

Tesis de Licenciatura

Caracterización del efecto de la infección con virus Junín sobre el estrés oxidativo de astrocitos murinos

Yep Rodríguez, Alejandra

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura 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 Six-Year Bachelor's 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:

Yep Rodríguez, Alejandra. (). Caracterización del efecto de la infección con virus Junín sobre el estrés oxidativo de astrocitos murinos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000712_YepRodriguez

Cita tipo Chicago:

Yep Rodríguez, Alejandra. "Caracterización del efecto de la infección con virus Junín sobre el estrés oxidativo de astrocitos murinos". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. . http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000712_YepRodriguez

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesis de Licenciatura

**Caracterización del efecto de
la infección con virus Junín
sobre el estrés oxidativo de
astrocitos murinos.**

autor /

Alejandra Yep Rodríguez

director /

Dr. Ricardo Martín Gómez

Laboratorio de Neurovirología

Facultad de Medicina / UBA

Departamento de Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN)

Universidad de Buenos Aires (UBA)

Buenos Aires

Octubre de 1999



Agradecimientos

A la Dra. María Isabel Berría, por darme un lugar dentro de su laboratorio y por su inestimable ayuda con los cultivos celulares

A la Dra. Ambrosio, quien cedió la cepa XJ-44 del virus Junín

A Lida Suligoy, por su apoyo técnico y por brindar generosamente su experiencia

A la Dra. Nélide Candurra y al Dr. Luis Scolaro, que muy amablemente me facilitaron líneas celulares

A Ricardo, por todo el tiempo y el esfuerzo dedicados

Resumen	1
Introducción	
El óxido nítrico en el SNC	3
Infección del SNC por virus Junín	7
Astrocitos	9
Materiales y métodos	
Virus	15
Titulación de infectividad	15
Animales	15
Cultivos astrocitarios	16
Diseño experimental	16
Infección de los cultivos primarios con el virus	17
Histopatología e inmunocitoquímica	17
Resultados	
Mortalidad	20
Infectividad viral en tejidos neurales	21
Histopatología	22
Inmunocitoquímica	24
Discusión	37
Referencias bibliográficas	43

AG = aminoguanidina

cGMP = guanosina monofosfato cíclica

DAB = diaminobenzidina

eNOS (endothelial nitric oxide synthase) = sintetasa endotelial de óxido nítrico

FHA = fiebre hemorrágica argentina

GFAP (glial fibrillary acidic protein) = proteína gliofibrilar ácida

HE = hematoxilina/eosina

IC = intracerebral

ICQ = inunocitoquímica

iNOS (inducible nitric oxide synthase) = sintetasa inducible de óxido nítrico

IP = intraperitoneal

MOI (multiplicity of infection) = multiplicidad de infección

nNOS (neuronal nitric oxide synthase) = sintetasa neuronal de óxido nítrico

NO = óxido nítrico

NOS = sintetasa de óxido nítrico

PBS (phosphate buffer saline) = buffer fosfato

PI = postinfección/postinoculación

SFB = suero fetal bovino

SNC = sistema nervioso central

SODc = Cu/Zn superóxido dismutasa / superóxido dismutasa citoplasmática

UFP = unidad formadora de placa

VJ = virus Junín

XO = xantina oxidasa

Resumen

Con el objetivo de estudiar el papel del óxido nítrico (NO) en la infección del SNC por virus Junín (VJ), se investigó la presencia de la sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS) junto con la expresión de la proteína gliofibrilar ácida astrocitaria (GFAP) en un modelo experimental murino y en cultivos predominantemente astrocitarios. En ambos casos, además, se estudió el efecto del tratamiento con aminoguanidina (AG), inhibidor específico de la iNOS. En ratones inoculados IC con VJ y tratados con AG, se registró al día 18 PI un 31% más de mortalidad espontánea ($p < 0,05$) respecto de los animales infectados no tratados con AG. En aquellos tratados con AG y no infectados no se observó mortalidad. Sin embargo, no se registraron diferencias en cuanto a títulos infectivos en el tejido neural de los animales infectados. Tanto en animales como en cultivos astrocitarios inoculados con VJ se detectó expresión de iNOS en células con morfología de astrocitos. La inmunomarcación de SODc y eNOS fue positiva en el endotelio vascular y en células indeterminadas, respectivamente, pero negativa en cultivos astrocitarios. Por marcación de GFAP, se precisó una significativa activación astrocitaria en animales y cultivos infectados, mientras que se observó una activación menor cuando se realizó tratamiento con AG. Estos resultados confirman la previa observación de la activación astrocitaria consecutiva a la infección por VJ y demuestran una mayor inducción de la iNOS en astrocitos en respuesta a la infección con VJ. Además, sugieren un papel

Resumen

protector del NO respecto de la mortalidad inducida por la infección del SNC por VJ.

Introducción

El óxido nítrico en el SNC

El óxido nítrico (NO) es un radical libre gaseoso con un electrón no compartido, producido por la conversión de L-arginina a L-citrulina, reacción catalizada por una NO sintetasa o NOS (Moncada and Higgs, 1993), y fue originalmente descrito como el factor relajante derivado de endotelio (Furchgott and Zawadzki, 1980).

El NO es una sustancia clave en el mediado de información, cuyos efectos pueden ser tanto fisiológicamente estimuladores como inhibidores en vasos sanguíneos, corazón, pulmón, riñón, cerebro, páncreas, intestino y el sistema inmune. El NO tiene varias propiedades que lo diferencian de los mensajeros moleculares convencionales. Una de ellas es la capacidad para difundir a través de las membranas, ya que es un gas, y así actuar sobre constituyentes celulares localizados en lugares distantes al sitio de su formación. Su disponibilidad biológica se basa en la difusión transcelular hacia blancos intracelulares, y no está restringida a estructuras anatómicas o al sistema circulatorio. En el cerebro, esto hace que el NO se comporte parcialmente como un neurotransmisor y parcialmente como una hormona. Al contrario de otros mensajeros moleculares, el NO tiende a formar uniones covalentes con sus blancos, en lugar de mediar sus efectos vía típicos mecanismos de activación de un receptor. Los blancos para el NO originado en las neuronas incluyen otras neuronas y células gliales vecinas (Murad, 1998).

El NO media la relajación del músculo liso en muchos órganos. En el SNC

varios fenómenos involucran al NO, incluyendo nocicepción, termogénesis, tolerancia a la morfina, control central de la presión sanguínea y actividad de nervios simpáticos. También está involucrado en procesos de aprendizaje y memoria. Por otra parte, ha generado especial interés el papel del NO en los cambios neurodegenerativos, ya que el NO es un radical libre potencialmente tóxico, y su excesiva generación puede tener consecuencias nocivas y contribuir a condiciones neurodegenerativas (Garthwaite et al., 1993). En el SNC, es sabido que el NO funciona como un poderoso activador de la forma soluble de la guanilato ciclasa, enzima que sintetiza el cGMP (Knowles and Moncada, 1994), lo cual lo involucraría en procesos de transducción de señal.

En todos los casos, el NO es generado a partir de uno de los nitrógenos del aminoácido L-arginina junto con oxígeno molecular, y el subproducto es la L-citrulina (Marletta, 1993). Existen varias sintetasas de NO, las cuales, dada la simplicidad del NO, son sistemas enzimáticos sorprendentemente complejos. Actualmente se conocen tres sintetasas de NO diferentes. La de mayor distribución en el SNC es una proteína soluble de 150 kDa expresada constitutivamente y dependiente de Ca^{2+} y calmodulina (nNOS, tipo I o cNOS neuronal). La enzima presente en células del endotelio vascular (eNOS o tipo III) posee propiedades similares, pero es menor (130 kDa) y está asociada a membrana. Finalmente, la tercera enzima difiere de las otras dos en que no está presente en condiciones normales sino que su síntesis es inducible y su actividad es independiente del Ca^{2+} (iNOS o tipo II). En el SNC, son las células de la

microglía quienes reconocidamente expresan esta sintetasa (Knowles and Moncada, 1994). Cuando es inducida, la iNOS permanece activa por periodos de tiempo mas prolongados y sintetiza NO en concentraciones 100-1000 veces mayores que las isoformas constitutivas (Licinio et al., 1999).

La iNOS puede ser inducida en el cerebro por dos mecanismos diferentes. El primero involucra su expresión como respuesta a eventos patofisiológicos que ocurren en el SNC, como isquemia, trauma, infección y autoinmunidad por intermedio de diversas citoquinas, incluyendo la interleukina 1β , el factor de necrosis tumoral α y el interferón γ . Por otra parte, la iNOS puede ser expresada en respuesta a infección sistémica; a ese respecto, productos bacterianos como los lipopolisacáridos, pueden indirectamente causar la inducción de la iNOS a través de la liberación de diversas citoquinas (Licinio et al., 1999).

En estudios previos realizados para elucidar el papel potencial de las NOS en la patogénesis de la encefalopatía viral se observó que la expresión de iNOS aumentaba mientras que la expresión de la nNOS disminuía significativamente en el cerebro de ratas inoculadas con virus, sea Borna o rábico. Esto sugiere que tanto la generación excesiva de NO por los macrófagos activados o la microglía, como una disminución en la producción de NO por las neuronas, pueden contribuir a la neuropatogénesis de las infecciones con virus neurotrópicos (Akaike et al., 1995).

En los últimos años se ha acumulado evidencia sobre la importancia biológica de la generación de radicales libres inducidos por infecciones virales y

bacterianas. En ciertas infecciones virales experimentales, se ha observado una inducción paralela de la xantina oxidasa (XO) y la iNOS, lo cual genera la reacción simultánea $\text{NO} + \text{O}_2^* \rightarrow \text{ONOO}^-$ (peroxinitrito). El peroxinitrito exhibe una singular reactividad química que incluye la nitración de proteínas, la ruptura de las hebras de ADN y la nitración de guanidinas, las cuales pueden producir citotoxicidad y también mutagénesis. Las respuestas inflamatorias inducidas por varios patógenos podrían acelerar la mutagénesis y el daño tisular (Maeda and Akaike, 1998).

Infección del SNC por virus Junín

El virus Junín (VJ) es miembro de la familia Arenaviridae y es el agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA). Si bien la FHA se caracteriza por alteraciones hematológicas, no ha sido infrecuente el compromiso del SNC en pacientes afectados. A fin de estudiar la patogenia de la enfermedad neurológica en pacientes con FHA se ha recurrido a modelos experimentales, generalmente representados por roedores inoculados intracerebralmente al nacimiento con VJ. Por ejemplo, consecutivamente a la inoculación experimental del VJ en el ratón, se ha observado meningitis moderada, infiltración perivascular linfocitaria y proliferación de células de la microglía; que a nivel ultraestructural coexisten con células aisladas (neuronas y astrocitos) en proceso de degeneración. Concomitantemente, se visualizaron partículas virales libres en el espacio extracelular o en curso de brotación, sobre todo en neuronas aunque también en astrocitos (Lascano and Berría, 1974). Por inmunomarcación del antígeno del virus Junín se precisó su localización principalmente en neuronas y, en menor cantidad, en astrocitos, justamente los dos tipos celulares del SNC en que tiene lugar la brotación de partículas virales. La mayoría de las neuronas marcadas fueron observadas en corteza cerebral, mientras que en el cerebelo las células de Purkinje mostraban expresión selectiva del antígeno viral.

En la infección persistente, a mayores tiempos pi, el virus se limita a subpoblaciones neuronales específicas incluyendo la corteza cerebral, ganglios

basales y cerebelo, lo cual sugiere que ciertos tipos celulares pueden albergar al virus durante la prolongada etapa asintomática, proveyendo así un reservorio que puede inducir el síndrome neurológico retardado (Lascano et al., 1989). Se observó que la encefalitis viral estaba acompañada por una notable reacción astrocitaria (Lascano and Berría, 1983). Por otro lado, la activación astrocitaria no correlacionaba con la presencia de antígenos virales y parece resultado de una condición generalizada, que posiblemente incluya factores cerebrales difusibles inducidos por la infección por VJ (Lascano et al., 1989). En cultivos primarios de astrocitos se observan similares cambios morfológicos e inmunocitoquímicos (Berría and Lascano, 1985).

Luego de la inoculación intracerebral de ratas recién nacidas con VJ se pudieron diferenciar tres estadíos: una fase temprana de enfermedad aguda, hasta 30 días postinfección (PI); uno intermedio, que se extiende por 280 días pi, sin signos clínicos pero con evidente persistencia viral, y un período final de enfermedad crónica, conformando un síndrome clínico neurológico (Weissenbacher et al., 1986).

Astroцитos

En 1895, Mihaly von Lenhossek propuso el nombre astrocito para identificar a elementos celulares bien diferenciados dentro del sistema nervioso central (SNC) y el de neuroglía para englobar a todas las células con funciones de soporte en el SNC. Durante mucho tiempo se consideró que los astrocitos tenían un papel meramente estructural y que reaccionaban en forma lenta y estereotipada en el curso de la enfermedad. Es gracias a los avances en cultivos celulares y a formas más específicas de identificar estas células, que actualmente se ha incrementado el conocimiento sobre el desarrollo, estructura, función y papel del astrocito durante la enfermedad (revisado en Tower, 1988).

Los astrocitos maduros, como su nombre lo sugiere, son células estrelladas con prolongaciones; están distribuidos a lo largo del cerebro y de médula espinal. Tradicionalmente, se los dividió en protoplasmáticos y fibrosos basándose en su morfología y distribución en el SNC (Privat and Rataboul, 1986). Más recientemente, se propuso clasificarlos en astrocitos de tipo I (protoplasmáticos) y de tipo II (fibrosos), cada uno proveniente de diferentes células progenitoras. Mientras que la célula progenitora del tipo I sería de estirpe astrocítica, la del tipo II podría diferenciarse en astrocitos tipo II o bien en oligodendrocitos (Cameron and Rakic, 1991).

Los astrocitos son células diversificadas funcionalmente. Se diferencian continuamente desde el período embrionario y postnatal temprano, a partir de células neuroepiteliales localizadas en las regiones ventriculares y

subventriculares del cerebro en desarrollo. Después de alcanzar su destino final, inician su diferenciación en astrocitos maduros, los que exhiben una forma asimétrica, un citoesqueleto bien desarrollado y numerosas prolongaciones. Por otro lado, ciertos precursores astrocitarios pueden permanecer como un reservorio de células indiferenciadas, constituyendo una fuente de astrocitos potencialmente reactivos frente a un eventual daño (de Vellis, 1993).

Los astrocitos, por su número y por sus relaciones con otros componentes estructurales y celulares, ocupan una parte esencial y diversa en el desarrollo y funcionamiento normal del SNC. Algunas de estas funciones son: guiar la migración neuronal durante el desarrollo del SNC, proveer proteínas de matriz extracelular y moléculas de adhesión necesarias para el desarrollo, asegurar el mantenimiento de relaciones estructurales y de la reparación del SNC luego de una lesión. Además pueden producir factores solubles neurotróficos, inducir y mantener la barrera hematoencefálica, participar en la recaptación de neurotransmisores y la regulación de pH, ajustar la concentración de iones y la osmolaridad del microambiente cerebral, así como jugar un papel importante en la detoxificación, la fagocitosis y en la respuesta inmune (Montgomery, 1994).

El citoesqueleto astrocitario está constituido por tres componentes filamentosos principales: microtúbulos, de 25 nm de diámetro constituidos por tubulina y otras proteínas; microfilamentos, de 10 nm de diámetro constituidos por actina, y filamentos intermedios, de 15 nm de diámetro aproximado constituidos por diversas proteínas (ver mas adelante). Los componentes del

citoesqueleto estén unidos a sitios específicos en el citoplasma y tienen proyecciones sobre su superficie que les permiten interactuar entre sí y con otras organelas. El citoesqueleto desempeña un papel importante en diferentes funciones, tales como la motilidad celular, organización espacial de otros componentes celulares, determinación de la forma celular y la fagocitosis.

Entre las funciones específicas de los microtúbulos se encuentran los movimientos cromosómicos durante la mitosis, el transporte selectivo de constituyentes citoplasmáticos, el desarrollo y mantenimiento de la forma celular, la movilidad celular y la transducción sensorial.

Los microfilamentos son responsables de diferentes tipos de movimientos citoplasmáticos, incluyendo la endocitosis, citocinesis, el flujo citoplasmático, el transporte de proteínas en la membrana celular y la liberación de gránulos de neurotransmisores.

Los filamentos intermedios están compuestos por polipéptidos de amplio rango de tamaño que varían según el tipo celular. Los filamentos intermedios están involucrados en el comportamiento de los astrocitos, en el desarrollo de su citoarquitectura durante la proliferación postnatal, en la transición al estado diferenciado, y en el envejecimiento y la enfermedad. La proteína gliofibrilar ácida (glial fibrillary acidic protein, GFAP) es el principal componente de los filamentos intermedios de la astroglia (Tardy et al., 1993). Fue aislada en 1971 por Eng a partir de la cicatriz glial de un paciente con esclerosis múltiple (Eng et al., 1971). La estructura y regulación del gen que la codifica en el cerebro

humano y de ratón han sido caracterizadas, y la secuencia completa establecida (Tardy et al., 1993). El transcripto es traducido a una proteína de 41 a 51 kDa dependiendo de la especie, y su organización y polimerización aparece sincronizada con la acumulación de gliofilamentos (Eng, 1988). La inmunomarcación de la GFAP ha permitido su localización precisa en el cuerpo celular y las prolongaciones citoplasmáticas. Aun cuando se la ha encontrado también en el sistema nervioso periférico y en tejidos no neurales (Eng and Ghirnikar, 1994), la GFAP es la proteína más específica del citoesqueleto de los astrocitos y es utilizada como marcador astrocitario.

Las lesiones en el SNC, tanto por trauma, anoxia, infección o daño químico, como por enfermedades desmielinizantes o neurodegenerativas, ocasionan una respuesta típica de los astrocitos denominada astrogliosis. La astrogliosis reactiva es una característica prominente de los astrocitos adyacentes al sitio de la lesión y que se extiende más allá de ella. Esta reacción se caracteriza por la proliferación astrocitaria, hipertrofia extensiva de núcleos, cuerpos celulares y prolongaciones citoplasmáticas, y por un incremento en la GFAP (Vijayan et al., 1990). La acumulación de GFAP puede incluso causar una barrera física que impediría el restablecimiento de un medio ambiente funcional (Ghirnikar et al., 1994).

Las gliosis reactivas que ocurren en casi todos los tipos de trauma o lesión están caracterizadas por una expresión aumentada de GFAP y vimentina (otro filamento intermedio presente en variados tipos celulares), que produce

importantes cambios morfológicos en los astrocitos reactivos (Oblinger et al., 1993). Dependiendo de la naturaleza del daño pueden existir diferentes mecanismos biológicos que sean capaces de inducir y mantener este incremento durante diversos períodos. Fundamentalmente, las gliosis reflejan tanto un número aumentado de prolongaciones citoplasmáticas, como sustanciales cambios en el volumen de las células astrogliales (Tardy et al., 1993). Se han observado importantes astrogliosis reactivas en encefalopatías espongiformes asociadas a priones, enfermedades inflamatorias desmielinizantes, lesiones cerebrales agudas traumáticas, enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer, y en demencia asociada a SIDA. La gliosis reactiva no es una respuesta estereotipada, sino que varía ampliamente en duración y grado de hiperplasia, incluyendo variación temporal en la expresión de GFAP. Hay diferentes mecanismos biológicos para la inducción y mantenimiento de la gliosis reactiva, los cuales, dependiendo de la clase de daño tisular, resultan en diferentes expresiones de esa respuesta (Norton et al., 1992).

Es interesante destacar que el NO influye en la gliosis reactiva propia de la respuesta microglial al daño neural pero no en la astrocitaria (Caggiano and Kraig, 1996).

La prominencia de la reacción astrogliar en varias enfermedades, la rapidez de la respuesta astrogliar y la conservación evolutiva de la astrogliosis reactiva indican que los astrocitos reactivos cumplen importantes funciones del SNC. Sin embargo, el rol exacto que juegan los astrocitos reactivos en las enfermedades del

SNC no está todavía precisado (Eng and Ghirnikar, 1994).

Basándose en los antecedentes expuestos, resultaba de interés caracterizar el efecto de la infección con VJ en tejido neural murino, con el interés centrado en la posible inducción de la iNOS y su papel en la mencionada patología.

Materiales y Métodos

Virus

Se utilizó la cepa XJ-44 del VJ, gentilmente cedido por la Dra. A. Ambrosio (Instituto de Enfermedades Hemorrágicas, Pergamino). Se realizó un stock en células Vero, el cual fue titulado según se describe mas abajo. Se utilizaron 6×10^4 UFP por inóculo tanto en estudios in vivo como in vitro.

Titulación de infectividad

Se procedió según previa descripción (Gómez et al, 1991). Brevemente: en el caso de las muestras de encéfalo de animales infectados, se realizó previamente un homogenato al 20% (P/V) en PBS. Las monocapas inoculadas con las respectivas muestras, fueron mantenidas a 37°C por 1 h, para luego ser sometidas al agregado de una solución 1:1 de metilcelulosa 1,6% y MEM 2X con 4% de suero fetal bovino (SFB). Las placas fueron retornadas a la estufa por 6-7 días, después de lo cual a cada pocillo se agregó una solución fijadora de tinción (8 partes de agua, 1 de formaldehído 8% y 1 de cristal violeta 1% en alcohol), incubando por 1 h. Los resultados correspondientes a las muestras de animales infectados fueron expresados en UFP/gr, mientras que los de la titulación del stock viral en UFP/ml.

Animales

Para los estudios in vivo, se recurrió a ratones Balb/c menores de 48 hs de vida sin diferencia de sexo.

Cultivos astrocitarios

Se prepararon cultivos primarios de cerebro a partir de encéfalos de ratones Balb/c dentro de las 24 hs después del nacimiento. Después de remover cuidadosamente meninges y vasos sanguíneos adheridos, el tejido fue incubado en PBS, cortado con tijeras de iridectomía, diluido en medio adicional (DMEM 10% SFB) y disgregado por pipeteo repetido. La suspensión resultante fue incubada 15 min con tripsina a 4°C, luego centrifugada 5 min a 1000 rpm, y el pellet resuspendido en DMEM 10% SFB. Esta suspensión fue sembrada en botellas a razón de 6×10^5 células/ml. Luego de 2-3 semanas in vitro la monocapa se disoció con tripsina para su resuspensión en DMEM 10% SFB y su siembra en tubos Leighton. Reemplazando el sobrenadante con medio de mantenimiento (DMEM 5% SFB) dentro de las 24 hs posteriores al subcultivo, las neuronas fueron eliminadas por medio de su adherencia diferencial a la superficie de cultivo (Lim et al., 1973), obteniéndose una población predominantemente astrocitaria.

Diseño experimental

Se constituyeron 4 grupos de ratones de ambos sexos con menos de 48 horas de vida: a) inoculados por vía intracerebral (IC) con VJ, b) inoculados por vía IC con VJ y que recibieron aminoguanidina (AG), un inhibidor selectivo de iNOS (Griffiths et al., 1993) a razón de 130 mg/Kg de peso/día por vía

intraperitoneal (IP), c) inoculados por vía IC con PBS y que recibieron AG IP, y d) inoculados solamente con PBS por vía IC. Se evaluó mortalidad a los 18 días PI, y título de infectividad viral en tejido cerebral e histopatología (incluyendo inmunocitoquímica de antígeno iNOS, eNOS, SODc, y GFAP) a los 7 y a los 24 días PI.

Los mencionados estudios se repitieron con un diseño similar en cultivos de astrocitos. Se conformaron 4 grupos de cultivos en monocapa confluyente en tubos Leighton: a) infectados con VJ, b) infectados con VJ y con AG (120 mg/ml), c) sólo con AG y d) sin infectar y sin AG. Se evaluó morfología, e inmunocitoquímica de antígeno viral, iNOS, GFAP, SODc y eNOS a los 7 días PI.

Infección de los cultivos primarios con el virus

Para llevar a cabo la infección de los cultivos primarios astrocitarios con el VJ, el medio de crecimiento fue removido de los cultivos y reemplazado por un 10% del volumen original de medio conteniendo 6×10^4 UFP de virus (MOI aproximada 0,1 UFP/célula). Se permitió la adsorción del virus por 1 h a 37°C; luego de la cual se removi6 el in6culo mediante lavados con PBS. Se agreg6 luego medio de mantenimiento fresco y se incubaron los cultivos a 37°C.

Histopatología e inmunocitoquímica

Las muestras cosechadas (enc6falos) a los 7 y 24 días PI fueron fijados en metanol 6cido (metanol 5% 6cido ac6tico v/v) durante 1 h a -20°C y luego

procesadas para inclusión en parafina en forma rutinaria. Se realizaron cortes de 5-8 μm de espesor y luego de su rehidratación por pasajes seriados en alcoholes se procedió a su tinción con hematoxilina y eosina (HE) o a una reacción ICQ como ya se ha descrito (Lascano and Berria, 1983). Brevemente, los cortes de tejido rehidratados fueron tratados primeramente con una solución de metanol + 3% de H_2O_2 a fin de bloquear la peroxidasa endógena. Luego fueron tratados con Tris salino 0,05 M + 5% de suero de cabra de complementado durante 30 min a fin de bloquear el ligado inespecífico. A continuación se incubó con el antisuero primario correspondiente a 4°C durante toda la noche. Se lavó repetidamente con tris 0,05 M y luego se aplicó el antiespecie biotinilado a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, luego de lavados repetidos, se agregó el complejo extravidina-peroxidasa durante 30 min. Luego de repetidos lavados, el revelado se realizó con solución de tris 0,05 M con DAB (0,03%) + H_2O_2 (0,02%) durante aproximadamente 20-30 min bajo control microscópico. En ocasiones se realizó contracoloración con hematoxilina de Mayer. Finalmente, las muestras fueron deshidratadas y montadas de forma rutinaria.

En el caso de los cultivos astrocitarios se procedió de la misma forma excepto que se omitió el bloqueo de la peroxidasa endógena; y así, luego de la fijación en metanol ácido, se rehidrató y se incubó en Tris salino 0,05 M + 5% suero de cabra.

Como antisuero anti-VJ se utilizó un pool de monoclonales cedido gentilmente por el Dr. Barrera Oro (USAMRID), mientras que se recurrió a

Materiales y Métodos

antisueros comerciales para aquellos anti-iNOS (Cayman), SODc, eNOS (Transduction) GFAP y secundarios (Dako).

Resultados

Mortalidad

De los 41 animales inoculados con VJ que no recibieron AG, sobrevivieron 26 al día 18 PI (aproximadamente 37% de mortalidad). En contraste, de los 39 animales infectados y que recibieron tratamiento con AG, sólo 13 sobrevivieron al día 18 PI (aproximadamente 68% de mortalidad). Comparativamente, se registró un 31% de mortalidad mayor en los infectados que recibieron AG a los 18 días PI. Esa diferencia analizada con el test de Fisher es significativa ($p < 0.05$). La mortalidad espontánea acumulativa de diversos experimentos observada en los grupos de animales infectados se representa en la Figura 1. La mortalidad espontánea registrada después del día 18 PI en los animales infectados no modificó sustancialmente la diferencia entre los porcentajes previamente obtenidos. No se registraron muertes espontáneas en los animales inoculados con PBS ni en los inoculados con PBS y que recibieron AG.

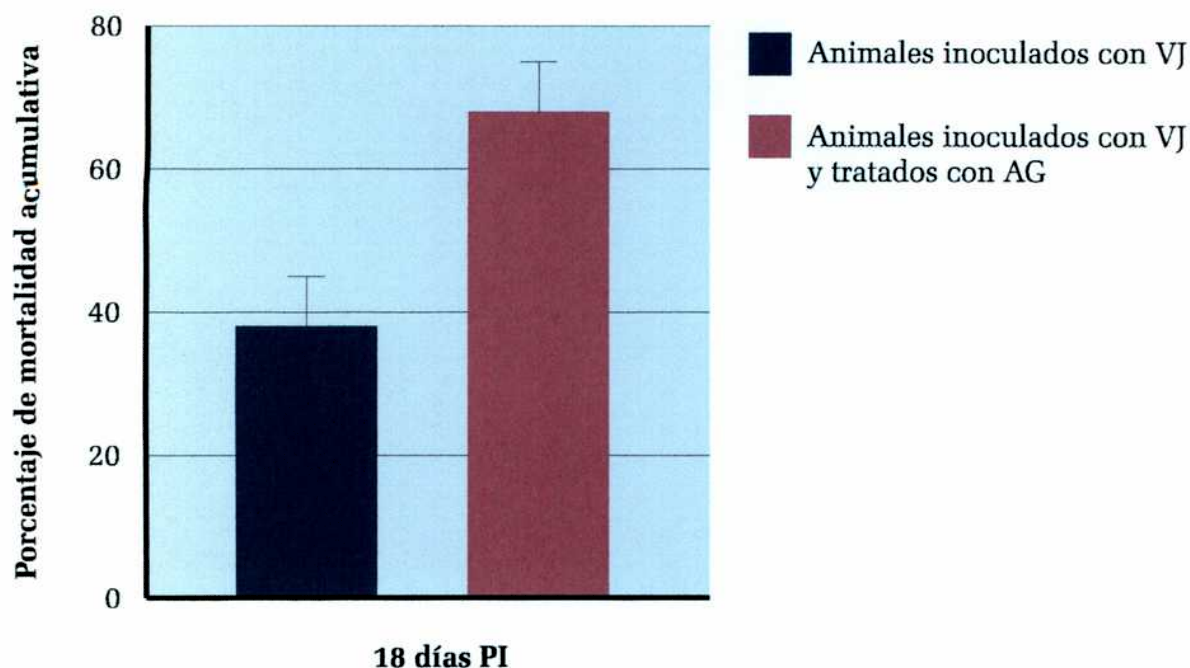


Figura 1: representación de la mortalidad en los animales inoculados con VJ con o sin tratamiento con AG al día 18 PI.

Infectividad viral en tejidos neurales

Se detectaron aproximadamente 1×10^6 UFP/gr de virus infeccioso a los 7 y 24 días PI. Si bien se registró un mayor título de infectividad viral en aquellas muestras provenientes de animales que recibieron AG, dicha diferencia resultó no significativa cuando se analizó con el test de Student. Los datos se representan en la Figura 2.

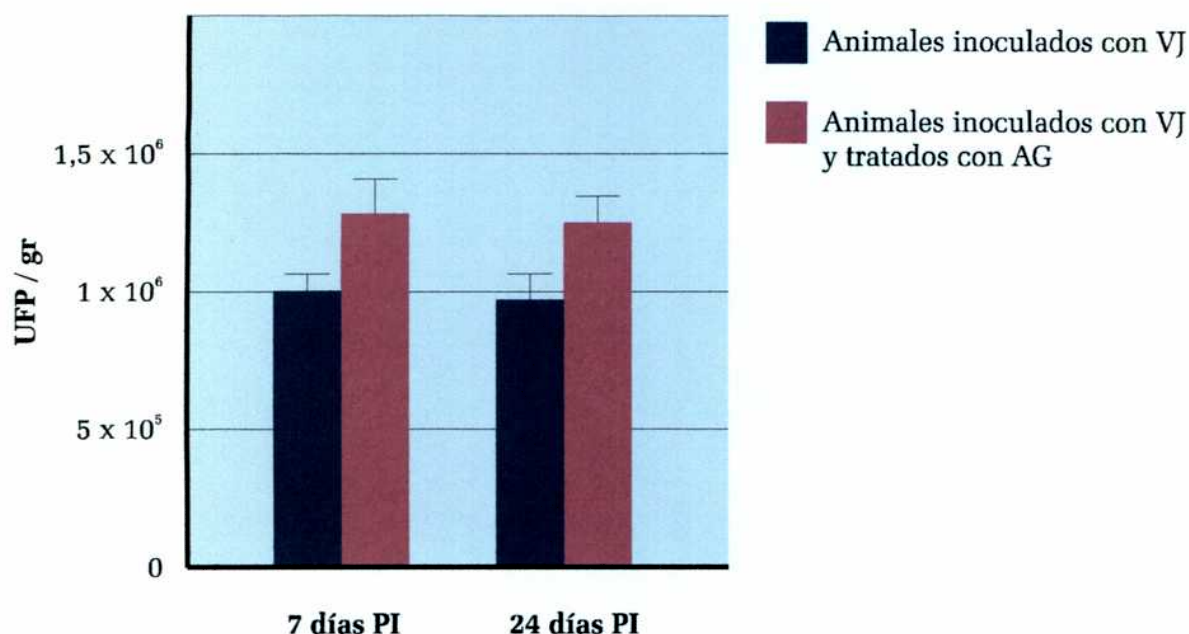


Figura 2: infectividad viral en muestras de animales inoculados con VJ tratados o no con AG a los 7 y a los 21 días PI.

Histopatología

En cortes teñidos con HE, no se observaron diferencias con respecto a controles en los animales cosechados a los 7 días PI (datos no mostrados). En contraste, en aquellos cosechados a los 24 días PI, se observó una discreta presencia de células necróticas y degeneradas en los animales que no habían recibido AG, respecto de aquellos también infectados pero que habían recibido AG, en los cuales no se observaron cambios histológicos (Figura 3).

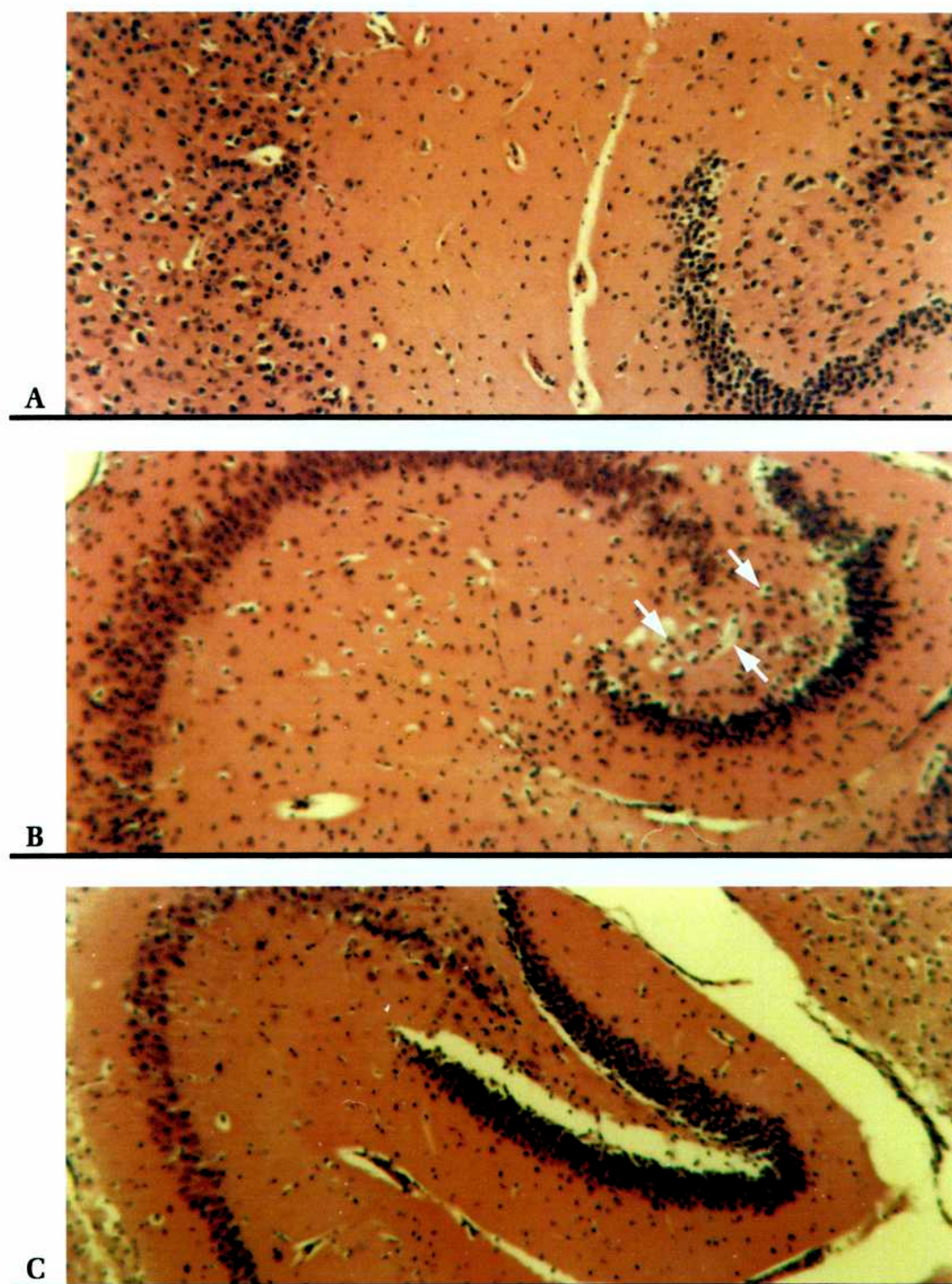


Figura 3: cortes de encéfalo mostrando hipocampo teñidos con HE de animales no infectados tratados con AG (A), infectados (B) e infectados y tratados con AG (C) a los 24 días PI. Las flechas indican células necróticas/degeneradas (220×)

Inmunocitoquímica

La tinción para iNOS fue negativa en los animales control pero detectable en los animales infectados, especialmente en las muestras provenientes de animales sacrificados a los 24 días PI. Las células positivas, que morfológicamente asemejaban astrocitos, fueron abundantes en ciertas áreas, especialmente hipocampo. La marcación fue levemente más intensa en las muestras de los animales que no recibieron AG (Figura 4). También se detectó positividad en algunas de las escasas células inflamatorias presentes así como en neuronas Purkinje del cerebelo (Figura 5).

La inmunomarcación de eNOS fue también positiva en muestras de animales infectados a los 24 días PI y negativa a los 7 días PI y en los controles (Figura 6). El patrón de marcación fue diferente al observado cuando se detectó iNOS y en consecuencia, en relación con el tipo celular involucrado, de difícil interpretación. Es posible que la marcación positiva se deba a reacción cruzada de este antisuero con la/s otra/s isoforma/s de la enzima, hecho sustentado por la negatividad de la inmunomarcación en cultivos astrocitarios (ver mas adelante).

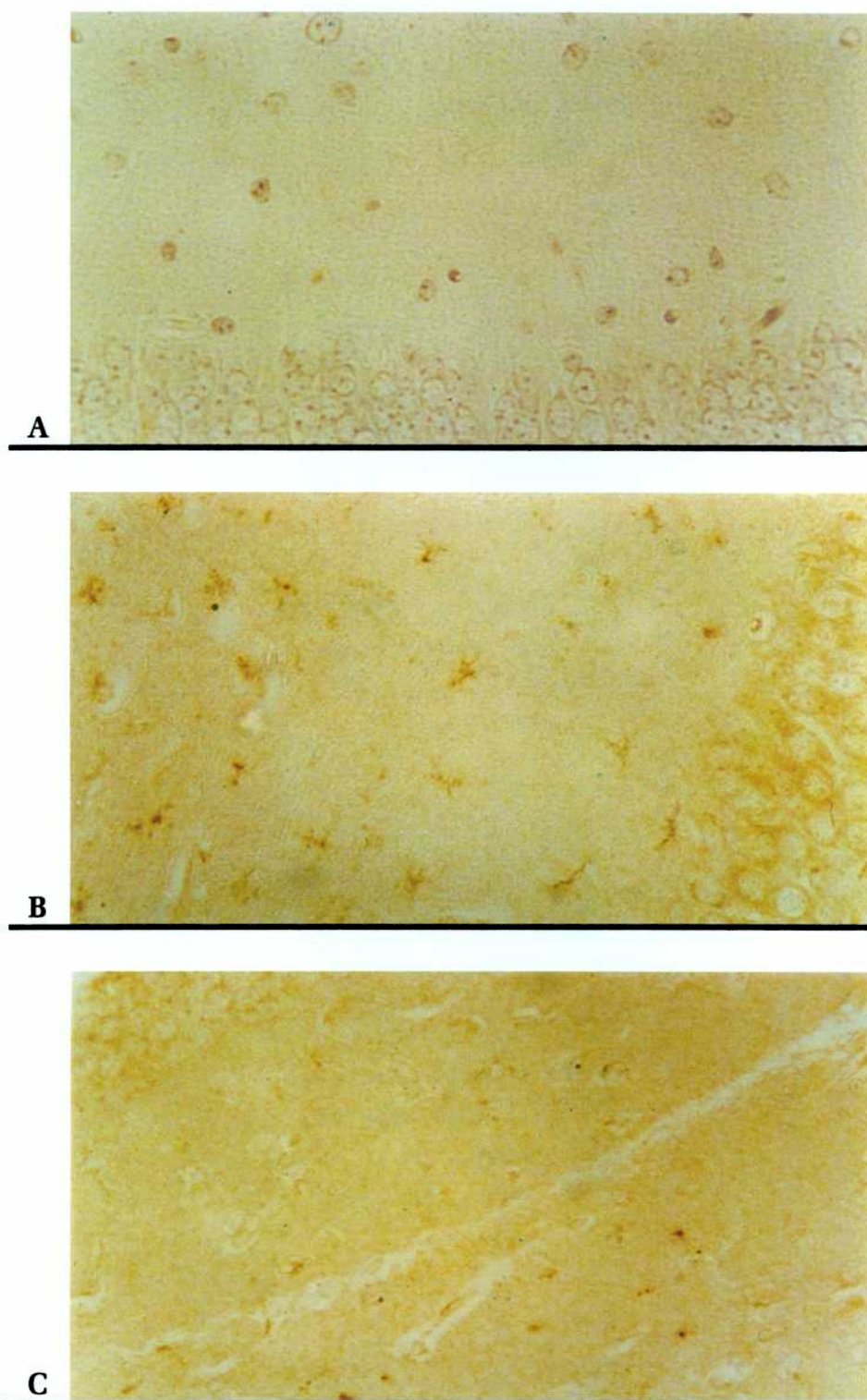


Figura 4: inmunomarcación de iNOS en hipocampo de ratones control (A), inoculados con VJ (B) e inoculados con VJ y AG (C) a los 24 días PI (600×).



Figura 5: inmunomarcación de iNOS en células Purkinje en cerebelo de animales infectados con VJ a los 24 días PI (650×).

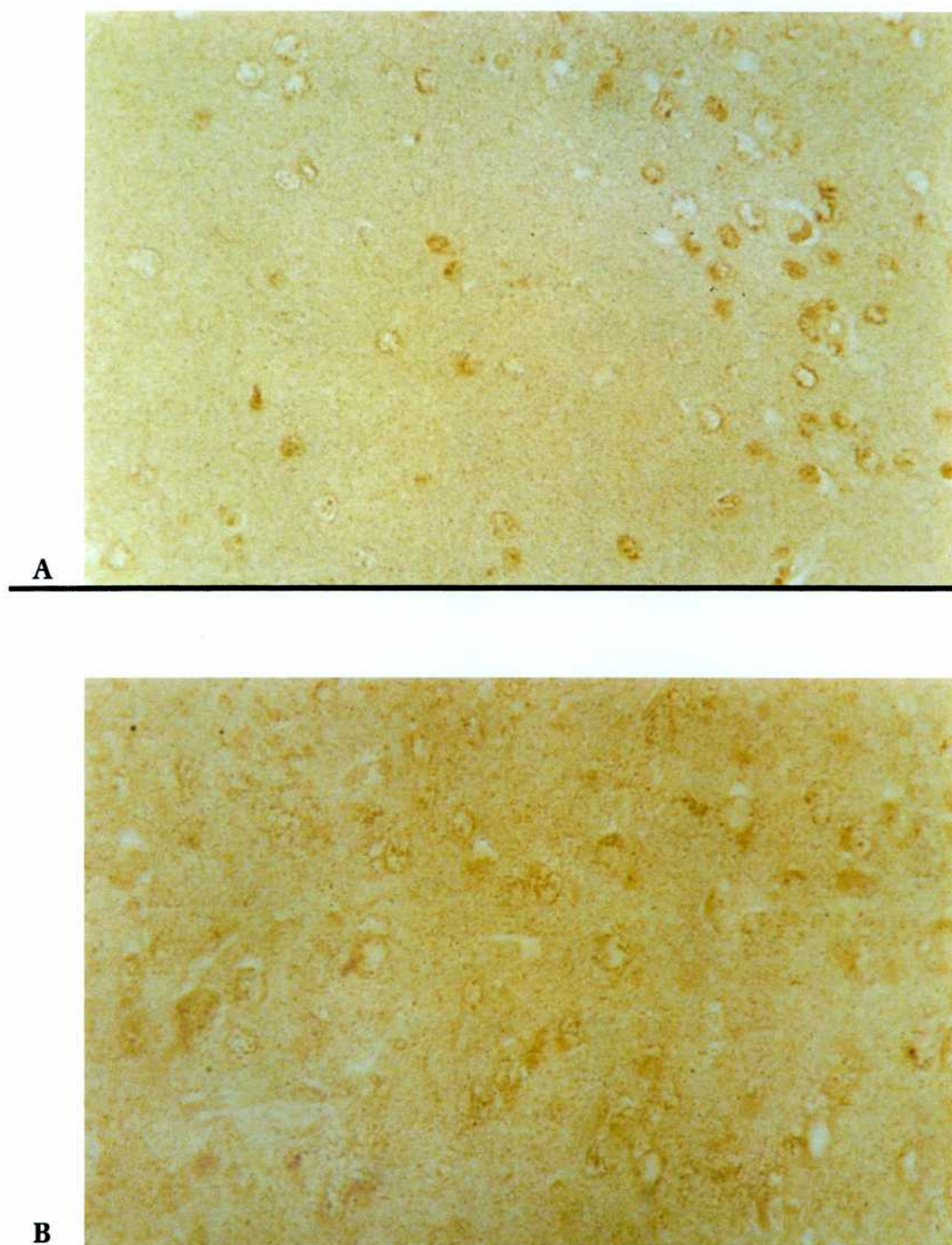


Figura 6: inmunomarcación de eNOS en encéfalo de ratones control (A) e inoculados con VJ (B) a los 24 días PI (600×).

En cortes procesados para inmunomarcación de GFAP, se observó marcación en algunos dispersos astrocitos en los tejidos de los animales control (Figura 7). En contraste, los animales infectados con VJ mostraron aumentada marcación de GFAP, especialmente evidente hacia el día 24 PI. Dicha marcación representaba activación astrocitaria con hipertrofia e hiperplasia de este tipo celular observable en diversas áreas del encéfalo, especialmente hipocampo (Figura 8) y cerebelo (Figura 9). En los animales infectados y que no recibieron AG, la marcación fue de mayor intensidad con respecto a los animales infectados y que recibieron AG, donde la marcación fue también notoria pero de menor intensidad (Figuras 8 A y B, 9 A y B, respectivamente).

La SODc fue casi exclusivamente detectable en muestras de animales infectados en células inflamatorias y, principalmente, a nivel del endotelio capilar (Figura 10).

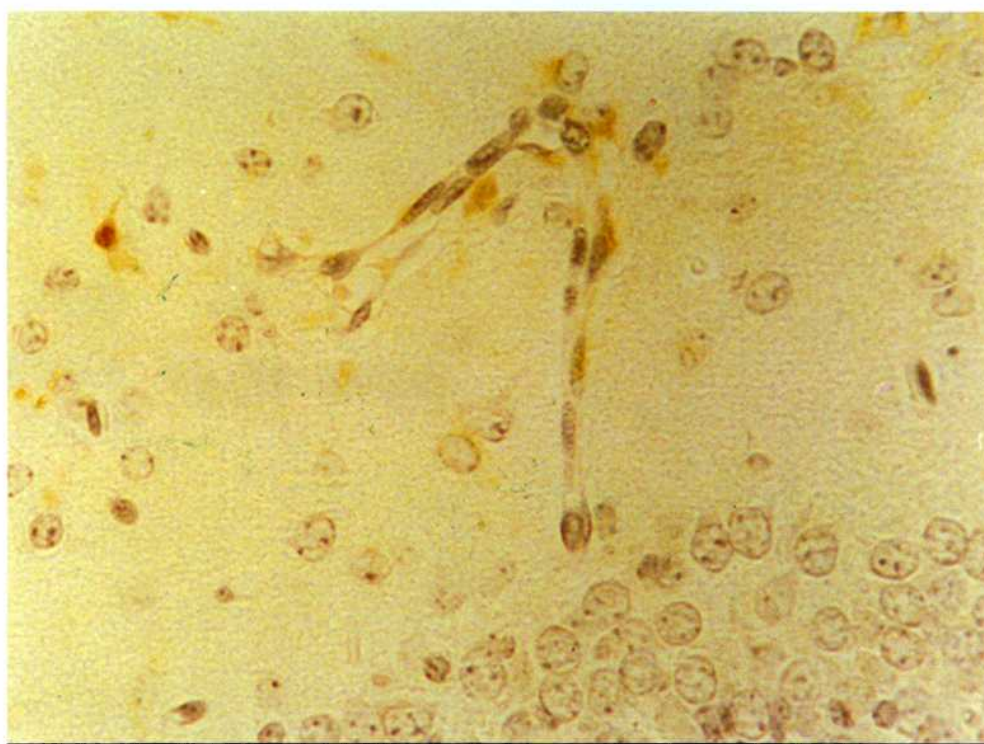


Figura 7: corte representativo de encéfalo de animales no infectados procesados para inmunomarcación de GFAP (600×)

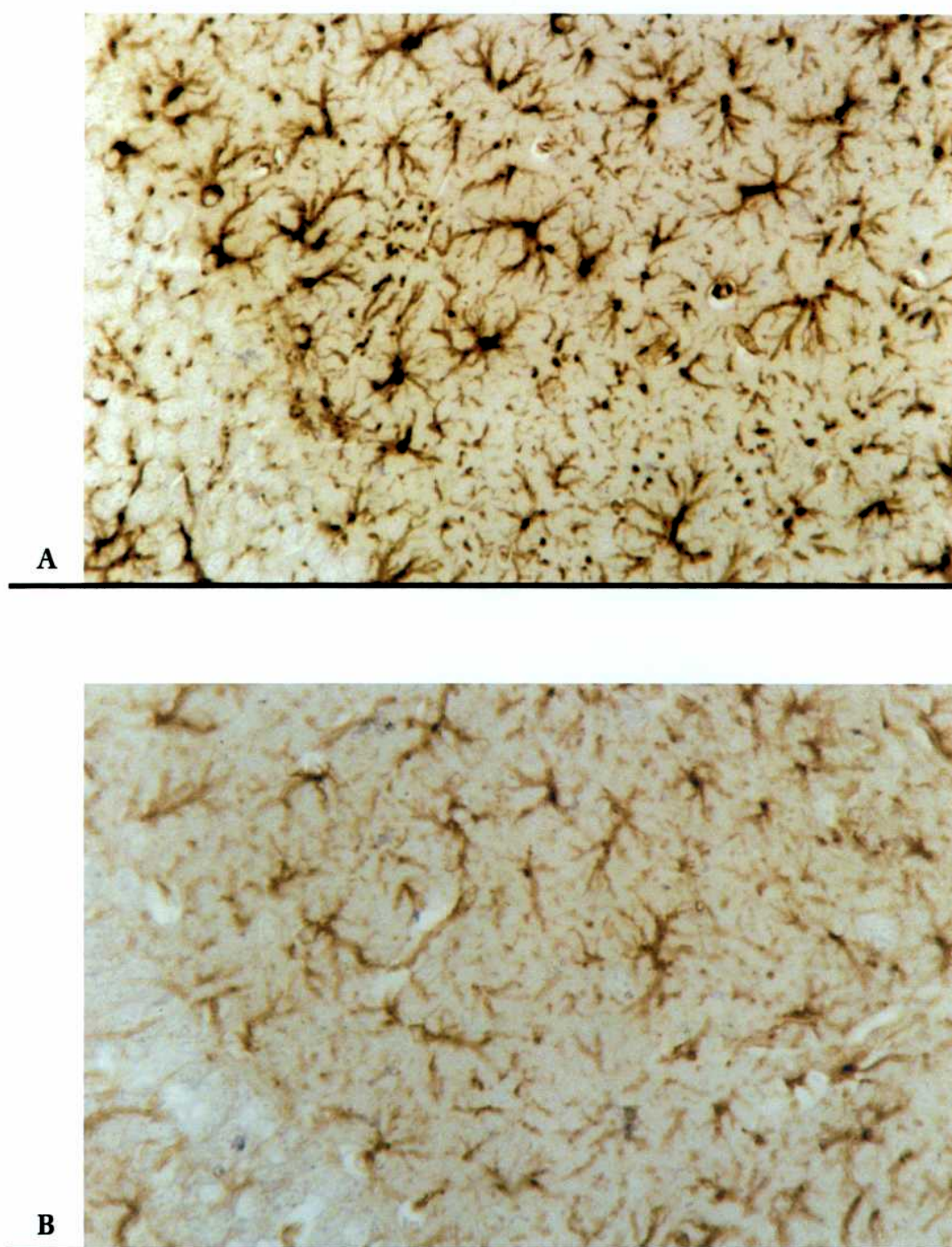


Figura 8: inmunomarcación de GFAP en hipocampo de ratones inoculados con VJ (A) e inoculados con VJ y AG (B) a los 24 días PI (600×).

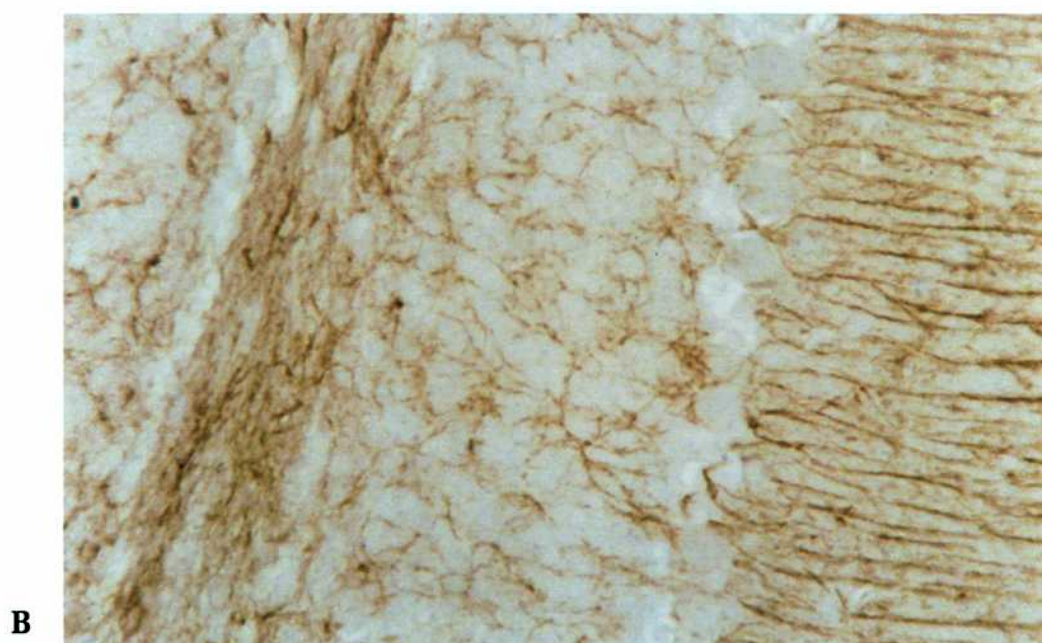
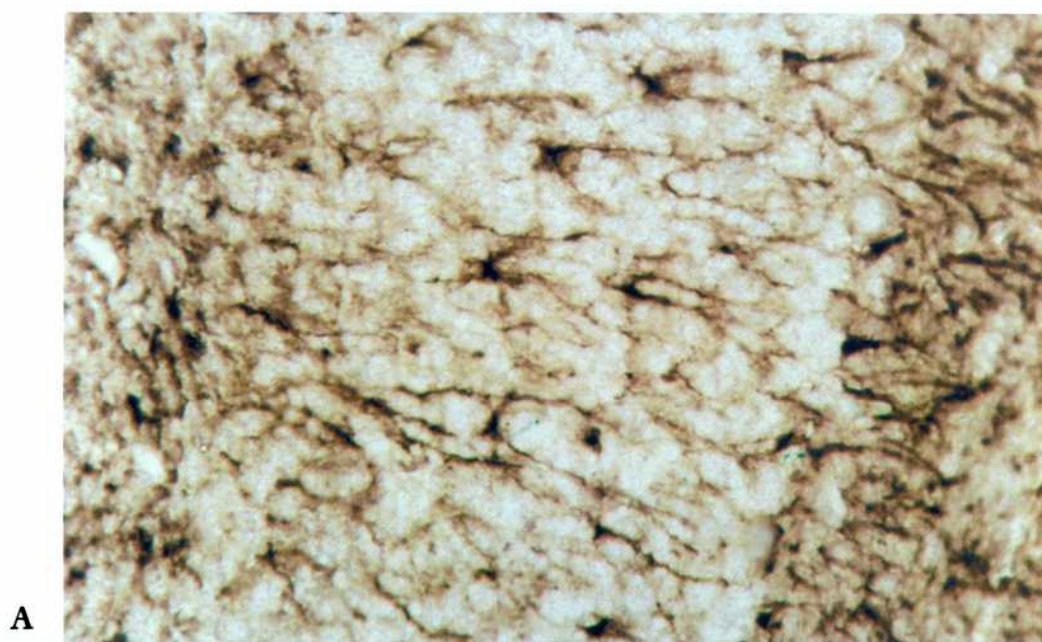


Figura 9: marcada detección de GFAP a los 24 días PI en ratones infectados. Animales inoculados con VJ (**A**) e inoculados con VJ y AG (**B**) (600×).

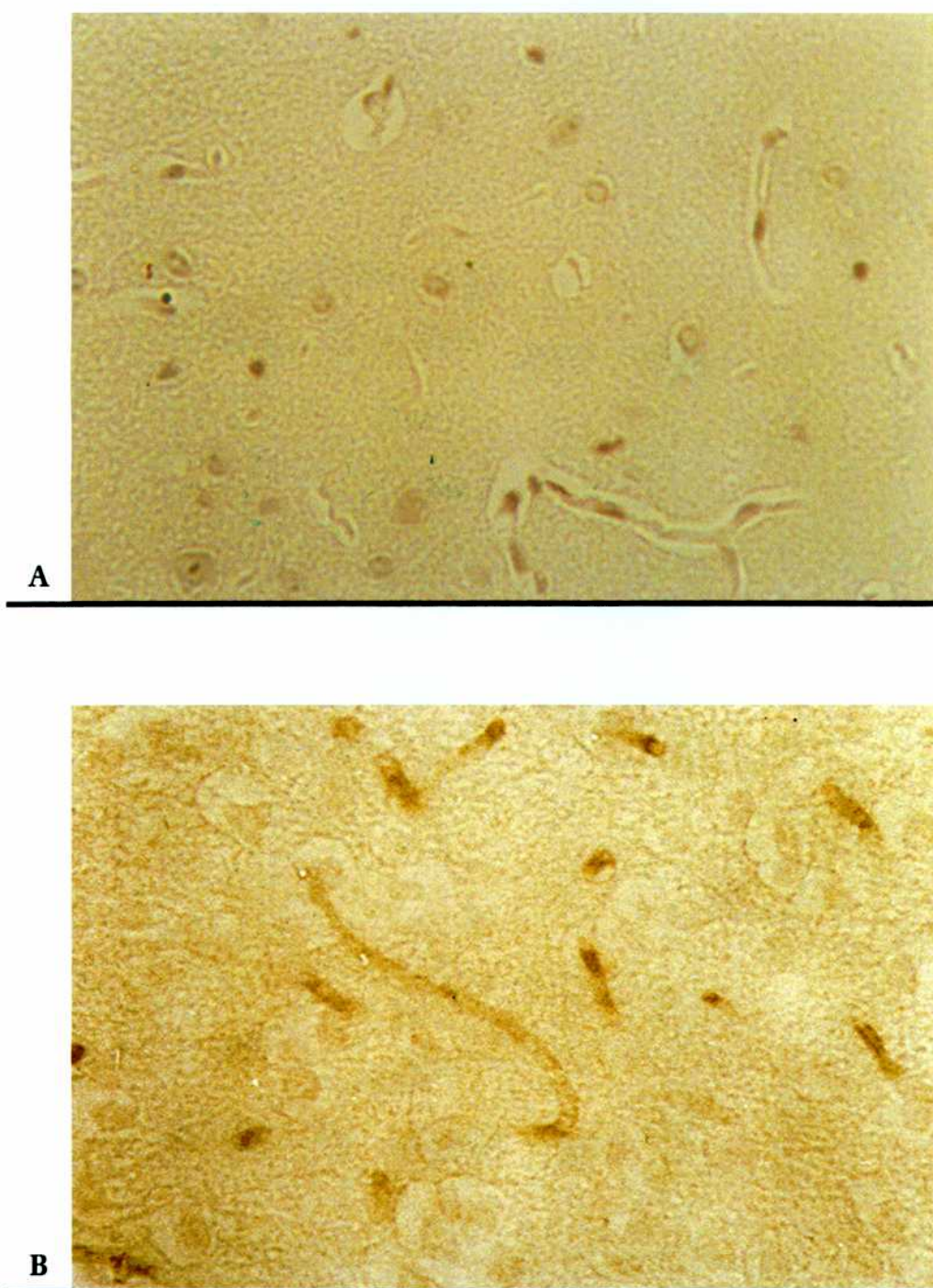


Figura 10: inmunomarcación de SODc en hipocampo de ratones control (**A**) e inoculados con VJ (**B**), a los 24 días PI (600×).

Los cultivos predominantemente astrocitarios no mostraron presencia de efecto citopático por la infección con VJ o por la presencia de AG (dato no mostrado).

El antígeno viral pudo ser detectado en forma diseminada en la monocapa en el citoplasma de células con morfología compatible con astrocitos (Figura 11).

La marcación de iNOS fue mínima en los cultivos control no infectados, y mostró claramente mayor intensidad en los cultivos infectados con VJ (Figura 12), sin observarse diferencias entre los cultivos tratados o no con AG (dato no mostrado). Tanto SODc como eNOS fueron negativos en todos los casos (dato no mostrado).

La marcación de GFAP en estos cultivos evidenció un aumento en los infectados respecto de los no infectados. En los cultivos infectados sin tratar este aumento fue notoriamente más importante que en aquellos infectados tratados con AG (Figura 13).

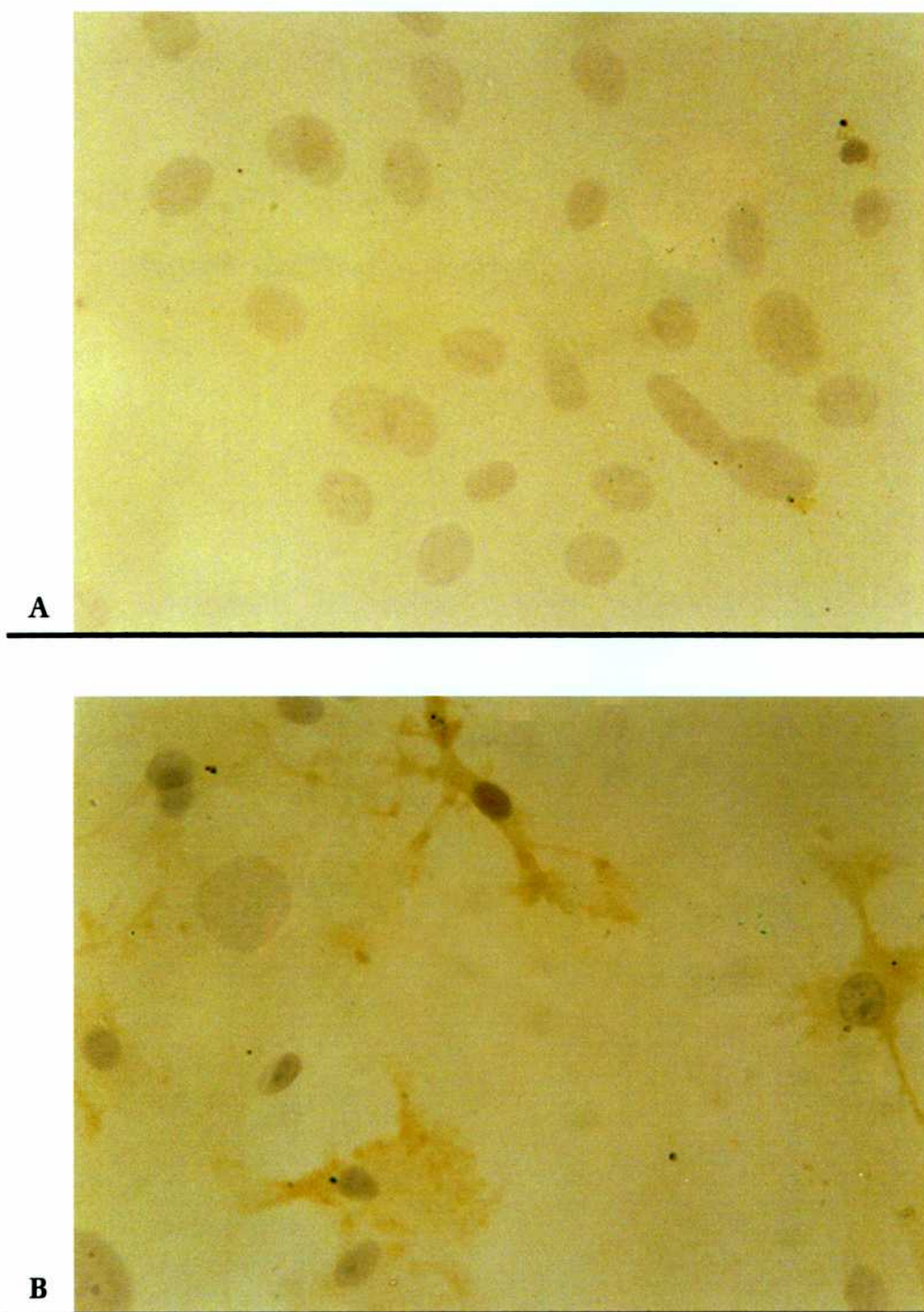


Figura 11: inmunomarcación de antígeno viral en monocapa de cultivo primario astrocitario. Cultivo control (A) y cultivo infectado con VJ (B) a los 7 días PI (600×).

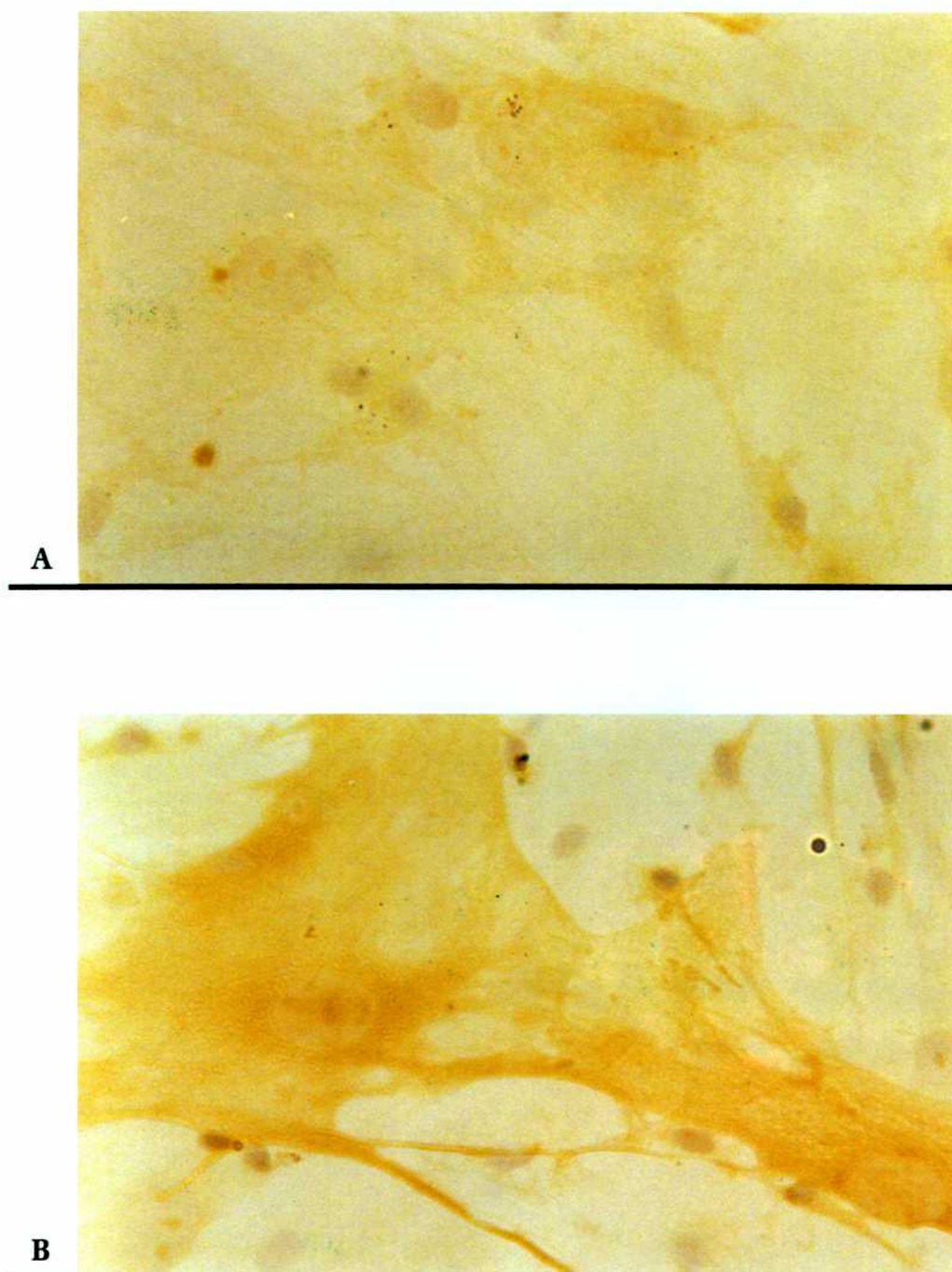


Figura 12: inmunomarcación de iNOS en monocapa de cultivos primarios astrocitarios control (A) e infectado con VJ (B) a los 7 días PI (600×).

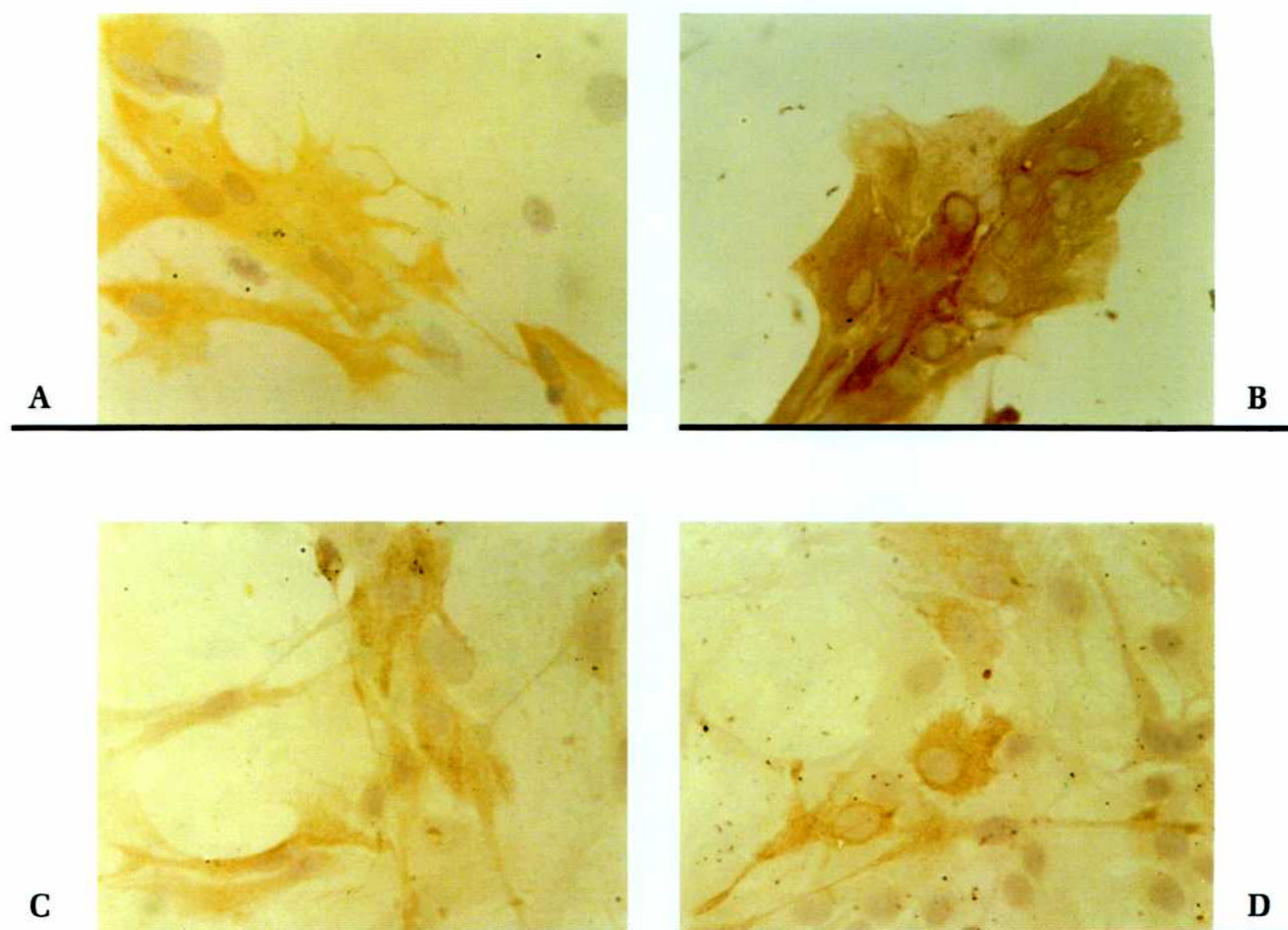


Figura 13: inmunomarcación de GFAP en monocapa de cultivos primarios astrocitarios (600×).

A) cultivo control

B) infectado con VJ

C) cultivo tratado con AG

D) cultivo infectado con VJ y tratado con AG

Discusión

La cepa XJ-44 del VJ es una variante atenuada de dicho virus realizada por el Dr. Barrera Oro partiendo de la cepa virulenta XJ (Dra. Ambrosio, comunicación personal). En los experimentos aquí presentados, cuando fue inoculada intracerebralmente en ratones recién nacidos, indujo una menor mortalidad espontánea que otras variantes atenuadas previamente estudiadas como la XJ-Clon3 (Winocur et al., 1990), lo que permitió que un número significativo de animales pudieran ser sacrificados para su estudio a los 24 días PI. No se conocen con detalle los determinantes moleculares de virulencia del VJ. Sin embargo, es conocido que pueden generarse variantes con diverso grado de virulencia dependiendo de diversos factores como diferente historia de pasajes, o diferentes sustratos en los mismos, entre otros.

Tampoco está aclarado cuáles son las causas específicas de muerte de los ratones recién nacidos inoculados intracerebralmente con VJ. A ese respecto, es interesante destacar la observación realizada por otros investigadores cuando ratones recién nacidos, congénitamente atímicos e inoculados con la cepa XJ del VJ, presentaron escasa mortalidad espontánea comparada con la casi 100% de la misma en ratones eutímicos, aun cuando se detectara una significativa presencia de virus infeccioso en el tejido neural (Weissenbacher et al., 1983). Esto sugiere, por un lado, un importante papel de la respuesta inmune celular en la virulencia, y por otro, que la replicación viral y la consecuente presencia de virus infectivo en el cerebro no es motivo, *per se*, de virulencia y mortalidad.

En ese contexto, el hecho de que los animales que recibieron AG

presentaran mayor mortalidad, podría indicar que el NO tendría un papel protector. Sin embargo, a nivel histológico, se observó mayor patología en los animales que no recibieron AG, lo que indicaría que el eventual papel protector no se correlaciona con menor enfermedad neurológica, al menos desde el punto de vista histopatológico. Tampoco se podría justificar por menor replicación viral, ya que no se encontraron diferencias significativas entre las muestras de los animales que recibieron AG y las de aquellos que no la recibieron. Además, como ya se mencionó, la replicación viral no sería un determinante de virulencia.

A este respecto, los resultados obtenidos concuerdan con los previamente observados cuando se utilizó el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV, otro miembro de la familia Arenaviridae y similar al VJ) para inducir encefalitis experimental. En ese estudio, se observó que la administración de AG disminuye el tiempo de sobrevivencia pero no modifica los niveles de virus infeccioso en los tejidos cerebrales de los ratones tratados con AG respecto de aquellos de los animales infectados pero no tratados. Sin embargo, la severidad clínica fue mayor en aquellos que recibieron AG (Campbell, 1996). Lamentablemente, en el citado trabajo no se realizó un estudio histopatológico comparativo y por lo tanto es incierto si la mayor severidad clínica correlacionaba con un mayor grado de injuria a nivel histológico, como ocurrió en nuestro estudio.

La presencia de iNOS en los tejidos de los animales infectados fue manifiesta sobre todo a nivel de hipocampo y cerebelo y levemente más evidente en los animales que no recibieron AG. Por lo tanto, se correlacionó la marcación

más intensa en los animales que no recibieron AG con el mayor grado de injuria observado en los mismos, sugiriendo que el NO juega un importante papel en la injuria neural inducida por infección con VJ. El observar una clara inducción de la expresión de iNOS en los animales infectados fue una condición necesaria para atribuir el efecto observado por la administración de AG a inhibición específica de la iNOS.

La inmunomarcación de iNOS sugirió su localización no sólo en las escasas células del infiltrado inflamatorio o de la microglía, sino también, y principalmente, en células con características de astrocitos y en algunas neuronas como las Purkinje cerebelosas. Si bien no se realizaron dobles marcaciones o estudios con microscopía confocal, el hecho de que los cultivos predominantemente astrocitarios expresaran iNOS luego de su infección por VJ, confirmó la capacidad de dicho tipo celular de expresar iNOS en forma consecutiva a la infección por VJ y brindó sustento al hecho de que dicha célula exprese iNOS en la infección por VJ *in vivo*.

Este hecho difiere de otros estudios donde se ha utilizado LCMV, cuando la expresión de iNOS se observó aumentada exclusivamente en células de estirpe macrofágica (Campbell et al., 1994). La diferencia puede deberse a que LMCV y VJ inducen iNOS en forma selectivamente diferente o al diferente estadio postinfección que se estudió en ambos trabajos. A la vez, asigna un todavía más importante papel al astrocito en la encefalitis inducida por VJ en relación con la producción de NO. A ese respecto, es interesante destacar que los astrocitos son

capaces de incrementar su producción de NO y peroxinitrito en respuesta a citoquinas. El NO/ONOO- formado no parece afectar la supervivencia de los astrocitos, pero en ciertos desórdenes neurológicos puede difundir y causar daño mitocondrial (y posiblemente la muerte) a otras células, como las neuronas (Heales et al., 1999) y este podría ser uno de los mecanismos involucrados que explicarían el mayor grado de injuria tisular observado en aquellos animales no tratados con AG. Otro mecanismo podría involucrar al NO como elemento regulador de la respuesta inmune, en especial en la inducción de apoptosis y en el balance celular Th1/Th2 (Kolb and Kolb-Bachofen, 1998). En ese sentido, interesa destacar que se ha descrito la inducción de iNOS consecutiva a la infección por LMCV en ratones eutímicos pero no en aquellos atímicos (Campbell et al., 1994), justamente ratones que presentan menor mortalidad cuando son inoculados con VJ (ver previamente). De existir este mecanismo, se podría predecir que la respuesta celular asociada a la muerte del animal eutímico sería predominantemente Th2. Esta hipótesis podría corroborarse cuantificando la presencia de citoquinas en el tejido neural consecutiva a la infección viral.

Por otro lado, si bien se ha descrito previamente la presencia de iNOS en algunas neuronas (revisado en Licinio et al, 1999) no consta, en lo mejor de nuestro conocimiento, la descripción de su presencia en neuronas Purkinje cerebelosas, justamente donde se observara en otros estudios importante presencia de antígeno viral (Lascano et al., 1989).

La detección de eNOS en cerebros infectados fue de difícil interpretación.

En primer lugar, porque la distribución de antígeno no sugirió su presencia en células endoteliales, primer lugar donde se esperaría detectarla, ni tampoco sugirió su ubicación en astrocitos, donde recientemente se ha descrito su presencia (Barna et al., 1996), ya que la marcación difirió de aquella obtenida cuando se inmunomarcó iNOS. Mas aún, también se obtuvieron resultados negativos cuando se intentó su marcación en cultivos predominantemente astrocitarios. Los motivos de estos resultados podrían deberse a que la marcación obtenida se trate de una reacción cruzada del antisuero con isoformas de la enzima, sea iNOS o nNOS y/o que la infección por VJ no induzca dicha isoenzima en astrocitos.

La detección de SODc, principalmente en el endotelio vascular de animales infectados, podría deberse a un aumento en la expresión de dicha enzima en ese tipo celular, quizás con fines detoxificadores. Es sabido que el aumento de la concentración de peroxinitrito en ciertas circunstancias requiere de un mayor poder detoxificador de la célula (Heales et al., 1999).

El dramático aumento en la inmunomarcación de GFAP observado en las muestras de animales infectados, tanto *in vivo* como *in vitro*, confirmó los hallazgos obtenidos previamente por otros investigadores (Lascano and Berría, 1983; Berría and Lascano, 1985). Sin embargo, fue un hallazgo inesperado la importante reducción en la expresión de GFAP en aquellos animales que habían recibido AG. Dicha reducción podría deberse a que fue en aquellos animales que recibieron AG donde se observó un menor grado de injuria tisular. Sin embargo,

fue confirmada en los estudios de cultivos predominantemente astrocitarios infectados y tratados con AG y por lo tanto es improbable que se deba exclusivamente a ese motivo. Se podría especular que el NO induce directa o indirectamente, síntesis de GFAP y/o activación astrocitaria. También podría deberse a que la AG por sí misma altere la expresión de GFAP o su polimerización. Quizás, una manera elegante de precisarlo sería cuantificar niveles de GFAP soluble y de su respectivo ARNm en astrocitos tratados o no con AG.



Ricardo Fortes



Alejandra Yeg

Referencias bibliográficas

Akaike T, Weihe E, Schaefer M, Fu ZF, Zheng YM, Vogel W, Schmidt H, Koprowski H and Dietzschold B (1995). Effect of neurotropic virus infection on neuronal and inducible nitric oxide synthase activity in rat brain. *J Neurovirol* 1: 118-125.

Barna M, Komatsu T and Reiss CS (1996). Activation of type III nitric oxide synthase in astrocytes following a neurotropic viral infection. *Virology* 223:331-343.

Berría MI and Lascano EF (1985). Astrocyte differentiation induced by Junín virus in rat brain cell cultures. *Acta Neuropathol (Berl)* 66:233-238.

Caggiano AO and Kraig RP (1996). Eicosanoids and nitric oxide influence induction of reactive gliosis from spreading depression in microglia but not astrocytes. *J Comp Neurol* 369:93-108.

Cameron RS and Rakic P (1991). Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia* 4:124-137.

Campbell IL (1996). Exacerbation of lymphocytic choriomeningitis in mice treated with the inducible nitric oxide synthase inhibitor aminoguanidine. *J Neuroimmunol* 71:31-36.

Campbell IL, Samimi A and Chiang CS (1994). Expression of the inducible nitric oxide synthase. Correlation with neuropathology and clinical features in mice with lymphocytic choriomeningitis. *J Immunology* 153:3622-3629.

de Vellis, J (1993). Regulation of gene expression in astrocytes. *In* Biology and Pathology of Astrocyte-Neuron Interactions, Fedoroff et al., eds. (New York Plenum Press), pp.141-151.

Eng LF (1988). Regulation of glial intermediate filaments in astrogliosis. *In* The Biochemical Pathology of Astrocytes, Norenberg et al., eds. (Alan R Liss, New York, NY) pp. 79-90.

Eng LF and Ghirnikar RS (1994). GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 4:229-237.

Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A and Gerstl B (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28:351-354.

Furchgott RF and Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.

Garthwaite J, Southam E and Morris R. (1993). Inter-cellular signalling by nitric oxide. *In* Biology and Pathology of Astrocyte-Neuron Interactions, Fedoroff et al., eds. (New York: Plenum Press), pp. 67-81.

Ghirnikar RS, Yu AC and Eng LF (1994). Astrogliosis in culture: III. Effect of recombinant retrovirus expressing antisense glial fibrillary acidic protein RNA. *J Neurosci Res* 1:376-385.

Griffiths MJ, Messent M, MacAllister RJ and Evans TW (1993). Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 110:3963-3968.

Gómez RM, Lascano EF and Berría MI (1991). Murine acinar pancreatitis preceding necrotizing myocarditis after coxsackievirus B3 inoculation. *J Med Virol* 35:71-75.

Heales JR, Bolaños JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM and Clark JB (1999). Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochemica et Biophysica Acta* 1410:215-228.

Knowles RG and Moncada S (1994). Nitric oxide synthases in mammals.

Biochem J 298:249-258.

Kolb H and Kolb-Bachofen V (1998). Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator? *Immunology Today* 19:556-561.

Lascano EF and Berría MI (1974). Ultrastructure of Junin virus in mouse whole brain and mouse brain tissue cultures. *J Virol* 14:965-974.

Lascano EF and Berría MI (1983). Immunoperoxidase study of astrocytic reaction in Junin virus encephalomyelitis of mice. *Acta Neuropathol (Berl)* 59:183-190.

Lascano EF, Berría MI, Avila MM and Weissenbacher MC (1989). Astrocytic reaction predominance in chronic encephalitis of Junin virus-infected rats. *J Med Virol* 29:327-333.

Licinio J, Prolo P, McCann SM and Wong M-L (1999). Brain iNOS: current understanding and clinical implications. *Mol Med Today* 5:225-232.

Lim R, Mitsunobu K and Li WKP (1973). Maturation-stimulating effect of brain extract and dibutyryl cyclic AMP on dissociated embryonic brain cells in culture. *Exp Cell Res* 79:243-246.

Maeda H and Akaike T (1998). Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Mosc)* 63:854-865.

Marletta MA (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 268:12231-12234.

Moncada S and Higgs A (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl J Med* 329:2002-2012.

Montgomery DL (1994). Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet Pathol* 31:145-167.

Murad F (1998). Nitric oxide signaling: would you believe that a simple free radical could be a second messenger, autacoid, paracrine substance, neurotransmitter, and hormone? *Recent Prog Horm Res* 57:43-59.

Norton WT, Aquino DA, Hozumi I, Chiu FC and Brosnan CF (1992). Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res* 17:877-885.

Oblinger MM, Kost SA and Singh LD. (1993). Regulation of type III intermediate filament protein genes in astrocytes during development and after

injury. *In* Biology and Pathology of Astrocyte-Neuron Interactions, Fedoroff et al., eds. (New York: Plenum Press), pp. 291-302.

Privat A and Rataboul P (1986). Fibrous and protoplasmatic astrocytes. *In* Astrocytes. Development, Morphology and Regional Specialization of Astrocytes, Fedoroff S and Vernadakis A, eds. (Academic Press, Orlando, FL), pp 105-129.

Tardy M, Le Prince G, Babajko S, Riol H, Fages C and Rolland B. (1993). GFAP gene expression in normal and reactive astrocytes. *In* Biology and Pathology of Astrocyte-Neuron Interactions, Fedoroff et al., eds. (New York: Plenum Press), pp. 153-161.

Tower DB (1988). Development of knowledge about astrocytes since Virchow. *In* The Biochemical Pathology of Astrocytes, Norenberg et al., eds. (Alan R Liss, New York, NY), pp 3-18.

Vijayan VK, Lee YL and Eng LF (1990). An increase in glial fibrillary acidic protein following neural trauma. *Mol Chem Neuropathol* 13:107-118.

Weissenbacher MC, Calello MA, Quintans CJ, Panisse H, Woyskowsky NM and Zannoli VH (1983). Junin virus infection in genetically athymic mice. *Intervirology* 19:1-5.

Weissenbacher MC, Lascano EF, Avila MM and Berría MI (1986). Chronic neurologic disease in Junin virus-infected rats. *J Med Virol* 20:57-65.

Winocur DH, Videla C, Laguens R y Carballal G (1990). Infección intracerebral de ratones atímicos con una cepa atenuada de virus Junín. *Rev Argent Microbiol* 22:150-154.



