

Tesis de Posgrado

Factores inmunológicos que participan en la resistencia del ratón adulto a la infección por virus Junin

Nejamkis, Marta Rosa

1977

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:

Nejamkis, Marta Rosa. (1977). Factores inmunológicos que participan en la resistencia del ratón adulto a la infección por virus Junin. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1559_Nejamkis.pdf

Cita tipo Chicago:

Nejamkis, Marta Rosa. "Factores inmunológicos que participan en la resistencia del ratón adulto a la infección por virus Junin". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1977.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1559_Nejamkis.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FOYER

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TESIS DE DOCTORADO

*"Factores inmunológicos que participan en la resistencia del
ratón adulto a la infección por virus Junín"*

Licenciada en Ciencias Químicas : Marta Rosa Nejamkis

Director de tesis : Dr Marcelo J. Frigerio

*Realizada en la Cátedra de Microbiología - Parasitología
e Inmunología de la Facultad de Medicina - UBA*

1977

1559

a mis padres

a mi esposo

a mi hijo

I N D I C E

I. INTRODUCCION	Pág. 1
Enfermedad del ratón lactante	Pág. 2
Patogenia de la enfermedad causada por el virus Junín en el ratón lactante	Pág. 3
II. EXPERIENCIA PERSONAL	Pág. 6
1. Mecanismo de acción de los inmunosupresores utili- zados en este trabajo	Pág. 7
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1 Determinación de la sensibilización del ratón adulto	Pág.11
2.2 Acción de los inmunosupresores en la infección del ratón adulto	Pág.12
2.2.1 Inmunosupresores	
Ciclofosfamida	Pág.14
Suero antitimocito	Pág.14
2.3 Histopatología	Pág.15
3. RESULTADOS	
3.1 Determinación de la sensibilización del ratón adulto	Pág.17
3.2 Acción de los inmunosupresores en la infección del ratón adulto	
3.2.1 Tratamiento con Ciclofosfamida	Pág.18
3.2.2 Tratamiento con Suero antitimocito	Pág.22
4. DISCUSION	Pág.26
5. BIBLIOGRAFIA	Pág.36
Abreviaturas utilizadas	Pág.42

Agradecimientos

Los estudios anatomopatológicos del presente trabajo han sido realizados por el Dr. Francisco Celeste, docente de la 2° Cátedra de Patología de la Facultad de Medicina, UBA y Director del Instituto de Oncología "Angel H. Roffo", cuya desinteresada colaboración agradezco muy especialmente.

Deseo también expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Celia E. Coto por el inestimable y continuo apoyo que me ha brindado en todo momento.

El tipeado del manuscrito ha sido una tarea más a agradecer a la Srta. Dora Tinta.

I. INTRODUCCION

El virus Junín, agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) fue aislado por primera vez por Parodi y col. (1) en 1958, del suero de pacientes provenientes de la ciudad homónima sita en la provincia de Buenos Aires.

En la última clasificación del Comité Internacional de Nomenclatura Viral, presentada por Fenner en 1975, este virus está ubicado en la Familia Arenaviridae, dentro del complejo Tacaribe integrado por virus biológica y antigenicamente relacionados entre sí.

La enfermedad producida por el virus Junín es endemoepidémica en un amplio sector del centro-oeste de la pampa húmeda incidiendo sobre todo en la zona de cultivo de maíz, de ahí el nombre que también recibe de mal de los rastrojos, aceptándose en la actualidad que roedores del tipo del ratón maicero como el Calomys musculinus y Calomys laucha, son reservorios del agente infeccioso (2).

Uno de los animales de laboratorio más susceptibles al virus Junín ha resultado ser el ratón albino lactante, el que reproduce uno de los cuadros clínicos más graves de la enfermedad humana como son las formas encefalíticas (3)(4). En cambio, el ratón adulto es mucho menos sensible a la infección, lo que está indicando que en la patogenia de la encefalitis producida por el virus Junín en este animal de experimentación, hay una importante relación entre la acción del virus y la edad

del huésped, como sucede en un gran número de infecciones virales (5).

Este trabajo de tesis se realizó con el objeto de aclarar los factores de interacción virus-huésped que determinan que el ratón albino adulto no presente morbimortalidad cuando es infectado con virus Junín.

Enfermedad del ratón lactante con virus Junín

Para comprender o poder determinar las razones por las cuales el ratón adulto es menos susceptible a la infección, es conveniente describir primeramente las características de esta infección en el ratón albino lactante, a la que hemos denominado: "fiebre hemorrágica experimental tipo del ratón"(6). El cuadro corresponde al producido por la cepa prototipo (XJ) del virus Junín, que es la que se utilizará en todas las experiencias que se describen en este trabajo.

El ratón albino inoculado entre 1 y 7 días de edad intracerebralmente (i.c.) con la cepa XJ de virus Junín desarrolla una severa encefalitis, con una mortalidad que alcanza 90-100 % alrededor de los 15 días post-infección (p.i.).

Otros agentes del grupo Arenavirus presentan un cuadro clínico muy semejante como por ejemplo los virus de: Coriomeningitis linfocitaria (LCM), Tacaribe, Amaparí, Machupo, etc.

La susceptibilidad del ratón albino al virus Junín

varía también con la vía de inoculación en relación con la edad (7), siendo más susceptible por vía i.c. que por vía intraperitoneal (i.p.).

En el modelo experimental tipo, es decir infección i.c. del ratón entre 24 y 72 hs. de vida con 1000 DL₅₀ de la cepa XJ, se determinó la distribución del virus en diferentes órganos y se encontró replicación viral a las 48 hs. después de la inoculación solamente en cerebro, alcanzando un título máximo a los 7 días p.i. Después del 4º día p.i. también se detecta virus en sangre y luego en hígado y bazo. La aparición de las primeras manifestaciones clínicas coinciden con la invasión por el virus de todo el organismo.

Se detectan anticuerpos fijadores de complemento (FC) recién en el último período de la enfermedad, mientras que el título de anticuerpos neutralizantes (AN) se mantiene negativo hasta la muerte de los animales (6). En la fase terminal fue posible demostrar una intensa leucolinfopenia (6).

En estos animales por inmunofluorescencia se puso en evidencia antígeno viral a partir de los 7 días p.i. en el citoplasma de las neuronas corticales y en el endotelio de los pequeños vasos meníngeos (3).

Patogenia de la enfermedad causada por el virus Junín en el ratón lactante

El estudio anatomopatológico de las lesiones cerebrales producidas por el virus Junín en el ratón lactante demostraron

la existencia de una encefalitis con acúmulo de células mononucleadas alrededor de los pequeños vasos cuyo aspecto histológico es similar al que se produce en la encefalitis alérgica experimental (8).

Numerosos trabajos realizados posteriormente llevaron a la conclusión de que el virus Junín producía en el ratón lactante una enfermedad inmunoalérgica.

Así, Schmuñis y col. (9) comprobaron que ratones lactantes timectomizados antes de las 12 hs. de vida y horas después inoculados por vía i.c. con virus Junín, no enferman, presentando altos títulos de virus en cerebro hasta los 30 días p.i. Es decir, que la timectomía neonatal protegía al 100 % de los animales a pesar de la importante concentración de virus en cerebro.

Para confirmar estos resultados y demostrar la naturaleza inmunológica del proceso, en otra serie de experimentos se administró suero antitimocito (SAT) a ratones lactantes inoculados i.c. con virus Junín, empleando un esquema preventivo, es decir, suministrando el suero previo a la infección y continuándolo después de la misma aproximadamente 1 mes (10). Tanto en este esquema experimental como con otro esquema que comenzaba la administración del SAT a los 4 y a los 7 días p.i., se obtuvo una marcada disminución de la morbimortalidad, con altos títulos de virus en cerebro. También en estos casos las manifestaciones anatomopatológicas encefalíticas del animal infectado eran inhibidas o suprimidas por el SAT (11).

Los resultados obtenidos en las experiencias de

Giovanniello y col., utilizando otro inmunosupresor, la ciclofosfamida, en el mismo modelo ratón lactante-virus Junín, fueron similares a las encontradas con la administración del SAT (12).

Todos los trabajos enumerados hasta aquí llevaron a la conclusión que, para que el ratón albino lactante enferme, es necesario la integridad de su aparato linfoideo timo dependiente, ya que si éste se suprime por algunos de los mecanismos descritos, el animal logra sobrevivir sin que la multiplicación del virus en cerebro sea capaz de producir morbimortalidad, es decir que sobre la base de estos resultados puede afirmarse que, en las condiciones experimentales descritas, el virus Junín no es citopatogénico para el ratón.

A diferencia de otros Arenavirus, el virus Junín no desarrolla en este animal un estado de portador o "carrier".

Los estudios histopatológicos realizados por microscopía electrónica (8) confirmaron los hallazgos anteriores ya que demostraron que en el ratón lactante la patogénesis de los desordenes inducidos por el virus Junín, está basada en una reacción inmunológica de hipersensibilidad retardada.

Por otra parte, se comprobó que los anticuerpos administrados pasivamente ya sea en forma natural o artificial confieren al ratón lactante un alto grado de resistencia a la infección con virus Junín (13). Se ha postulado que esta resistencia sería debida a que la acción antiviral de los anticuerpos no permitiría que hubiera suficiente antígeno viral en el cerebro como para desencadenar la reacción inmunológica mediada por células sensibilizadas.

II. EXPERIENCIA PERSONAL

La idea de que una infección viral puede depender del equilibrio que se establece entre la acción del virus y los mecanismos inmunológicos humorales o celulares del huésped, podía ser de utilidad para explicar o comprender la patogenia de la infección por virus Junín en el ratón albino lactante o la resistencia a la infección que este huésped adquiere con la edad.

El objeto de esta tesis fue tratar de evaluar alguno de los factores que podrían estar implicados en la resistencia del ratón adulto a la infección viral.

Sería lógico suponer que el ratón adulto tiene su aparato inmunocompetente adecuadamente dotado para una efectiva defensa contra el virus o al menos esta defensa debiera ser superior a la del ratón lactante. Suponiendo entonces que en los ratones adultos tanto la inmunidad humoral como la celular fuesen los mecanismos que se ponen en juego para evitar que el virus cause enfermedad, tratamos de suprimir ambos tipos de mecanismos inmunológicos por medio de inmunosupresores y tomando como base los utilizados previamente en el ratón lactante, se propuso estudiar la acción que sobre el ratón adulto tenían los dos inmunosupresores ya usados: ciclofosfamida y suero antitimocito. Previamente a esos estudios, se quiso demostrar la existencia de una sensibilización del ratón adulto por el virus Junín, para comprobar si la inhibición de dicha sensibilización producía alguna modificación en el curso que sigue la infección insaparente.

1. Mecanismo de acción de los inmunosupresores utilizados en este trabajo

Ciclofosfamida

La ciclofosfamida es un derivado de la mostaza nitrogenada que se emplea con algún éxito en el tratamiento de las neoplasias experimentales y humanas. Numerosos trabajos sugieren que el principal metabolito citotóxico de la ciclofosfamida es un compuesto aldehídico que posee actividad alquilante. La ciclofosfamida no es tóxica por sí misma, pero por acción enzimática se transforma en un derivado alquilante citotóxico (14) conocido como fuerte agente inmunosupresor porque su efecto está dirigido principalmente hacia células linfoideas bursa derivadas (linfocito B). En los ganglios y en el bazo de los roedores, la ciclofosfamida induce una desaparición de linfocitos B, dando como resultado una menor formación de anticuerpos. Sin embargo, esta droga afecta también las células linfoideas de la corteza tímica causando una disminución de linfocitos timo-dependientes del ganglio y del bazo. Además, la ciclofosfamida puede afectar funcionalmente a los linfocitos T ya que, su prolongada administración provoca en el hombre una supresión de la inmunidad mediada por células. Este efecto es reversible y la recuperación funcional y morfológica del sistema timo-dependiente es más rápido que la que se obtiene en el sistema timo-independiente. Es de hacer notar que la ciclofosfamida por su acción citotóxica sobre las células linfoides del sistema inmune, induce a la tolerancia inmunológica (15).

En conclusión se puede decir que el tratamiento con ciclofosfamida coincidentemente con la inoculación de un antígeno inhibe la subsecuente respuesta de anticuerpos (16), pero tiene diferentes efectos sobre la inmunidad celular.

Puede impedir el rechazo de injertos (16) o la hipersensibilidad retardada a proteínas, pero sobre la sensibilidad de contacto tiene una acción muy poco precisa; una sola dosis de droga deprime la concentración de linfocitos de las áreas timo-independientes de los ganglios linfáticos y del bazo, dejando prácticamente inalteradas las áreas timo-dependientes (17).

Suero antitimocito

Un suero contra células blancas sanguíneas fue preparado y utilizado por Metchnikoff en 1899, aunque estudiado en forma sistemática recién desde 1956.

El término "suero antilinfocítico" se refiere a un suero preparado en una especie animal por inmunización con linfocitos homólogos o heterólogos. Tiene una actividad directa contra linfocitos del donante (especie-específico) produciendo leucopenia. Es decir que el suero anti-linfocítico actúa selectivamente sobre las células responsables de la respuesta inmune, dañando también otros tipos celulares.

In vitro, puede provocar: aglutinación o lisis de

leucocitos (dependiendo de la presencia del complemento), transformación blástica, inhibición de la acción citotóxica de linfocitos sobre células sensibilizadas (células blanco o "target"), opsonización, etc. (18)(19).

Se ha demostrado que el suero antilinfocito resulta, por lo tanto, ser uno de los más poderosos inmunosupresores, pudiendo inhibir reacciones inmunológicas del tipo de allo y xeno injertos, formación de anticuerpos, etc.

Entre las numerosas hipótesis que han sido postuladas para explicar su modo de acción como inmunosupresor se pueden mencionar:

1) Linfocitotoxicidad: Reducción de los linfocitos que intervienen en la respuesta inmune por lisis con mediación del complemento.

2) "Blindfolding": Teoría que admite que las células linfoideas no son dañadas por el suero, pero son recubiertas por los anticuerpos IgG específicos que las mantienen incapaces de reconocer antígenos extraños.

3) Competición antigénica: Como el suero antilinfocítico es al mismo tiempo un antígeno, utiliza a las células inmunocompetentes, compitiendo con los nuevos antígenos que pueden llegar al organismo.

4) Inactivación estéril: La inactivación de los linfocitos inmunocompetentes por los anticuerpos del suero, produce una transformación generalizada de las células con

pérdida de potencial inmunológico.

Numerosos investigadores (18)(19)(20) sostienen o contradicen cada una de estas teorías y en definitiva el preciso modo de acción del suero antilinfocítico no ha sido aún completamente establecido pero se ha demostrado, sin duda, que provoca una drástica disminución de una subpoblación de células recirculantes, derivadas de las áreas timo dependientes de los órganos linfáticos secundarios.

Las células que con mayor frecuencia han sido utilizadas en la preparación de suero antilinfocítico son las del timo, de los ganglios linfáticos, del conducto torácico y de sangre periférica.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Determinación de la sensibilización del ratón adulto

Animal:

Ratones cepa Balb/c endocriados, obtenidos originalmente del Centro Panamericano de Zoonosis y reproducidos posteriormente en la Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina - UNBA.

Virus:

Junín cepa prototipo XJ (Catalogue of arthropod-borne viruses N° 77). Se utilizó un stock con 2 pasajes en ratón lactante, 25 en cobayo, y 13 en ratón lactante, con un título de 2.5×10^8 DL_{50}/ml en este último animal.

El stock fue preparado a partir de cerebro de ratón lactante, obtenido 7 días después de la infección i.c., suspendido al 10 % en solución de Hanks y titulado en ratón lactante. El título se calculó por el método de Reed y Muench.

Obtención de células de bazo

Para obtener células esplénicas viables inmunes, ratones Balb/c de alrededor de 8 semanas de edad recibieron 5 inoculaciones de 10^3 DL_{50} de virus Junín cepa XJ, por vía i.p. separadas por una semana de intervalo. Los animales se sacrificaron a los 7-10

días de la última inoculación y se les extrajo el bazo, los que se pasaron a través de mallas de acero inoxidable estériles en líquido de Hanks. Las células se lavaron dos veces en líquido de Hanks, centrifugando a 4° C y 700 g durante 5 minutos, se contaron en cámara de Neubauer y su número se ajustó a $7-8 \times 10^8$ células/ml, inoculándolas inmediatamente. Se determinó su viabilidad por exclusión de azul Trypan lo que en todos los casos osciló entre el 87 y el 92 %.

Se determinó que la suspensión de células esplénicas no era portadora de anticuerpos, incubando alícuotas de células durante 2 horas a 37° C en medio 199 con 3 % de suero de ternero. En los sobrenadantes se dosó anticuerpos neutralizantes, resultando todos los ensayos negativos.

En extractos celulares obtenidos por congelación y descongelación de las suspensiones no fue posible detectar la presencia de virus.

De la misma manera se procedió para obtener las células de bazo de animales normales.

2.2 Acción de los inmunosupresores en la infección del ratón adulto

Animales:

Ratones cepa Rockland reproducidos y mantenidos en

la colonia de la Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina - UNBA.

Conejos albinos de 2.5 a 3 Kg de peso.

Virus:

El mismo usado en la parte 2.1 del trabajo.

Cultivos celulares:

Células Vero, línea continua de riñón de mono *Cercopithecus aetiops* (21). Los ensayos de titulación de virus, se hicieron infectando monocapas confluentes preparadas en tubos, mantenidas después de la infección con medio basal de Eagle con 3 % de suero de ternero.

Serología:

Para el dosaje de anticuerpos neutralizantes se empleó el método de dilución de suero-virus constante ($\pm 1000 \text{ DICT}_{50}$). El título de anticuerpos se expresa como la mayor dilución de suero capaz de neutralizar la aparición de acción citopatogénica en el 50 % de los cultivos de células Vero.

Los anticuerpos fijadores de complemento se valoraron por el método en placas (micrométodo), usando un antígeno preparado a partir de cerebro de ratón lactante infectado, según la técnica de Barrera Oro (22).

2.2.1 Inmunosupresores

Ciclofosfamida (CY)(Endoxán-Asta Laboratorios Inca):

Se administraron por animal 4 dosis de 50 mg cada una, la primera 1 día antes de la infección viral y las siguientes en los días +1, +4 y +6 p.i., recibiendo cada ratón un total de 200 mg de ciclofosfamida. En el día 0 los animales fueron infectados i.c. con 1000 DL_{50} de virus Junín.

Obtención de suero antitimocito (SAT):

El suero fue preparado según el método de Levey y col. (23) inoculando a conejos albinos dos sucesivas inyecciones endovenosas con intervalo de 14 días, de 10^9 células tímicas de ratón de 3 a 4 semanas de vida. Los conejos fueron sangrados a blanco 7 días después de la segunda inoculación.

La potencia del suero fue probada "in vivo" por su capacidad de inducir leucolinfopenia en un ratón adulto. La disminución de los leucocitos circulantes y en especial de los linfocitos resultó en una caída del 49.6 y del 54 % respectivamente a las 4 hs. de su inoculación.

Las pruebas "in vitro" realizadas con el suero fueron: citotoxicidad (90 % con una dilución del suero 1/64) y título leucoaglutinante (1/320), ambas determinaciones siguiendo la técnica de Barth y col.(24).

Previa a su utilización, el SAT fue decomplementado

(calentándolo 30' a 56° C), adsorbido con glóbulos rojos frescos de ratón normal (en relación de 3 volúmenes de suero a 1 volumen de glóbulos rojos durante 1 hora a temperatura ambiente) y comprobado "in vitro" que carecía de efecto antiviral.

Esquema de administración del suero:

Se siguió el esquema de administración de SAT según Hirsch y col. (25). Los animales fueron inoculados i.p. con 0.25 ml de SAT cada 3 días, comenzando 6 días antes de la infección viral y en el día 0 fueron inoculados i.c. con 1000 DL₅₀ de virus Junín; es decir, que el esquema de inoculación fue -6, -3, 0, +3, +6. El mismo esquema experimental fue utilizado cuando se usó suero normal de conejo como control.

2.2.2 Histopatología

Para realizar un estudio sistemático de los cambios patológicos que pudieran producirse a nivel del SNC de los animales infectados y tratados con los distintos esquemas experimentales, se estudió la histopatología del cerebro de estos ratones comparándolos con los controles infectados sin tratamiento.

Los cerebros de los animales sacrificados fueron fijados en formol al 20 % en buffer de fosfatos, pH 7.4, procesados con las técnicas histológicas habituales e incluidos en parafina. De cada muestra se

hicieron por lo menos 15 cortes de 6-7 micrones de espesor, los que fueron teñidos con hematoxilina y eosina y por el método tricrómico de Masson.

Análisis estadísticos:

Para los estudios estadísticos fue usado el test de Kolmogorov-Smirnov.

3. RESULTADOS

3.1 Determinación de la sensibilización del ratón adulto.

Experiencias de trasplante de células de bazo de animal adulto inoculado con virus Junín a ratones lactantes infectados con este mismo virus

Ciento tres ratones cepa Balb/c endocriadas de 48 a 96 horas de vida fueron infectados con 10^3 DL₅₀ de virus Junín. Se dividieron 24 hs. después, en tres grupos experimentales:

1) Grupo CS + V (33 animales) fueron transferidos i.p. con $7-8 \times 10^7$ células esplénicas viables inmunes.

2) Grupo CN + V (30 animales) fueron transferidos i.p. con $7-8 \times 10^7$ células viables procedentes de bazos normales.

3) Grupo V (40 ratones) dejados como control de virus.

Los animales se controlaron diariamente para registrar morbimortalidad.

Las curvas de mortalidad acumulativa de los 3 grupos están expresadas en el gráfico 1.

Es evidente que los animales que recibieron células

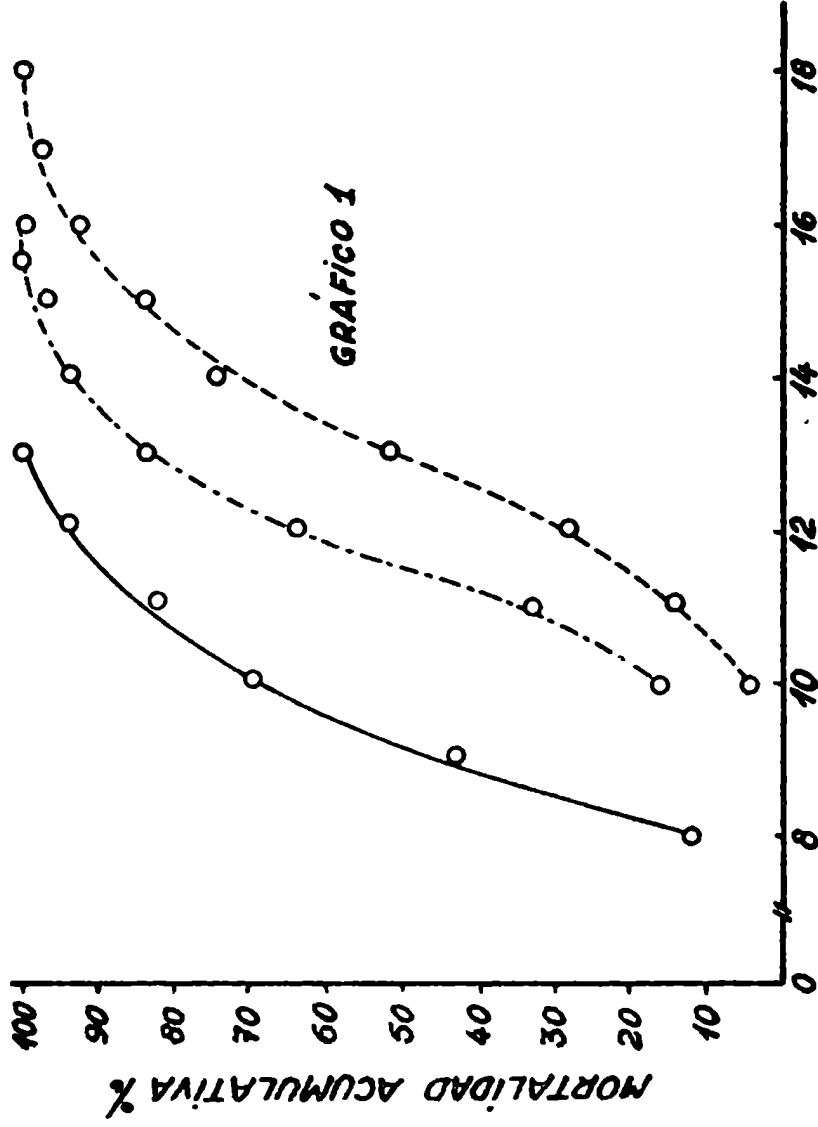


GRÁFICO 1

DÍAS POST-INFECCIÓN

Mortalidad acumulativa de ratones Balb/c, infectados a las 48-72 hrs. de edad con 10^3 DL₅₀ de virus Junín, cepa XJ por vía i.c. e injertados 2 días después con $70-80 \cdot 10^6$ células de bazo: (- - - - -) sensibilizadas; (- · - · - ·) normales; (—) control de virus solamente.

procedentes de ratones adultos inoculados con virus (grupo CS + V) mueren 3-4 días antes que los controles inoculados con virus solamente, es decir, entre el 8° y 13° día p.i., mientras que los infectados sin transferir solo alcanzan, en el día 13° p.i., el 50 % de mortalidad ($p < 0.001$).

Es de hacer notar que por una razón no fácil de comprender la transferencia de células normales también produce una aceleración en la morbimortalidad de los ratones.

No obstante el análisis estadístico de la diferencia de la morbimortalidad registrada entre el grupo transferido con células normales y sensibilizadas mostró también una alta significación ($p < 0.001$).

Este gráfico demuestra que las células esplénicas provenientes de animales adultos han sido sensibilizadas por acción del virus ya que son capaces de modificar el curso de la enfermedad del ratón lactante. El tiempo de aceleración corresponde en general al necesario para la sensibilización de tipo celular.

3.2 Acción de los inmunosupresores en la infección del ratón adulto con virus Junín

3.2.1 Tratamiento con ciclofosfamida (CY)

Trescientos treinta y seis ratones cepa Rockland entre 60 y 90 días de vida fueron divididos en tres grupos:

1) Grupo CY + V: Los 203 ratones que constituyeron este grupo fueron inoculados como fue descripto, i.p. con 50 mg de ciclofosfamida en los días -1, +1, +4, +6. En el día 0 los animales previa anestesia fueron infectados i.c. con 10^3 DL₅₀ de virus Junín cepa XJ.

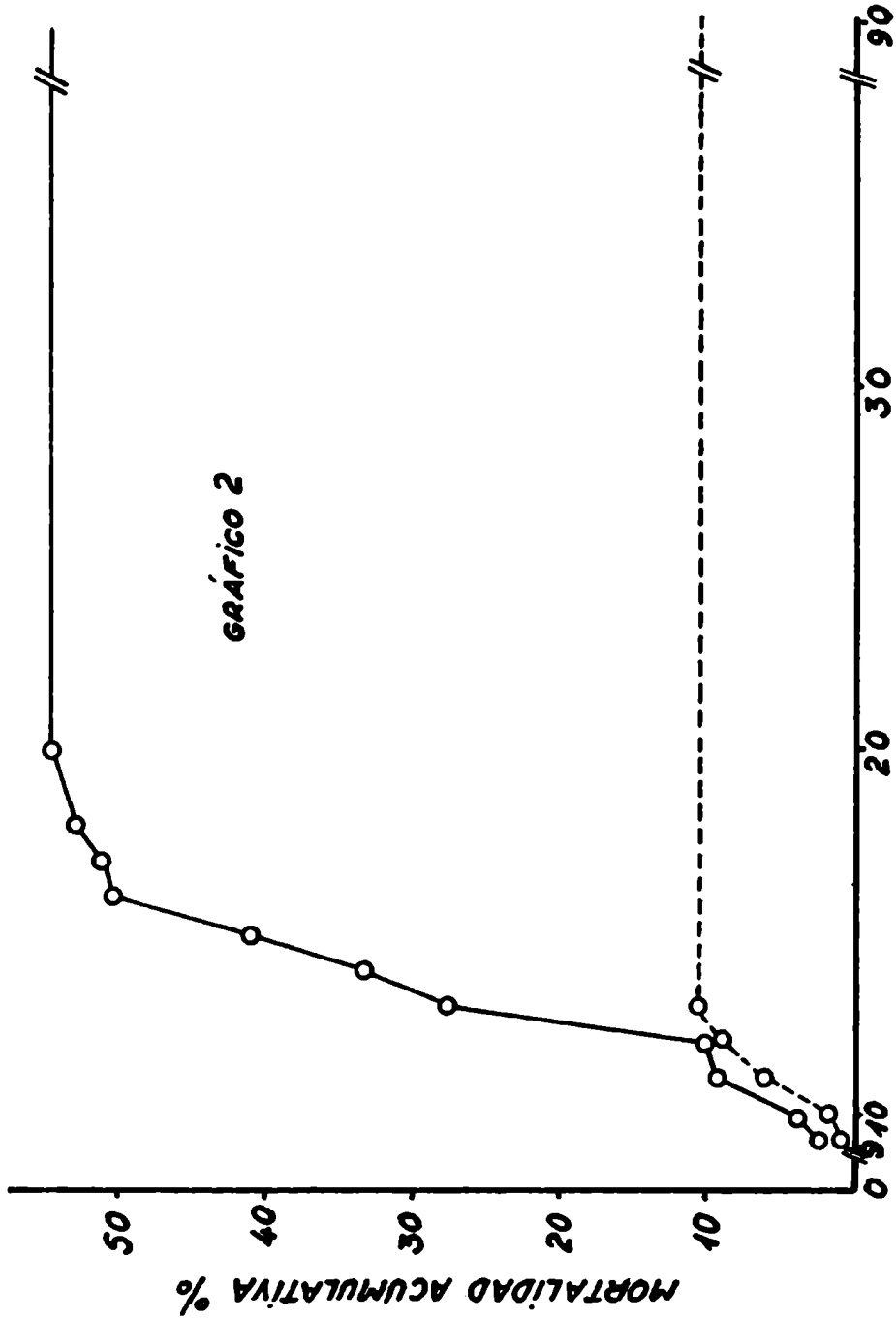
2) Grupo V: 96 animales que recibieron i.c. 10^3 DL₅₀ de virus constituyeron un grupo control.

3) Grupo CY: 37 ratones recibieron con el mismo ritmo y dosis que el grupo CY + V solamente ciclofosfamida, constituyendo el grupo control de la droga.

Los animales fueron controlados diariamente durante 90 días, registrándose los signos de enfermedad y mortalidad.

Las curvas de mortalidad de los grupos experimentales CY + V y V se presentan en el gráfico 2. En los animales tratados con ciclofosfamida e infectados con virus Junín la mortalidad alcanzó el 54,5 % entre los días 9 a 20 p.i. En el grupo que recibió virus solamente la mortalidad alcanzó el 10,4 % entre los días 9 y 13 p.i. El estudio estadístico mostró diferencias significativas entre los 2 grupos con un $p < 0.001$.

La muerte de los animales no presenta las características clínicas del cuadro clásico de la fiebre hemorrágica argentina experimental observada en los ratones lactantes, ya que no muestran signos de encefalitis ni aún 24 hs. antes de la muerte.



DÍAS POST-INFECCIÓN

Mortalidad acumulativa de ratones Rockland adultos inoculados con 10^3 DL₅₀ de virus Junín cepa LJ por vía i.c.:

(———) Tratados con ciclofosfamida (CY)

(- - - - -) Control de virus sin tratamiento

En los 37 animales inoculados con CY que sirvieron de control se registró solamente 1 muerte sin evidencias de poder ser atribuída a la droga.

Multiplicación del virus Junín en el cerebro de los ratones adultos:

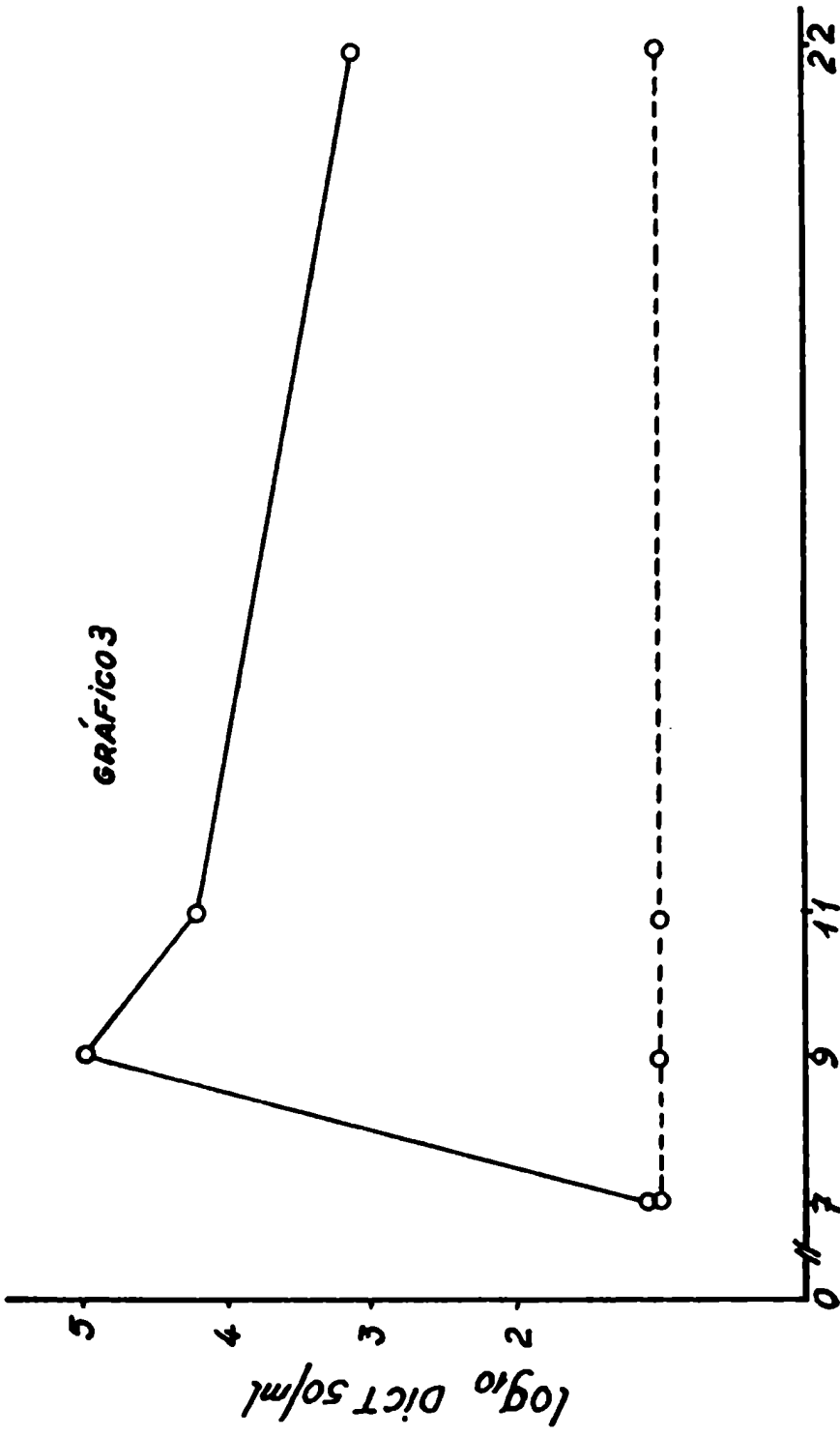
Otro lote de animales de características similares a los anteriores constituidos por 19 ratones para el grupo CY + V y 17 para el grupo V se utilizaron para determinar si el virus Junín se multiplicaba en los mismos. Se extrajeron los cerebros, se homogeinizaron y se titularon en cultivos celulares de células Vero.

Los títulos expresados como $\log_{10} DL_{50}/ml$ de ambos grupos están expresados en la tabla 1 y en el gráfico 3.

Tabla 1

Días	7	9	11	22
CY + V	<2,2	4,94	4,2	3,1
V	<2,2	<2,2	<2,2	<2,2

Como lo demuestra la tabla 1 y el gráfico 3, la administración de la droga favorece la multiplicación viral en el cerebro, ya que el virus alcanza títulos de



DÍAS POST-INFECCIÓN

Título de virus en cerebro de ratones Rockland adultos inoculados con 10^3 DL₅₀ de virus Junín por vía i.c.:

(——) Tratados con CY

(- - - - -) Control de virus sin tratamiento

4,94 log en los animales tratados, siendo $< 2,2$ log en los inoculados con virus solamente.

Titulación de anticuerpos neutralizantes

Un lote de animales del grupo CY + V y del grupo V fueron sacrificados a los 3, 6, 8, 11, 20 y 33 días p.i. para determinar el título de anticuerpos neutralizantes en suero, utilizando 2 a 4 animales por tiempo.

Tabla 2

Días	3	6	8	11	20	33
CY + V	$< 1/10$	$< 1/20$	$< 1/20$	$< 1/20$	$< 1/20$	$1/320$
V	$< 1/10$	$< 1/20$	$< 1/20$	$< 1/40$	$1/40$	$1/320$

La tabla 2 parece indicar que la ciclofosfamida produce cierta inhibición en la formación de anticuerpos, ya que en los animales infectados sin tratamiento, ya al día 20° p.i. comienzan a detectarse anticuerpos neutralizantes en circulación, mientras que en los ratones infectados y tratados, en ese momento los anticuerpos están por debajo de los valores detectables. Esto sin embargo no resultó altamente significativo.

Histopatología

Animales de los grupos V y CY + V fueron sacrificados a los 3, 7, 9, 11, 15, 20 y 30 días p.i. utilizando 2 animales por tiempo. El estudio histológico no demostró grandes diferencias anatomopatológicas ya que las lesiones de los cerebros de los dos grupos experimentales presentaban características similares, es decir las que corresponden a una encefalitis focal mínima.

3.2.2 Tratamiento con suero antitimocito

Un total de 177 ratones cepa Rockland entre 60 y 90 días de vida fueron divididos en tres grupos experimentales.

1) Grupo SAT + V: 87 ratones se inocularon i.p. con 0,25 ml de SAT los días -6, -3, 0, +3, +6. El día 0 los animales, previamente anestesiados fueron infectados i.c. con 10^3 DL₅₀ de virus Junín cepa XJ.

2) Grupo V: 70 ratones fueron infectados en el día 0 constituyendo el grupo control de virus.

3) Grupo SAT solo: 20 ratones recibieron solamente SAT en el mismo ritmo y dosis que el grupo SAT + V, constituyendo entonces el grupo control de SAT.

Los animales fueron controlados diariamente durante 90 días, registrándose los signos de enfermedad y la mortalidad.

Las curvas de mortalidad de los grupos experimentales SAT + V y V están expresadas en el gráfico 4.

En el grupo que recibió virus solamente se registró una mortalidad del 8,6 % entre los días 8 y 12 p.i. En los animales tratados con SAT e infectados con virus Junín, la mortalidad alcanzó el 28,9 % entre los días 7 y 37 p.i.

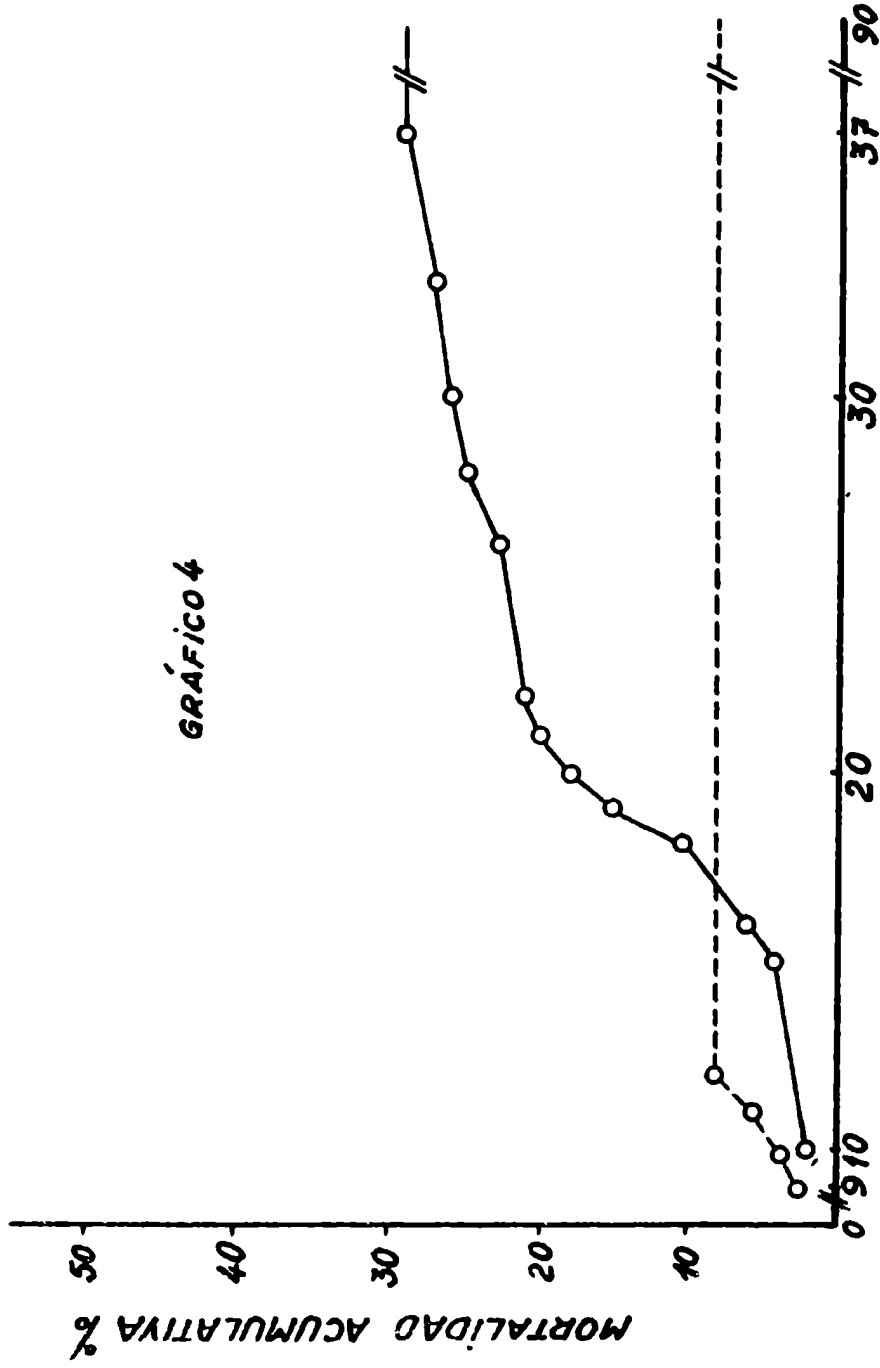
Las diferencias de mortalidad entre ambos grupos resultó estadísticamente significativa ($p < 0,001$). En los animales tratados solamente con SAT se registró en los 90 días de observación una sola muerte, por lo que se considera que el suero no provoca mayores alteraciones en los ratones normales.

Titulación de virus

Otro lote de ratones constituido por 21 animales del grupo V y 25 animales del grupo SAT + V fueron sacrificados a los 3, 6, 10, 13, 20, 30, 40 y 50 días p.i. para determinar el título de virus en cerebro usando en cada caso 2-3 animales por tiempo.

Los títulos expresados como $\log_{10} \text{DL}_{50}/\text{ml}$ fueron en todos los casos para los animales de los dos grupos $< 2,2 \log$, a excepción de una muestra de 10 días procedente de ratones inoculados solamente con virus en la que se registró un título de 3,44 log.

GRÁFICO 4



DÍAS POST-INFECCIÓN

Mortalidad acumulativa de ratones Rockland adultos inoculados con 10^3 DL₅₀ de virus Junín cepa XJ por vía i.c.:

- (—) Tratados con SAT
- (- - - -) Control de virus sin tratamiento

Titulación de anticuerpos neutralizantes

Veinte animales del grupo V y 23 animales del grupo SAT + V fueron sacrificados a los 10, 20, 30, 40 y 50 días p.i. para determinar el título de anticuerpos neutralizantes en suero usando entre 3-4 animales como mínimo por tiempo.

Tabla 3

Días	10	20	30	40	50
SAT + V	<1/10	1/20	1/320	1/640	1/640
V	<1/10	1/40	1/160	1/640	1/1280

La tabla 3 demuestra que el tratamiento con SAT no tiene mayor influencia sobre la síntesis de anticuerpos antivirales ya que el título de anticuerpos neutralizantes, de los 2 grupos estudiados, SAT + V y V solo, no muestran diferencias significativas en los tiempos estudiados.

Histopatología

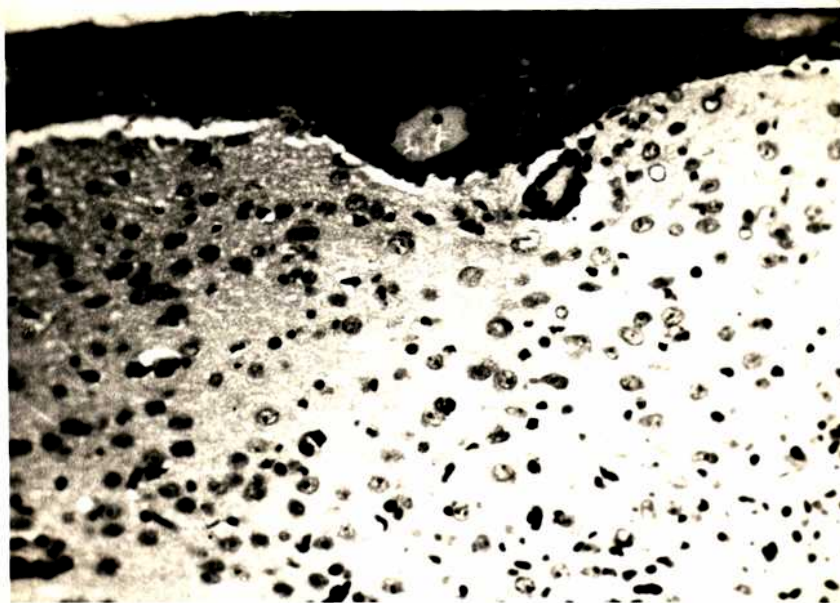
Animales del grupo V: Se estudiaron 19 ratones sacrificados desde el día 3 p.i. hasta los 76 días p.i. Las lesiones anatomopatológicas comienzan a visualizarse a

partir del 10º día p.i., consistiendo en una meningoencefalitis leve sin mayores lesiones parenquimatosas; las mismas persisten sin variaciones de intensidad hasta los 65 días p.i. Los animales de 76 días p.i. estudiados no presentaron lesiones histológicas.

Es de hacer notar que un animal de 8 días p.i. que murió espontáneamente presentaba una meningoencefalitis de mediana intensidad, extensas áreas de necrobiosis en corteza y necrosis de hipocampo.

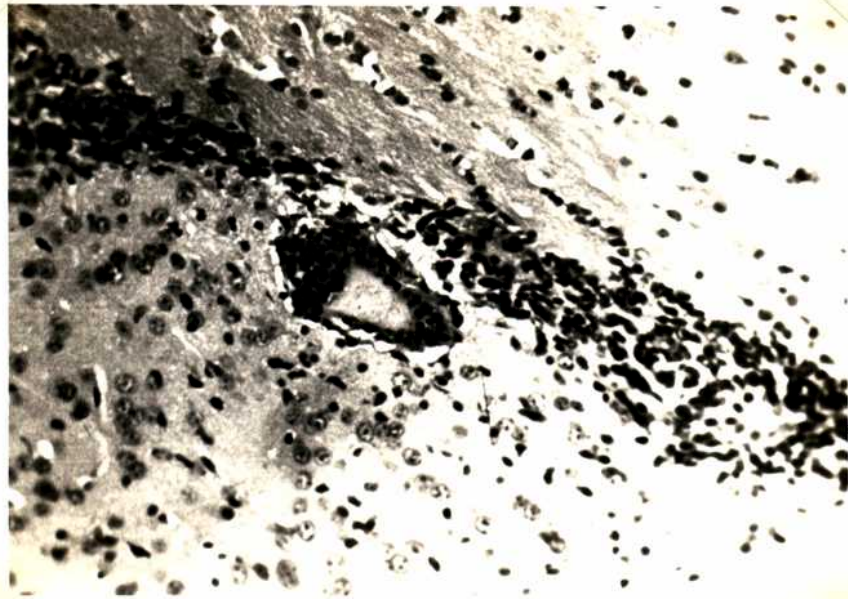
Animales del grupo SAT + V: Se estudiaron 28 animales desde el día 3º p.i. hasta los 76 días p.i. Las lesiones observadas consistieron en una meningoencefalitis y co-rioependimitis de leve a intensa. La lesión es leve a los 10 días p.i., alcanza su máxima intensidad a los 20 días p.i., y se mantiene hasta los 76 días p.i. Existen además lesiones de necrosis hemorrágica focal parenquimatosas. En algunos animales después de los 50 días p.i. se observa fibrosis focal con hemosiderosis que indica una expresión de evolución hacia la cicatrización como secuela de las lesiones necróticas.

FOTO 1



Cerebro de ratón adulto infectado con 10^3 DL_{50} de virus Junín y tratado con suero de conejo antitimocito de rata. Muestra tomada a los 20 días después de la infección. Se observa intenso infiltrado meningeo a expensas de linfocitos y polimorfonucleares.
Hematoxilina y eosina 400 X.

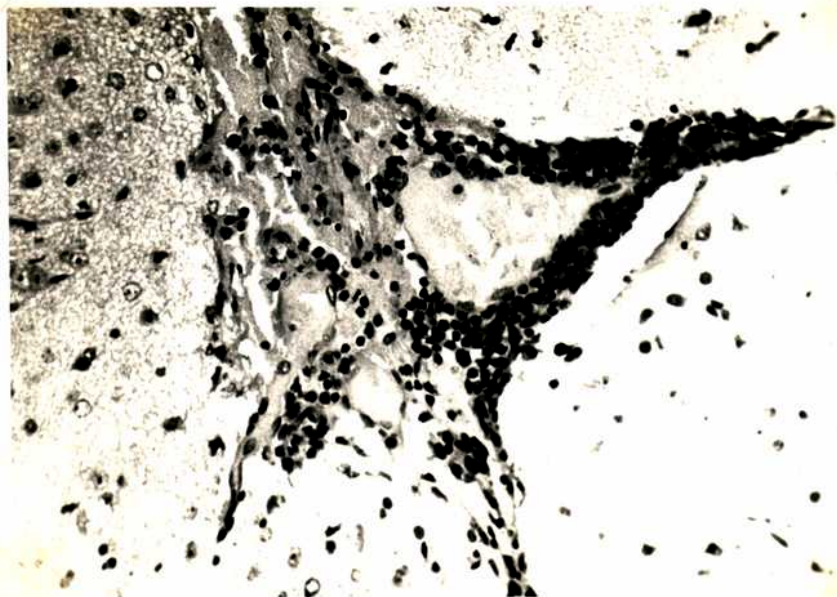
FOTO 2



Cerebro de ratón adulto infectado con 10^3 DL_{50} de virus Junín y tratado con suero de conejo antitimocito de rata. Muestra tomada a los 20 días después de la infección. Se observa intenso infiltrado meningeo parenquimatoso y perivascular.

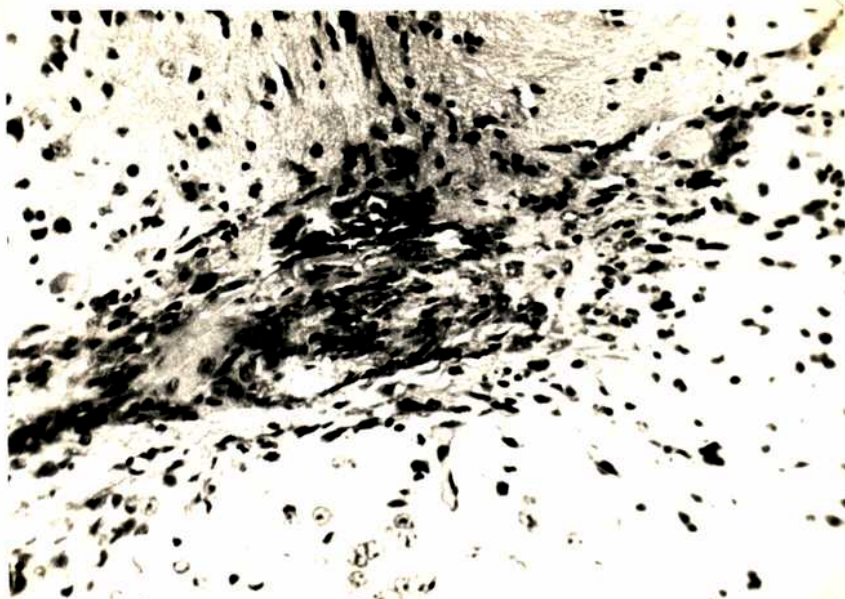
Hematoxilina y eosina 400 X.

FOTO 3



Cerebro de ratón adulto infectado con 10^3 DL₅₀ de virus Junín y tratado con suero de conejo antitimocito de rata. Muestra tomada a los 20 días después de la infección. Puede apreciarse una zona de hemorragia y foco de necrosis cerebral reciente. Hematoxilina y eosina 400 X.

FOTO 4



Cerebro de ratón adulto infectado con 10^3 DL₅₀ de virus Junín y tratado con suero de conejo antitimocito de rata. Muestra tomada a los 70 días después de la infección. Se observa una zona de fibrosis focal con hemosiderosis, expresión de evolución hacia la cicatrización con secuela de las lesiones necróticas.

Hematoxilina y eosina 400 X.

4. DISCUSION

La importancia que en la producción de enfermedad tienen los fenómenos inmunológicos puestos en marcha como consecuencia de una infección viral, ha sido comprobado en una serie de trabajos realizados fundamentalmente con el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM) perteneciente al grupo Arenavirus. La infección del ratón adulto con este virus, ha sido establecida como prototipo de la inmunopatología que induce la producción de una coriomeningitis fatal. Sin embargo, la inoculación intracerebral del mismo virus en el ratón recién nacido da lugar a una infección persistente, e induce un estado de "portador", con altos niveles de virus LCM en cerebro, sangre y otros tejidos y sin patología detectable en el sistema nervioso central (SNC) (26)(27)(28).

En lo que hace a la susceptibilidad y la edad, el virus Junín perteneciente al mismo grupo virológico que el LCM se comporta, sin embargo de manera diferente.

Como ha sido dicho, en el modelo experimental ratón albino-virus Junín, se ha demostrado que es el ratón lactante el que enferma y muere por el desarrollo de una inmunopatología del tipo de la hipersensibilidad retardada. Los ratones entre 24 y 96 hs. de vida inoculados i.c. o i.p. con virus Junín desarrollan una encefalitis, precedida de una corta viremia, con invasión en ambos casos del SNC, mientras que los ratones adultos inoculados por vía neural

o extraneural presentan una infección inaparente, sin viremia y con fugaces niveles de virus en cerebro.

Las evidencias que la enfermedad neurológica del ratón lactante es un fenómeno inmunológico del tipo celular provienen de trabajos realizados utilizando tratamientos con inmunosupresores como el SAT y la CY y de experiencias de timectomía perinatal, métodos con los cuales se consigue prevenir el desarrollo de la enfermedad (8)(10)(11)(12).

Estudios realizados con otro miembro del grupo taxonómico Arenavirus, el Tacaribe, indican que este virus se comporta en el ratón albino de manera similar al virus Junín, es decir, es letal para el ratón recién nacido, produciendo una enfermedad inmunológica mediada por células, resultando avirulento para el ratón adulto (29)(30).

Son numerosas las infecciones virales que provocan una aguda y muchas veces letal enfermedad en animales recién nacidos y que sin embargo son resistentes a la infección en la edad adulta. Se ha postulado que esta diferencia puede estar influenciada por los mecanismos defensivos que va adquiriendo el huésped con la edad. Estos mecanismos pueden incluir la respuesta inmune celular, humoral, la producción de interferón u otros factores fisiológicos.

La importancia del papel que juega la inmunidad humoral y celular en la recuperación de un animal después de una infección viral ha sido extensamente estudiada para gran cantidad de virus, sin haber llegado a una conclusión definitiva (25)(31)(32)(33)(34)(35).

El presente trabajo destinado a indagar algunos aspectos inmunológicos en el ratón adulto, inoculado con virus Junín demuestra que los ratones adultos logran sensibilizarse y esa sensibilización puede ser transferida a ratones lactantes, con células esplénicas obtenidas entre 7 y 10 días de la última inoculación, lo que produce un acortamiento de 72 hs. en la sobrevida de los ratones lactantes inoculados i.c. con virus Junín.

El momento de obtención de las células luego de la inoculación viral parece ser crítico para lograr evidenciar el estado de sensibilización, ya que como lo han demostrado varios autores solo las células denominadas tempranas son capaces de modificar el curso de la enfermedad del ratón, indicando que el estado de sensibilización en las infecciones virales es relativamente breve si se lo compara con lo que sucede con las bacterias, o bien que los métodos de transferencia como los utilizados en nuestros trabajos, no son válidos en el estadio tardío de una enfermedad viral, para demostrar la hipersensibilidad celular (30)(36)(37)(38).

Es interesante el hecho que las células sensibilizadas no produzcan en el animal adulto, inoculado con virus Junín, muerte o evidencias clínicas de una enfermedad inmune del SNC, mientras que ellas son capaces de acelerar la meningoencefalitis letal cuando son transferidas a ratones lactantes preinfectados. Para poder explicarlo debemos tener en cuenta que en los ratones infectados con virus Junín aparecen por lo menos 2 componentes diferentes que constituyen los mecanismos operativos que conducen a la lesión

hística. Uno está asociado a la capacidad funcional de los linfocitos timo-dependientes como células efectoras de la inmunidad celular, mientras que el otro depende del número de células (blanco o "target") infectadas en el órgano de choque.

Con respecto a las células efectoras ha sido demostrado que los linfocitos T sensibilizados tienen la capacidad de acumularse en el infiltrado celular provocado en una reacción mediada por células (39). Pero para que se produzca daño letal tiene que existir un número adecuado de células target portadoras del antígeno (40). Las experiencias de transplante de células ya mencionadas demuestran que en nuestro caso el ratón adulto es portador de uno de los componentes, es decir las células efectoras, pero lo que parecería ejercer mayor influencia en la falta de lesiones es la carencia de la concentración necesaria de células infectadas en el cerebro (por la escasa multiplicación viral en el mismo) como para producir daño letal que lo conduzca a la muerte.

Es posible que la existencia en el ratón adulto de mecanismos inmunológicos maduros del tipo humoral o celular actuen como mecanismo de limpieza y logren evitar que el virus se replique lo suficiente en el cerebro como para que el número de células a ser lesionadas sea el necesario.

Una vez comprobado que el virus Junín era capaz de desencadenar en el ratón adulto una respuesta humoral y celular se trató de determinar cuál era la participación de cada uno de estos mecanismos en la ausencia de enfermedad.

Las experiencias se llevaron a cabo por medio de la utilización de inmunosupresores de ambas respuestas como es el caso de la CY y el SAT.

De los resultados obtenidos surge que la CY modifica el curso de la infección de los ratones adultos (60-90 días de vida) infectados i.c. con virus Junín. El tratamiento con la droga inmunosupresora incrementa marcadamente la mortalidad, ya que los animales que recibieron solamente virus presentaron una mortalidad del 10,4 %, mientras que los ratones infectados y tratados con CY, con el ritmo y dosis ya señalado tuvieron una mortalidad de 54,4 % (Fig.2).

Los resultados de las presentes experiencias coinciden con los de otros investigadores utilizando diferentes virus y aún en otras especies animales. De acuerdo a ellos ha sido descrito que una infección inaparente originada en animales adultos por un determinado virus, puede ser transformada en una enfermedad letal por la inmunosupresión producida por CY, observando también un aumento de virus en cerebro y un menor título de anticuerpos en suero (31)(34)(41)(42)(43).

En nuestro caso es evidente también una modificación en la replicación de virus en cerebro entre los animales tratados y no tratados con droga, ya que hasta el 7° día p.i. el virus tiene una mínima replicación en los 2 grupos de animales, pero a partir de allí hay una diferencia notoria entre los ratones tratados y no tratados. Mientras en el grupo inoculado con virus solamente, los títulos están siempre por debajo de 2,2 log, en el grupo de ratones adultos

infectados y tratados con CY el virus alcanza títulos cercanos a los 5,0 log después de los 7 días p.i. manteniéndose en esos valores durante todo el período en que se registró la muerte de los animales (Fig. 3).

En cuanto a los anticuerpos neutralizantes antivirales Junín, nuestro trabajo ha demostrado que con el tratamiento con CY parecería deprimir temporariamente su formación, pues mientras en el grupo control a partir del día 20 p.i. comienzan a detectarse anticuerpos en el suero de los ratones, en el grupo tratado con CY solo alcanzan títulos detectables desde el día 30 p.i. Es decir que en estos animales el freno que provoca la CY sobre la inmunidad humoral (la última dosis de droga se suministra a los 6 días p.i.) se ve reflejada más allá de los 20 días p.i. Según algunos autores esta acción depresora de la inmunidad humoral se ejercería a través de la eliminación de la respuesta de la célula B, pues el tratamiento con CY afecta las células que están en rápida división (44). Todo lo expuesto está de acuerdo con los resultados de quienes demostraron que la CY tiene un efecto preferencial sobre los linfocitos que no llevan el antígeno theta (17)(45).

Por otra parte, Lagrange y col. (46) sostienen que la inmunidad mediada por células T es potenciada o incrementada cuando se produce una selectiva supresión de la formación de anticuerpos por medio de la CY. En ratones inmunizados con dosis subóptimas de glóbulos rojos de carnero se desarrolla hipersensibilidad retardada, la que es progresivamente bloqueada cuando se aumenta la dosis del antígeno ya que esto da lugar a que sea mayor el título de anticuerpos.

La distinta acción que presenta la CY sobre las células B y T es debida al diferente estado fisiológico de estas dos poblaciones linfocitarias. Mientras las células T presentan largos períodos de reposo y son por lo tanto insensibles a la droga, las células B al hallarse permanentemente en rápida multiplicación son por lo tanto susceptibles a la acción de la CY, ya que como fue dicho esta droga solamente es activa cuando la célula está en mitosis.

Por los resultados del presente trabajo y por el esquema, ritmo y dosis de administración de la CY, ésta inhibe fundamentalmente la inmunidad humoral ejerciendo también algún efecto sobre la inmunidad celular, que no impediría la sensibilización del animal pero no alcanzaría a producir limpieza de virus (47).

Por lo tanto la administración de CY en cantidad suficiente como para alterar la respuesta humoral y celular transforma un proceso silencioso o inaparente que se produce en el organismo del ratón adulto infectado con virus Junín, en una enfermedad letal.

En lo que se refiere al otro inmunosupresor utilizado, de acción casi selectiva sobre los mecanismos ligados a la hipersensibilidad celular, numerosas experiencias han demostrado que el componente celular de la respuesta inmune en las infecciones virales es de particular importancia para la defensa del huésped. Los trabajos de Blanden (47) ponen en evidencia que en la infección del ratón por virus de ectromelia, el uso del SAT reduce notablemente la hipersensibilidad retardada, sin disminución de la concentración

de anticuerpos neutralizantes ni de interferón y debido a la inhibición de la inmunidad celular se produce un marcado incremento en la mortalidad de los animales, afirmando entonces el concepto de que la inmunidad celular es de importancia fundamental, aunque no exclusiva en la recuperación del ratón a la infección con ectromelia.

Esto coincidiría con nuestras experiencias donde el tratamiento con SAT de ratones adultos entre 60 y 90 días de edad infectados i.c. con virus Junín provoca un aumento significativo de la mortalidad (28,8 %) comparado con la escasa mortalidad registrada en los animales controles infectados sin tratamiento (8,6 %)(Fig. 4). Esto demuestra la habilidad del SAT en potenciar las consecuencias patológicas de la infección por virus Junín incrementando la morbi-mortalidad de los animales infectados, sin detectar ninguna variación en el título de virus en cerebro ni en los valores de anticuerpos neutralizantes.

La función de limpieza viral ejercida por la inmunidad celular puede ser comprendida sobre todo, en los virus que salen de la célula infectada por brotación, como es el caso del virus Junín. Durante el proceso de brotación los antígenos virales están presentes en la superficie celular y podrían también formarse nuevos antígenos los que estarían expresados sobre la membrana celular aún antes de que la brotación comience. Los animales se sensibilizarían a los antígenos del virus o a los antígenos celulares modificados por el virus, dando origen a linfocitos con acción citotóxica, que actuarían sobre la célula blanco o target (portadora

del virus o de antígenos virales o de los nuevos antígenos codificados por el virus) destruyéndolas. La eliminación o destrucción de la célula infectada es la más segura forma de interrumpir el ciclo de replicación viral.

Se sugiere que en el animal adulto la multiplicación viral es suficiente como para alcanzar la masa antigénica que logra sensibilizarlo y esto se realiza con la infección de una pocas células. La destrucción de las mismas termina con la infección, sin excesivo daño del huésped. Sin embargo, cuando las circunstancias conducen a una tardía producción de linfocitos sensibilizados, en nuestro caso por la administración del SAT, muchas células pueden ser portadoras del antígeno antes de que pueda actuar la respuesta celular. Por el mecanismo de hipersensibilidad retardada, el cerebro como órgano de choque puede sufrir entonces un daño irreversible.

Todo lo expuesto explicaría el incremento de la morbimortalidad en los ratones adultos infectados con virus Junín e inmunosuprimidos con SAT.

No se puede dejar de señalar que en todo este proceso puede no ser el virus en sí mismo el antígeno, sino que pueden formarse nuevos antígenos por acción viral que sean los responsables de la puesta en marcha del fenómeno inmunológico. Estos antígenos de los tejidos serían inmunogénicos por ser presentados al sistema inmune en una forma modificada por acción viral (48)(49). La existencia de tales antígenos en tejido nervioso capaz de dar "autosensibilización" ha sido aceptado como mecanismo patogénico en la

encefalitis alérgica experimental.

Resumiendo las principales conclusiones que surgen del trabajo presentado, podríamos decir que cuando los animales son tratados con CY, la inhibición que esta droga provoca en la inmunidad humoral, permite que el virus se multiplique en cerebro en cantidad tal como para que el número de células blanco o target infectadas sea adecuado para que los linfocitos sensibilizados desencadenen el daño inmunológico.

La mortalidad provocada en el ratón adulto por el tratamiento con SAT sería debida a que el suero al eliminar la subpoblación de linfocitos T_2 recirculantes sensibles, elimina una de las poblaciones que logra producir la limpieza de las primeras células que llevan los antígenos "sensibilizantes" y por lo tanto permite que se formen los mencionados antígenos del cerebro, los que al ser atacados por los linfocitos sensibilizados formados tardíamente luego de la suspensión del tratamiento con SAT, provocan el daño tisular (50)(51)(52). Esto parecería estar confirmado por los resultados de la anatomía patológica que demuestran que las lesiones son más intensas y tardías en los animales que recibieron suero, si se compara con las lesiones observadas en los animales controles.

Los datos presentados pretenden ser un aporte a los complejos mecanismos que entran en juego en la defensa de un individuo a las infecciones virales. El modelo experimental ratón-virus Junín ofrece amplias posibilidades para el desarrollo de investigaciones que tiendan a aclarar tan apasionante problema.

FRANCISCO L. PRIGERIO
PROFESOR REGULAR ADJUNTO
CATEDRA DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA

Francisco L. Prigerio

5. BIBLIOGRAFIA

1. Parodi, A.S.; Greenway, D.J.; Rugiero, H.R.; Rivero, E.; Frigerio, M.J.; de la Barrera, J.M.; Mettler, N.; Garzón, F.; Boxaca, M.C.; Guerrero, L.T.B. de; Nota, N.R.
Sobre la etiología del brote epidémico de Junín.
Día Médico, 30:2300, 1958.
2. Vanella, J.M.; González, L.E.; Paglini, S.; Márquez, A.
Evidencia de laboratorio de actividad del virus Junín en el Sudeste de Córdoba: hipótesis sobre su epidemiología.
Día Médico, 36:290-295, 1964.
3. Garay, R.P.
Patogenia del virus Junín: Estudios en ratón lactante.
Medicina (Bs. Aires), 31:383-392, 1971.
4. Greenway, D.J.; Rugiero, H.R.; Parodi, A.S.; Frigerio, M.J.; Rivero, E.; de la Barrera, J.M.; Garzón, F.; Boxaca, M.; Mettler, N.; Guerrero, L.B. de
Epidemic hemorrhagic fever in Argentine.
Public Health Reports, 74:1011-1014, 1959.
5. Mettler, N.E.; Casals, J.
Susceptibility of mice aged 0-14 day to Junín virus infection.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 134:1051-1054, 1970.
6. Giovanniello, O.A.; Boxaca, M.C.; Nota, N.R.; Nejamkis, M.R.
Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junín: Enfermedad tipo.
Rev. Asoc. Argent. Microbiol., 7:8-14, 1975.
7. Boxaca, M.C.; Giovanniello, O.A.; Nota, N.R.; Nejamkis, M.R.; Guerrero, L.B. de; Frigerio, M.J.
Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junín: Cuadro clínico y susceptibilidad.
Rev. Asoc. Argent. Microbiol., 5:1-12, 1973.
8. Taratuto, A.L.; Tkaczewski, L.Z. de; Nota, N.R.; Nejamkis, M.R.; Giovanniello, O.A.
Junín virus encephalitis in mice: Its inhibition by antithymocyte serum.
Arch. ges. Virusforsch., 43:173-183, 1973.

9. Schmuñis, G.A.; Weissenbacher, M.C.; Parodi, A.S.
Tolerance to Junín virus in thymectomized mice.
Arch. ges. Virusforsch., 21:200-204, 1967.
10. Nota, N.R.; Nejamkis, M.R.; Frigerio, M.J.; Guerrero,
L.B. de
Estudio de la infección experimental del ratón por vi-
rus Junín. Efecto del suero antitimocito.
Medicina (Bs. Aires), 33:398-405, 1973.
11. Nota, N.R.; Nejamkis, M.R.; Giovanniello, O.A.
Further Experiments on the Action of Antithymocyte Serum
in Experimental Junín Virus Infection.
Acta Virol., 20:61-65, 1976.
12. Giovanniello, O.A.; Boxaca, M.C.
Effect of Cyclophosphamide on Junín Virus Infection in
Mice.
Medicina (Bs. Aires), 33:368-376, 1973.
13. Nejamkis, M.R.; Nota, N.R.; Weissenbacher, M.C.; Guerrero,
L.B. de; Giovanniello, O.A.
Passive immunity against Junín virus in mice.
Acta Virol., 19:237-244, 1975.
14. Sladek, N.E.
Bioassay and Relative Cytotoxic Potency of Cyclophospha-
mide metabolites Generate in Vitro an in Vivo.
Cancer Research, 33:1150-1158, 1973.
15. Eskola, J.; Toivanen, P.
Effect of in Ovo Treatment with Cyclophosphamide on
Lymphoid System in Chicken.
Cell. Immunol., 13:459-471, 1974.
16. Gabrielsen, A.E.; Good, R.A.
Chemical Suppression of Adaptive Immunity.
Advances in Immunology, Vol. 6, 91-229, Academic Press
1967.
17. Kerckhaert, J.A.M.; van den Berg, G.J.; Willers, J.M.N.
Influence of Cyclophosphamide on the Delayed Hypersen-
sitivity of the Mouse.
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 125 C:415-426, 1974.

18. Jooste, S.V.
Immunological Effects of Heterologous Antilymphocytic Sera.
Lymphology, 3:79-103, 1970.
19. Inderbitzin, Th. M.
Immunologic Properties of Anti-lymphocyte Sera.
Int. Arch. All. applied Immunol., 41:110-116, 1971.
20. Taub, R.N.
Biological Effects of Heterologous Antilymphocyte Serum.
Progress in Allergy, 14:208-258, 1970.
21. Yasumura, Y.; Kawakita, Y.
Study on SV40 virus in tissue cultures.
Nippon Rinsho, 21:1-201, 1963.
22. Barrera Oro, J.G.
Un método simple para obtener antígeno fijador de complemento del virus Junín.
Medicina (Bs. Aires), 30(Supl.1):22-26, 1970.
23. Levey, R.H.; Medawar, P.B.
Nature and Mode of action of Antilymphocytic Antiserum.
Proc. Nat. Acad. Sc., 56:1130-1137, 1966.
24. Barth, R.F.; Southworth, J.; Burger, G.M.
Studies on Heterologous Antilymphocyte and Antithymocyte Sera. I. Serologic Specificity and Immunosuppressive Activity of Rabbit Anti-Mouse Sera on the Primary Immune Response.
J. Immunol., 101:282-291, 1968.
25. Hirsch, M.S.; Nahmias, A.J.; Murphy, F.A.; Kramer, J.H.
Cellular Immunity in Vaccinia Infection of Mice. Anti-thymocyte Serum Effects on Primary and Secondary Responsiveness.
J. Exp. Med., 128:121-132, 1968.
26. Mims, C.A.
Acute and Chronic LCM Disease.
Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other Arenaviruses, 167-173, Springer-Verlag 1973.

27. Hotchin, J.
The biology of lymphocytic choriomeningitis infection:
Virus-induced immune disease.
Cold Spr. Harb. quant. Biol., 27:479-499, 1962.
28. Hannover Larsen Jørgen
The effect of immunosuppressive therapy on the murine
lymphocytic choriomeningitis virus infection.
Acta path. microbiol. Scand., 77:433-446, 1969.
29. Borden, E.C.; Murphy, F.A.; Nathanson, N.; Monath, T.P.C.
Effect of Antilymphocyte Serum on Tacaribe Virus Infec-
tion in Infant Mice.
Infec. Immun., 3:466-471, 1971.
30. Borden, E.C.; Nathanson, N.
Tacaribe Virus Infection of the Mouse: An Immunopatho-
logic Disease Model.
Laboratory Investigation, 30:465-473, 1974.
31. Cole, G.A.; Nathanson, N.
Potentiation of Experimental Arbovirus Encephalitis by
Immunosuppressive Doses of Cyclophosphamide.
Nature, 220:399-401, 1968.
32. Nahmias, A.J.; Hirsch, M.S.; Kramer, J.H.; Murphy, F.A.
Effect of Antithymocyte Serum on Herpesvirus Hominis
(type 1) Infection in Adult Mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 132:696-698, 1969.
33. Ida, S.; Hinuma, Y.
Effect of Antilymphocyte Serum on Reovirus Infection
of Mice.
Infec. Immun., 3:304-307, 1971.
34. Worthington, M.; Rabson, A.S.; Baron, S.
Mechanism of Recovery from Systemic Vaccinia Virus
Infection. I. The Effects of Cyclophosphamide.
J. Exp. Med., 136:277-290, 1972.
35. Thind, I.S.; Price, W.H.
The Effect of Cyclophosphamide treatment on Experimental
Arbovirus Infections.
Amer. J. Epidemiol., 90:62-68, 1969.

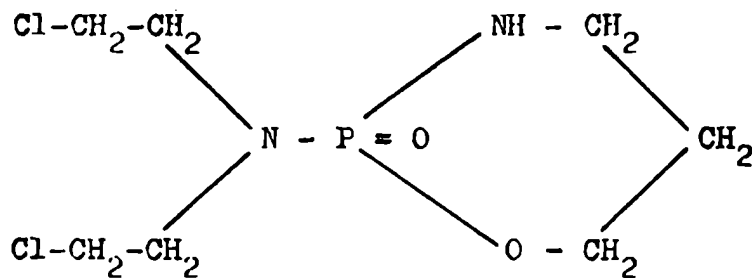
36. Marker, O.; Volkert, M.
Studies of Cell-Mediated Immunity to Lymphocytic Choriomeningitis Virus in Mice.
J. Exp. Med., 137:1511-1525, 1973.
37. Allbritton, A.R.; Loan, R.W.
Correlation of Cytotoxicity with Experimental Allergic Encephalomyelitis.
Cell. Immunol., 19:91-98, 1975.
38. Griffin, D.E.; Johnson, R.T.
Cellular Immune Response to Viral Infection: In Vitro Studies of Lymphocytes from Mice Infected with Sindbis Virus.
Cell. Immunol., 9:426-434, 1973.
39. Bhan, A.K.; Reinisch, C.L.; Levey, R.H.; McCluskey, R.T.; Schlossman, S.F.
T-Cell Migration into Allografts.
J. Exp. Med., 141:1210-1215, 1975.
40. Volkert, M.; Marker, O.; Bro-Jorgensen, K.
Two Populations of T Lymphocytes Immune to the Lymphocytic Choriomeningitis Virus.
J. Exp. Med., 139:1329-1343, 1974.
41. Mayer, V.; Halim Ibrahim, A.; Gajdosova, E.
Viral Infection and Resistance in Immunosuppressed Host III. Intracerebral Challenge with Sindbis Virus in Immunized or Interferon Inducer Given Mice.
Acta Virol., 17:29-40, 1973.
42. Nathanson, N.; Cole, G.A.
Immunosuppression: a means to assess the role of the immune response in acute virus infections.
Fed. Proc., 30:1822-1830, 1971.
43. Zlotnik, I.; Smith, C.E.G.; Grant, D.P.; Peacock, S.
The Effect of Immunosuppression on Viral Encephalitis, with Special Reference to Cyclophosphamide.
Br. J. exp. Path., 51:434-439, 1970.
44. Neta, R.; Salvin, S.B.
Specific Suppression of Delayed Hypersensitivity: The Possible Presence of a Suppressor B Cell in the Regulation of Delayed Hypersensitivity.
J. Immunol., 113:1716-1725, 1974.

45. Kerckhaert, J.A.M.
Influence of Cyclophosphamide on the Delayed Hypersensitivity in the Mouse after Intraperitoneal Immunization. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 125 C:559-568, 1974.
46. Lagrange, P.H.; Mackaness, G.B.; Miller, T.E.
Potentiation of T-Cell-Mediated Immunity by Selective Suppression of Antibody Formation with Cyclophosphamide. *J. Exp. Med.*, 139:1529-1539, 1974.
47. Blanden, R.V.
Mechanisms of Recovery from a Generalized Viral Infection: Mousepox. I. The Effects of Anti-Thymocyte Serum. *J. Exp. Med.*, 132:1035-1054, 1970.
48. Rock, G.A.W., Weeb, H.E.
Antilymphocyte Serum and Tissue Culture Used to Investigate Role of Cell-mediated Response in Viral Encephalitis in Mice. *Br. Med. J.*, 4:210-212, 1970.
49. McFarland, H.F.
In Vitro Studies of Cell-Mediated Immunity in an Acute Viral Infection. *J. Immunol.*, 113:173-188, 1974.
50. Cantor, H.
Two Stages of development of Lymphocytes. Cell Interactions, Proc. of the third Lepetit Colloquium, 172-182, Ed. Luigi G. Silvestri, Milan 1971.
51. Baker, Ph.J.; Reed, N.D.; Stashak, Ph.W.; Amsbaugh, D.F.; Prescott, B.
Regulation of the Antibody Response to Type III Pneumococcal Polysaccharide. I. Nature of Regulatory Cells. *J. Exp. Med.*, 137:1431-1441, 1973.
52. Braley-Mullen, H.
Regulatory role of T Cells in IgG Antibody Formation and Immune Memory to type III Pneumococcal Polysaccharide. *J. Immunol.*, 113:1909-1920, 1974.

Abreviaturas utilizadas

- CN : Células de bazo normal
CS : Células de bazo sensibilizados
CY : Ciclofosfamida
PHA : Fiebre Hemorrágica Argentina
i.c. : intracerebral
i.p. : intraperitoneal
p.i. : post-infección
SNC : Sistema nervioso central
V : Virus Junín cepa XJ
XJ : cepa prototipo del virus Junín

Ciclofosfamida



DR. MARCELO J. FIGERIO
PROFESOR REGULAR ADJUNTO
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA
Y PARASITOLOGIA

Marta Rosa Nejamkis