

Tesis de Posgrado

Biogénesis de partículas interferentes y su posible rol en las infecciones por virus Junín

Help, Guillermina Ida

1980

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:

Help, Guillermina Ida. (1980). Biogénesis de partículas interferentes y su posible rol en las infecciones por virus Junín. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1616_Help.pdf

Cita tipo Chicago:

Help, Guillermina Ida. "Biogénesis de partículas interferentes y su posible rol en las infecciones por virus Junín". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1616_Help.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOGENESIS DE PARTICULAS INTERFERENTES Y SU POSIBLE ROL
EN LAS INFECCIONES POR VIRUS JUNIN

AUTOR : Guillermina I. Help

DIRECTOR : Dra. Celia E. Coto de Ravaschino

LUGAR DE TRABAJO : Cátedra de Virología.

Departamento de Química Biológica

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

A MIS PADRES

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Celia E. Coto de Ravaschino por su infatigable estímulo y generosa dirección desde mis comienzos en la investigación científica y muy especialmente durante el desarrollo de este trabajo.

A Elsa B. Damonte, Susana E. Mersich, Marta E. León, Ana C. D'Aiutolo, María del Carmen Vidal y Jorge S. Lampuri, amigos y compañeros de trabajo.

A Mabel E. Prado por la tarea dactilográfica realizada.

INDICE

<u>INTRODUCCION</u>	1
<u>Propiedades generales de las partículas interferentes</u>	3
a.- Interferencia	3
b.- Carácter defectivo	7
c.- Enriquecimiento	10
<u>Obtención de partículas interferentes</u>	11
Detección	12
<u>Partículas interferentes "in vivo"</u>	15
<u>Partículas defectivas en las infecciones persistentes "in vitro"</u> ...	18
<u>Partículas defectivas en las infecciones por Arenavirus</u>	22
Participación de las partículas interferentes de Arenavirus en las infecciones "in vivo"	24
<u>Antecedentes sobre el virus Junín</u>	29
Objetivos del presente trabajo	31
 <u>MATERIALES Y METODOS</u>	 32
Virus	32
Cultivos celulares	33
Preparación de stocks de virus Junín	37
Determinación de la infectividad	37
Neutralización de la actividad interferente	40
Ensayos de interferencia viral	41
Pasajes concentrados de virus	45

Inmunofluorescencia	46
Técnicas de inducción de virus en las sublíneas persistentemente infectadas	47
Inducción de antígenos virales y su detección mediante inmunofluorescencia	49
<u>RESULTADOS</u>	50
SECCION I	
<u>Evidencias de actividad interferente en los stocks de virus Junín y en sobrenadantes de líneas celulares persistentemente infectadas.</u> ..	51
<u>PARTE I: Evidencias de actividad interferente en los stocks de virus Junín preparados "in vivo" e "in vitro"</u>	52
a.- Detección de la actividad interferente en cultivo de tejidos ...	52
b.- Detección de la actividad interferente presente en los stocks de virus utilizando como sistema el ratón lactante	58
<u>PARTE II: Actividad interferente en sobrenadantes de líneas celulares persistentemente infectadas con virus Junín</u>	61
a.- Detección de la actividad interferente utilizando cultivo de tejidos	61
b.- Detección de la actividad interferente presente en sobrenadantes de líneas celulares persistentemente infectadas utilizando ratones lactantes	65
<u>PARTE III: Caracterización del agente interferente</u>	68
1.- Neutralización con inmunosuero anti-Junín	69
2.- Sensibilidad a solventes de lípidos	69

3.- Sensibilidad a la temperatura	70
4.- Sedimentación de la actividad interferente	71
5.- Dilución de la interferencia	73
6.- Presencia de actividad interferente en el medio intracelular ...	74
7.- Variación de la actividad interferente en función del tiempo ...	76

SECCION II

<u>Inducción de partículas interferentes</u>	81
--	----

PARTE I: Inducción de partículas interferentes en cultivos

<u>celulares</u>	82
------------------------	----

a.- Inducción de partículas interferentes por pasajes con- centrados en cultivo de tejidos	82
---	----

b.- Influencia de la célula huésped sobre la evolución de la infectividad e interferencia de los sucesivos pasajes	83
---	----

c.- Influencia del stock utilizado para iniciar los pasajes concentrados, sobre la infectividad y actividad interfe- rente de los mismos	85
--	----

d.- Caracterización de la actividad interferente inducida en cultivo de tejidos	87
--	----

1.- Neutralización de la actividad interferente con immuno- suero anti-Junín	87
---	----

2.- Sensibilidad al calentamiento	88
---	----

3.- Sensibilidad a la irradiación con luz UV	89
--	----

4.- Filtración del agente interferente	90
--	----

5.- Variación de la interferencia en función de la concen- tración relativa de partículas interferentes	92
--	----

6.- Momento del ciclo de replicación del virus estándar en el cual se produce el máximo de interferencia	92
7.- Interferencia heterotípica y heteróloga	93
<u>PARTE II: Inducción de partículas interferentes en animales de experimentación</u>	96
a.- Inducción de partículas interferentes por pasajes concen- trados de virus Junín en cerebro de ratón lactante	96

SECCION III

<u>Implicancias de las partículas interferentes en las infecciones con virus Junín</u>	98
<u>PARTE I: Infección primaria</u>	99
. Aparición de actividad interferente durante la multiplicación de virus Junín XJC13 "in vivo"	99
. Aparición de actividad interferente durante la multiplicación de virus Junín "in vitro"	100
. Influencia de distintas proporciones de partículas interferen- tes sobre el crecimiento del virus estándar	101
<u>PARTE II: Infección persistente</u>	103
. Características virológicas de las sublíneas VRJ-3 y VRJ-4	103
a.- Liberación espontánea de virus	103
b.- Producción de partículas interferentes	104
c.- Síntesis de antígenos virales en la sublínea VRJ-4	106
. Inducción de virus infeccioso en la sublínea VRJ-3	106
. Inducción de virus infeccioso y/o partículas interferentes en la sublínea VRJ-4	108

. Inducción de antígenos virales en la sublínea VRJ-4	110
a.- Cocultivo con células Vero	110
b.- Tratamiento con Actinomicina D	111
c.- Tratamiento con cicloheximida	112
<u>DISCUSION</u>	113
. Características de la actividad interferente	116
. Inducción de partículas interferentes	121
. Interrelación entre partículas infectantes e interferentes durante la infección primaria	125
. Relación entre partículas infectantes e interferentes en la etapa de persistencia viral	127
<u>RESUMEN</u>	131
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	133

ABREVIATURAS

FHA : Fiebre Hemorrágica Argentina.

PI : partículas interferentes.

DI : partículas defectivas interferentes.

ADN : ácido desoxiribonucleico.

ARN : ácido ribonucleico.

VSV : virus de la estomatitis vesicular.

NDV : virus de la enfermedad de Newcastle.

LCM : virus de la coriomeningitis linfocitaria.

ACP : acción citopatogénica.

UFP : unidad formadora de placa.

UHA : unidad hemoaglutinante.

F.I. : foco de interferencia.

CTDI50 : cultivo de tejido, dosis infectante 50%.

DL50 : dosis letal 50%.

PBS : buffer salino fosfatado.

Act D : actinomicina D.

p.i. : post-infección.

m.i. : multiplicidad de infección.

i.c. : intracerebral.

t_s : termosensible.

log : logaritmo en base 10.

INTRODUCCION

La multiplicación de un virus en una célula sensible da origen a una progenie que se libera más o menos rápidamente al medio exterior.

La madurez de esta progenie dependerá de la interacción entre el virus parental y la célula huésped infectada, en un medio ambiente favorable. Sin embargo, aún en las mejores condiciones experimentales la proporción de viriones en la progenie que poseen capacidad infectiva, varía entre un 0,0001 % y un 10 % (1) cuando se trata de virus animales. Esto significa que de cada 100 partículas virales producidas sólo 10 más o menos pueden dar origen a un nuevo ciclo de multiplicación. Los 90 restantes son virus que por diferentes causas han perdido su potencial replicativo, aún cuando algunos conserven la capacidad infectante.

Varios son los factores que contribuyen a la existencia de esta descendencia anómala. En general, la célula infectada produce un exceso de componentes virales; además, una cierta proporción de los virus durante su crecimiento o por el manipuleo al cual son sometidos, sufren una inactivación irreversible; otro porcentaje corresponde a partículas virales genéticamente defectivas, ya sea por mutaciones o deleciones en su genoma, por pérdida de alguna pieza del mismo, si es que se trata de un virus cuyo genoma es segmentado, o incluso por la falta completa de su ácido nucleico, dando origen a viriones vacíos (2). Finalmente, existen partículas virales con alteración en su envoltura que impiden la correcta adsorción a la célula huésped debido a modificaciones de los sitios específicos de fijación.

Es decir, la descendencia que resulta de la replicación de un virus en una célula está integrada por un porcentaje bajo de partículas infectantes,

y una población defectuosa, incapaz de autoreplicarse y con un espectro de anomalías que varía entre las meramente estructurales y las genéticamente irreversibles.

Si bien la mayoría de estas partículas virales son incapaces de iniciar un ciclo de replicación, pueden participar de interacciones genéticas cuando se producen infecciones múltiples y reducir o incrementar el rendimiento del virus estándar (3).

La existencia de partículas defectivas fué comunicada inicialmente por P.Von Magnus (4) en 1947 y ampliada en 1951 (5), en base a observaciones hechas sobre la multiplicación del virus de Influenza en huevos embrionados. En sus investigaciones Von Magnus descubrió que luego de sucesivos pasajes concentrados en este huésped, los stocks de virus Influenza sufrían una pérdida de su capacidad infectante pero no en el número de partículas físicas, las cuales podían ser detectadas por hemoaglutinación.

El virus recuperado de los sucesivos pasajes concentrados presentaba características biológicas que lo diferenciaban de la cepa original, denominada "estándar", como ser un menor potencial patógeno tanto "in vitro" como "in vivo", y la capacidad de interferir con la multiplicación del virus parental.

En los años posteriores se descubrió una gran variedad de sistemas virus-huésped en los cuales se producía este fenómeno de interferencia homóloga (6) entre ellos figuran los virus: Rift Valley fever, Estomatitis Vesicular (VSV), Paperas, Sendai, SV40, Polioma, siendo en la actualidad un hecho generalizado que abarca la casi totalidad de los grupos de virus animales y algunos vegetales (7) y bacteriofagos (8).

En el cuadro N° 1 se resumen los principales virus animales ARN y ADN

capaces de dar origen a partículas defectivas. Si bien estas partículas no han sido específicamente caracterizadas en todos los sistemas, existen evidencias suficientes basadas en la interferencia homóloga que se produce por pasajes concentrados, como para incluirlas en ese cuadro.

PROPIEDADES GENERALES DE LAS PARTICULAS INTERFERENTES

Los experimentos realizados por Von Magnus indicaban que luego de sucesivos pasajes concentrados del virus de Influenza (5) a alta multiplicidad de infección se producía una inhibición de la multiplicación del virus estándar. Es decir que una de las primeras características que se detectó de las partículas defectivas es su capacidad de interferir con la multiplicación del virus parental. La segunda está relacionada con su inhabilidad para propagarse en ausencia de un virus "helper", en este caso, el mismo que les dió origen. Estas dos características, la de replicar en presencia del estándar y la de interferir con su multiplicación, traen como consecuencia la tercer propiedad que poseen y que consiste en su enriquecimiento a expensas y en detrimento del virus "helper".

a.- INTERFERENCIA

Existen varios métodos para medir la actividad interferente; ellos se basan en la detección de la inhibición que se produce en la actividad citolítica, en la patogenicidad o en el rendimiento del virus estándar cuando se hace una infección mixta (virus estándar + interferente), en relación a un control.

CUADRO N°1Presencia de partículas defectivas en los virus ARN y ADN

<u>ARN</u>		
FAMILIA	GENEROS	ESPECIE
PICORNAVIRIDAE	ENTEROVIRUS	Polio
TOGAVIRIDAE	ALFAVIRUS	Sindbis
ORTOMIXOVIRIDAE	INFLUENZAVIRUS	Influenza
RHABDOVIRIDAE	VESICULOVIRUS	VSV
	LISAVIRUS	Rabia
ARENAVIRIDAE	ARENAVIRUS	LCM, Junín, Paraná Pichindé
REOVIRIDAE	REOVIRUS	Reo
RETROVIRIDAE	ONCOVIRUS TIPO C	Sarcoma murino
PARAMIXOVIRIDAE	PARAMIXOVIRUS	NDV, Sendai, Paperas
	MORBILIVIRUS	Sarampión
<u>ADN</u>		
PAPOVAVIRIDAE	POLIOMAVIRUS	SV ₄₀ y Polioma
HERPESVIRIDAE	HERPESVIRUS	Herpes y Seudorabia
ADENOVIRIDAE	MASTADENOVIRUS	Adeno
PARVOVIRIDAE	ADENO-ASOCIADOS	AAV tipo 2

La interferencia mediada por partículas defectivas tiene propiedades que permiten diferenciarla de otro tipo de interferencia.

I. Es homóloga, es decir, actúa frente al virus que originó dichas partículas o con virus serológicamente relacionados.

II. Ocurre en una etapa intracelular de la multiplicación del estándar. Mediante distintas técnicas puede determinarse que no bloquea los pasos de adsorción, penetración o liberación del virus parental. En la mayoría de los casos, la irradiación previa de las partículas defectivas anula su capacidad inhibitoria (9)(10), lo cual indicaría que necesitan que su genoma sea funcional para producir interferencia.

Se han detectado, sin embargo, partículas pertenecientes a virus del grupo Arena (11)(12) cuya actividad interferente resultó estable frente a la luz UV.

III. La interferencia no está condicionada a la presencia de interferón (13) aunque se conocen partículas defectivas capaces de inducirlo (14).

Mecanismo por el cual se produce la interferencia

El mecanismo por el cual las partículas defectivas interfieren con la multiplicación del virus parental no está aún aclarado aunque en la mayoría de los casos se encuentra involucrada la etapa de replicación del ácido nucleico viral (11)(12)(15)(16)(17)(18). La excepción sería el caso del virus Polio, cuyas partículas defectivas son deficientes en un 15% de ARN respecto del estándar, e incapaces de sintetizar el precursor de las proteínas de la cápside del virión, aunque pueden llevar a cabo todas las otras funciones virales (19). Según Baltimore y Col (20) la interferencia ocurriría en dos

niveles del ciclo de crecimiento del estándar. El primero correspondería a la etapa de síntesis de proteínas ya que en las células doblemente infectadas con el virus parental y las partículas defectivas habría dos clases de poliribosomas (unos conteniendo el mRNA estándar y otros, el mRNA de las partículas defectivas) pero sólo aquellos sintetizarían el precursor de las proteínas de la cápside.

El otro nivel de interferencia sería en la encapsidación del ARN viral, ya que habría dos tipos de ARN con posibilidades de ser encapsidados, estándar y defectivo, pero uno solo de ellos sería funcional.

Papel de la célula huésped

La célula huésped tiene un rol importante en la expresión de la capacidad interferente de las partículas defectivas. Las funciones celulares involucradas se desconocen hasta el presente, sin embargo se sabe que distintas líneas de células inoculadas con una misma preparación de virus estándar y partículas defectivas pueden dar valores distintos de interferencia (21)(22)(23)(24)(25) y (26) e incluso en algunas no producirse este fenómeno (27)(28)(29). Por su parte Darnell y Koprowsky (30) trabajando con una cepa de ratones resistentes a la infección con el virus West Nile encontraron que esa resistencia les era conferida por un gen dominante que favorecía la interferencia mediada por partículas DI.

Un hecho singular que enfatiza el papel de la célula huésped en la expresión de la interferencia la proporciona el virus Semliki Forest, el cual, luego de sucesivos pasajes concentrados en células de embrión de pollo, ne-

cesita un pasaje adicional en células murinas para que se manifiesten las partículas defectivas generadas en los pasajes anteriores (31).

Sin embargo, la evidencia más directa que se tiene acerca de la importancia del huésped en la inducción de partículas defectivas, la proporciona el trabajo de C. Yong Kang and Rae Allen (32) quienes demostraron que este mecanismo de inducción requiere una función de la célula huésped que es sensible a la Actinomicina D (Act. D).

b.-CARACTER DEFECTIVO

Las partículas defectivas son incapaces de replicar en ausencia de un virus "helper", esto implica que en su genoma debe existir alguna lesión en un gen esencial. El "helper" proveería entonces la(s) función(es) necesaria(s) para la multiplicación de estas partículas.

Naturaleza del defecto

Los resultados obtenidos con partículas defectivas de los diferentes grupos de virus indican que la mayoría de las veces esa lesión es una deleción (21)(33)(34)(35), y que en el caso de los virus cuyo genoma es segmentado las partículas interferentes carecen de 1 ó más piezas de su ácido nucleico, como por ejemplo Reovirus (36), Influenza (37) y Pichinde (38).

En otros casos, estas partículas tienen un genoma de aproximadamente el mismo tamaño que el del virus estándar, el cual se ha originado por una deleción seguida de una duplicación y que puede incluir, además, incorpora-

ción de ADN del huésped o polimerización de trozos del ADN viral solo o unido a ADN celular (39)(40)(41)(42).

Mecanismo de la delección

El mecanismo por el cual se produce una pérdida de material genético durante la replicación del virus estándar para originar las partículas defectivas no está aún aclarado, pero dependería de las características del genoma viral.

La delección en el ácido nucleico defectivo puede ser terminal o interna, e incluso en el caso de virus de genoma segmentado hay pérdida de una o más piezas del mismo (36)(37)(38).

Estas delecciones se producen por recombinaciones intra e intermoleculares del ácido nucleico durante la etapa de replicación viral, faltando así secuencias específicas del mismo.

Si bien la consecuencia de estos eventos será un genoma defectivo con menor contenido en ácido nucleico viral, no necesariamente su tamaño resulta siempre inferior al del estándar, ya que se han detectado duplicaciones en tandem y/o incorporación de material genético del huésped en las partículas defectivas, que compensan la pérdida sufrida (39)(40)(41)(42)(43).

En un principio se pensó que el tipo de partículas DI que se generaba por pasajes concentrados estaba genéticamente predeterminado para cada clon de virus estándar (44)(45); sin embargo los resultados obtenidos por Holland y Col (28) con el virus VSV, y más recientemente por Janda y Col (46) trabajando con la mutante t_s-52 del virus de Influenza, indican que se trata de un

proceso al azar, en el cual las partículas defectivas se originan durante la preparación de un stock de virus clonado y luego son amplificadas por pasajes a alta multiplicidad de infección. En algunos casos esas partículas emergen durante la formación de una placa por un virus infeccioso ya que la misma requiere múltiples ciclos de infección que en general son a alta multiplicidad (46). Es decir que las partículas defectivas aparecerían al originarse una placa en el momento de clonar el virus, o durante la preparación de un stock viral con ese clon.

Los genomas defectivos así obtenidos deben reunir ciertas características para dar lugar a partículas defectivas, como ser:

I.- Poseer el sitio de iniciación para su replicación. Esta sería la única secuencia teóricamente indispensable para dar origen a partículas DI.

II.- Servir como templados para la polimerasa viral.

III.- Ser reconocidos por las proteínas estructurales del virión, para su encapsidación. Esto implica probablemente alguna secuencia específica para la interacción de las proteínas de la cápside con el ácido nucleico.

IV.- Tener la cantidad mínima necesaria de ácido nucleico para formar con las proteínas una estructura estable. Se ha demostrado que en el caso de VSV esa cantidad es de aproximadamente un 25% del genoma estándar (44). mientras que el SV40 requiere un 70% del ADN parental (47).

Cuando la delección involucra trozos mayores de ácido nucleico que los permitidos, la duplicación en tandem de algunas secuencias específicas y/o la incorporación de material genético de la célula huésped pueden reconstruir el genoma original y cumplir así, con el requisito de ser encapsidado.

c. -ENRIQUECIMIENTO

Otra de las propiedades de las partículas defectivas es su habilidad para incrementar su número a expensas del virus estándar. Esto significa que la proporción de estas partículas en la progenie de una infección mixta (co-infección con virus estándar) es superior a la existente en el inóculo. Si este requisito se cumple, es decir, si se produce una amplificación de la cantidad inicial de partículas DI por pasajes sucesivos, llega un momento en que pueden ser detectadas.

Este enriquecimiento selectivo indica que en alguna etapa del ciclo de crecimiento del virus estándar debe estar favorecida la síntesis de PI. Los puntos críticos durante la multiplicación viral serían la replicación del ácido nucleico y la encapsidación. Existen evidencias, en el caso del virus Polio, de una replicación y encapsidación preferenciales del genoma defectivo respecto del estándar (48). Sin embargo, en la mayoría de los sistemas estudiados, aunque el mecanismo responsable no se conoce con exactitud, se piensa que tanto la interferencia como el enriquecimiento involucran la etapa de replicación del ácido nucleico (27)(49)(50)(51).

Cuando una célula resulta doblemente infectada, o en ella se generan genomas defectivos, se produce una competencia por algún factor limitante del proceso de replicación. Ese factor es, generalmente, la polimerasa específica del virus, y un desplazamiento del equilibrio hacia la copia del ácido nucleico defectivo indica una mayor afinidad de la enzima hacia él.

El mecanismo de enriquecimiento podría explicarse, entonces, por un si-

tio de iniciación en el genoma DI con mayor afinidad por la polimerasa, o por un mayor número de sitios de iniciación en la cadena. El primer caso correspondería a algunos virus ARN que tendrían sitios de iniciación de elevada afinidad (6)(26), mientras que para ciertos virus ADN se ha demostrado que las partículas defectivas poseen dos o más sitios de iniciación (6)(41)(52) obtenidos por recombinación o duplicaciones en tandem.

OBTENCION DE PARTICULAS DEFECTIVAS

La mayor parte de los intentos para caracterizar las partículas interferentes se vieron demorados por la dificultad que presentaba su purificación, y principalmente su separación del virus estándar. Cuando estas partículas tienen diferencias de tamaño o densidad respecto del virus parental pueden utilizarse métodos físicos de separación como ser gradientes zonales o de equilibrio. Tal es el caso de los virus de la rabia (53)(54), Polio (33), VSV (55). En este caso Doyle y Holland (56) proponen un método más riguroso de purificación, que asegura una contaminación menor de 5 UFP de virus VSV infeccioso en 0,2 mg de partículas DI puras. La técnica consiste esencialmente en someter el sobrenadante de cultivos infectados, previamente concentrado, a cuatro centrifugaciones zonales en sacarosa, tomando las precauciones necesarias para evitar el arrastre de partículas estándar. Esto representa una purificación de las partículas defectivas superior a 10^9 veces respecto del virus parental.

Otro método utilizado bastante exitosamente con virus Papova (47)(57) y Reo (58)(59) consiste en complementar partículas DI, no con el virus estándar

dar, sino con mutantes t_s , en condiciones en que la progenie que se produce es exclusivamente de partículas defectivas. Así, por ejemplo, se observó(58) que la coinfección de células L con nucleoides provenientes de partículas defectivas de Reovirus y una mutante t_s determinada, a la temperatura no permisiva (39°C) originaba sólo las partículas DI, es decir que la función ausente en el virus defectivo era provista por la mutante; sin embargo, aquél era incapaz de complementar la deficiencia de la t_s . Esta falta de multiplicación de la mutante a 39°C durante la infección mixta no se debía a un fenómeno de interferencia, ya que a la temperatura permisiva (31°C) se producía la replicación de ambos virus.

En algunos sistemas virales se ha empleado el sobrenadante de cultivos persistentemente infectados como fuente de partículas defectivas ya que su proporción en la progenie se aproxima al 100% (12)(60)(61). Se sabe que las mismas están contaminadas con una baja proporción de partículas infecciosas las cuales se detectan por inoculación en cultivos normales (61). Estas no pueden separarse por los métodos habituales, como ser gradientes zonales o isopícnicos, debido a que las densidades respectivas son similares (62).

DETECCION

Existen métodos que permiten detectar partículas interferentes, aún en presencia de virus estándar; los más utilizados se basan en:

I.-La capacidad interferente: que poseen sobre distintas propiedades biológicas del virus estándar. En general se estudia la inhibición de la ACP o

de la formación de placas en cultivos, o la disminución de la mortalidad y el aumento del tiempo de sobrevida en animales de experimentación.

Esta actividad puede cuantificarse, en forma aproximada, ya sea en base a la interferencia con un determinado número de placas o con el rendimiento del virus estándar luego de un ciclo de multiplicación.

II.- Propiedades fisicoquímicas diferentes

Algunos virus defectivos han sufrido una delección en su genoma lo suficientemente importante como para presentar un comportamiento distinto del estándar en gradientes zonales e isopícnicos. El prototipo de este grupo, es sin duda, el virus VSV cuyas partículas defectivas tienen entre 1/3 y 2/3 de su genoma y por lo tanto menor S, lo cual permite su separación en un gradiente de sacarosa. La observación de una banda opalescente con menor velocidad de sedimentación que el estándar en estos gradientes es indicativa de la presencia de partículas DI (32).

III.- Formación de focos de interferencia

Uno de los métodos de detección más sensibles es el propuesto por Popescu y Lehmann-Grube (63) para virus defectivos LCM. El mismo consiste en inocular el material interferente junto con una concentración de virus estándar capaz de lisar el cultivo; las células coinfectadas por ambos virus resultan protegidas del efecto citopático por la acción de las partículas defectivas. Este fenómeno se visualiza como el negativo de un ensayo de placas, en el cual sobre un cultivo lisado se observan áreas de células viables. Los auto-

res explican esta protección celular por la existencia de un factor que se generaría en la célula coinfectada, y luego migraría a las células vecinas. Este factor sería de naturaleza particulada y tendría la capacidad de inhibir la ACP y la multiplicación del virus estándar (63).

IV.- Amplificación

Holland y Villareal (64) desarrollaron un método de amplificación de partículas defectivas, mediante el cual puede determinarse el número de partículas DI en un inóculo conociendo la proporción de las mismas en la progenie de una infección mixta hecha en células sensibles y utilizando 100 UFP por célula de virus estándar. En base a la cantidad de partículas defectivas producidas por esta amplificación puede calcularse, por extrapolación, su concentración inicial. Se determinó así que se necesitan aproximadamente 5×10^6 partículas DI/ml en el inóculo para que sean amplificadas lo suficiente para ser detectadas como una banda opalescente en un gradiente de sacarosa.

PARTICULAS INTERFERENTES "IN VIVO"

La existencia de partículas defectivas no está circunscripta al sistema "in vitro" sino que han sido detectadas también en animales de experimentación. En realidad, los estudios iniciales de Von Magnus con el virus de Influenza, demostraban que tanto en ratones como en huevos embrionados se producía la síntesis de partículas interferentes (65). Sin embargo, recién en los últimos años pudieron ser caracterizadas bioquímicamente las generadas "in vivo". Así fué como Holland y Villareal (64) demostraron que el virus VSV producía partículas interferentes en cerebro de ratones infectados las cuales resultaron idénticas a las obtenidas en cultivos celulares.

Algo similar se observó en el caso de los virus de la Rabia (64) y LCM (66). Lehmann- Grube y Popescu (66) estudiaron la generación de PI en los distintos órganos de ratones lactantes y adultos inoculados con virus LCM por vía intracerebral e intraperitoneal. Encontraron que en ambos casos y por ambas vías se producían partículas defectivas, siendo más eficiente el sistema ratón-lactante. Estas partículas detectadas "in vivo" poseían propiedades biológicas similares a las obtenidas por pasajes concentrados en células L o a partir de cultivos persistentemente infectados (63).

Sin embargo, la mayor parte de los ensayos hechos en animales de experimentación tropezaron con la complejidad propia del huésped, que hacía dificultosa la interpretación de los resultados obtenidos. Por esta razón los estudios "in vivo" se centraron fundamentalmente en la inoculación de dosis elevadas de partículas DI y la observación de las consecuencias que esto tenía sobre la evolución de la enfermedad del animal.

Los estudios iniciales hechos por Bernkopf (67) y Von Magnus (5) con virus defectivos de Influenza obtenidos por pasajes concentrados, demostraban que estos no sólo no producían efectos letales sobre el huésped, sino que eran capaces de protegerlo frente al desafío con el virus estándar. Esa protección desaparecía si el material proveniente de los pasajes concentrados se inoculaba diluído. Resultados similares se obtenían si se trabajaba con virus previamente sedimentado (68) lo cual hizo que diversos investigadores atribuyeran este efecto protector a partículas defectivas o incompletas del virus de Influenza, aún cuando estas no pudieran ser aisladas y purificadas. Más recientemente, Gamboa y col. (69) determinaron que el efecto protector debido a las DI de Influenza era más notorio si se utilizaban ratones de 7 semanas en vez de 3 semanas.

En los últimos años, Holland y sus colaboradores han estudiado en profundidad el efecto de las partículas defectivas de VSV sobre la evolución de la enfermedad en el ratón (56)(64)(70)(71). Así, por ejemplo, encontraron que los animales tratados con DI en vez de sufrir una muerte rápida, presentaban una parálisis progresiva, que comenzaba por las extremidades posteriores, con lomos arqueados y el pelo erizado y en desorden. Ellos concluyeron que las partículas interferentes habían atenuado la infección viral y modificado la evolución de la enfermedad del huésped.

Crick y Brown (72) encontraron algunas discrepancias con estos resultados, ya que utilizando partículas defectivas inactivadas con acetiletlenimina (AEI), que destruye su capacidad interferente, se mantenía la protección temprana que aquéllos atribuían a los virus DI. Esta interferencia, que no era mediada por interferón, se producía también si se trabajaba con viriones tra-

tados con AEI y ocurría no sólo frente a la cepa homóloga, sino con cepas heterólogas de VSV, y con virus tales como Rabia y Fiebre Aftosa.

El otro modelo estudiado en animales de experimentación es la necrosis cerebelar inducida por el virus LCM en ratas. Welsh y col.(73) encontraron que las partículas defectivas de LCM podían interferir con la infección neurológica producida por el virus estándar "in vivo".

Los autores postulan dos posibles mecanismos para explicar este hecho: a) las DI inhibirían la síntesis de virus LCM y la producción de antígenos virales por interferencia directa; b) las DI inducirían una respuesta inmunológica, específica o no, que protegería los animales de la infección con virus estándar. Los resultados experimentales obtenidos sugieren que la acción del virus DI no es de tipo inmunológico, siendo entonces más probable el primer mecanismo propuesto.

El efecto profiláctico obtenido por la inoculación de partículas defectivas, hizo que varios investigadores las tuvieran en consideración para la preparación de vacunas. Más aún, Mc Laren y Holland (74) demostraron que las cepas vacunantes de virus Polio contenían una gran proporción de partículas DI. Cuando estas cepas se clonaban, regeneraban dichas partículas con mayor frecuencia que las cepas virulentas.

Sin embargo, el empleo de virus defectivos con propósitos inmunizantes debe ser tomado con precaución. La persistencia de las DI está condicionada a pequeñas cantidades de virus estándar en el inóculo, y si bien su presencia puede resultar enmascarada por la actividad interferente de aquéllas, el conjunto de ambas es capaz de originar infecciones crónicas en el animal, con un deterioro progresivo del mismo.

PARTICULAS DEFECTIVAS EN LAS INFECCIONES PERSISTENTES "IN VITRO"

El establecimiento de infecciones persistentes en cultivos celulares es un hecho habitual para la mayoría de los grupos de virus (75)(76). Hasta el presente, de los diferentes mecanismos propuestos para explicar esta persistencia, cinco fueron motivo de serias consideraciones(77).

- I.- Producción de partículas DI (25)
- II.- Generación de mutantes termosensibles t_s (76)
- III.- Producción de interferón (78)(79)
- IV.- Integración al genoma celular de copias ADN del ARN viral (80)(81) (82) de virus distintos de los Oncorna. En el caso de virus tumorales ARN y para algunos ADN este mecanismo es esencial para establecer y mantener la persistencia.
- V.- Síntesis de una proteína distinta del interferón (83)(84)

La participación de las partículas interferentes en infecciones persistentes ha sido demostrada en el caso de los virus LCM (85), Sindbis (36), Parana (60), Rabia (54), Sarampión (9), Sendai (87), Encefalitis japonesa (8 (88) y VSV (89)(90). Existen otros sistemas virales como ser: sarampión (91) (92)(93), Encefalomiocarditis (94), VSV (95) y Polioma (96), en los cuales a pesar de no haber establecido fehacientemente la existencia de partículas DI, las evidencias experimentales sugieren su intervención en esta clase de infecciones.

Los cultivos persistentemente infectados, presentan características comunes que podrían resumirse en las siguientes:

- a) Son resistentes a la sobreinfección con el virus homólogo, pero sensibles a virus heterólogos
- b) Se pueden detectar antígenos virales por inmunofluorescencia en un % variable de células.
- c) En algunos sistemas la infectividad en el medio extracelular muestra una evolución cíclica, con crisis esporádicas de acción citopatogénica en los primeros pasajes de las sublíneas.
- d) Estas se establecen más fácilmente a mayor multiplicidad de infección
- e) Las partículas virales liberadas por las sublíneas tienen menor potencial citolítico que la cepa parental, son no patógenas "in vivo" y capaces de interferir con la multiplicación del virus estándar.
- f) En general, no se necesita el interferón para mantener la persistencia (9)(54)(87)(89) aunque en algunos sistemas no puede descartarse su presencia (86)(97)
- g) Las DI son capaces de originar y mantener una infección crónica, si tienen como helper el estándar

Si bien existen sistemas virus-célula en los cuales los viriones defectivos son los únicos involucrados en el desarrollo de una infección persistente, en ciertas oportunidades se encuentran asociados a la selección de mutantes termosensibles (t_s) (91)(98) o son inducidos por pasajes concentrados de estas mutantes(99)(100)(101). Así mismo, como se mencionara en párrafos anteriores, es posible detectar en algunas de estas infecciones pequeñas cantidades de interferón. Sekellik and Marcus (14) encontraron una interacción original entre una partícula DI del virus VSV (VSV-DI-011) y la

célula huésped. El genoma de esta DI contiene un ARN pequeño de doble cadena que es un excelente inductor de interferón, el cual protege los cultivos frente a la descarga con el virus estándar. La producción de interferón en este sistema estaba condicionada a una síntesis continua de partículas DI.

Los posibles mecanismos involucrados en el establecimiento y mantenimiento de las infecciones persistentes son sumamente complejos, y los resultados obtenidos hasta el presente indican que existe en la mayoría de los casos una coparticipación más que un único mecanismo. Tal es el caso de las células L infectadas con VSV (78) en las cuales, Nishiyama concluyó, deben intervenir interferón, mutantes t_s y partículas DI para mantener la infección persistente. Resultados similares fueron comunicados por Ramseur y Friedman (79)(102).

Una última consideración que habría que hacer sobre este tema se relaciona con los factores responsables de la iniciación y el mantenimiento de una infección crónica que no necesariamente deben ser los mismos. En la fase de iniciación lo fundamental es prevenir el efecto citopático producido por el virus. Esto se ha logrado por medio de anticuerpos (98)(103), utilizando una mutante t_s a la temperatura no permisiva (104), pretratando con interferón (78)(102)(105), coinfectando con el virus estándar y partículas defectivas (9)(87)(89) o utilizando un virus poco adaptado al cultivo celular (106).

El mantenimiento de la persistencia en cambio está condicionado a la estabilización de alguno o varios de los mecanismos antes mencionado, como se observó para los virus Sindbis (86), Rabia (54), Sarampión (9)(98), Distemper canino (83), LCM (77) y VSV (101)(104)(107). Younger y col.(76)(101)

(144)(107) estudiaron en profundidad la interacción del virus VSV con las células L y encontraron que en ese sistema el mantenimiento de la infección crónica estaba relacionado a la selección de una mutante $t_s \text{ARN}^-$, aún cuando el cultivo se hubiera iniciado con mutantes $t_s \text{ARN}^+$ o con partículas defectivas. Esto indicaba que el genoma que se hacía predominante durante la persistencia podía diferir profundamente del que había originado la sublínea. En estos cultivos también era posible detectar indirectamente la producción de interferón.

PARTICULAS DEFECTIVAS EN LAS INFECCIONES POR ARENAVIRUS

Una de las propiedades más importantes de los Arenavirus es la capacidad de establecer una relación no citocídica con el huésped que parasitan, ya sea en el roedor, reservorio natural del agente (108)(109)(110)(111)(112)(113), o en cultivos celulares (60)(61)(85)(114)(115)(116)(117).

El virus LCM es el prototipo de este grupo, y el primero para el cual se describió el fenómeno de interferencia. Traub en 1938 (118) demostró que ratones persistentemente infectados con LCM exhibían un nuevo tipo de interferencia, que era homóloga y no dependía de la inmunidad humoral. Más tarde se vió que el interferón no estaba involucrado en este tipo de infecciones (13). Mims y Subrahmanyam (119) estudiando el mecanismo por el cual los ratones crónicamente infectados con LCM eran resistentes a la descarga con este virus descubrieron que si se aislaban los macrófagos de esos animales y los cultivaban "in vitro", estos también resultaban resistentes al desafío con el virus homólogo.

Entre los años 1960/70 se aislaron otros miembros del grupo Arenavirus: Tacaribe (120), Junín (121), Machupo (122), Amapari (113), Tamiami (109), Paraná (123), Pichinde (112), Latino y Lassa (124), la mayoría de los cuales pueden establecer infecciones crónicas en roedores silvestres, con transmisión horizontal y vertical del virus, mecanismo por el cual éste se mantendría en la naturaleza. A diferencia de lo que ocurre con LCM, en el caso de estos virus el fenómeno de persistencia "in vivo" no está aún demasiado estudiado, pero las evidencias experimentales que se poseen (125)(126)(127) muestran una gran analogía con el sistema LCM-Mus Musculus.

La persistencia del virus LCM en cultivos celulares fue comunicada inicialmente por Hotchin (128) y confirmada posteriormente por Benson utilizando células L (129). El sobrenadante de estos cultivos crónicamente infectados no inducía ACP en células normales, pero sí las protegía frente a la descarga con el virus estándar. Benson concluyó que esos sobrenadantes debían contener algún agente protector de naturaleza desconocida.

En los años subsiguientes fueron varios los autores que investigaron esta relación prolongada del virus LCM con distintos cultivos celulares (85) (130)(131)(132). Las características más notables eran la producción cíclica de virus en los primeros estadios de la infección, la ausencia de ACP y la presencia de antígenos virales en un gran porcentaje de células, a pesar de lo cual no podía detectarse virus infectante en el medio extracelular luego de un cultivo prolongado. Si estas células se inoculaban a ratones eran capaces de protegerlos frente a la descarga con LCM. La sublínea infectada era resistente a la sobreinfección con el virus homólogo, pero no frente a virus heterólogos como VSV, Vaccinia o Encéfalomiocarditis.

Lehmann-Grube y col. (85) encontraron que los cultivos persistentemente infectados con LCM aún cuando no producían virus infeccioso, liberaban partículas semejantes al virus estándar por su capacidad inmunogénica y su velocidad de sedimentación. Estos resultados fueron confirmados y profundizados por Welsh y col. (12) quienes determinaron que esas partículas eran neutralizables por inmunosuero anti-LCM, incapaces de replicar en ausencia del virus homólogo y relativamente resistentes a la irradiación con luz UV, lo cual los llevó a postular la existencia de partículas defectivas interferentes en estos sistemas celulares crónicamente infectados.

Staneck y Pfau (60), y Dutko y col.(38) llegaron a conclusiones similares luego de estudiar la interacción de los virus Paraná y Pichinde con células BHK₂₁/13S.

En el sistema Pichinde-BHK₂₁/13S (38) se analizó además la composición de los ARN_s de los virus estándar y defectivo. El perfil electroforético en gel de poliacrilamida indicó para el virus Pichinde la existencia de 6 componentes con coeficientes de sedimentación de 31, 28, 22, 18, 15 y 4-6S. Las partículas defectivas en ningún momento presentaron las especies 22 y 15S, y luego de 200 generaciones celulares también hubo una pérdida del componente 31S con aparición de una nueva especie 20S.

Un estudio similar hecho por Welsh y col. con las partículas defectivas de LCM (62) confirmaron la presencia de ARN_s de coeficientes 31, 28, 23 y 18S en el virus estándar, pero no pudieron detectar diferencias con el perfil electroforético correspondientes a los viriones DI.

En el Cuadro N°2, extraído del trabajo de Welsh y col.(62) están esquematizadas en forma comparativa las propiedades de los viriones estándar y defectivo de LCM.

PARTICIPACION DE LAS PARTICULAS INTERFERENTES DE ARENAVIRUS EN LAS INFECCIONES "IN VIVO"

La persistencia de los Arenavirus en roedores silvestres sólo es posible si existe:

- (a) una respuesta inmune incapaz de erradicar al agente o limitar su diseminación.

CUADRO N 2Propiedades de los viriones de LCM

	ESTANDAR	DEFECTIVO
Densidad (g/cm ³)	1,17	1,15 - 1,17
Ribosomas	+	+
Especies de ARN celular	28 S, 18 S	28 S, 18 S
Especies de ARN viral	31 S, 23 S	31 S, 23 S
ADN	-	N.H.
ARN infeccioso	-	N.H.
ARN polimerasa	-	N.H.
Transcriptasa inversa	-	-
Nucleocápside infecciosa	-	N.H.
Sensibilidad a la luz UV	+(alta)	+(baja)
Sensibilidad al rojo neutro	+(alta)	+(baja)
Antígeno fijador de complemento	+	+
Antígeno de fluorescencia	+	+
Antígeno inmunizante	+	+
Antígeno neutralizante	+	+
Potencial citolítico	+	-
Potencial interferente	?	+
Potencial replicativo	+	-

N.H. = No Hecho

+ = positivo

- = negativo

- (b) ausencia de actividad citolítica o citopatogénica producida por la multiplicación del virus en órganos vitales.

Los experimentos hechos "in vivo" con el virus LCM (133)(134) indican que el establecimiento del estado "carrier" en los ratones infectados sólo ocurre cuando la multiplicación viral aventaja al desarrollo de la respuesta inmune. Volkert y col. (133) inocularon ratones de 0 a 30 días de edad con LCM, y estudiaron:

- 1.- La aparición de inmunidad celular contra el antígeno viral.
- 2.- El % de esos animales que desarrollaba persistencia.

El 100% de los animales inoculados dentro de los 10 días de vida resultaron crónicamente infectados y en ninguno de ellos se detectó inmunidad celular. Por el contrario cuando se trabajó con animales de más de 20 días los resultados fueron completamente opuestos. Para ratones entre 10 y 20 días de edad, ambos parámetros tuvieron valores intermedios, es decir, se observó un aumento progresivo de la inmunidad celular y una disminución del número de animales que quedaban persistentemente infectados. Asimismo, estos autores pudieron revertir el estado "carrier" y producir la eliminación del virus en los ratones inoculados, transfiriéndoles células linfoides de ratones inmunes. El tratamiento con inmunosuero anti-LCM en dosis repetidas fue completamente ineficaz.

Las conclusiones generales de este trabajo fueron:

- 1.- En los animales persistentemente infectados se establece un estado de tolerancia inmunológica celular.
- 2.- Esta tolerancia es completa.

3.- Los anticuerpos son de escasa importancia en la erradicación del virus, aunque pueden tener efecto preventivo ante reinfecciones posteriores.

Lehmann- Grube (134) y col. obtuvieron resultados similares trabajando con el mismo sistema "in vivo", con lo cual se cumpliría con el primer requisito estipulado, (a) para que se produzca la persistencia.

En relación a la ausencia de actividad citolítica en los ratones "carrier" (b) durante mucho tiempo se pensó que debía existir en estos animales un fenómeno de interferencia homóloga que actuaría protegiendo los órganos y/o tejidos murinos de la actividad citopatogénica del virus estándar.

La estrecha relación que hay "in vitro" entre la presencia de partículas defectivas y la resistencia de un cultivo persistentemente infectado frente a la descarga con el virus parental, las señalaron como probables responsables de aquella interferencia. Más aún, actualmente se sabe que además de interferir con la replicación del virus homólogo y de enriquecerse a expensas de él, estas partículas tienen la propiedad de enmascarar su potencial citolítico (29).

Popescu y Lehmann-Grube (66) por su parte encontraron que en ratones recién nacidos inoculados con LCM, se originaban partículas defectivas cuyo título máximo era del orden de 10^7 partículas/g de tejido (medidas como unidades formadoras de focos de interferencia (UFI)) al 7º día p.i., en momentos en que el virus infeccioso comenzaba a disminuir. Luego de 1 o 2 meses ambos parámetros se estabilizaban alcanzando un equilibrio prolongado, con predominio del virus infeccioso. Este comportamiento se adecúa al modelo

propuesto por Huang (135), en el cual la interacción continua entre partículas defectivas, virus estándar y célula huésped, mostraría inicialmente una fluctuación cíclica de ambos tipos de partículas, para alcanzar luego un equilibrio mutuo en el cual las oscilaciones serían mínimas o nulas.

Si retomamos las condiciones planteadas al iniciar este tema, relacionadas con el establecimiento de la persistencia "in vivo" vemos que una de ellas, la (a), ha sido estrictamente comprobada, es decir que los ratones portadores de LCM carecen de una respuesta inmune a nivel celular capaz de erradicar el virus.

La persistencia de este agente en concentraciones elevadas dentro del organismo del huésped (10^8 - 10^9 UFP/g tejido) favorecería la génesis de partículas defectivas, las cuales actuarían protegiendo las células de los diferentes órganos del efecto citopatogénico causado por el virus. Conociendo las propiedades biológicas de estas partículas y sabiendo de su existencia en los ratones portadores de LCM, parece lógico suponer que ellas, junto con la falta de inmunidad celular, serían los principales factores involucrados en el establecimiento del estado "carrier".

ANTECEDENTES SOBRE EL VIRUS JUNIN

El virus Junín tiene como reservorio natural cricétidos silvestres de las especies *Calomys musculinus*, *Calomys laucha* y *Akodon azarae*. En *Calomys musculinus* atrapados en áreas endémicas se encontraron niveles altos de virus en sangre y órganos (125) mientras que en el laboratorio se comprobó que los animales infectados eliminaban virus por saliva y orina (125). Por estudios inmunohistoquímicos y de microscopía electrónica se detectó antígeno viral, brotación y acumulación de partículas con características de *Arenavirus* en las glándulas salivales de los roedores (135), lo cual estaría de acuerdo con la propagación del virus que se produce por transmisión vertical post-parto y transmisión horizontal, siendo éstas tanto mayores cuanto más prolongado el contacto (125). El estudio inmunológico de los animales persistentemente infectados no se ha encarado hasta el presente.

El comportamiento del virus Junín "in vitro" es similar al de otros miembros del grupo. Se caracteriza por multiplicar en una variedad de cultivos primarios y continuos sin producir efecto citopático, con excepción de las líneas HeLa y Vero (137) en las cuales el desarrollo de la actividad citolítica depende de la cepa de virus, la multiplicidad de infección y la célula huésped.

La línea Vero ha sido hasta el presente la más utilizada para estudiar el virus Junín. Como consecuencia de la infección entre el 3er. y 5to. día p.i. se inicia la ACP que muy raramente resulta irreversible, ya que las células que sobreviven son capaces de multiplicar y dar origen a una sublínea persistentemente infectada (114)(115)(116). Las características principales de estas sublíneas son:

- a) Se establecen sin dificultad; no requieren agregado de inmunosuero o condiciones nutricionales especiales.
- b) Son morfológicamente semejantes a un cultivo sin infectar. La velocidad de división también es similar a la de la línea Vero.
- c) Por inmunofluorescencia sólo se detecta antígeno citoplasmático en 0,1% (138) a un 20% (139) de las células.
- d) Los cultivos persistentemente infectados son resistentes a la sobreinfección con el virus homólogo, pero sensibles a virus heterólogos.
- e) No se detecta interferón, lo cual indica que la infección prolongada se puede mantener sin su intervención.
- f) Algunas líneas liberan espontánea y esporádicamente virus al medio extracelular (115). En otros casos, las partículas infecciosas sólo pueden detectarse haciendo un extracto de células(114).
- g) Existen sublíneas persistentemente infectadas que producen virus en forma cíclica (116). El estudio de las propiedades de este virus indica que se trata de una mutante termosensible (t_s) del virus parental (140). Dentro del grupo Arena este es el único caso hasta el presente en que se aíslan t_s como resultado de infecciones persistentes.
- h) En otras oportunidades, en los sobrenadantes de líneas crónicamente infectadas se detectan partículas sin potencial citolítico o citopatógeno, pero capaces de interferir con la multiplicación del virus estándar (115).

OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

La observación de algunos hechos peculiares relacionados con la multiplicación del virus Junín en células Vero nos hizo suponer que en este sistema, al igual que en otros conocidos, se generaban partículas interferentes. Puesto que no existían antecedentes de estudios en el tema se encaró en el presente trabajo de tesis, la búsqueda y caracterización de estas partículas en las infecciones originadas por el virus Junín.

La detección de partículas interferentes asociadas a la multiplicación del virus tanto "in vivo" como "in vitro", es un requisito indispensable para poder analizar, luego, la participación de las mismas en las infecciones persistentes.

El mecanismo por el cual se establece y mantiene el equilibrio entre un virus y su célula huésped es el objetivo hacia el cual se han dirigido los esfuerzos de numerosos investigadores. En el caso del virus Junín, estos estudios tienen una importancia adicional, ya que debido a la relación que el virus mantiene con determinados roedores silvestres, el esclarecimiento de este mecanismo sería una contribución más a la erradicación de la Fiebre Hemorrágica Argentina.

MATERIALES Y METODOS

VIRUS

- a.- Junín: se trabajó con la cepa atenuada de virus Junín denominada XJC13 (141) y mantenida en el laboratorio por pasajes en cerebro de ratón lactante. Se la utilizó en el pasaje 9 posterior a su clonado. El título de los stocks fue del orden de 10^8 UFP/ml en células Vero.
- b.- Tacaribe: la cepa de virus empleada fue la TRLV 11573, propagada como la anterior en cerebro de ratón lactante y con títulos de 10^8 UFP/ml aproximadamente.
- c.- Pichinde: se empleó la cepa An-3739 crecida en cerebro de ratón lactante. El título del stock fue de 2×10^7 UFP/ml en células RK₁₃.
- d.- Virus de la estomatitis vesicular: (VSV) cepa Indiana; el stock se preparó en células Vero, cosechando sobrenadante y células a las 24 hs p.i.; su título fue de 3×10^8 UFP/ml en células RK₁₃.
- e.- Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV): se trabajó con un stock de la cepa Victoria preparado en embrión de pollo, cosechando el líquido alantoideo a las 48 hs p.i. El título del stock fue de 2×10^7 UFP/ml en células Vero.
- f.- Herpes simplex, tipo I: proporcionado por el Dr. Aurelian del John's Hopkins Memorial Hospital a la Dra. Nuria C. de De la Peña.

El stock se preparó en células Hep-2 a partir de sobrenadante y células, y su título fue de $2,5 \times 10^{11}$ UFP/ml en células RK₁₃.

CULTIVOS CELULARES

Células Vero: se utilizaron tres líneas de células Vero (riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*) de procedencias distintas, pero crecidas todas en monocapas.

Vero M: esta línea se obtuvo de la Cátedra de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina. Se la mantuvo por repiques bisemanales en medio H.L.S. compuesto por una solución salina de Hank's adicionada de un 10% de hidrolizado de lactoalbúmina al 5%, 6% de suero de ternera inactivado y 50 ug/ml de gentamicina. La línea Vero M se utilizó para la inducción de partículas interferentes, la titulación de los materiales en estudio por el método de unidades formadoras de placas (UFP) y por la técnica de dilución al punto final (ACP), y para la obtención de sublíneas persistentemente infectadas: VRJ-1, VRJ-2, y VRJ-3. Se la empleó entre los pasajes 150 y 300.

Vero Z: Esta línea celular fue suministrada por el Dr. O. Larghi del Centro Panamericano de Zoonosis y se mantuvo por repiques cada 3 o 4 días con MEM (medio esencial mínimo con sales de Earle) suplementado con 10% de suero bovino inactivado y 50 ug/ml de gentamicina. Se la utilizó para hacer estudios comparativos de

biogénesis de partículas interferentes, empleándola entre los pasajes 150 y 220.

Vero U: esta línea fue provista por la Dra. Weissebacher quien la recibiera del Dr. Monath. Se la mantuvo en el laboratorio en iguales condiciones que la anterior Vero Z observándose entre ambas algunas diferencias en la morfología y velocidad de crecimiento. Se la utilizó entre los pasajes 180 y 220 para estudiar modificaciones de la interferencia en relación a la célula huésped.

El medio de mantenimiento en los tres casos fue MEM adicionado de 3% de suero de ternera inactivado y 50 ug/ml de gentamicina.

Sublíneas de células Vero persistentemente infectadas con virus Junín, cepa XJCl3: se utilizaron cuatro sublíneas en el desarrollo de este trabajo. Las condiciones de su establecimiento y mantenimiento, y las características de cada una de ellas se esquematizan en el Cuadro N°3. Estas sublíneas se obtuvieron de la siguiente forma: se infectaron células Vero en el pasaje y con la multiplicidad de infección que se indican en cada caso en el Cuadro N°3. Una vez finalizada la adsorción, que fue de 2 hs a 37°C, se descartó el inóculo y las células se cubrieron con un volumen apropiado de medio de mantenimiento. La aparición, intensidad y duración de la acción citopatogénica (ACP), y el momento en que se iniciaron los subcultivos se especifican en cada caso.

CUADRO N° 3

Características de distintas sublíneas de células Vero persistentemente infectadas con virus Junín, cepa XJC13

SUBLINEAS	VRJ-1	VRJ-2	VRJ-3	VRJ-4
Células	Vero M	Vero M	Vero M	Vero U
. pasaje N°	167	170	180	187
Multiplicidad de infección	0,01	0,002	0,06	0,5
Acción citopatogénica:				
. Aparición (días p.i)	3°	3°	2°	2°
. Intensidad máxima (día)	4+ (6°)	3+ (7°)	3+ (5°)	3+ (4°)
. Duración días	11	6	6	6
Subcultivos:				
. Medio de crecimiento	199 + 5% ST	199 + 5% ST	199 + 10% ST	199 + 10% ST
. Primero (días p.i)	25	25	18	23
. Segundo *	3	3	3	35
. Subsiguientes	Cada 3 ó 4 días	Cada 3 ó 4 días	Cada 3 ó 4 días	Cada 3 ó 4 días
Duración de las sublíneas:				
. N° de subcultivos	8	9	110	27
. Días acumulativos in-vitro	28	32	385	126

CUADRO N° 3 (continuación)

SUBLINEAS	VRJ-1	VRJ-2	VRJ-3	VRJ-4
Características de las sublíneas:				
. Resistencia **	Total desde 1° subcultivo	Total desde 1° subcultivo	Total desde 5° subcultivo	Total desde 1° subcultivo
. Liberación espontánea de virus	Escasa.Detectable solo en cultivo de tejidos,no en ratón lactante.	Escasa.Detectable solo en cultivo de tejidos,no en ratón lactante.	Escasa.Detectable en ratón lactante.	No detectable.
Estado actual de las sublíneas:	Perdida	Perdida	Perdida	Congelada

*: Días posteriores al 1° repique

** : Frente a la descarga con 100 UFP de virus Junín

PREPARACION DE STOCKS DE VIRUS JUNIN

Cerebro de ratón lactante: se inocularon ratones albino-suizos de 24 a 48 hs de edad por vía intracerebral, con 10^3 DI₅₀ de virus Junín. Al 7° día posterior a la infección los animales fueron sacrificados, cosechándose sus cerebros en frío. El homogeneizado se preparó al 10% p/v de cerebro de ratón en una solución buffer fosfato isotónico pH 7,4, con 10% de suero de ternera inactivado y antibióticos. La suspensión obtenida se centrifugó a 12.500 g durante 45 minutos, separando luego cuidadosamente el sobrenadante, el cual se utilizó como fuente de virus. Los homogeneizados así obtenidos se fraccionaron y congelaron a -70°C, determinando su infectividad por el método de unidades formadoras de placas. Los títulos fueron del orden de 10^8 UFP/ml.

Células Vero: se inocularon células Vero a las 48-72 hs de sembradas, con una multiplicidad de infección de 0,2 UFP/célula, durante 2 hs a 37°C con agitación periódica. Al cabo de ese tiempo se descartó el inóculo y las células se cubrieron con medio de mantenimiento. Al 3er día p.i. se cosechó el sobrenadante, se centrifugó 10 min a 1.500 rpm para eliminar los restos celulares y el stock así obtenido se fraccionó y congeló a -70°C.

DETERMINACION DE LA INFECTIVIDAD

La infectividad de los distintos materiales estudiados se determinó por observación del efecto citopático producido en células Vero ó utilizando la técnica de formación de placas bajo agar.

Titulación por observación de la acción citopatogénica causada
por el virus Junín en cultivos celulares

Células Vero crecidas en tubos fueron inoculadas, a las 48 hs de sembradas, con 0,2 ml de diluciones decimales crecientes de virus Junín, durante 1 h a 37°C. Una vez finalizada la adsorción, se descartaron los inóculos y a cada tubo se agregó 1 ml de medio de mantenimiento que se renovó cada 3 o 4 días. Los cultivos se observaron diariamente al microscopio óptico, registrándose la evolución e intensidad de la ACP; al décimo día p.i. se dió por finalizada la titulación. Se usaron 4 tubos por dilución y la dosis infectante 50% para cultivo de tejidos (CTDI₅₀) se calculó de acuerdo al método de Reed y Muench (142).

La gradación de la acción citopatogénica se hizo en forma cualitativa teniendo en cuenta la aparición de focos de células redondeadas y oscuras en la monocapa y la cantidad de células muertas en el medio de cultivo. El grado 1 corresponde a la presencia de un número regular de células en el sobrenadante junto con la aparición esporádica de focos de ACP en la monocapa. A medida que transcurre la infección, la intensidad de estos efectos se incrementa pasando por una etapa en que los focos de ACP involucran todo el tejido (grado 2) dando como resultado la aparición de zonas de lisis (grado 3) que llegan a hacerse confluentes (grado 4) quedando muy pocas células adheridas a las paredes del recipiente. Estas células que sobreviven a la infección, pueden seguir multiplicándose hasta regenerar la monocapa. La intensidad y evolución de la ACP no son homogéneas en todo el tejido sino que pueden observarse zonas en recuperación vecinas a áreas de lisis celular.

Titulación por el método de formación de placas bajo agar

Se utilizó el método de Damonte y Coto (143) con algunas variantes.

Monocapas confluentes de células Vero crecidas en botellas de capacidad variable (90 cm³, 30 cm³ ó 15 cm³) se infectaron con diluciones crecientes del material a titular, al tercer día después de sembradas.

El volumen del inóculo se adecuó al tamaño del recipiente en uso, y en todos los casos se lo dejó adsorber durante 1 h a 37 °C con agitación periódica. Una vez finalizada la adsorción, se descartó el virus remanente, las células se lavaron con solución salina fosfatada (PBS) y se cubrieron con un volumen apropiado de agar nutritivo. Este se dejó solidificar por espacio de una hora a temperatura ambiente y luego, las botellas invertidas se incubaron a 37°C en la oscuridad durante 7 días. Al cabo de ese tiempo se fijaron las células con formol al 10 % durante 1 h. Se descartó luego la capa de agar y las placas se revelaron mediante tinción con cristal violeta al 1 % durante 15 min. Una vez extraído el colorante, las monocapas se lavaron varias veces con agua corriente y se dejaron escurrir 30 min antes de contar las placas.

Se utilizaron 2 a 4 botellas por dilución y los títulos se calcularon en base al número de placas, el volumen del inóculo y la dilución considerada, según la fórmula:

$$\text{Título (UFP/ml)} : \frac{n}{v \times d}$$

donde: n: n° promedio de placas

v: volumen del inóculo

d: dilución

El medio nutritivo usado para cubrir las células estuvo compuesto por una solución salina de Earle de doble concentración, 6% de hidrolizado de lactoalbúmina al 5%, 6% de extracto de levadura al 1%, 10% de suero de ternera previamente inactivado y 100 ug/ml de gentamicina. El pH se ajustó a 7,4 con bicarbonato de sodio al 5%. Esta solución en el momento de ser usada se mezcló en volúmenes iguales con agar al 2%.

Este medio sólido nutriente se utilizó en la mayor parte de las titulaciones, sin embargo en los últimos tiempos y a causa de problemas en la conservación de las monocapas bajo el agar, se debió recurrir a otro medio nutritivo. Por este motivo se empleó el propuesto por Bablanian (144) y que fuera ensayado con éxito en nuestro laboratorio (S.Mersich, comunicación personal). El mismo consta de un 20% de medio mínimo esencial (MEM) concentrado 10 veces (10x), 20% de glucosa (35g/l), 20% de nitrato férrico 0,1g%, 1% de glutamina (29,2g/l), 20% de piruvato de sodio 0,1% g/l, 10% de suero de ternera inactivado y 100 ug/ml de gentamicina. El pH se llevó a 7,4 con solución de bicarbonato de sodio al 5%. En el momento de ser utilizado, este medio se mezcló con un volumen igual de agar al 2%.

NEUTRALIZACION DE LA ACTIVIDAD INTERFERENTE

Se utilizó suero humano de convalesciente con un índice de neutralización 10^7 respecto de la cepa homóloga. El material a tratar se mezcló en partes iguales con el inmunosuero diluido al 20% y previamente inactivado, y se incubó a 37°C durante media hora. Paralelamente se hicieron controles con el mismo material sin inmunosuero que se mantuvieron a 0°C y a 37°C. Con 0,2

ml de cada uno de estos materiales se inocularon células Vero que se incubaron 1 h a 37°C. Se descartaron los inóculos y los cultivos se desafiaron con 10^4 CTDI₅₀ de virus Junín (m.i. = 0,05). Como control de infectividad se inocularon simultáneamente células Vero con la misma dosis de virus. Los cultivos se observaron diariamente, registrando la intensidad y evolución de la ACP hasta el décimo día p.i.

ENSAYOS DE INTERFERENCIA VIRAL

Las técnicas utilizadas para medir la interferencia de los distintos materiales en estudio se basaron en la observación y/o cuantificación de la inhibición que se produce en algunas de las propiedades biológicas del virus estándar "in vivo" ó "in vitro".

a.- Ensayo in-vivo

Modificación del tiempo de sobrevida y mortalidad de ratones lactantes inoculados con virus Junín

Ratones albino-suizos de 24 a 48 hs de edad se inocularon por vía i.c. con 0,02 ml de una mezcla en volúmenes iguales, del material cuya actividad interferente se quería determinar y 20 DL₅₀ de virus Junín, cepa XJC13. Paralelamente se inocularon ratones controles con la misma dosis de virus estándar, y otra camada de animales recibió el material en ensayo diluido al medio. Los ratones se observaron durante 30 días, registrando la morbilidad y mortalidad de los mismos. El día promedio de muerte se calculó en base a la

fórmula:

$$\bar{x} = \frac{\sum n_i \cdot x_i}{N}$$

donde:

\bar{x} : día promedio de muerte

n_i : n° de ratones muertos el día x_i

x_i : día de muerte

N : n° total de ratones muertos

b.- Ensayos in-vitro

Inhibición de la acción citopatogénica producida por el virus Junín en células Vero

Se coinfectaron células Vero a las 48-72 hs de sembradas con 0,2 ml de una mezcla del material en estudio y diluciones decimales crecientes de virus Junín. El período de adsorción se prolongó por espacio de 1 h y una vez finalizado, se descartó el inóculo y se agregó a cada tubo 1 ml de medio de mantenimiento que se renovó cada 2 ó 3 días. Los cultivos se observaron diariamente, registrando la evolución e intensidad de la ACP; ésta se graduó en forma arbitraria de 0 a 4 según se describió anteriormente, teniendo en cuenta la presencia de células muertas en el medio extracelular y la aparición de focos de necrosis en la monocapa.

Inhibición de la formación de placas bajo agar

Células Vero sembradas en botellas de 90 cm³ de capacidad fueron inoculadas al hacerse confluentes (48 a 72 hs después de la siembra), con 0,4 ml del material en ensayo conteniendo aproximadamente 100 UFP del virus estándar. Paralelamente se hicieron controles con células que recibieron las mismas dosis de virus o de la muestra interferente respectivamente. Se utilizaron de 2 a 4 botellas en cada serie. Luego de 1 h de adsorción a 37°C con agitación cada 15 min, se retiró el inóculo, las células se lavaron con PBS y se cubrieron con 8 ml de agar nutritivo. Las botellas se reincubaron a 37°C protegidas de la luz y las placas se revelaron al 7° día según se describiera anteriormente.

La interferencia se expresó como el % de la relación del número de placas inhibidas respecto del control, es decir:

$$\% \text{ Actividad interferente : } \frac{E - I}{E} \times 100 \text{ (I)}$$

donde:

E: número de placas producidas por el virus estándar sólo.

I: número de placas producidas por la mezcla del material en estudio y la misma cantidad de virus estándar, luego de restar las originadas por la muestra interferente sola.

E - I: número de placas inhibidas en la mezcla.

El error del método, calculado en forma experimental, es de aproximadamente un 5%, lo cual equivale a una diferencia de ± 5 placas cada 100. Este valor es semejante al correspondiente a la titulación por el método de pla-

cas.

Inhibición de la replicación del virus estándar durante un solo ciclo de crecimiento

Se inocularon cultivos de células Vero, crecidas en botellas de 90 cm³, a las 48 hs de sembradas, con 0,5 ml de cada una de las muestras sin diluir cuya actividad interferente se quería determinar. Se incubaron a 37°C durante 1 h con agitación cada 15 min, luego se descartaron los inóculos y las monocapas se lavaron con PBS. Los cultivos se desafiaron con virus Junín cepa XJC13 a una multiplicidad de infección de aproximadamente 1 UFP/célula. Como control, se infectaron células sin tratar, con la misma dosis de virus estándar. Se reincubaron los cultivos a 37°C por una hora adicional, terminada la cual se extrajeron los inóculos, se lavaron las monocapas con PBS y se cubrieron con 8 ml de medio de mantenimiento. Todas las botellas se dejaron a 37°C hasta la hora 20^a posterior a la infección (145) momento en el cual se cosecharon los sobrenadantes y se congelaron a -70°C hasta su titulación por el método de unidades formadoras de placas.

La actividad interferente se calculó utilizando la fórmula anterior (I) pero en este caso I y E corresponden a los rendimientos a las 20 hs p.i. del virus estándar en la infección mixta y en el cultivo control respectivamente.

PASAJES CONCENTRADOS DE VIRUS

En cerebro de ratones lactantes

Ratones albino-suizos criados en el bioterio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, fueron inoculados por vía intracerebral con 0,02 ml de un stock de virus Junín proveniente de cerebro de ratones infectados ($1,4 \times 10^6$ CTDI₅₀). Al 7° día p.i. se sacrificaron los animales y una vez extraídos los cerebros se preparó el homogeneizado correspondiente el cual se denominó C₁ (cerebro de ratón, pasaje N° 1), siendo éste el primer pasaje concentrado "in-vivo". Con 0,02 ml de este material sin diluir, se inoculó un nuevo lote de ratones lactantes, sacrificándolos al 7° día p.i. y preparando el stock C₂ como se describiera anteriormente. Los pasajes concentrados subsiguientes se obtuvieron de manera similar. En todos los casos se utilizaron entre 3 y 5 camadas de ratones para preparar cada stock concentrado.

En cultivo de tejidos

Se inocularon células Vero de 72 hs con virus Junín XJCl3 a una multiplicidad de 10 UFP/célula, durante 2 hs a 37°C con agitación cada 15 min. Una vez terminada la adsorción se descartó el virus residual, las células se lavaron con PBS y se cubrieron con 9 ml de medio de mantenimiento, reincubándolas a 37°C. Al 3° día p.i. se cosechó el sobrenadante, se centrifugó a baja velocidad y se congeló a -70°C. Este material se denominó CT₁ (cultivo de

tejidos, pasaje N°1) y fue el primer stock concentrado preparado en cultivo de tejidos. Para obtener CT₂ se infectaron células Vero con 0,5 ml de CT₁ sin diluir, procediendo exactamente como en el caso anterior, y así sucesivamente hasta CT₁₂ .

INMUNOFLUORESCENCIA

Se investigó la presencia de antígenos virales en cultivos de la sublínea VRJ-4 mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Las células se sembraron en tubos Leighton y una vez alcanzada la confluencia (48-72 hs) los cultivos se procesaron para detectar antígeno citoplasmático ó de superficie.

a.- Antígeno citoplasmático

Los cubreobjetos con las monocapas celulares se retiraron cuidadosamente de los tubos Leighton luego de descartar el sobrenadante y se lavaron dos veces con PBS. Se dejaron secar a temperatura ambiente y las células se fijaron durante 5 minutos en acetona a 4°C. Se los lavó nuevamente y cubrió con inmunosuero específico antiviral Junín proveniente de ratones inmunizados o de humanos convalescientes. Los cubreobjetos se incubaron en cámara húmeda, a temperatura ambiente durante 30 min a fin de permitir la reacción antígeno-anticuerpo. Luego de dos lavados con PBS y una vez secos, los preparados se trataron durante 30 min con antiglobulina de ratón ó humana, según el inmunosuero usado en la etapa anterior, conjugada con isotiocianato de

fluoresceína. Los cultivos así procesados se lavaron dos veces más, se dejaron secar a temperatura ambiente y se montaron con una gota de Elvanol sobre un portaobjetos. La observación de los mismos se hizo con un microscopio Zeiss con equipo de epi-iluminación para fluorescencia.

b.- Antígeno de superficie

En esta detección la unión antígeno viral-anticuerpo se produce antes de fijar las células. Para ello se lavaron los cultivos de células VRJ-4 dos veces con PBS y los cubreobjetos se colocaron en una cámara húmeda cubriéndolos con la dilución apropiada de inmunosuero antiviral Junín. Luego de 30 min a temperatura ambiente, se repitieron los lavados y las células se fijaron con formol al 10%. La reacción con la antiglobulina humana y la observación de los preparados se realizó tal cual se describiera en el punto a.

En ambos casos el % de células fluorescentes se determinó mediante el recuento de 500 células por cultivo.

TECNICAS DE INDUCCION DE VIRUS EN LAS SUBLINEAS PERSISTENTEMENTE INFECTADAS

Tratamiento con Actinomicina D

Monocapas confluentes de células VRJ-3 fueron tratadas en distintos pasajes, con 0,5 ug/ml de Actinomicina D en medio de crecimiento, durante 3 hs a 37°C. Una vez finalizado ese período, se descartaron los sobrenadantes, los

cultivos se lavaron dos veces con PBS y se cubrieron con agar nutritivo. Paralelamente se procesaron células sin la droga. Las placas se revelaron al 7° día p.i. de acuerdo al método usual.

Agregado de células sensibles

En algunos pasajes, las monocapas de células VRJ-3 fueron cubiertas con aproximadamente 2×10^6 células Vero normales, suspendidas en 10 ml de medio de crecimiento. Los cultivos se incubaron luego 24 hs a 37°C para permitir que las células sembradas se depositaran y adhirieran a la monocapa preformada. En ese momento se descartaron los sobrenadantes, los cultivos se cubrieron con agar nutritivo y se incubaron durante 6 días más a 37°C antes de revelar las placas.

Tratamiento combinado

Cultivos confluentes de células VRJ-3 fueron sometidos al tratamiento con Actinomicina D tal cual se describiera anteriormente. Una vez eliminada la droga, las monocapas se lavaron exhaustivamente con PBS y se les agregó una suspensión de células Vero normales, reincubando los cultivos a 37°C durante 24 hs. Al cabo de ese tiempo se descartaron los sobrenadantes, las monocapas se cubrieron con agar nutritivo y se dejaron durante 6 días a 37°C.

INDUCCION DE ANTIGENOS VIRALES Y SU DETECCION MEDIANTE
INMUNOFLUORESCENCIA

Cocultivo con células Vero normales

A partir de monocapas confluentes de células Vero y VRJ-4 se prepararon por tripsinización suspensiones celulares de 10^5 cél/ml de medio de crecimiento, que se mezclaron en volúmenes iguales, y luego fueron sembradas en tubos Leighton provistos de cubreobjetos.

A las 72 hs estos cultivos se procesaron para investigar la presencia de antígenos virales citoplasmáticos y de superficie, incluyendo como controles células VRJ-4 y Vero normales crecidas separadamente.

Tratamiento con Actinomicina D

Monocapas de células VRJ-4 fueron tratadas con distintas concentraciones del inhibidor durante 3 ó 24 hs, a 37°C. En el primer caso, una vez terminadas las 3 hs se eliminó la droga y los cultivos se lavaron y reincubaron hasta completar el período de 24 hs, momento en el cual se procesaron según la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

No se observaron efectos tóxicos en las células con las concentraciones de inhibidor y los tiempos empleados.

Tratamiento con cicloheximida

Este inhibidor de la síntesis proteica se utilizó en concentraciones de 50 y 100 ug/ml durante 2 ó 24 hs, haciendo el tratamiento de las células VRJ-4 en forma similar al descrito en el párrafo anterior.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis se han subdividido en tres secciones, y cada una de ellas en varias partes, según que se trate de experimentos hechos en cultivos de tejido o en ratones lactantes, o durante la etapa primaria o persistente de la infección.

Los resultados están ordenados cronológicamente de tal forma que la Sección I incluye los antecedentes experimentales que indican la existencia de un fenómeno de interferencia asociado a los stocks de virus Junín o presente en los sobrenadantes de líneas persistentemente infectadas.

En la Sección II se presentan los resultados de la inducción de partículas interferentes "in vitro" e "in vivo" y el estudio de sus propiedades.

Finalmente en la Sección III se analiza el comportamiento del virus Junín en presencia de cantidades variables de partículas interferentes durante la etapa primaria de la infección, o su relación con las mismas en el estadio de persistencia viral.

SECCION I

EVIDENCIAS DE ACTIVIDAD INTERFERENTE EN LOS STOCKS DE VIRUS JUNIN Y EN SOBRENADANTES DE LINEAS CELULARES PERSISTENTEMENTE INFECTADAS CON ESTE VIRUS

El virus Junín se mantiene en el laboratorio por sucesivos pasajes en cerebro de ratón lactante. Ocasionalmente, dependiendo del tipo de investigaciones que se realizan, se preparan stocks de virus en cultivos celulares. Sin embargo, este último sistema no se utiliza para propagar el agente debido a que los títulos correspondientes son menores en 10² unidades logarítmicas que los obtenidos en cerebro de ratón.

Cuando los stocks se titulan por el método del punto final (ACP) o por formación de placas bajo agar se observa en las diluciones menores inoculadas una interferencia con la actividad citolítica del virus Junín, efecto que se evidencia por la escasa alteración morfológica que presentan los cultivos infectados.

También es posible detectar actividad interferente en sobrenadantes de líneas persistentemente infectadas con este virus. Esta actividad aparece alternadamente en distintos pasajes de las sublíneas, y no es un hecho reproducible, ya que se han establecido cultivos persistentemente infectados que resultaron buenos productores de interferencia, junto con otros que en ningún momento evidenciaron ese tipo de actividad.

PARTE I

EVIDENCIAS DE ACTIVIDAD INTERFERENTE EN LOS STOCKS DE VIRUS JUNIN PREPARADOS "IN-VIVO" E "IN-VITRO"

En la primera parte de esta sección se presentan las evidencias obtenidas, ya sea en cultivo de células Vero o en ratones lactantes, acerca de la actividad interferente presente en los stocks de virus Junín.

a.- Detección de la actividad interferente en cultivo de tejidos

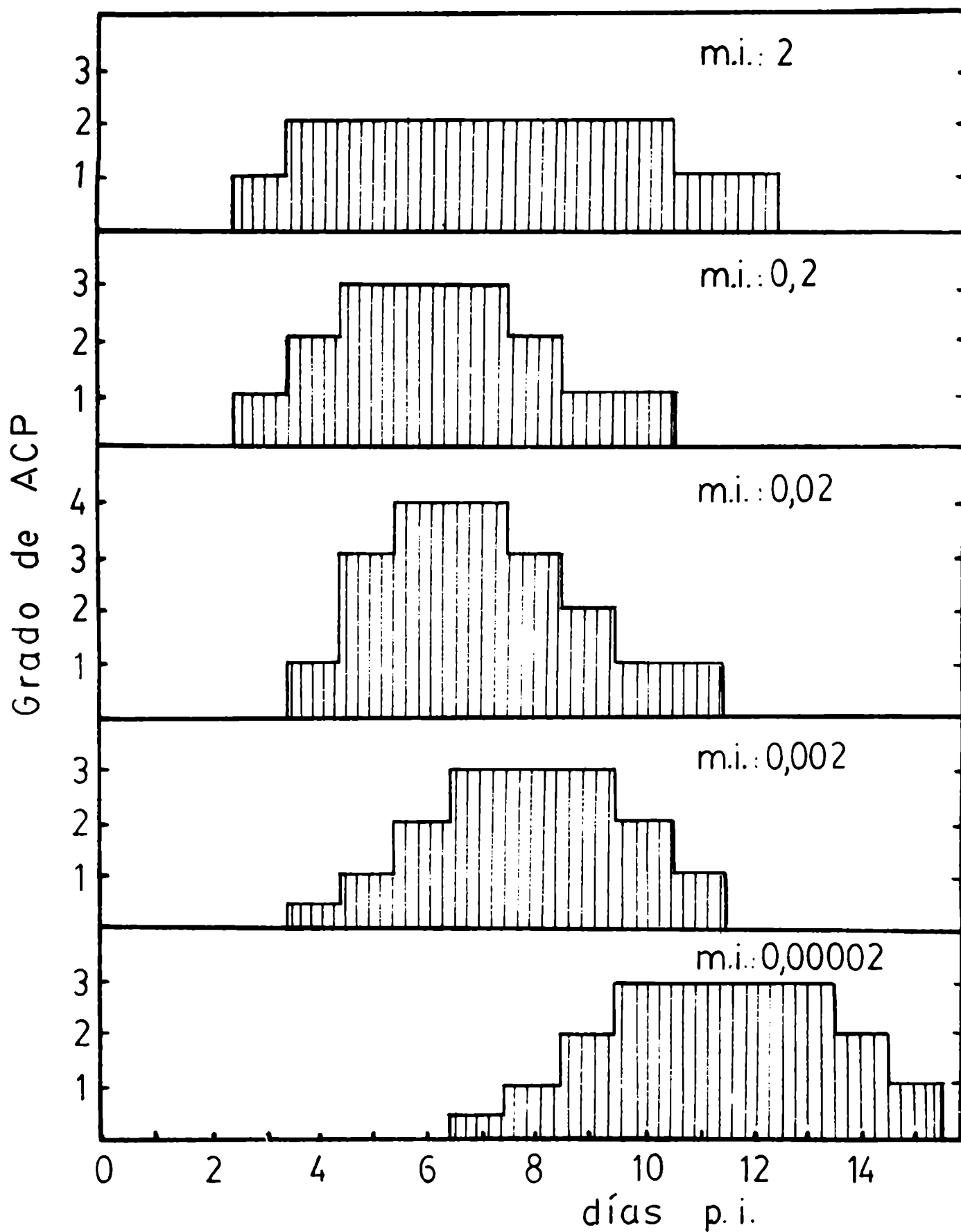
Se investigó la presencia de actividad interferente en stocks de virus Junín, preparados en cerebro de ratón lactante o en cultivo de tejidos, observando la inhibición de la ACP y de la formación de placas bajo agar, y la modificación del ciclo de crecimiento de este virus en cultivos infectados a alta multiplicidad.

1.- Inhibición de la acción citopatogénica

La infección primaria del virus Junín en células Vero produce una respuesta lítica, con abundante destrucción celular, cuya intensidad varía de acuerdo a la cantidad de virus inoculado. Esto es cierto para diluciones altas de virus, en las cuales existe una relación directa entre la concentración relativa de virus y la intensidad de ACP producida. Para diluciones menores, en general, no se observa la aparición de este efecto citopático o es escaso, tal como se ve en el Gráfico N° 1 y en la fotografía N° 1.

Gráfico N° 1

Intensidad y evolución de la ACP en células Vero inoculadas con distintas multiplicidades



El Gráfico N° 1 muestra la intensidad y evolución de la ACP en células Vero infectadas con virus Junín XJC13, a distintas multiplicidades. Se observa que el mayor grado de ACP aparece en cultivos infectados a baja multiplicidad (0,02 y 0,002). Independientemente de la concentración de virus y de la intensidad del efecto citopático, el período de tiempo entre la aparición de éste y la regeneración del cultivo es de 7 a 10 días.

En la fotografía N°1 se muestran cultivos de células Vero infectados con diluciones crecientes de virus Junín y teñidos con cristal violeta al 8° día post-infección. Las monocapas inoculadas con las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} no presentan ACP o es muy escasa, como se evidencia si se las compara con la dilución 10^{-8} considerada como control en esta titulación. Por el contrario en los cultivos infectados con las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} la escasa tinción de los mismos y las áreas de lisis celular dan una idea del efecto citopático producido por el virus. En la dilución 10^{-3} se observan zonas densamente teñidas, similares al control, yuxtapuestas a grandes áreas de células muertas.

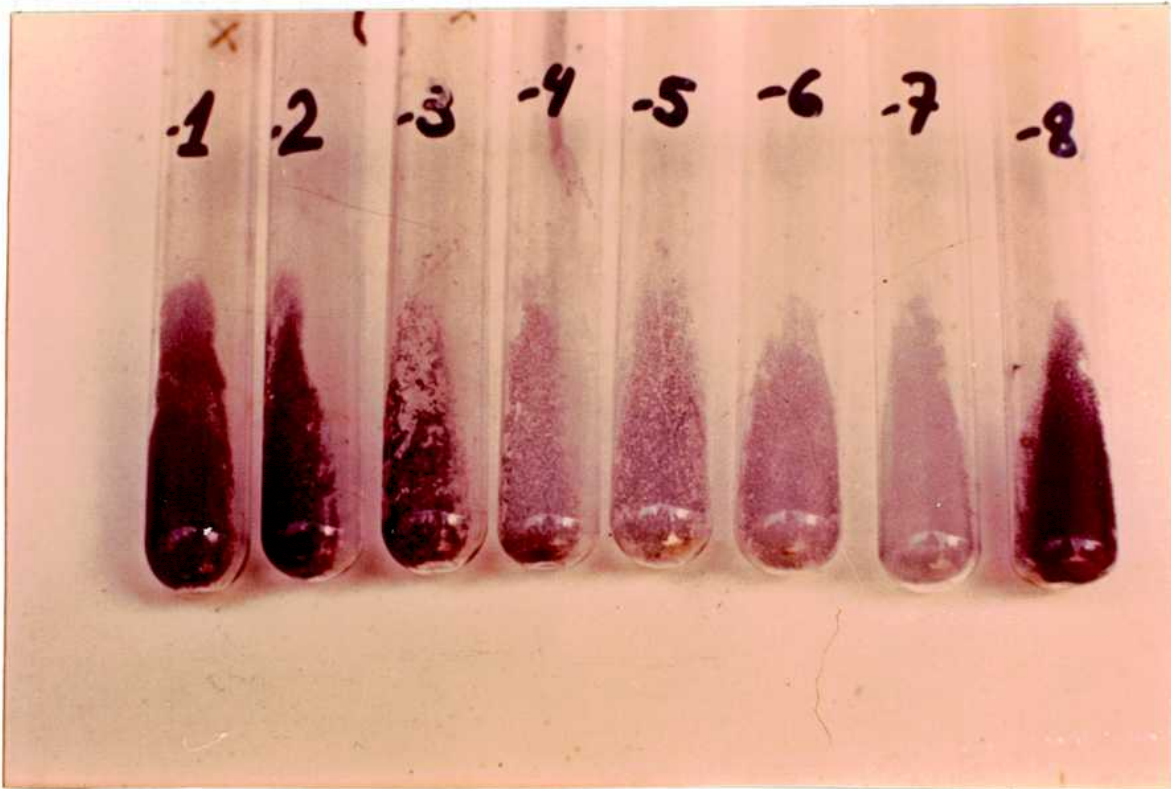
Estas observaciones son coincidentes con los datos presentados en el gráfico N°1, aún cuando hay que considerar que la gradación de la ACP es de carácter subjetivo.

El análisis de este gráfico, complementado con la observación de la fotografía 1, indica la existencia de dos fenómenos paralelos y antagónicos en los cultivos inoculados, uno capaz de proteger las células de las consecuencias de la infección, y el otro responsable de la ACP observada.

En los tejidos inoculados por las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} la concentración del agente protector es suficiente para inhibir la actividad citolítica

FOTOGRAFIA N° 1

ACP DEL VIRUS JUNIN EN CELULAS VERO



Células Vero infectadas con diluciones crecientes de virus Junín y teñidas al 8° día p.i. La dilución -1 corresponde a m.i. = 20

del virus Junín. En diluciones posteriores se establece el predominio de las partículas infectantes dando como resultado la aparición e intensificación de la ACP; la dilución 10^{-3} correspondería a concentraciones de equilibrio entre ambos.

Algo similar puede deducirse si se grafica el día de aparición del efecto citopático en función de la concentración relativa de virus (Gráfico N° 2). En este caso el valor 10 corresponde a la dilución 10^{-1} de virus (Fotografía 1) y a una multiplicidad de infección de 20 (Gráfico N° 1). Puede observarse que el día de aparición de la ACP es independiente de la concentración de virus para los valores relativos 10^1 , 10^0 y 10^{-1} que corresponden a diluciones en las cuales se detecta la existencia de un factor interferente con la capacidad citolítica del virus Junín. Recién a partir de la dilución siguiente (concentración relativa = 10^{-2}), se establece una relación lineal entre los parámetros graficados.

2.- Fenómeno de prozona. Formación de focos de interferencia

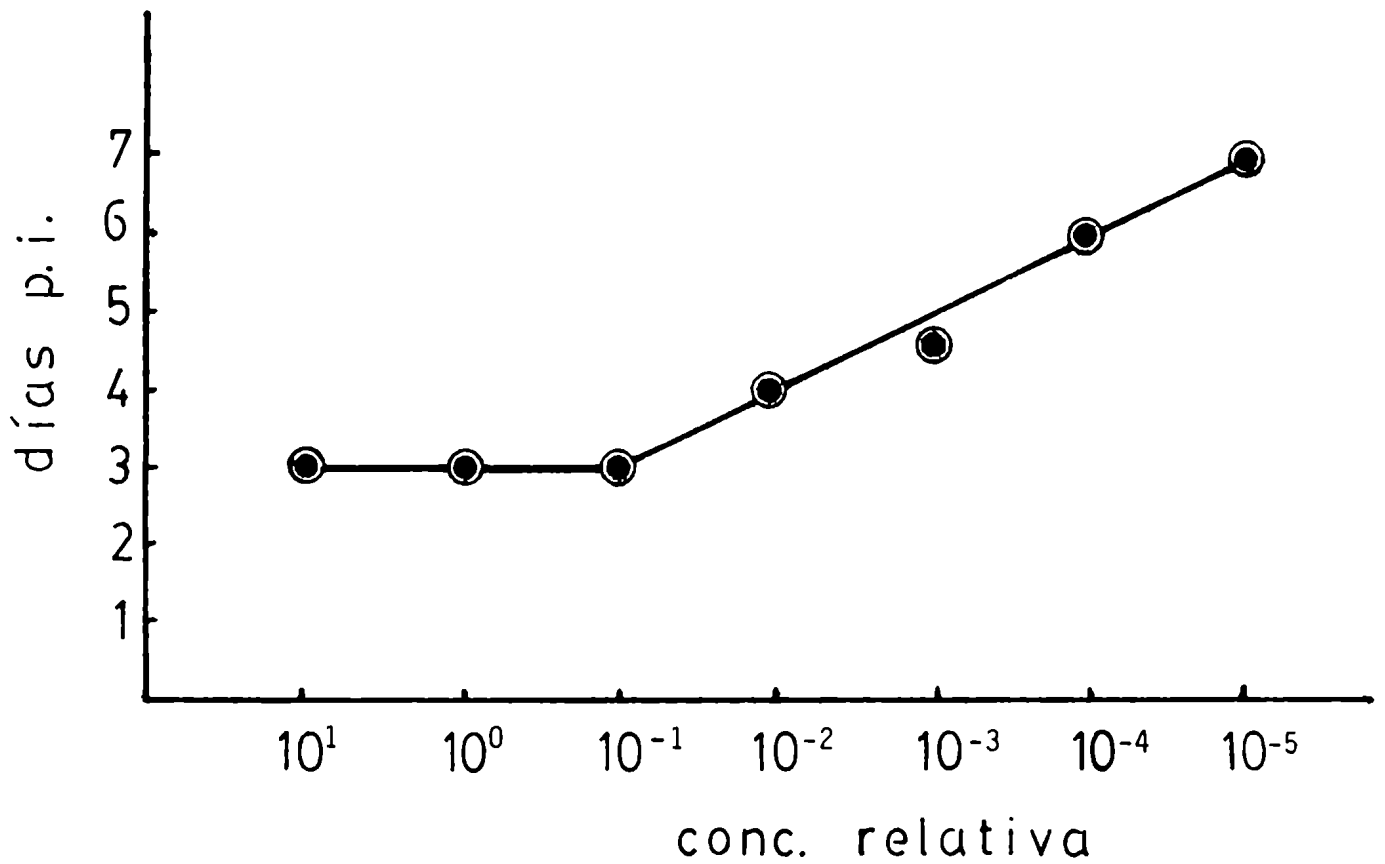
El virus Junín es capaz de producir en células Vero placas bajo agar, luego de un prolongado período de incubación.

Para estudiar la relación entre la concentración de virus y el número de placas producidas, se inocularon células Vero crecidas en botellas de 30 cc de capacidad con 0,2 ml de diluciones crecientes de virus Junín XJC13 desde 10^{-1} hasta 10^{-6} .

La fotografía 2 muestra los resultados obtenidos en la titulación de un stock de virus XJC13 preparado en cerebro de ratón lactante según el método de rutina.

Gráfico N° 2

Aparición de la ACP en función de la
concentración de virus



FOTOGRAFIA N° 2

TITULACION DE UN STOCK DE VIRUS JUNIN POR UFP



Se inocularon monocapas de células Vero con diluciones crecientes de virus. Las placas se revelaron al 7° día p.i.

En forma similar a lo observado en la fotografía 1, las diluciones menores inoculadas: 10^{-1} y 10^{-2} no producen placas bajo agar, como se evidencia por el aspecto y tinción de las monocapas correspondientes. En las diluciones mayores 10^{-5} y 10^{-6} la relación entre el número de placas y la concentración relativa de virus inoculada es lineal dando un título de $7,1 \times 10^8$ UFP/ml. Sin embargo para valores intermedios (10^{-3} y 10^{-4}) se presenta el mismo fenómeno de equilibrio mencionado anteriormente entre el factor capaz de interferir con la multiplicación del virus y la actividad citolítica de éste. En la dilución 10^{-3} hay un predominio del agente interferente, ya que la mayor parte del tejido está formado por células vivas, con áreas intermedias de lisis; en 10^{-4} esta relación se invierte observándose sobre una base de células muertas que abarca todo el cultivo, focos o clones de células viables, sobrevivientes a la infección. Si consideramos que cada uno de estos focos celulares es el resultado de la protección otorgada por una unidad del factor interferente, entonces por recuento del número de clones en esa dilución (10^{-4}) podemos tener una idea aproximada de su concentración en el stock original. Para el experimento que aquí se presenta ese valor es de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ focos de interferencia (F.I)/ml, es decir que la relación UFP/FI es ~ 50 .

3.- Variación del título de los stocks en función de la concentración de virus en el inóculo.

Otro hecho experimental que indica la existencia de un agente interferente en los stocks de virus Junín es la variación de títulos observada cuando éste se calcula en base al número de placas obtenido en distintas diluciones.

Se preparó un stock de virus Junín en células Vero a una m.i. = 0,005. El virus se dejó adsorber a 37°C, luego se descartó el inóculo, se lavó el cultivo con PBS y se agregaron 9 ml de medio de mantenimiento. Se incubaron las células a 37°C durante 24 hs al cabo de las cuales se cosechó el sobrenadante, se centrifugó a baja velocidad para eliminar restos celulares y se guardó a -70°C. La titulación del stock se hizo por el método de placas.

Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro N°4, en el cual se observan las variaciones producidas en el título del virus cuando se utilizan distintas diluciones para su cálculo. El valor mayor se obtiene para concentraciones bajas de virus en el inóculo, lo cual indicaría la existencia de un factor inhibidor en el stock de virus que también estaría presente en las primeras diluciones ensayadas.

Si consideramos que 6×10^3 UFP/ml (calculado en base a la dilución 1/20) es el valor real del título (0% de interferencia), entonces para las diluciones 1/2 y 1/10 la actividad interferente sería de 70% y 30% respectivamente.

CUADRO N°4

Influencia de la concentración de virus inoculada respecto del título del stock

DILUCION	N° DE PLACAS *	TITULO (UFP/ml)
1/2	372	$1,9 \times 10^3$
1/10	167	$4,2 \times 10^3$
1/20	120	$6,0 \times 10^3$

*: Valor promedio de cuatro cultivos.

4.- Modificación del ciclo de crecimiento del virus en cultivo de tejidos

El gráfico N°3 muestra una curva de crecimiento típica del virus Junín en células Vero, comparativamente con la evolución de la ACP. El período de latencia dura aproximadamente 24 hs, alcanzando el título del virus valores máximos al 3er día p.i., para luego declinar paulatinamente, siendo la liberación viral casi constante entre los días 8° y 13° p.i. La ACP aparece siempre retrasada 1 ó 2 días respecto de la producción de virus, pero ésta se mantiene aún después de iniciarse la recuperación celular y la etapa de persistencia.

Para estudiar la influencia de la multiplicidad de infección sobre el ciclo de crecimiento del virus Junín, se infectaron células Vero con multiplicidades de 1, 0,1 y 0,01 respectivamente. Diariamente se cosecharon alícuotas de los sobrenadantes, se centrifugaron a baja velocidad y se congelaron a - 70°C hasta su titulación por el método de placas.

Los resultados obtenidos se muestran en el Gráfico N°4, en el cual se representan los títulos de virus en función de los días post-infección. Para las multiplicidades ensayadas la concentración máxima de virus en el medio extracelular se obtiene en todos los casos al 3er día p.i., observándose sin embargo, variaciones en los valores de infectividad en ese día, de tal forma que cuanto menor es la m.i. mayor el título de virus obtenido; en este caso, para una m.i. de 0,01 la infectividad es 3,7 veces mayor que para una m.i.= 1.

Hay también diferencias en la velocidad con que se alcanzan esos títulos, lo cual se deduce de las pendientes de las curvas del gráfico N°4. Una

Gráfico N° 3

Multiplicación del virus Junín en células Vero
y evolución de la ACP

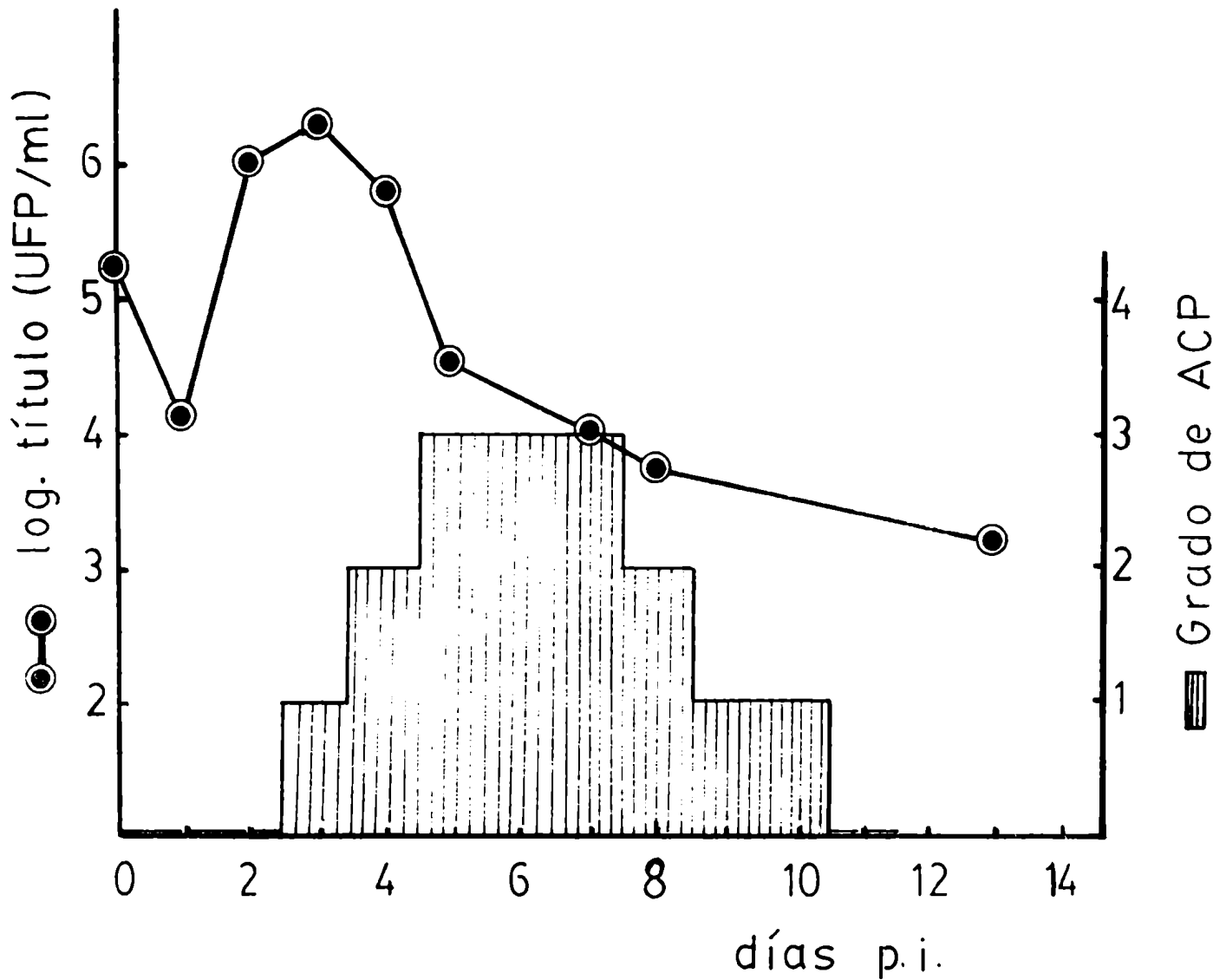
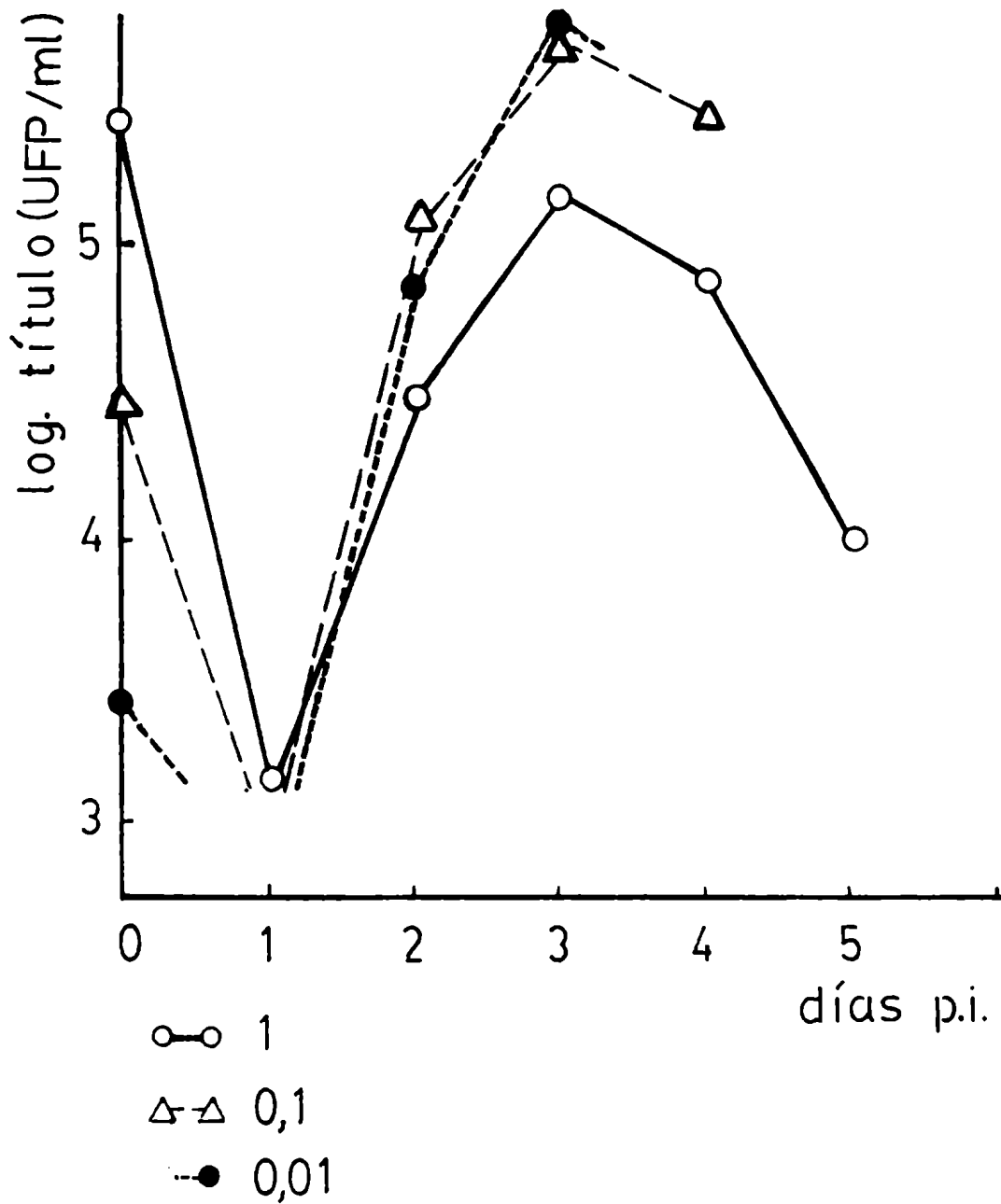


Gráfico N°4

Multiplicación del virus Junín a distinta m.i.



vez finalizado el período de latencia, la producción de virus es mayor en los cultivos infectados a menor multiplicidad; así por ejemplo la concentración viral al 2° día p.i. para m.i.= 0,1 es semejante a la correspondiente al 3° día p.i. para m.i.= 1; algo similar ocurre para m.i.= 0,01.

Si definimos eficiencia de multiplicación (E.M.) como la relación entre el título máximo alcanzado y la concentración de virus inoculada para cada m.i. y representamos estos valores en función de las cantidades relativas de virus, se obtiene la curva del gráfico N°5. Puede observarse que dentro de los límites de este experimento la eficiencia es inversamente proporcional a la multiplicidad de infección utilizada, ya que a menor concentración viral en el inóculo, mayor el rendimiento de virus.

Es decir que el agente interferente detectado en experimentos anteriores por su capacidad de inhibir la actividad citolítica del virus Junín, también es capaz de interferir con su multiplicación en células Vero.

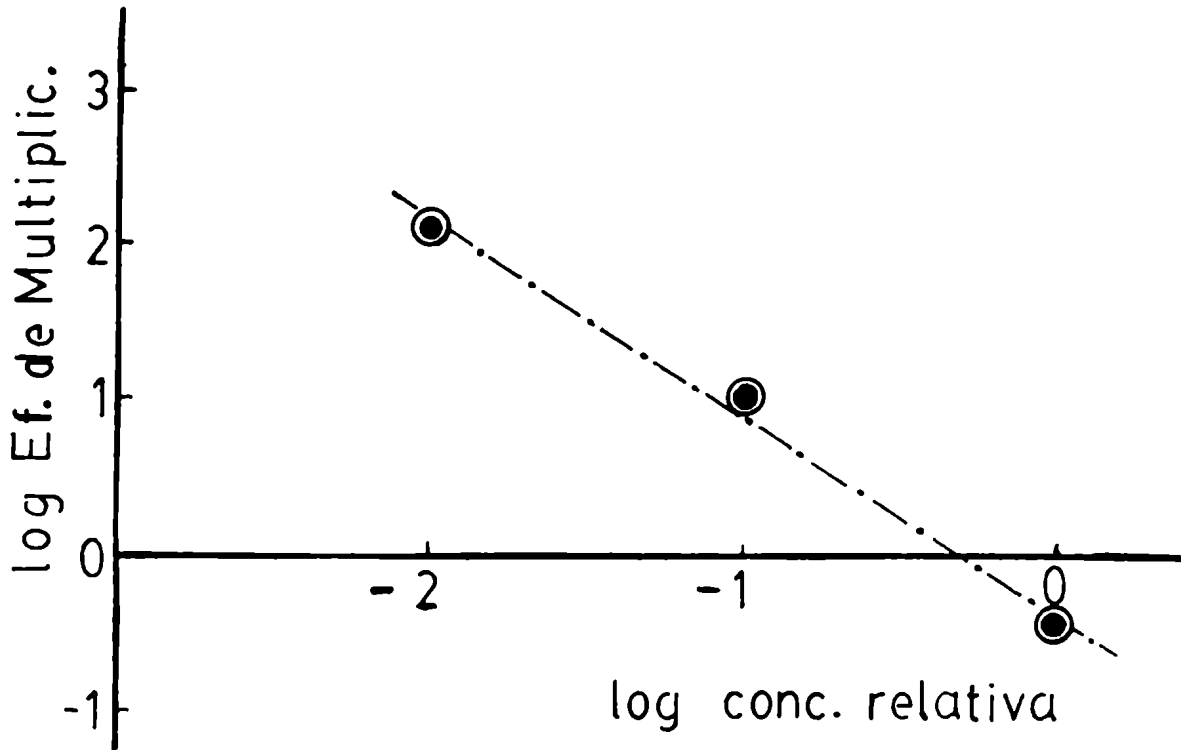
b.- Detección de la actividad interferente presente en los stocks de virus utilizando como sistema el ratón lactante.

1.- Modificación del tiempo de sobrevida de ratones lactantes según la dosis de virus inoculada .

El ratón albino-suizo es un huésped apropiado para la titulación del virus Junín ya que, como consecuencia de la infección, a los 9-10 días de inoculados desarrollan una enfermedad generalmente fatal que comienza con parálisis del tren posterior, lateralización de la marcha y arqueamiento del lomo. La muerte sobreviene entre los 11 y 20 días p.i. dependiendo de

Gráfico N° 5

Eficiencia de Multiplicación "in vitro" según
la concentración de virus



la dosis de virus y la edad de los animales.

En el gráfico N°6 se presenta el % de mortalidad acumulativa en función del tiempo post-infección para distintas concentraciones de virus en el inóculo.

Se observa que con dosis de $2,2 \times 10^5$ a $2,2 \times 10^1$ DL₅₀ muere el 100% de los ratones, tanto más tardíamente cuanto menor la cantidad de virus administrada; con 2,2 DL₅₀ muere sólo el 75% de los animales, con un aumento significativo del tiempo de sobrevida.

Sin embargo, si se inoculan $2,2 \times 10^5$ DL₅₀, a pesar de morir el 100% de los ratones, estos lo hacen más tardíamente de lo esperado. Esto estaría indicando la presencia en el stock de virus de un factor que interfiere con la patogenicidad del virus Junín.

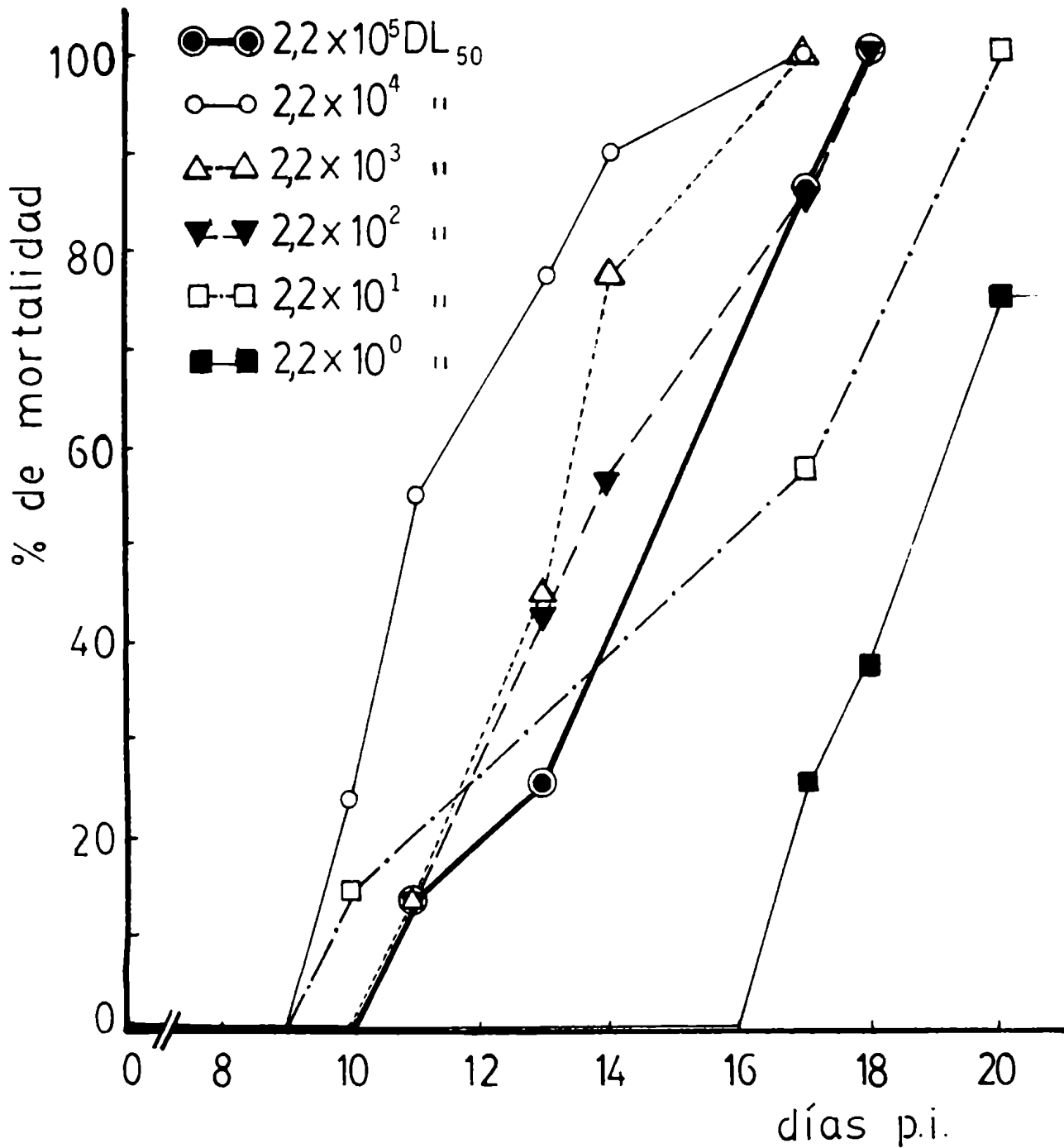
2.- Reducción del título de virus en cerebro de ratón lactante.

El virus Junín multiplica en cerebro de ratón lactante alcanzando títulos del orden de 10^8 UFP/gr de cerebro.

A fin de estudiar el efecto de la m.i. sobre la multiplicación del virus Junín XJC13 en cerebro de ratón lactante, se inocularon por vía intracerebral, cuatro camadas de animales con 0,02 ml de PBS conteniendo 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 y 2×10^3 UFP. Al 7° día p.i. se sacrificaron las crías y se extrajeron los cerebros con los cuales se prepararon los macerados correspondientes que se titularon por el método de UFP. Los valores de la infectividad y la eficiencia de multiplicación se presentan en el cuadro N°5.

Gráfico N° 6

Mortalidad del ratón lactante en relación
a la dosis inoculada



CUADRO N° 5Relación entre la multiplicidad de infección y el título de virus alcanzado en cerebro de ratón lactante

INOCULO (UFP/0,02 ml)	TITULO (UFP/ml)	E.M. *
2×10^6	$3,5 \times 10^7$	$1,75 \times 10^1$
2×10^5	$4,0 \times 10^7$	$2,00 \times 10^2$
2×10^4	$2,0 \times 10^8$	$1,00 \times 10^4$
2×10^3	$3,5 \times 10^8$	$1,75 \times 10^5$

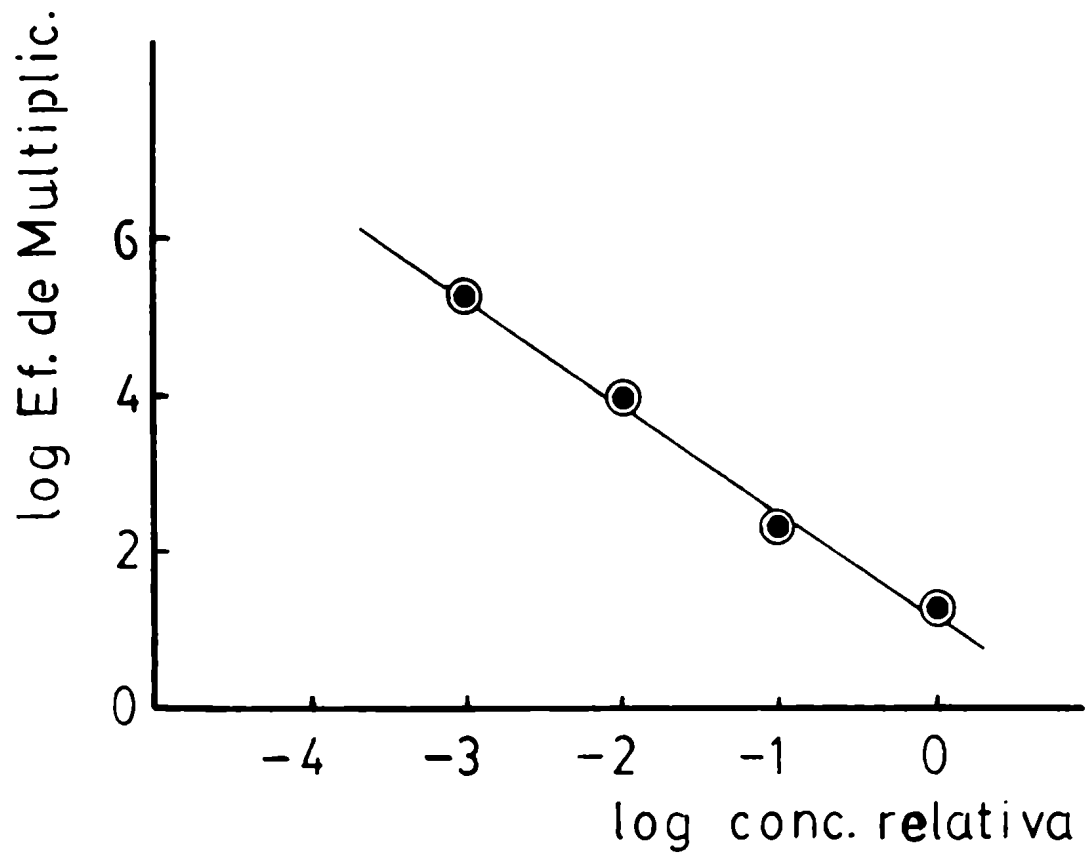
*: Eficiencia de multiplicación.

El título de virus obtenido al inocular 2×10^3 UFP fue 10 veces mayor que el correspondiente a una dosis de 2×10^6 UFP.

Si representamos la eficiencia de multiplicación en función de las concentraciones inoculadas, obtenemos el gráfico N°7. Puede observarse que a semejanza de lo que ocurre en cultivo de tejidos, la dilución del inóculo favorece el rendimiento de virus en cerebro de ratón lactante (comparar gráficos N° 5 y 7). Es decir que los stocks de virus Junín XJC13 preparados en ratones lactantes y en cultivo de tejidos contienen un agente interferente, el cual es capaz de inhibir total o parcialmente no solo la actividad citolítica del virus en células Vero, sino también su multiplicación en cultivo y en cerebro de ratón lactante.

Gráfico N° 7

Eficiencia de Multiplicación "in vivo" en función
de la concentración de virus



PARTE II

ACTIVIDAD INTERFERENTE EN SOBRENADANTES DE LINEAS CELULARES PERSISTENTEMENTE INFECTADAS CON VIRUS JUNIN

Como ya se mencionara anteriormente también es posible detectar actividad interferente en los sobrenadantes de líneas persistentemente infectadas. En la segunda parte de esta sección se presentan las evidencias obtenidas acerca de esa actividad, utilizando como sistemas de ensayo cultivos de células Vero y ratones lactantes.

a.- Detección de la actividad interferente utilizando cultivo de tejidos

La metodología empleada para detectar actividad interferente en los sobrenadantes de líneas celulares persistentemente infectadas fue similar a la utilizada en el capítulo anterior. En este caso, los sobrenadantes provenientes de las distintas sublíneas, cuyo poder interferente se quería determinar, se mezclaron con concentraciones conocidas de virus Junín y se inocularon en células Vero registrando la aparición de acción citopatogénica o la formación de placas bajo agar en relación a un control de virus estándar.

1.- Inhibición de la ACP producida por el virus estándar en células Vero.

Se inocularon cultivos de células Vero con una mezcla, en volúmenes iguales, del sobrenadante VRJ-1p3 (3er pasaje de la sublínea VRJ-1) sin diluir, y virus estándar, m.i = 0,05, 0,5 y 5. Paralelamente se infectaron

células con la misma dosis de virus Junín, mezclado con sobrenadante de cultivos normales y otra serie de tubos recibió sobrenadante VRJ-1p3, a fin de determinar si producía alteraciones celulares. Diariamente se observó la ACP y registró su intensidad, obteniéndose los resultados que se presentan en el gráfico N° 8.

La intensidad de la ACP ocasionada por el virus estándar solo, es mayor cuanto menor la multiplicidad de infección utilizada, hecho similar al descrito en la Parte I, a-1.

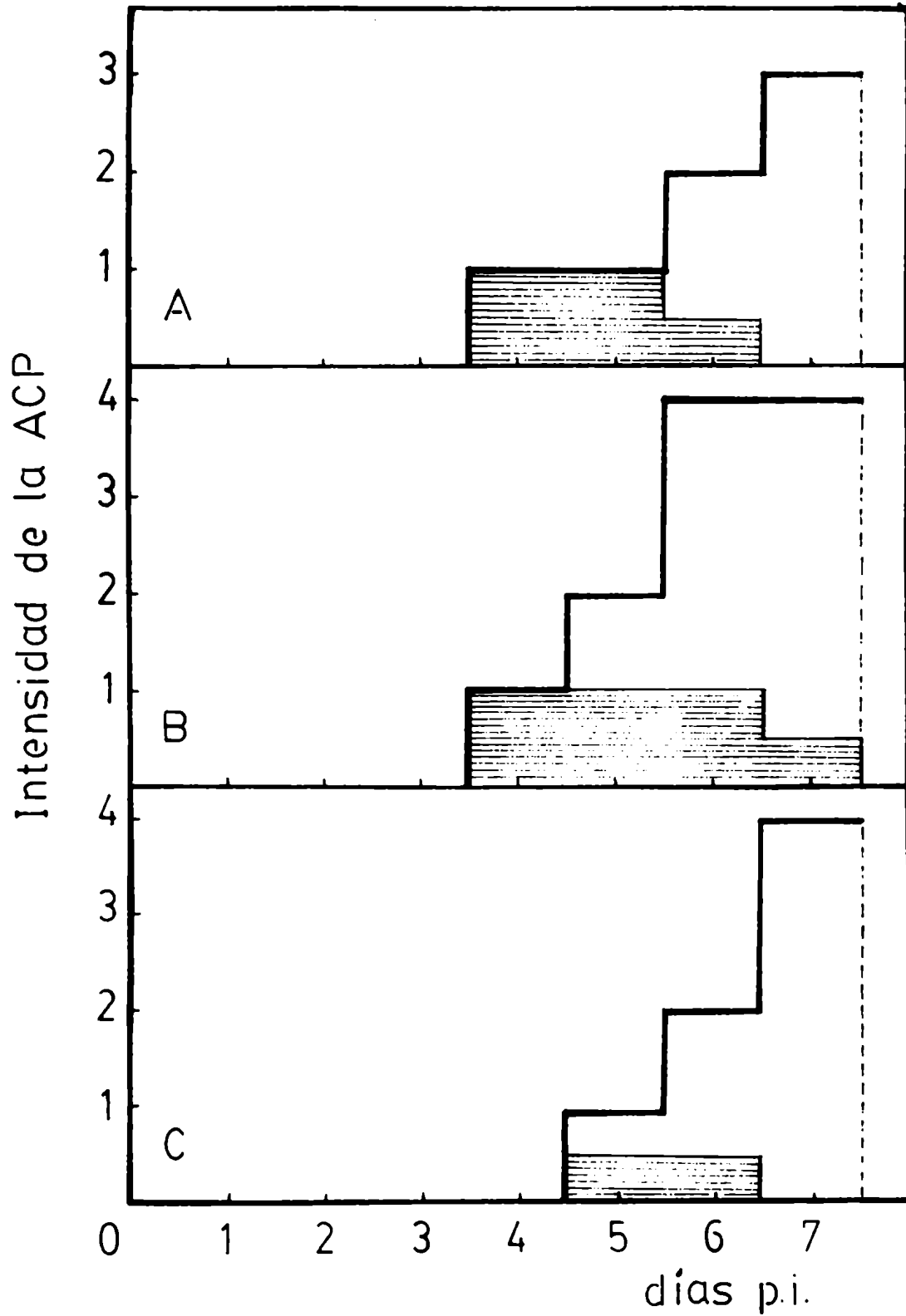
Los cultivos que recibieron la mezcla interferente muestran una ACP escasa que involuciona rápidamente, de tal forma que al 7° día p.i., mientras los controles pasan por la etapa de mayor destrucción celular, aquéllos presentan un aspecto casi normal.

La serie inoculada con el sobrenadante VRJ-1p3 no sufrió alteraciones visibles mientras duró el experimento.

Se puede observar que la concentración del factor interferente en la mezcla es suficiente como para inhibir la actividad citolítica de 10^4 CTDI₅₀ y disminuir considerablemente la ACP producida por 10^5 y 10^6 CTDI₅₀ (Gráfico N°8).

Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó el sobrenadante VRJ-3p79 en la mezcla interferente. En este caso, sin embargo, en ningún momento los cultivos doblemente infectados (virus estándar+interferente) presentaron efecto citopático.

Inhibición de la ACP del virus Junín
por coinfección con VRJ_{1p3}



2.- Interferencia con la capacidad del virus de formar placas bajo agar

Asímismo se ensayó la habilidad de algunos sobrenadantes de sublíneas persistentemente infectadas para inhibir la capacidad del virus estándar de formar placas bajo agar.

En un primer experimento se infectaron células Vero con aproximadamente 100 UFP de virus Junín cepa XJC13, diluido con medio de mantenimiento o mezclado en partes iguales con el sobrenadante VRJ-1p3 puro. Los cultivos infectados se procesaron según la técnica de titulación por el método de placas. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro N°6.

CUADRO N°6

Interferencia del sobrenadante VRJ-1p3 con la capacidad del virus estándar de formar placas bajo agar

MATERIAL INOCULADO	UFP/BOTELLA*	% DE INHIBICION
Virus estándar	65	0
Virus est. + sobren. VRJ-1p3	0	100 (>98,5)
Sobrenadante VRJ-1p3	0	-

*: Las determinaciones se hicieron por triplicado. Se consigna el valor promedio

El sobrenadante ensayado es capaz de inhibir en un 100% la formación de placas bajo agar, sin ser a su vez lítico para las células. La protección de los cultivos, en este caso, es similar a la observada en el experimento anterior (a-1) cuando ese mismo sobrenadante fue capaz de interferir con la

actividad citolítica de 10^4 CTDI₅₀.

En experimentos posteriores se estudió el poder inhibitorio de sobrenadantes de la misma sublínea pero en otro nivel de pasaje, VRJ-1p1 y VRJ-1p6, como así también los sobrenadantes VRJ-2p1 y VRJ-2p5. Se procedió en forma similar a la anterior, obteniéndose los resultados que se muestran en los Cuadros N° 7 y 8.

CUADRO N°7

Interferencia de los sobrenadantes VRJ-1p1 y VRJ-1p6 con la capacidad del virus estándar de formar placas bajo agar

MATERIAL INOCULADO	UFP/BOTELLA*	% DE INHIBICION
Virus estándar	88	0
Virus est. + sobren. VRJ-1p1	0	100 (>98,9)
Virus est. + sobren. VRJ-1p6	68	35
Sobrenadante VRJ-1p1	0	-
Sobrenadante VRJ-1p6	22	-

*: Valor promedio de cuatro determinaciones

CUADRO N°8

Interferencia de los sobrenadantes VRJ-2p1 y VRJ-2p5 con la capacidad del virus estándar de formar placas bajo agar

MATERIAL INOCULADO	UFP/BOTELLA*	% DE INHIBICION
Virus estándar	76	0
Virus est. + sobren. VRJ-2p1	0	100 (>98,7)
Virus est. + sobren. VRJ-2p5	63	34,2
Sobrenadante VRJ-2p1	0	-
Sobrenadante VRJ-2p5	25	-

*: Las determinaciones se hicieron por cuadruplicado. Se consigna el valor promedio

Un hecho que llamó la atención y que se observó en forma reiterada fue la producción de placas bajo agar por aquellos sobrenadantes con menor actividad interferente. Los que no resultaron infectivos fueron capaces de inhibir en un 100% las placas del virus estándar.

b.- Detección de la actividad interferente presente en sobrenadantes de líneas persistentemente infectadas utilizando ratones lactantes.

Los sobrenadantes de las líneas persistentemente infectadas utilizadas en estos experimentos fueron esporádicamente patógenos para ratones lactantes. En el cuadro N°9 se presentan los valores de infectividad de la sublínea VRJ-3.

CUADRO N°9

Patogenicidad de la sublínea VRJ-3 para ratón lactante

PASAJE N°	MORTALIDAD PARA RATON LACTANTE %
3	88,8
6	50
11-12-14-16-17-19-25	
30-64-66-67-68-70-72	0
75	16,6
77	44,4
79	0
94	77,7
96	71,4
101	33,4
102	0

El poder interferente asociado a algunos de esos sobrenadantes se determinó teniendo en cuenta la variación en la mortalidad y en el día promedio de muerte de los ratones inoculados.

1.- Disminución de la mortalidad y retraso en el día de muerte de los ratones lactantes.

Para estudiar la capacidad interferente de algunos sobrenadantes de líneas persistentemente infectadas se inocularon por vía intracerebral dos camadas de ratones de 24 hs de edad, una con 20 DL₅₀ de virus Junín XJC13, y la otra con una mezcla de virus estándar (20 DL₅₀) y sobrenadante VRJ-3p67 sin diluir.

Los animales se observaron diariamente, registrando la aparición de signos característicos de la enfermedad, y su mortalidad.

En el Gráfico N°9 se presentan los resultados obtenidos.

El lote inoculado con virus estándar muere entre el 15° y el 19° día p.i., con un día promedio de muerte= 17, presentando los animales el cuadro típico de la enfermedad.

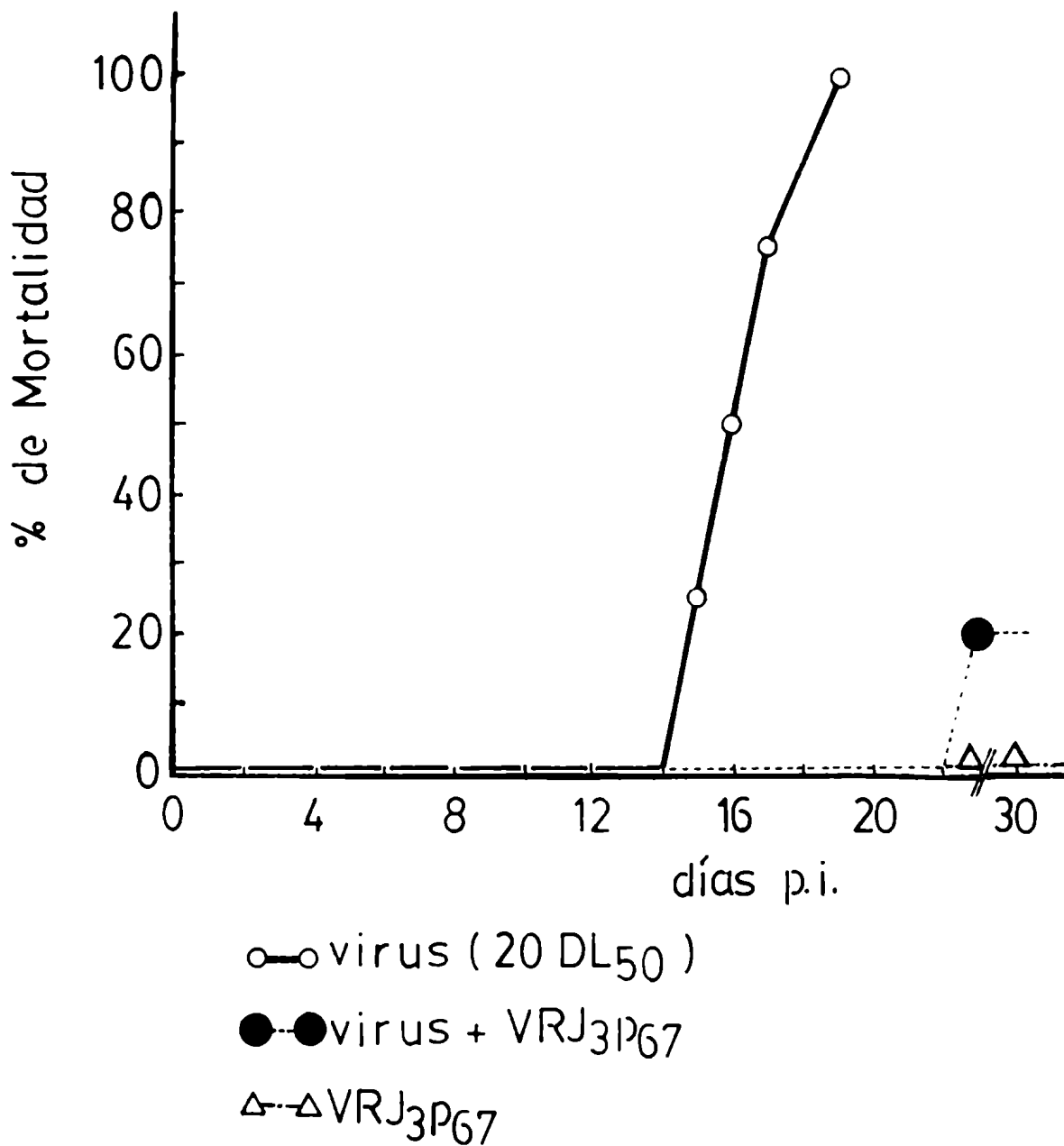
Algo diferente ocurre con los que recibieron la mezcla de virus Junín y sobrenadante VRJ-3p67; el 75% de los ratones sobrevive a la infección y los restantes mueren el día 23° p.i. siendo dudosas las causas de su muerte.

Como el número de ratones estudiados era insuficiente para hacer una evaluación estadística, se repitió el experimento anterior con mayor número de animales.

En este caso se inocularon ratones con: a) virus estándar (20 DL₅₀),

Gráfico N° 9

Disminución de la mortalidad del ratón lactante
por coinfección con VRJ3p67



b) una mezcla de virus (20 DL₅₀) + sobrenadante de VRJ-3p79 puro y c) sobrenadante de VRJ-3p79 diluido al medio. Los animales se observaron diariamente hasta el día 30 p.i.. El Gráfico N°10 muestra los resultados obtenidos de este experimento.

Los ratones lactantes inoculados con VRJ-3p79 no mostraron signos de infección mientras duró el experimento.

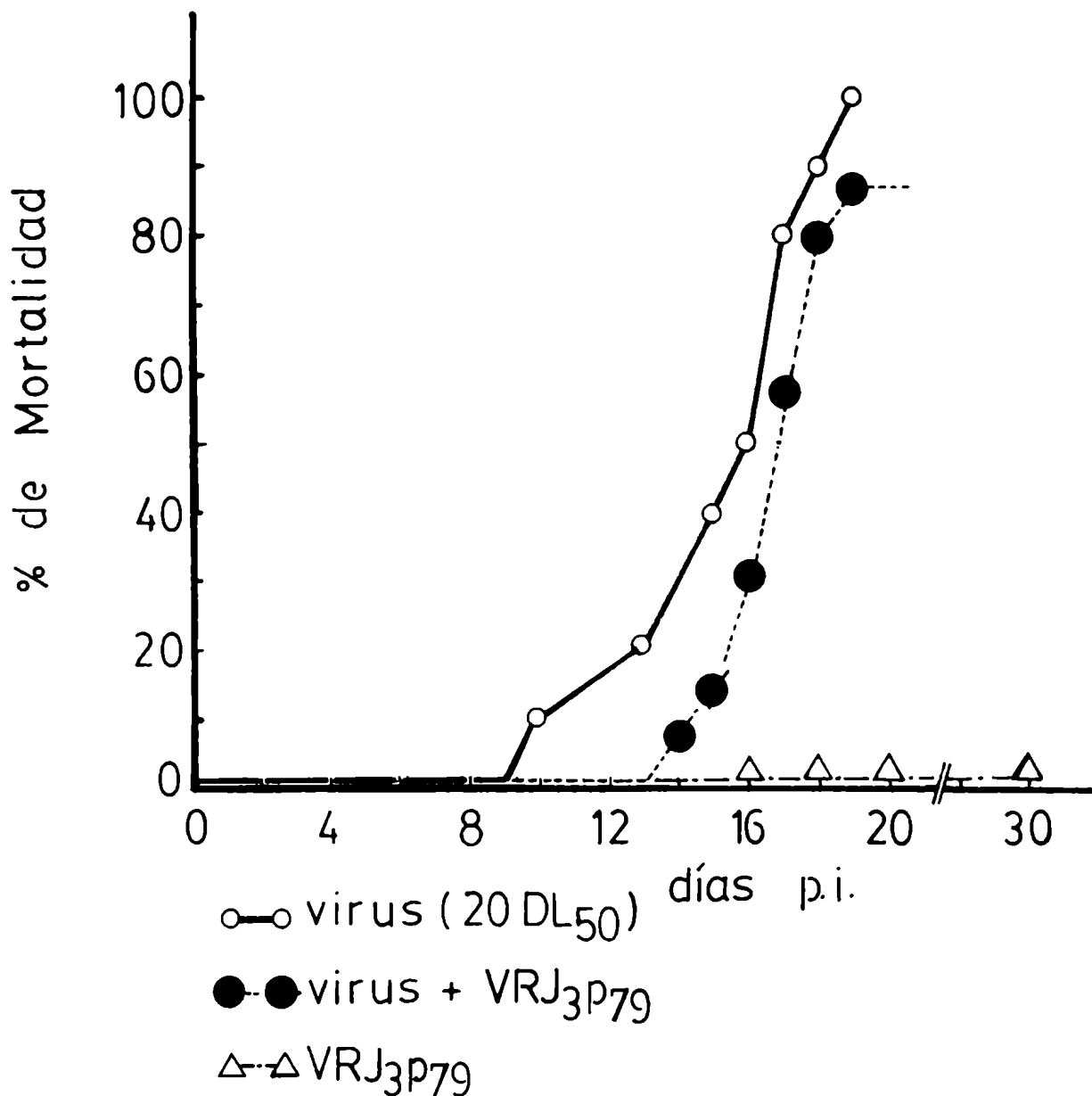
El 100% de los animales que recibieron virus Junín XJC13 muere entre el 10° y el 19° día p.i. con el cuadro característico de la enfermedad, siendo el día promedio de muerte el 16°.

Los ratones que fueron inoculados con la mezcla comienzan a morir cuatro días mas tarde que los controles, sobreviviendo el 13% de los animales ($0,1 > p > 0,05$). El día promedio de muerte en este caso es 17. A pesar de estas diferencias las curvas de mortalidad son semejantes y los ratones que mueren presentan los signos típicos de la enfermedad. En experimentos posteriores se obtuvieron resultados repetitivos.

En general, se obtienen dos tipos de respuesta en los ratones que reciben la mezcla de virus y agente interferente. Un determinado % de estos animales sobrevive a la infección, lo cual indicaría que son protegidos completamente por el factor inhibitorio presente en los sobrenadantes de líneas persistentemente infectadas. Los restantes mueren por el cuadro típico de la enfermedad, aunque más tardíamente que los controles. No se observan estadios intermedios entre estos dos comportamientos, como podrían ser animales con signos claros de infección, que luego se recuperan, o ratones que murieran sin el cuadro característico de la enfermedad.

Gráfico N°10

Disminución de la mortalidad del ratón lactante
por coinfección con VRJ_{3p79}



PARTE III

CARACTERIZACION DEL AGENTE INTERFERENTE

La existencia de un factor interferente con la multiplicación del virus Junín XJC13 en los stocks virales o en los sobrenadantes de líneas persistentemente infectadas no es un hecho aislado y específico de este virus, sino que ha sido descrito en numerosas oportunidades para otros sistemas virus-célula huésped. En varios de esos casos un detallado estudio del fenómeno de interferencia señaló a las partículas defectivas del virus estándar como responsables de ese tipo de interacción (25)(77). Sin embargo, en el caso del virus Sindbis (84) se ha demostrado la existencia de un inhibidor de bajo peso molecular, sensible a la proteasa K, que actúa específicamente reduciendo el nivel de virus extracelular durante la fase aguda de la infección. Asimismo Ter Meulen y Martín (83) comunicaron la producción de un factor lábil, en cultivos de células Vero persistentemente infectadas con virus del Distemper canino. Este agente que no es sensible a la radiación con luz UV, ni sedimentable por ultracentrifugación, inhibe selectivamente el crecimiento del virus homólogo.

A fin de esclarecer la naturaleza del agente capaz de interferir con la multiplicación del virus Junín, se sometieron algunos sobrenadantes de las sublíneas VRJ-1, VRJ-3 y VRJ-4, cuya actividad interferente ya había sido comprobada, a diversos tratamientos físicos, químicos y biológicos.

1.- Neutralización con inmunosuero anti- Junín

La neutralización de la actividad interferente se hizo utilizando suero humano de convalescente (inmunosuero anti-Junín) con un índice de neutralización 10^7 respecto de la cepa homóloga.

Los resultados se presentan en el Gráfico N° 11. El efecto citopático observado en las células infectadas con el virus Junín XJC13 es semejante en duración e intensidad al que se muestra en el Gráfico N° 8. La ACP comienza entre el 4° y 5° día p.i. alcanzando el máximo al 7° día y manteniéndose hasta el día 10° en que se dió por terminado el experimento.





En los cultivos inoculados con la mezcla, el agente inhibitorio interfiere significativamente con la capacidad citolítica del virus estándar en forma similar a lo observado en la Parte II-a-1 (comparar con el Gráfico N° 8). Las monocapas presentan una ACP mínima en los días 5°, 6° y 7° p.i., luego de la cual se recuperan rápidamente.

Las células infectadas con el sobrenadante VRJ-3p79 tratado con inmunosuero, y luego desafiadas con XJC13 se comportaron tal cual los controles de infectividad, es decir que la neutralización fue específica y efectiva ya que anuló completamente la interferencia propia de este sobrenadante.

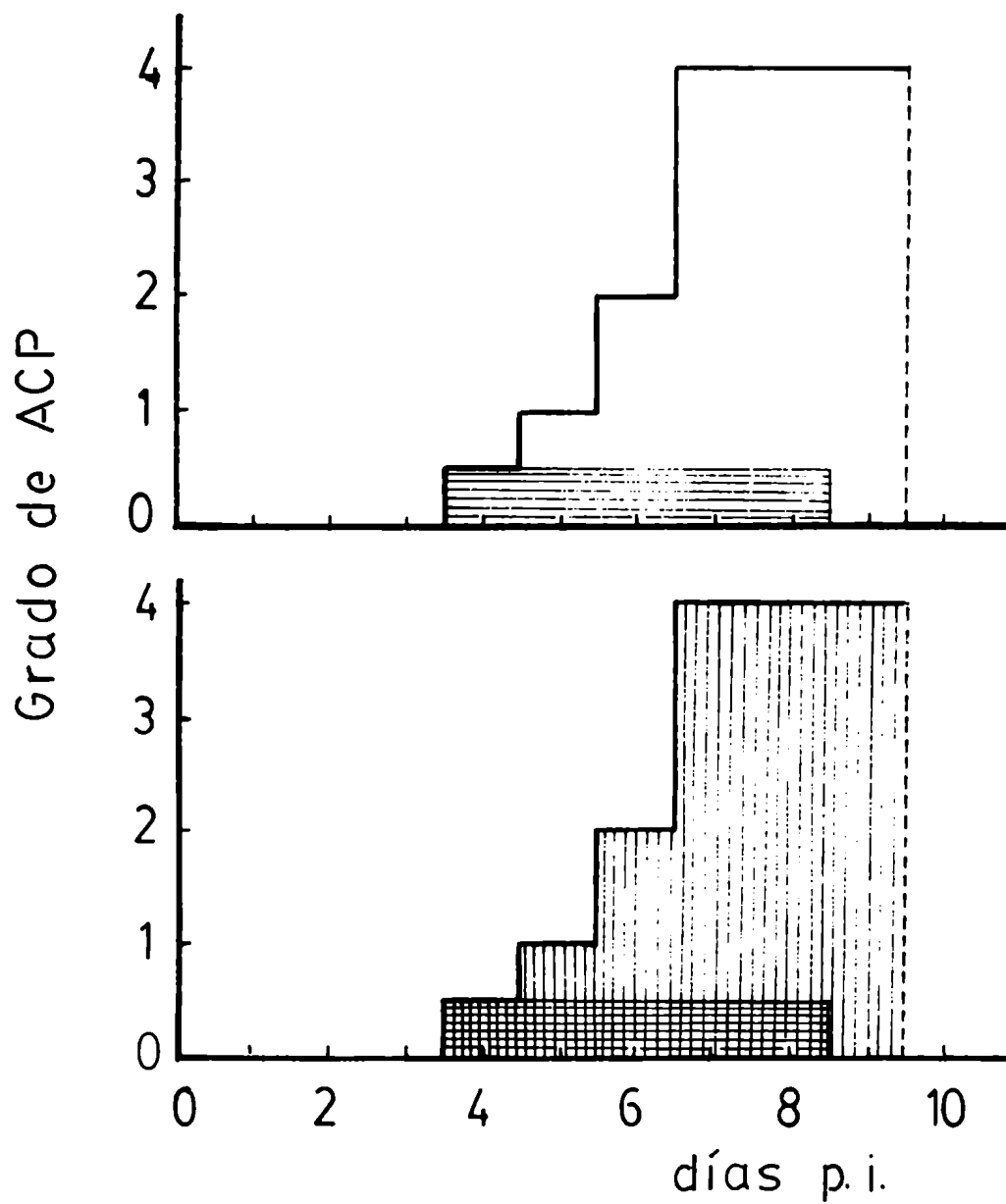
2.- Sensibilidad a solventes de lípidos

Una alícuota del sobrenadante VRJ-3p79 se trató con cloroformo (R.F. Carlo Erba) en una relación de volúmenes 20 a 1. La mezcla se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a baja velocidad para separar ambas fases. Con la fase acuosa se inocularon células Vero etc.

GRAFICO N° 11

-  VIRUS (m.i.: 0.05)
-  VIRUS + Sobren. VRJ-3p79 (0°C, 30 min)
-  VIRUS + Sobren. VRJ-3p79 (37°C, 30 min)
-  VIRUS + [Sobren.VRJ-3p79 + Inmunosuero anti-Junín]

Neutralización de la actividad interferente con inmunosuero antiviral Junín



cidas en tubos; paralelamente se procesó sobrenadante de VRJ-3p79 sin tratar. Ambas series se incubaron durante 1 h a 37°C, luego de lo cual se descartaron los inóculos, los cultivos de cada serie se sobreinfectaron con 10^4 CTDI₅₀ de virus y se incubaron a 37°C durante 1 h. Como control se inocularon células Vero con la misma dosis de virus. Se descartaron los inóculos y los cultivos se incubaron durante 10 días a 37°C, con medio de mantenimiento, registrándose diariamente la ACP. Los resultados obtenidos se muestran en el Gráfico N° 12.

El comportamiento de los cultivos infectados con el virus estándar es similar al descrito anteriormente (Parte II-a-1 y Parte III-1) para la misma m.i.. La evolución e intensidad del efecto citopático en las células inoculadas con el sobrenadante tratado con cloroformo son semejantes al control correspondiente hasta el 8° día p.i., a partir del cual se inicia la recuperación celular, persistiendo sin embargo la ACP al 10° día p.i. pero con diferencias de intensidad respecto del control.

Las células inoculadas con el sobrenadante de VRJ-3p79 sin tratar muestran, luego de la sobreinfección, una ACP pasajera entre los días 5° y 8° p.i. observándose la recuperación total de los cultivos al día 10° p.i.

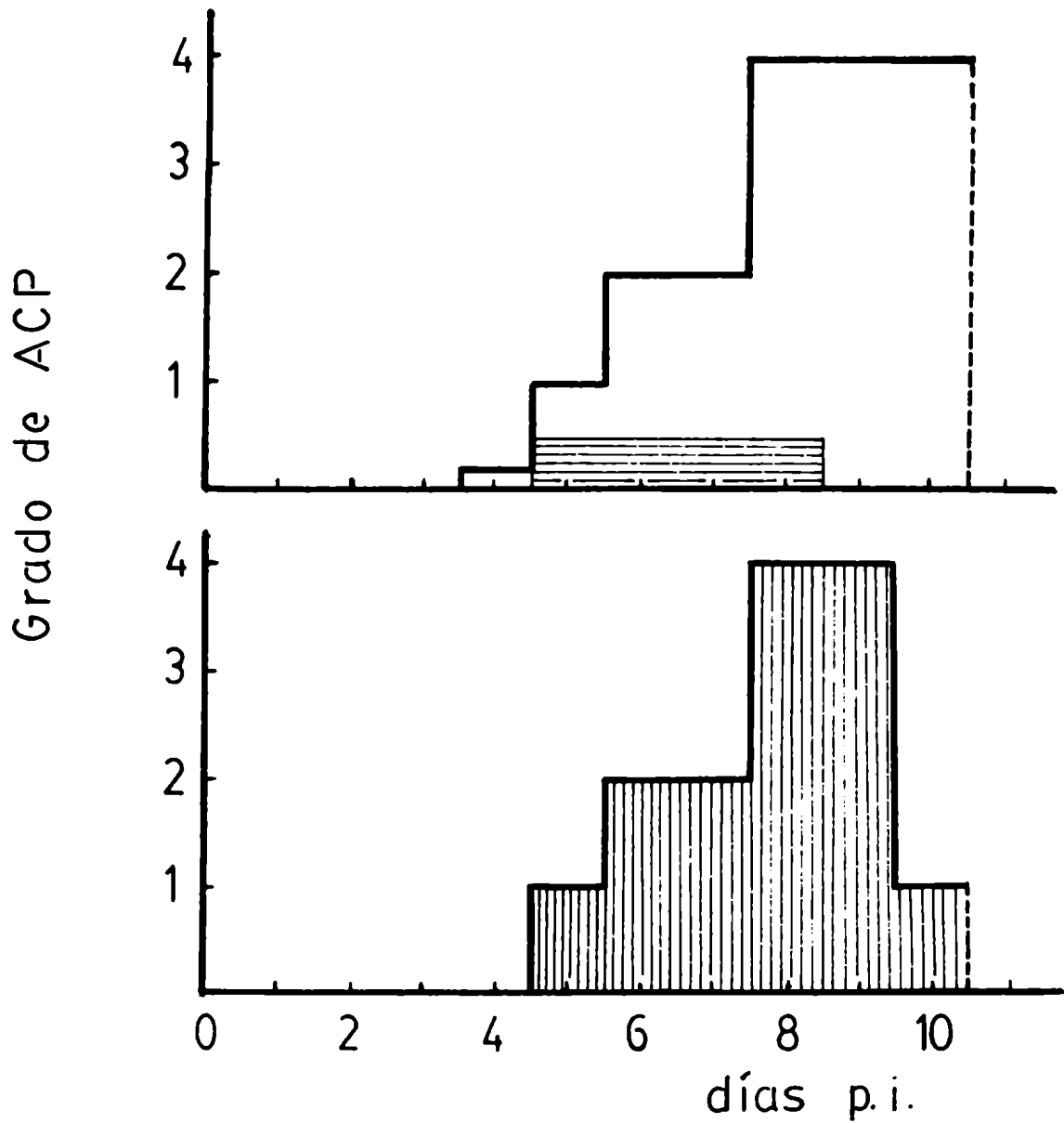
3.- Sensibilidad a la temperatura

Los resultados obtenidos en la Parte III-1 (Gráfico N° 11) habían indicado una relativa estabilidad térmica del agente interferente a 37 °C, ya que no se observaron variaciones en la actividad inhibitoria del sobrenadante VRJ-3p79 como consecuencia del calentamiento.

Se estudió, entonces, el efecto de una temperatura mayor durante inter-

Gráfico N°12

Sensibilidad de la Interferencia al cloroformo



- virus (m.i.:0,05)
- virus + VRJ3p79
- virus + (VRJ3p79 + Cl₃CH)

valos crecientes de tiempo. A tal fin se incubaron alícuotas del sobrenadante VRJ-3p79 a 56°C 1 h, 2 hs y 3 hs, al cabo de las cuales se utilizaron para inocular células Vero. Los cultivos se mantuvieron 1 h a 37°C descartándose luego los inóculos y sobreinfectándolos con 10^3 CTDI₅₀ de virus Junín XJC13 (m.i.: 0,005). Paralelamente se procesaron cultivos controles infectados con igual multiplicidad de virus estándar. Diariamente se observó la ACP, registrando su intensidad y evolución. Los resultados de este experimento se presentan en el Gráfico N° 13.

El efecto citopático en las células infectadas con virus Junín XJC13 tiene la evolución y duración habituales para esa multiplicidad de infección, mientras que los cultivos inoculados con el sobrenadante VRJ-3p79 calentado durante distintos períodos de tiempo, muestran una disminución de la capacidad interferente, tanto mayor cuanto mayor el tiempo de calentamiento. Sin embargo, aún después de 3 hs a 56°C la interferencia no se anula por completo como se deduce de comparar los gráficos correspondientes (Gráfico N° 13).

Si se representa el día de aparición de la ACP (grado 1) en función del tiempo de calentamiento del agente interferente se obtiene una relación lineal inversa (Gráfico N° 14), lo cual indica que el proceso de inactivación térmica seguiría una cinética de primer orden.

4.- Sedimentación de la actividad interferente

El sobrenadante de una sublínea persistentemente infectada, VRJ-4p26, se utilizó para determinar si la actividad interferente estaba asociada a partículas. Con este propósito 36 ml de dicho sobrenadante se centrifugaron

GRAFICO N° 13






-  VIRUS (m.i.: 0,005)
-  VIRUS + Sobren. VRJ-3p79
-  VIRUS + (Sobren. VRJ-3p79, calentado 1 h)
-  VIRUS + (Sobren. VRJ-3p79, calentado 2 hs)
-  VIRUS + (Sobren. VRJ-3p79, calentado 3 hs)

Gráfico N° 13

Sensibilidad de la Interferencia a la temperatura

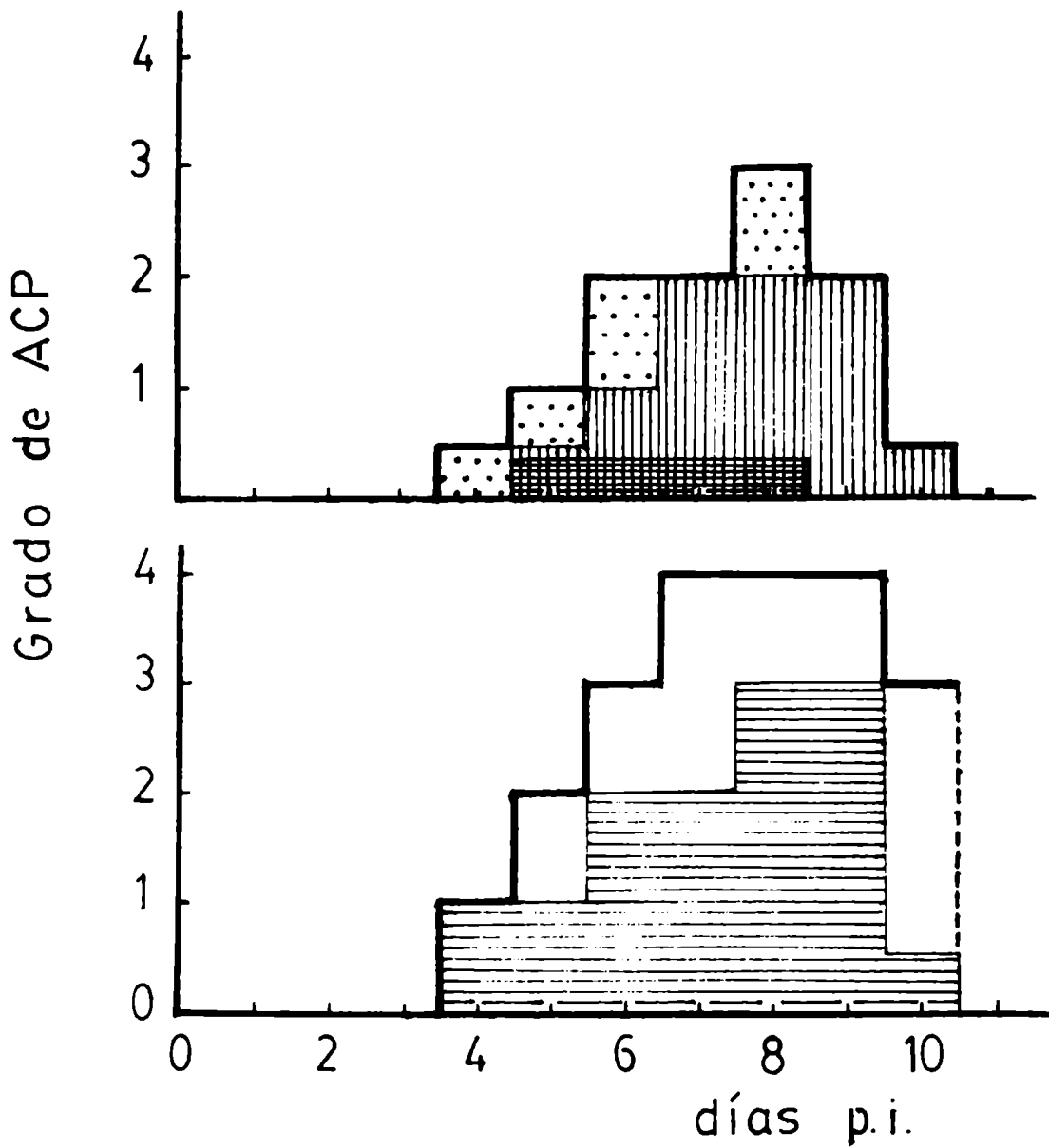
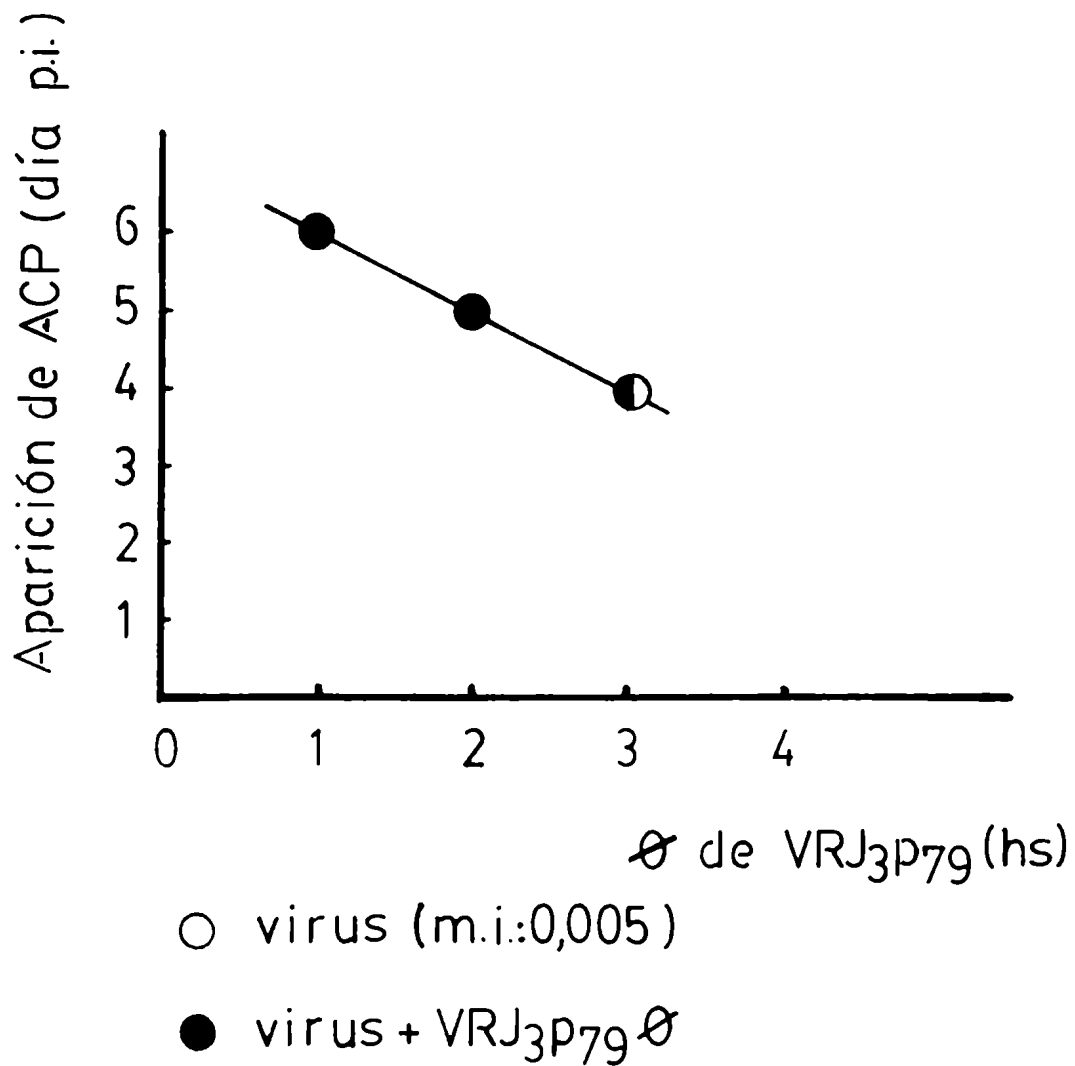


Gráfico N°14

Pérdida de actividad interferente en función
del tiempo de calentamiento



en el rotor SW-27 de una ultracentrífuga Beckman L-2, a 120.000 g durante 3 hs en frío. Una vez finalizada la operación se tomó una alícuota de la fase acuosa, descartando el resto; a su vez el pellet obtenido se resuspendió exhaustivamente en 4 ml de medio de cultivo y se centrifugó a 12.500 g, 30 min, para eliminar cualquier contaminación. Con cada uno de estos materiales: sobrenadante de la línea persistentemente infectada, sobrenadante de la ultracentrifugación y pellet resuspendido, se ensayó la actividad interferente, midiendo los rendimientos del virus Junín en una infección mixta a las 20 hs p.i., en relación al control correspondiente, según se describiera en Materiales y Métodos. Los valores obtenidos se presentan en el Cuadro N° 10.

CUADRO N°10

Ultracentrifugación de la actividad interferente

MATERIAL	DESAFIO UFP	RENDIMIENTO UFP/ml	INTERFERENCIA %
—	7×10^4	$2,4 \times 10^3$	0
VRJ-4p26	7×10^4	$2,1 \times 10^3$	14
Sobrenadante de la ultracentrifugación	7×10^4	$2,5 \times 10^3$	0
Sedimento de la ultracentrifugación	7×10^4	$1,6 \times 10^3$	33

Luego de la ultracentrifugación se obtiene una concentración de la interferencia de aproximadamente 2,5 veces. Sin embargo, si consideramos la concentración del volumen utilizado (36 ml a 4 ml), vemos que no se recupe-

ra al 100% de la actividad interferente luego de la centrifugación. Esto podría deberse a una inactivación parcial de las partículas responsables de la interferencia luego de este proceso tal como ocurre con el virus parental.

De los resultados obtenidos en 1., 2., 3. y 4. puede deducirse que la actividad interferente está asociada a elementos particulados que comparten con el virus estándar la capacidad de ser neutralizados por inmunosero anti-Junín e inactivados por tratamiento con cloroformo. Se trataría, entonces, de subestructuras virales o de partículas no infectivas pero capaces de interferir con la multiplicación del virus Junín.

5.- Dilución de la interferencia

Se estudió también la variación de la capacidad interferente con la dilución del sobrenadante en ensayo. A tal fin se inocularon células Vero con: a) virus Junín XJC13 aproximadamente 100 UFP, b) virus + sobrenadante VRJ-1p6 puro, en partes iguales, c) virus + sobrenadante VRJ-1p6 diluído al décimo, d) sobrenadante de VRJ-1p6 puro, e) sobrenadante de VRJ-1p6, 1/10. Los cultivos infectados se procesaron como habitualmente y las placas se revelaron al 7mo día p.i.. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro N° 11.

CUADRO N°11Variación de la capacidad interferente con la dilución del sobrenadante en ensayo

MATERIAL INOCULADO	UFP/BOTELLA	INTERFERENCIA %
XJC13	111	0
XJC13 + sobren. VRJ-1p6 puro	69	45
XJC13 + sobren. VRJ-1p6 1/10	96	17,2
Sobrenadante VRJ-1p6 puro	16	—
Sobrenadante VRJ-1p6 1/10	8	—

Como era de esperar el sobrenadante VRJ-1p6 que produce aproximadamente 40 UFP/ml, no interfiere en un 100% con el virus estándar, sin embargo por dilución, se observa una disminución significativa de la capacidad inhibitoria. La falta de proporcionalidad entre la infectividad de VRJ-1p6 puro y diluido al décimo se debe probablemente a factores complejos relacionados con la actividad interferente de este sobrenadante.

6.- Presencia de actividad interferente en el medio intracelular

Se investigó asimismo la presencia de un factor inhibitorio en el medio intracelular; para ello se procesaron células persistentemente infectadas en el pasaje 30 (VRJ-3p30) a las 96 hs de sembradas. El sobrenadante se centrifugó a baja velocidad y se guardó a -70°C (S_1). Las células se congelaron y descongelaron dos veces con 1 ml de medio de mantenimiento, se

centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min, se descartó el sedimento y el sobrenadante se guardó también a -70°C (S^2). Con S^1 y S^2 se hizo el ensayo de inhibición de placas, infectando células Vero con el virus estándar solo, o mezclado en partes iguales con estos sobrenadantes, puros o diluïdos al décimo. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro N° 12.

CUADRO N°12

Detección de actividad interferente en el medio intracelular

MATERIAL INOCULADO	UFP/BOTELLA	INTERFERENCIA %
Virus Junín + sobren.cél.norm.	438	0
Virus Junín + sobren.VRJ-3p30 puro	348	20,6
Virus Junín + sobren.VRJ-3p30 1/10	371	15,3
Virus Junín + intracel.de células normales	487	0
Virus Junín + intracel.de VRJ-3p30 puro	316	35
Virus Junín + intracel.de VRJ-3p30 1/10	427	13

Es decir que también en el medio intracelular se puede detectar el agente interferente en proporciones similares a la concentración extracelular.

7.- Variación de la actividad interferente en función del tiempo

1) Detección en cultivo de tejidos

A fin de determinar si la interferencia se mantenía o se modificaba en los días posteriores a la inoculación de células Vero con el agente interferente, se hicieron dos experimentos basados: uno, en la observación de la ACP producida por el virus estándar cuando éste se agregó al 3er ó al 5to día post-interferente, y el otro, en la inhibición de la formación de placas en cultivos infectados con virus Junín tres días después de haber recibido el factor inhibitorio. En ambos casos los resultados se compararon con los obtenidos por coinfección.

a.- Observación de la ACP

Se inocularon células Vero con sobrenadante de una de las líneas persistentemente infectadas (VRJ-1p6), durante 2 hs a 37°C. Se descartó luego el inóculo y a cada tubo se agregó 1 ml de medio de mantenimiento que se renovó cada dos ó tres días. Paralelamente se seudoinfectaron cultivos con medio de mantenimiento. Al 3er ó al 5to día p.i. se volcaron los sobrenadantes de las células tratadas y sin tratar, y se infectaron con 10^5 CTDI₅₀ de virus Junín XJC13 (m.i.: 0,5). Diariamente se registró la intensidad de la acción citopatogénica y se representó según muestra el Gráfico N° 15.

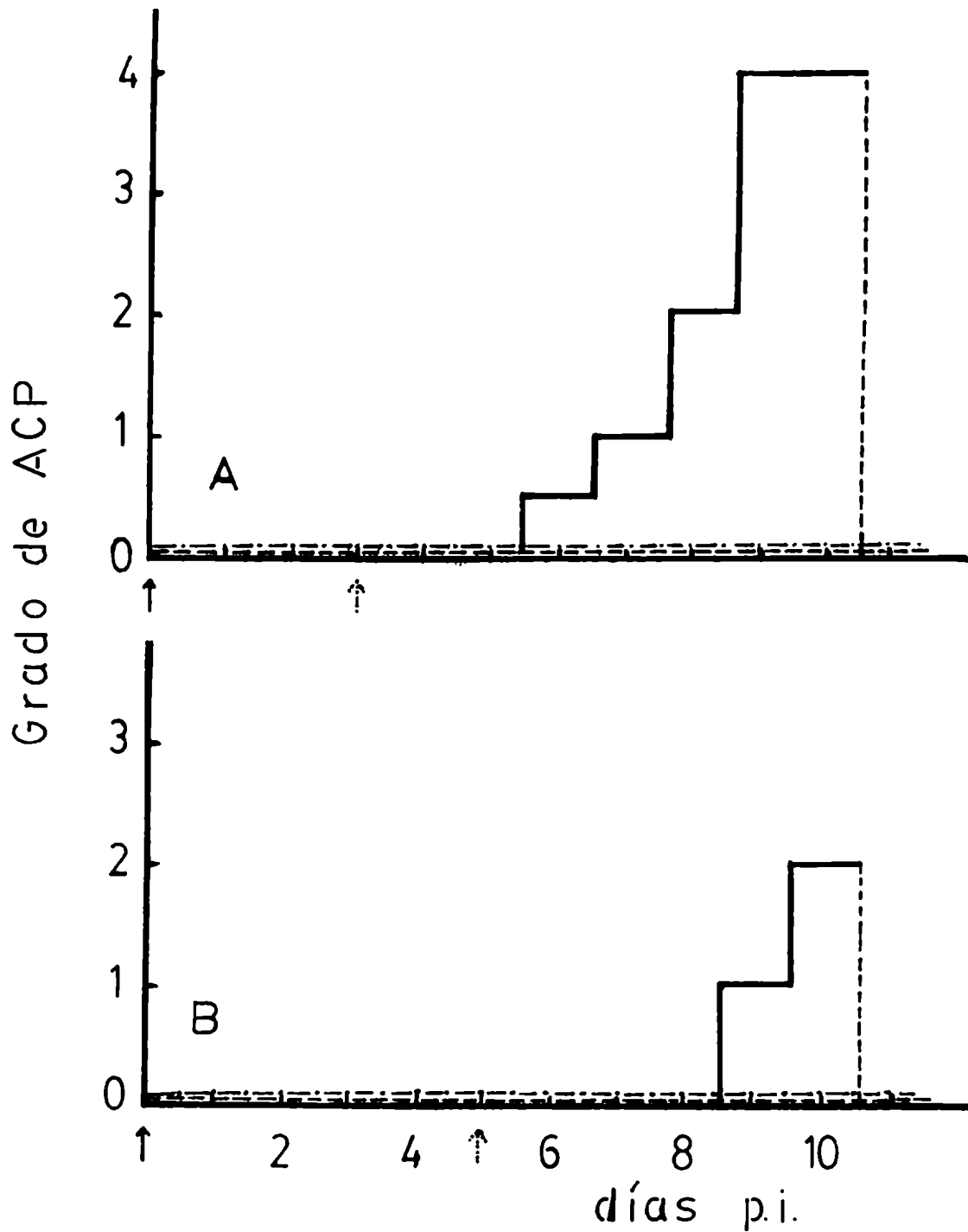
La intensidad y la evolución de la ACP son semejantes en los cultivos infectados con virus estándar al 3er y al 5to día de la seudoinoculación, independientemente de la edad de las células, e iguales a las observadas en el Gráfico N° 8 para la misma multiplicidad de infección.

GRAFICO N° 15

- ↑ Inoculación de VRJ-1p6
- ↑ Desafío con virus Junfn (m.i.: 0,5)
- VIRUS control
- VIRUS + Sobren. VRJ-1p6
- VRJ-1p6
- A. Desafío al 3° día post-interferente
- B. Desafío al 5° día post-interferente

Gráfico N°15

Incremento de la Interferencia "in vitro" en función del tiempo



Las monocapas previamente tratadas con el agente interferente y luego desafiadas con el virus estándar en distintos días, no revelan efectos citopáticos, a diferencia de lo que ocurre cuando se hace una coinfección (Gráfico N° 8).

Es decir que se produce un aumento significativo de la actividad interferente del sobrenadante VRJ-1p6, en función del tiempo transcurrido entre la inoculación del material interferente y la descarga con el virus estándar.

b.- Inhibición de la formación de placas bajo agar

Se trabajó con aproximadamente 2×10^6 células Vero crecidas en botellas, que se dividieron en cinco series de cuatro botellas cada una. Dos series (N° 1 y N° 3) se inocularon con 0,4 ml de sobrenadante VRJ-1p6 puro, y otras dos (N° 2 y N° 4) con el mismo sobrenadante diluido al décimo; la restante (N° 5) se seudo infectó con medio de mantenimiento. Se incubaron 1 h a 37°C , con agitación periódica, luego se descartó el inóculo y las células se cubrieron con 10 ml de medio de mantenimiento. Al 3er día se volcaron los sobrenadantes y las series Nos.1, 2 y 5 fueron infectadas con aproximadamente 150 y 300 UFP cada una y procesadas según el método de titulación por placas. Las series Nos.3 y 4 se cubrieron directamente con agar nutritivo. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro N° 13.

CUADRO N°13Modificación de la actividad interferente en función del tiempo

SERIE	MATERIAL PREINOCULADO	DESAFIO*	UFP/BOT.	INTERFERENCIA %
1	Sobren.VRJ-1p6 puro	A	0	100
		B	16	98,7
2	Sobren.VRJ-1p6 1/10	A	0	100
		B	156	56,4
3	Sobren.VRJ-1p6 puro	-	12	-
4	Sobren.VRJ-1p6 1/10	-	21	-
5	—	A	170	-
		B	300	-

*: Al 3er día post-interferente. A: aprox. 150 UFP; B: aprox. 300 UFP

El % de inhibición es variable, dependiendo de la concentración del factor interferente en el inóculo y de la m.i. del virus estándar. Así por ejemplo, los valores más altos corresponden al sobrenadante VRJ-1p6 inoculado sin diluir, el cual es capaz de inhibir hasta 300 UFP. Ese mismo sobrenadante diluido al décimo, protege los cultivos contra 170 UFP, pero sólo en un 56% contra 300 UFP.

Si comparamos estos resultados con los del Cuadro N° 6, vemos que hay un aumento considerable de la interferencia cuando se prolonga el tiempo que media entre la inoculación de los cultivos con el agente inhibitorio y el desafío con el virus Junín. Este incremento de la actividad interferente

se detecta tanto con el sobrenadante puro, como diluído al décimo.

Es decir que cualquiera sea el método que se utilice para detectar la interferencia, ACP ó UFP, puede observarse un aumento del poder interferente en función del tiempo hasta por lo menos el 3er día p.i.

2) Detección en animales de experimentación

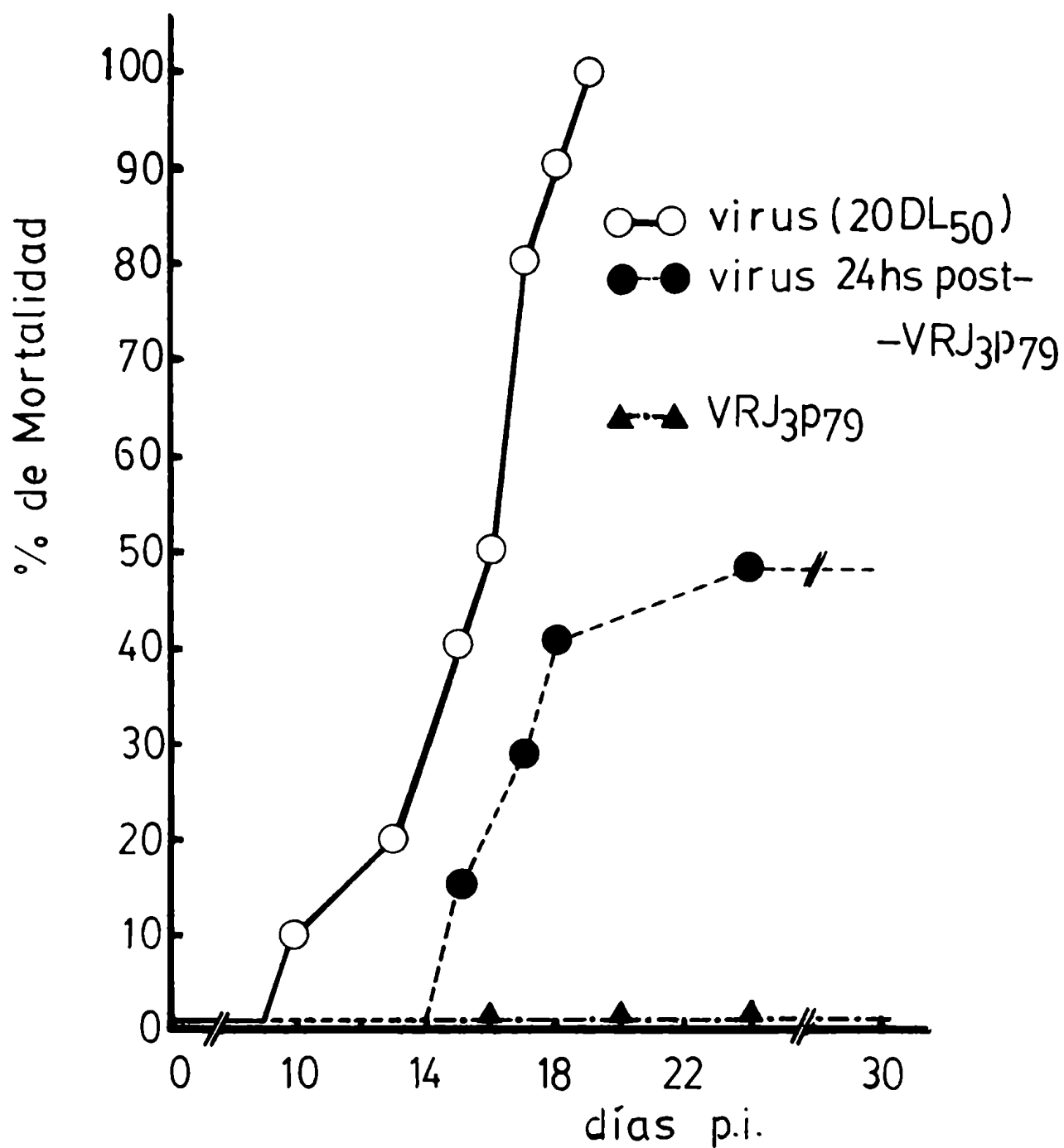
El sobrenadante VRJ-3p79 utilizado en los experimentos anteriores, se empleó para estudiar, en animales, la variación del poder inhibitorio en función del tiempo. Se inocularon dos camadas de ratones lactantes de 48 hs de edad con 0,02 ml del sobrenadante VRJ-3p79 puro. A las 24 hs, una de ellas recibió 20 DL₅₀ de virus Junín XJC13 en el hemisferio cerebral opuesto y la otra se dejó como control. Paralelamente se infectaron animales con 20 DL₅₀ de virus estándar solo. Los ratones se observaron diariamente durante 30 días registrando la mortalidad y los signos característicos de la infección. Los resultados obtenidos se presentan en el Gráfico N° 16.

Los animales inoculados con virus Junín murieron en su totalidad con el cuadro típico de la enfermedad, siendo el día promedio de muerte 16; por el contrario los que recibieron el sobrenadante puro no mostraron signos de infección.

Si se comparan los Gráficos N° 10 y 16 se observa que el efecto interferente es mucho más notable cuando el virus estándar se administra 24 hs después que el sobrenadante VRJ-3p79 ya que se produce un retraso en el día de muerte de los ratones (promedio: 19) y además sobrevive el 52% ($p < 0,01$) de los animales inoculados.

Gráfico N°16

Incremento de la Interferencia "in vivo" en
función del tiempo



Los resultados obtenidos indican que tanto "in vivo" como "in vitro", se observa un incremento de la interferencia cuando se prolonga el tiempo que media entre la inoculación del agente inhibitorio y el desafío con el virus estándar.

SECCION II

INDUCCION DE PARTICULAS INTERFERENTES

En el año 1947 Von Magnus (4) observó que por pasajes concentrados sucesivos en huevos embrionados, el virus de Influenza generaba una progenie viral en la cual la proporción de partículas infecciosas (UFP) respecto de las hemoaglutinantes (UHA) estaba muy disminuída si se la comparaba con un stock preparado a baja m.i.. Von Magnus atribuyó este hecho a la existencia de virus "incompletos" o "inmaduros" originados durante los pasajes seriados, los cuales a pesar de carecer de potencial replicativo, eran capaces de interferir con la multiplicación del virus parental.

Un fenómeno similar de interferencia se observó años más tarde en el caso de los virus Sendai (146) y VSV (147), este último con la ventaja de que por ser sus partículas defectivas más cortas que las del virus estándar, pudieron ser separadas, purificadas y analizadas bioquímicamente.

A partir de este momento y en los años subsiguientes se puso de manifiesto que los pasajes concentrados de virus en cultivos celulares eran apropiados para generar partículas interferentes en los más diversos sistemas virus-célula huésped (6).

Con este propósito se aplicó al virus Junín, cepa XJC13, esta metodología tanto "in-vitro" como "in-vivo", estudiando las fluctuaciones de infectividad y la posible aparición de partículas interferentes en los sucesivos pasajes, hecho este último sugerido por los experimentos presentados en la Sección I.

PARTE I

INDUCCION DE PARTICULAS INTERFERENTES EN CULTIVOS CELULARES

a.- Inducción de partículas interferentes por pasajes concentrados en cultivo de tejidos

Para hacer los pasajes seriados "in-vitro" se infectaron células Vero M con aproximadamente 2×10^7 UFP de virus Junín XJC13 proveniente de cerebro (m.i:10). Al día 3° p.i. se cosechó el sobrenadante, se centrifugó a baja velocidad y se congeló a -70°C (pasaje concentrado N° 1).

Este material sin diluir se utilizó para preparar el siguiente stock concentrado, procediendo de la misma manera que con el primero, y así sucesivamente hasta el número 12. En cada pasaje se determinaron la infectividad por el método de UFP y la actividad interferente en base a la fórmula: (I) donde I y E son los rendimientos de virus a las 20 hs p.i.

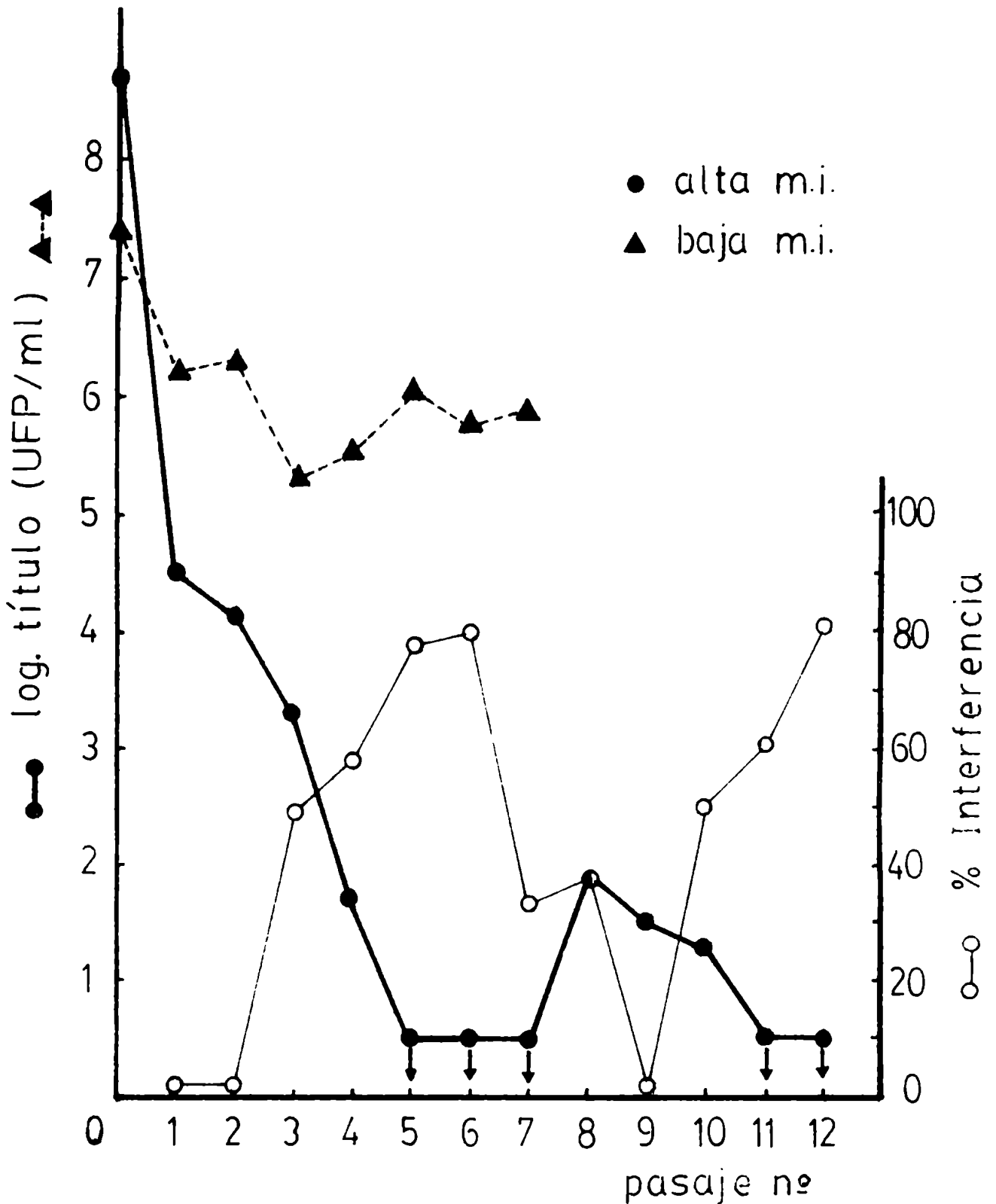
CT_n fue la nomenclatura utilizada para designar estos stocks concentrados a fin de diferenciarlos de los que se presentan más adelante ($n= 1,2, 3, \dots, 12$).

Los resultados obtenidos se muestran en el Gráfico N° 17 en el cual se incluyen comparativamente pasajes hechos a baja multiplicidad de infección (m.i. = 0,01).

Los valores de infectividad tienen una disminución brusca de aproximadamente 4 unid.log. en el primer pasaje (CT_1) llegando en el N° 5 (CT_5) a niveles no detectables, es decir que 5 pasajes concentrados son suficientes para reducir la infectividad en 8 unid.log.. Paralelamente se observa

Gráfico N° 17

Pasajes del virus Junín en células Vero
a alta multiplicidad de infección



un aumento progresivo de la actividad interferente, alcanzando el máximo (80%) en CT_6 , en momentos en que no se detectan UFP en los stocks concentrados. En el pasaje subsiguiente, CT_7 , hay una pérdida drástica de interferencia lo cual trae como consecuencia una reaparición de la infectividad en CT_8 , que se mantiene hasta CT_{10} , para negativizarse luego en CT_{11} y CT_{12} . Coincidentemente, la actividad interferente experimenta un nuevo incremento en los 3 últimos pasajes.

b.- Influencia de la célula huésped sobre la evolución de la infectividad y la interferencia de los sucesivos pasajes.

A fin de determinar la participación de la célula huésped en la génesis de partículas interferentes se hicieron pasajes concentrados en células Vero de distintas procedencias.

b₁) Células Vero Z

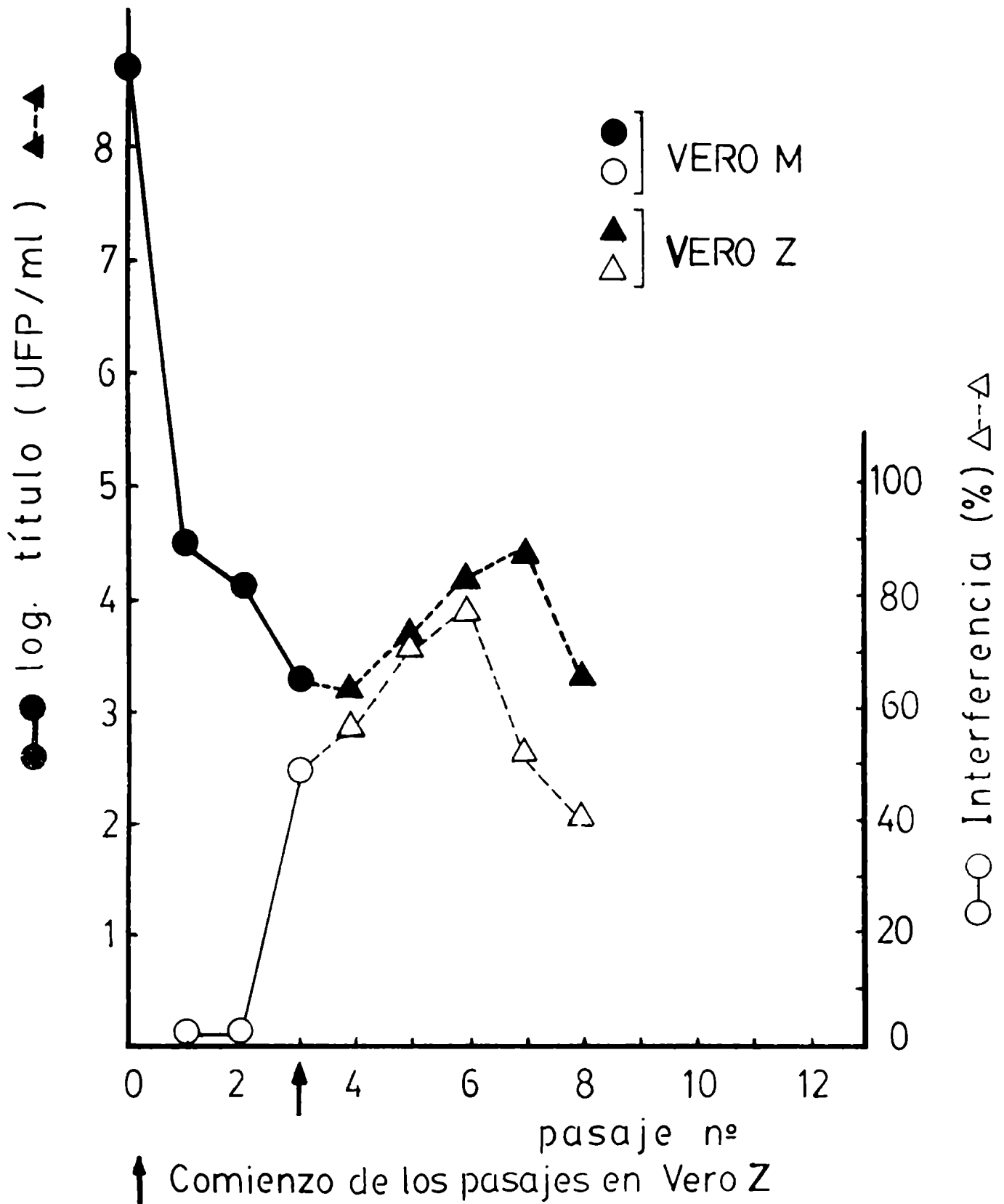
Los pasajes sucesivos se iniciaron a partir de CT_3 (3er pasaje concentrado de I.a) según la metodología descrita anteriormente, y para cada stock así obtenido se determinaron la infectividad por el método de UFP y la actividad interferente según la fórmula (I). La nomenclatura utilizada para designar esta serie fue \overline{CT}_n .

Los resultados se presentan en el Gráfico N° 18.

Hasta el 3er pasaje (CT_3) las curvas de infectividad y % de interferencia son comunes a ambos gráficos N° 17 y 18. Los pasajes subsiguientes, \overline{CT}_4 a \overline{CT}_8 muestran una evolución cíclica de la infectividad que en ningún momento se negativiza como en el caso anterior (Gráfico N° 17).

Gráfico N° 18

Influencia de la célula huésped sobre la infectividad e interferencia



La interferencia asociada a estos stocks tiene un comportamiento diferente al observado en I.a), ya que acompaña en todo momento, en forma proporcional los incrementos y descensos de la infectividad en cada uno de los stocks concentrados.

b₂) Células Vero U

Se iniciaron pasajes concentrados a partir de CT₃ y CT₈ (I.a) procediendo de igual forma a la descrita en I.a), denominándose CT_n^* los originados en CT₃, y CT_n^* los correspondientes a CT₈.

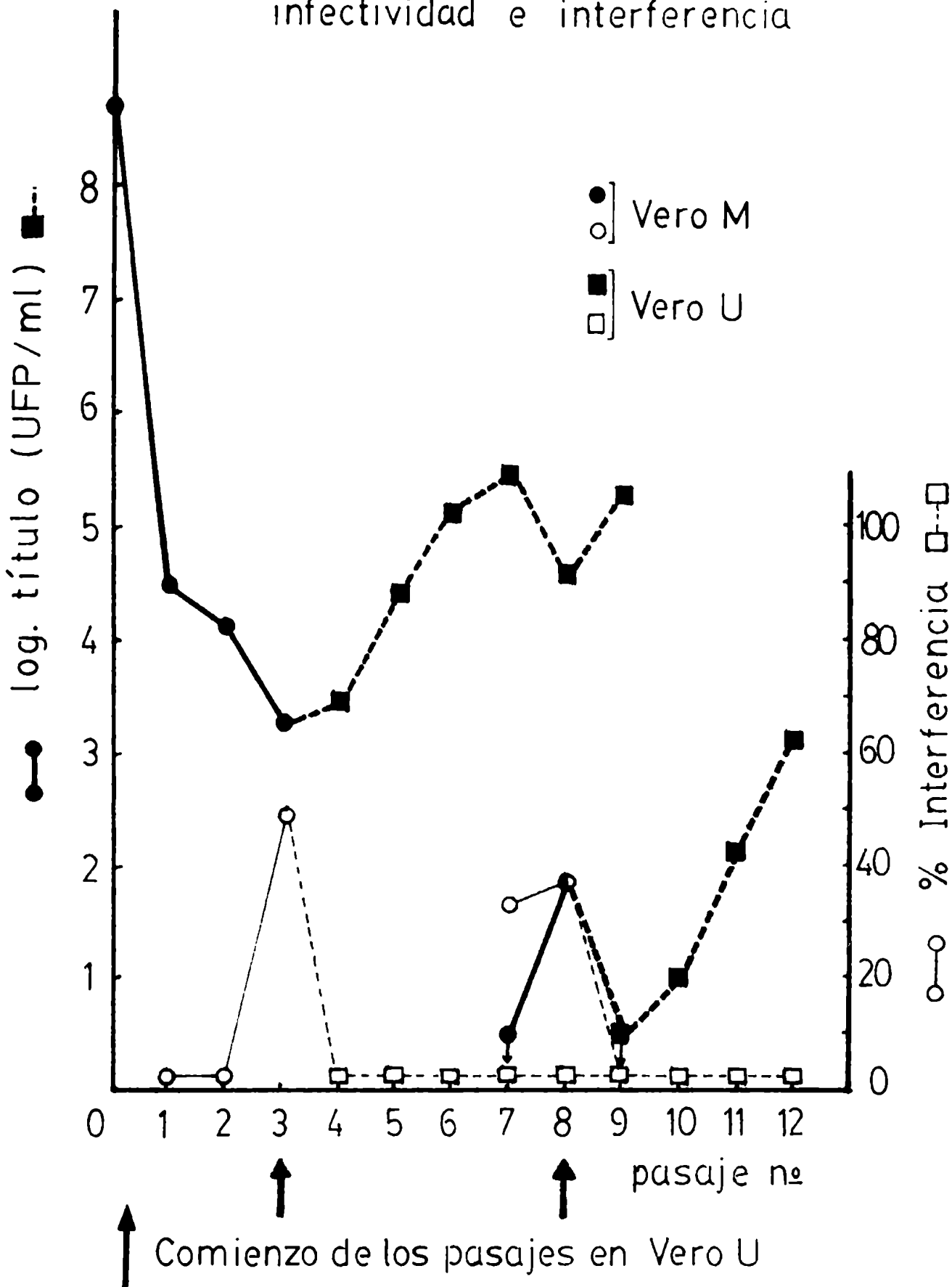
Los resultados obtenidos se muestran en el Gráfico N° 19.

La evolución de la infectividad en los stocks CT_4^* a CT_9^* es marcadamente distinta a la observada en la serie CT_n (CT₄ a CT₉, gráfico N° 17), alcanzando un título máximo en CT_7^* . A diferencia de lo que ocurre con las dos series anteriores (I.a y I.b₁) en que la infectividad de los stocks concentrados nunca supera la del primer stock (CT₁), en este caso el valor de CT_7^* es superior aproximadamente 1 unid.log. respecto de CT₁. Otra diferencia significativa en relación al huésped usado es que en ninguno de los pasajes hechos en este sistema celular fue posible detectar actividad interferente, lo cual explicaría el aumento del título de virus en los pasajes sucesivos.

Cuando los stocks concentrados se inician a partir de CT₈, se produce una disminución de la infectividad en CT_9^* hasta niveles no detectables, para reaparecer luego e incrementarse significativamente (>3 unid.log.) en CT_{10}^* , CT_{11}^* y CT_{12}^* . Como en el caso anterior, en estos pasajes no se detecta actividad interferente.

Gráfico N° 19

Influencia de la célula huésped sobre la infectividad e interferencia



c.- Influencia del stock utilizado para iniciar los pasajes concentrados, sobre la infectividad y actividad interferente de los mismos.

Otros autores, trabajando con el virus de LCM (148), encontraron que la historia previa del virus afectaba profundamente su comportamiento "in-vitro", pero sin cambiar sus propiedades, como por ejemplo, la de inducir infecciones persistentes en ratones recién nacidos.

Se estudió entonces, qué ocurría en nuestro sistema de pasajes seriados "in-vitro" cuando se reemplazaba el virus proveniente de ratón lactante usado para hacer el 1er pasaje concentrado (CT_1) por otra fuente de virus como ser un stock preparado en cultivo de tejidos. Este último se obtuvo infectando células Vero con virus Junín XJCl3 (procedente de cerebro de ratón) a una multiplicidad de infección de 0,01. Al 5° día p.i. se cosechó el sobrenadante, se centrifugó a baja velocidad y congeló a $-70^{\circ}C$ hasta su uso. El título de este stock fue de 2×10^6 UFP/ml.

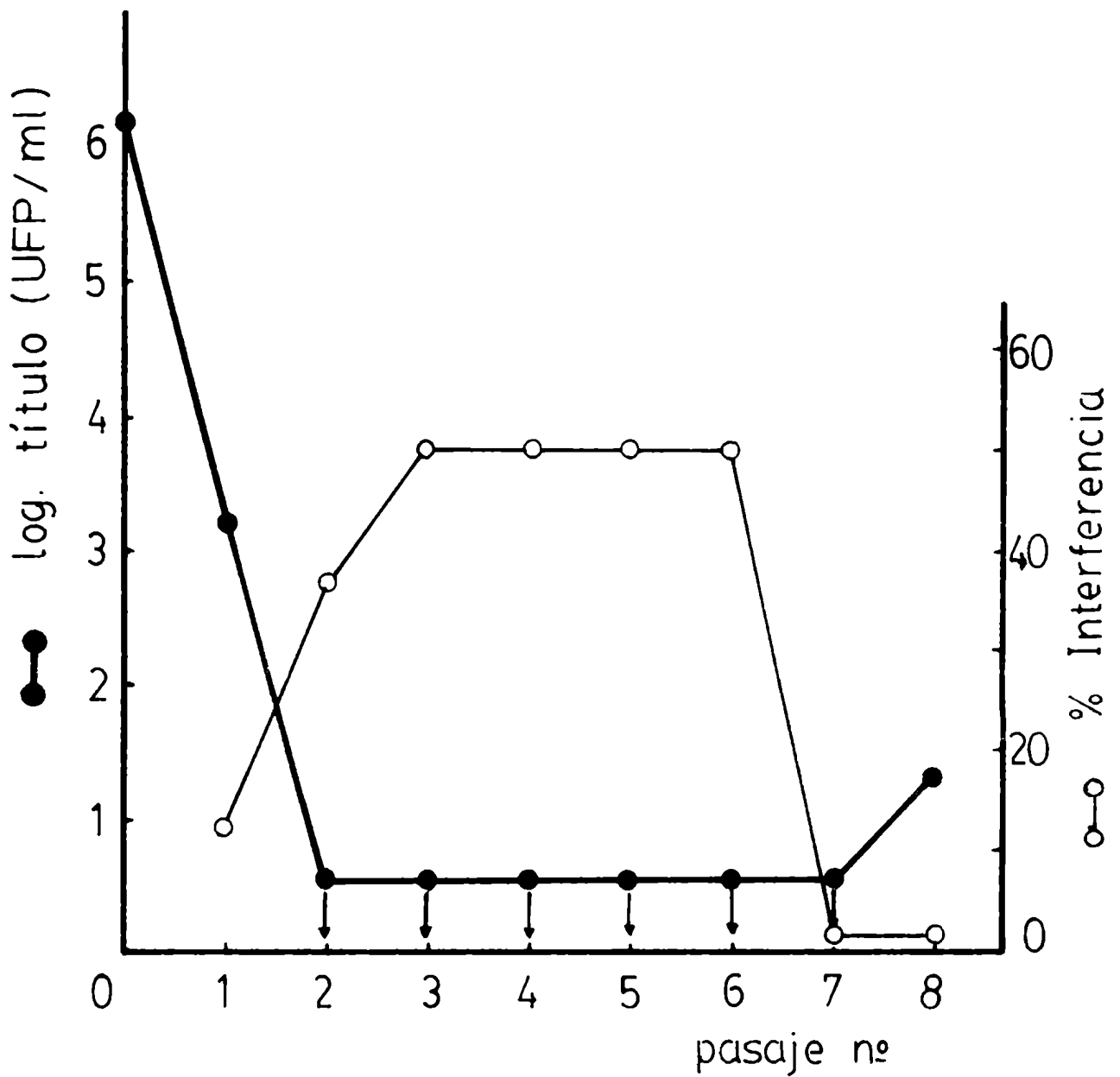
El primer pasaje concentrado se hizo inoculando células Vero M con este material (m.i.: 0,4). Al 3er día p.i. se cosechó el sobrenadante, se centrifugó y congeló a $-70^{\circ}C$. Los sucesivos pasajes se prepararon según la metodología descrita anteriormente y se denominaron $T_1, T_2, T_3, \dots, T_8$.

Los resultados se presentan en el Gráfico N° 20.

La evolución de la infectividad en los primeros pasajes es marcadamente distinta respecto de la obtenida en I.a) (Gráfico N° 17). Si bien en ambos casos se observa una pérdida inicial brusca de la cantidad de virus infectante, en la serie T_n son suficientes dos pasajes concentrados (T_1 y T_2) para que la infectividad descienda a valores no detectables. En el caso de la serie CT_n (Gráfico N° 17) se necesitan 5 de estos pasajes para obtener un

Gráfico N° 20

Influencia del stock de virus parental sobre la infectividad e interferencia



resultado similar.

En los stocks subsiguientes la variación de la infectividad en T_n y CT_n es bastante semejante, existiendo diferencias sólo en el número de pasajes en que no puede detectarse virus infeccioso, y que son 6 en el primer caso (T_2, T_3, \dots, T_7) y 3 en el segundo (CT_5, CT_6 y CT_7). Tanto en T_8 como en CT_8 se observa un aumento poco significativo de la infección viral de 30 UFP/ml y 90 UFP/ml respectivamente.

Asimismo, la interferencia tiene inicialmente un comportamiento diferente en ambas series, ya que en los pasajes CT_1 y CT_2 su valor es nulo, no observándose lo mismo en T_1 y T_2 en que se obtienen un 12% y 37% respectivamente. Es decir, que mientras en este último caso podría explicarse el descenso brusco de infectividad como una consecuencia del aumento de la actividad interferente, no sucede lo mismo con CT_1 y CT_2 , a pesar de producirse en los mismos una pérdida de 4 unid.log.

A partir del primer pasaje y hasta el N° 3 (T_3) la actividad interferente se incrementa linealmente, manteniéndose constante en los cuatro pasajes subsiguientes (T_3, T_4, T_5 y T_6) en un valor de 50% para desaparecer luego bruscamente en T_7 y T_8 . Es decir que aquellos stocks concentrados en los cuales no puede detectarse infectividad, salvo el N° 2 y el N° 7, coincidentemente tienen los valores mayores de interferencia. Es de hacer notar que el aumento de la infectividad en T_8 está precedido por la desaparición de la actividad inhibitoria en el pasaje anterior T_7 .

Resultados similares se habían observado en I.a) (Gráfico N° 17) en los pasajes con altos valores de interferencia (CT_5 y CT_6) en los cuales no pudo detectarse infectividad viral. Asimismo, al producirse en CT_7 una pérdi-

da significativa de la actividad interferente, reaparece la infectividad en el stock posterior CT₈.

d.- Caracterización de la actividad interferente inducida en cultivo de tejidos

Hasta el presente la información obtenida acerca de la naturaleza del agente interferente, si bien era escasa, lo señalaba como un ente particulado con algunas características comunes con el virus estándar. Se decidió entonces, ampliar dichos conocimientos sometiendo los stocks concentrados preparados in-vitro a diversos tratamientos que permitieran profundizar más en su estructura, composición química y propiedades biológicas.

1.- Neutralización de la actividad interferente con inmunosuero antiJunín

Una alícuota de CT₆ se trató durante 1 h a 37°C en baño maría con suero humano de convalescente (índice de neutralización 10⁷ respecto de la cepa homóloga) previamente inactivado. El inmunosuero se utilizó diluido inicialmente al 20% y se mezcló en partes iguales con el stock concentrado puro. Paralelamente se hicieron controles con alícuotas de CT₆ sin tratar, mantenidas a 0°C y a 37°C. Una vez finalizada la neutralización, se inocularon células Vero con cada uno de estos materiales sin diluir, a fin de determinar las actividades interferentes respectivas.

Los resultados que se obtuvieron se presentan en el Cuadro N° 14.

CUADRO N° 14Neutralización de la actividad interferente con inmunosuero antiJunín

MATERIAL INOCULADO	DESAFIO* (UFP)	RENDIMIENTO (UFP/ml)	INTERFERENCIA %
————	1×10^5	$2,2 \times 10^3$	0
CT ₆ , 1 h a 0°C	1×10^5	$5,3 \times 10^2$	76
CT ₆ , 1 h a 37°C	1×10^5	$6,5 \times 10^2$	70
CT ₆ + Inmunosuero al 10%	1×10^5	$2,2 \times 10^3$	0

*: Antes del desafío con el virus estándar, los cultivos se lavaron exhaustivamente a fin de eliminar cualquier resto de inmunosuero.

El tratamiento con suero de convalescente anti-Junín anula por completo la actividad interferente. Un resultado similar se había obtenido en la Sección I, Parte III.1 al ensayar el sobrenadante de una línea persistentemente infectada con el mismo inmunosuero. Es decir que las partículas responsables de la interferencia poseen antígenos comunes con el virus estándar, los cuales serían indispensables para que se produjese dicha interferencia.

2.- Sensibilidad al calentamiento

Se estudió la estabilidad térmica del stock concentrado CT₆ manteniendo una alícuota del mismo en baño maría a 37°C durante 1 h y haciendo paralelamente un control a 0°C. Al cabo de ese tiempo se determinaron las acti-

vidades interferentes de ambos materiales según el método descrito anteriormente.

Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro N° 14.

La actividad interferente disminuyó en aproximadamente un 8% en relación al control, lo cual indicaría una estabilidad térmica similar a la del virus parental (140).

3.- Sensibilidad a la irradiación con luz ultravioleta

Se analizó en forma comparativa la inactivación de la capacidad interferente de un stock concentrado y de la infectividad del virus estándar, producida por radiación UV.

Los materiales diluïdos en solución salina se colocaron en cajas de Petri y se irradiaron con una lámpara germicida de 15 watts, marca Phillips, en cámara oscura, a 10 cms de distancia durante 5 min. Una vez finalizado el tratamiento se cerraron las cajas, se cubrieron con papel de aluminio y el stock concentrado irradiado CT₆ y su control se procesaron según el método de rutina para determinar las actividades interferentes respectivas. El virus estándar tratado paralelamente y su control se titularon de acuerdo a la técnica de las unidades formadoras de placas a fin de determinar el grado de inactivación sufrido por la infectividad como consecuencia de la irradiación.

Los resultados se presentan en el Cuadro N° 15.

CUADRO N° 15Sensibilidad de la interferencia a la luz U.V. en relación a la infectividad

MATERIAL INOCULADO	RENDIMIENTO* (UFP/ml)	TITULO (UFP/ml)	INTERFERENCIA %	INACTIVACION %
---	$2,2 \times 10^3$	---	0	---
CT ₆ , temp.amb.	$5,3 \times 10^2$	---	76	---
CT ₆ + U.V.	$6,7 \times 10^2$	---	70	---
XJC13, temp.amb.	---	$2,7 \times 10^5$	---	0
XJC13 + U.V.	---	< 5	---	>99,998

*: El desaffo se hizo con 1×10^5 UFP/cultivo

A diferencia de lo que ocurre en algunos sistemas en los cuales la actividad de las partículas interferentes es sensible a la luz UV, las producidas por pasajes seriados del virus Junín XJC13 resultaron sumamente estables a la irradiación. Esto estaría indicando un menor contenido de ácido nucleico que el virus parental, o que no se necesita un genoma funcional para que se produzca la interferencia.

4.- Filtración del agente interferente

A fin de confirmar la naturaleza particulada del agente interferente y tener una idea aproximada de su tamaño, el pasaje concentrado N° 4 (CT_L) se

filtró a través de membranas Millipore con poros de 220 μ y 50 μ de diámetro promedio.

La filtración se hizo utilizando presión positiva, volúmenes pequeños y manteniendo el material original y los filtrados correspondientes en hielo hasta la determinación de las actividades interferentes respectivas en células Vero.

Los resultados se presentan en el Cuadro N° 16.

CUADRO N° 16

Determinación aproximada del tamaño del agente interferente

MATERIAL INOCULADO	DESAFIO (UFP)	RENDIMIENTO (UFP/ml)	INTERFERENCIA %
---	$1,2 \times 10^5$	$6,6 \times 10^3$	0
CT ₄	$1,2 \times 10^5$	$2,4 \times 10^3$	64
CT ₄ filtrado x 220 μ	$1,2 \times 10^5$	$2,5 \times 10^3$	62
CT ₄ filtrado x 50 μ	$1,2 \times 10^5$	$7,0 \times 10^3$	0

La actividad interferente es completamente retenida por filtros con poros de 50 μ de diámetro, lo cual indicaría un tamaño mínimo aproximado superior a los 50 μ para las partículas interferentes.

Estos resultados permiten descartar que sea un inhibidor de naturaleza polipeptídica el responsable de la interferencia en los stocks virales.

5.- Variación de la interferencia en función de la concentración relativa de partículas interferentes

Se analizó el efecto que producía la dilución de un stock concentrado (T_6) sobre su actividad interferente. A tal fin se inocularon células Vero con diluciones crecientes de T_6 y luego de 1 h a 37°C se desafiaron con $5,5 \times 10^5$ UFP (m.i.: 0,3). A las 20 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes, se centrifugaron y congelaron a -70°C . Estos materiales se titularon por el método de unidades formadoras de placas y con los resultados obtenidos se calcularon las actividades interferentes correspondientes (Gráfico N° 21).

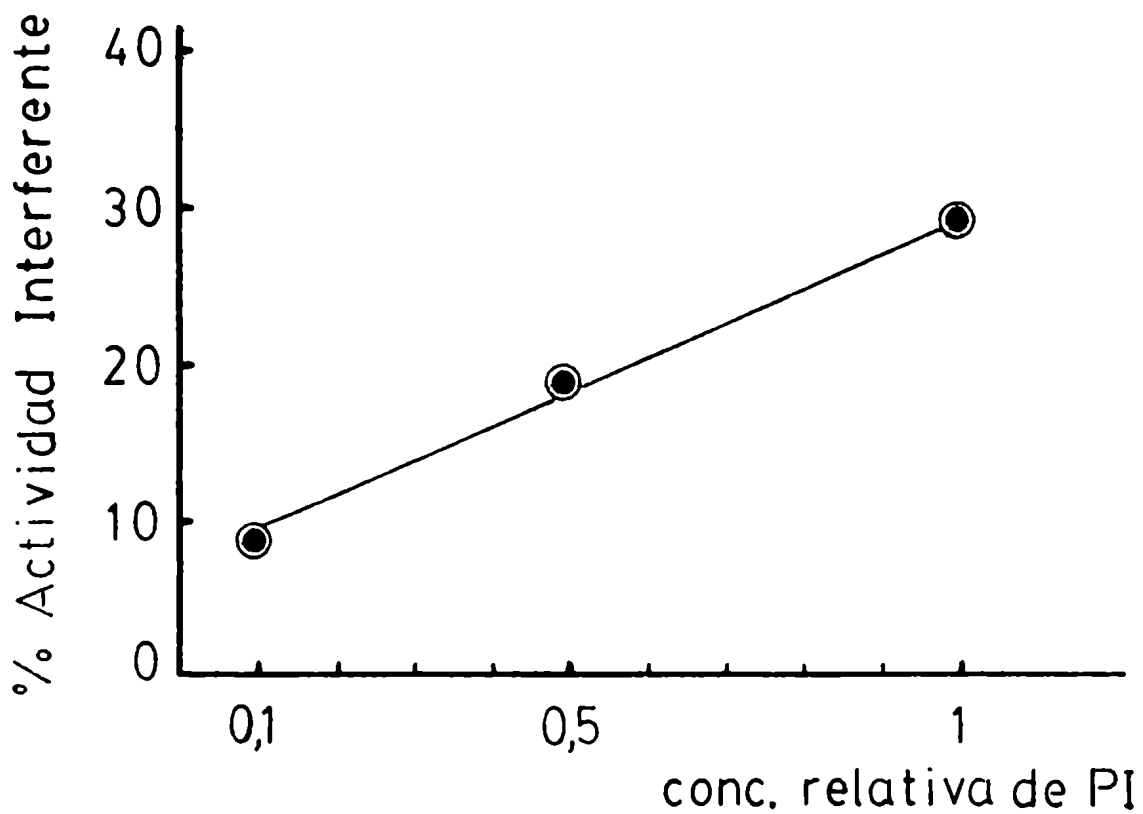
La dilución de T_6 produce una pérdida proporcional de interferencia lo cual indica que existe una relación directa entre la cantidad de partículas interferentes inoculadas y la actividad inhibitoria del stock; es decir que para una dosis constante de virus estándar (en este caso $5,5 \times 10^5$ UFP), la concentración de partículas interferentes en el stock sería la que determina el grado de interferencia alcanzado. La relación lineal entre los parámetros graficados indica que es suficiente la infección de una célula con una partícula interferente para inhibir la multiplicación del virus estándar en esa misma célula.

6.- Momento del ciclo de replicación del virus estándar en el cual se produce el máximo de interferencia

Células Vero de 48 hs fueron inoculadas con una misma concentración de partículas interferentes, a distintos tiempos antes y después del desafío con virus Junín XJC13, durante 1 h a 37°C . Finalizado ese intervalo, los

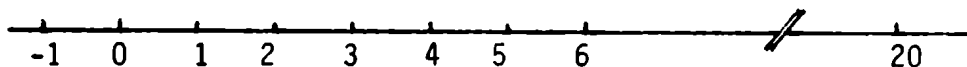
Gráfico N°21

Variación de la Interferencia en función de
la concentración de PI



cultivos se lavaron con PBS y se infectaron con el virus estándar, m.i. = 0,02 UFP/cél. Paralelamente se hizo un control con células normales que recibieron la misma dosis del virus parental.

El siguiente es un esquema del experimento realizado:



donde 0 es la hora en que los cultivos fueron desafiados con 4×10^4 UFP de virus estándar, y -1, 0, 1, 2,, 6 las horas en que se hizo la inoculación con el stock concentrado interferente (\overline{CT}_7). A las 20 hs p.i. se determinaron los rendimientos respectivos.

La titulación de los sobrenadantes de cada una de las series dió el resultado que se presenta en el Gráfico N° 22.

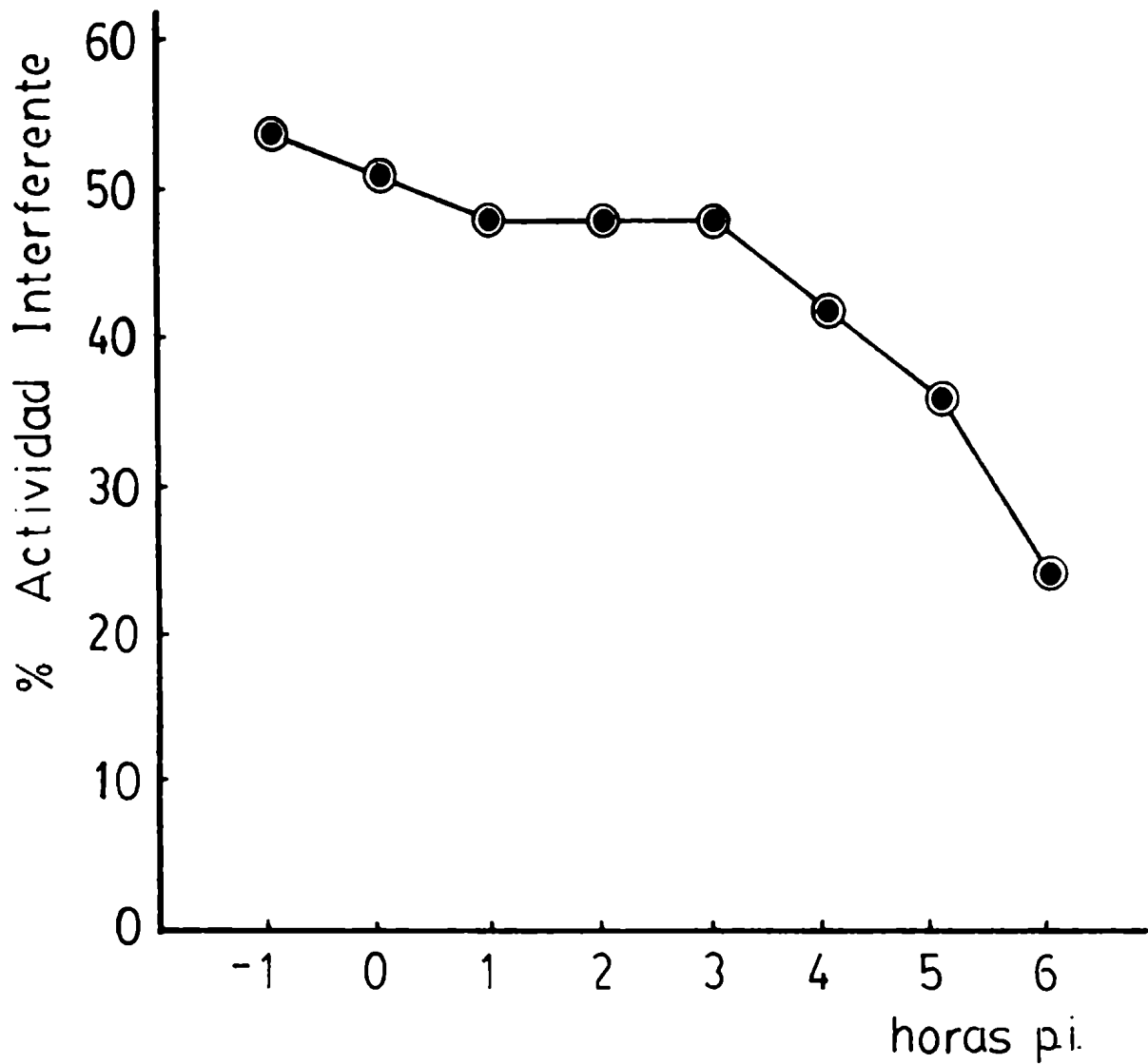
Los valores máximos de interferencia se obtuvieron cuando el stock concentrado se agregó en las primeras 3 hs del ciclo de multiplicación del virus estándar. A partir de la 4ta hora se observó una disminución progresiva de la actividad inhibitoria, lo cual indicaría que la interferencia ocurre en una etapa temprana de la replicación viral. Los resultados obtenidos permiten descartar la posibilidad de que la interferencia se produzca a nivel de adsorción o penetración del virus a la célula huésped, o en el estadio de maduración y liberación al medio extracelular.

7.- Interferencia heterotípica y heteróloga

A fin de determinar la especificidad de la interferencia mediada por las partículas defectivas de virus Junín, se ensayó la replicación de dis-

Gráfico N° 22

Etapa del ciclo de multiplicación del virus estándar sensible a las P.I.



tintos virus, relacionados o no, en presencia de un stock concentrado de actividad interferente conocida. El experimento se hizo inoculando cultivos paralelos de células Vero con T₅ sin diluir, dejándolo en contacto durante 1 h a 37°C. Se descartaron luego los inóculos, las monocapas se lavaron con PBS y se desafiaron con los virus Junín, Tacaribe, Pichinde, VSV y Herpes Simplex (m.i.: 0,3, 0,6, 0,13, 5 y 1 respectivamente). Los controles se hicieron con células Vero normales que fueron inoculadas simultáneamente con cada uno de los stocks virales. Luego de 1 h a 37°C los cultivos se lavaron con PBS y se cubrieron con 8 ml de medio de mantenimiento. Los sobrenadantes se cosecharon a las 8 hs p.i. en el caso de VSV (149), 18 hs para Pichinde (150) y 20 hs para Junín (145), Tacaribe y HSV (151). Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro N° 17.

La interferencia con la multiplicación del virus Tacaribe es bastante similar a la observada en el caso del virus Junín lo cual está de acuerdo con la resistencia que presentan los cultivos persistentemente infectados con este virus a la descarga con Tacaribe. El virus Pichinde resulta inhibido en una proporción significativamente menor, a pesar de estar serológicamente relacionado con el virus Junín.

La multiplicación de los virus VSV y HSV no es afectada durante la infección mixta.

CUADRO N°17Especificidad de la interferencia

INTERFERENTE	VIRUS	DESAFIO (UFP)	RENDIMIENTOS (UFP/ml)	INTERFERENCIA %
--	JUNIN	$6,0 \times 10^5$	$5,7 \times 10^3$	0
T ₅	JUNIN	$6,0 \times 10^5$	$2,9 \times 10^3$	49,1
--	TACARIBE	$1,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	0
T ₅	TACARIBE	$1,2 \times 10^6$	$6,5 \times 10^4$	40,9
--	PICHINDE	$2,5 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	0
T ₅	PICHINDE	$2,5 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	19,4
--	VSV	$1,0 \times 10^7$	$2,4 \times 10^8$	0
T ₅	VSV	$1,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^8$	0
--	HSV	$2,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	0
T ₅	HSV	$2,0 \times 10^6$	$3,1 \times 10^5$	0

PARTE II

INDUCCION DE PARTICULAS INTERFERENTES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION

a.- Inducción de partículas interferentes por pasajes concentrados de virus Junín en cerebro de ratón lactante.

Se utilizaron ratones lactantes de 24-48 hs de edad, los cuales fueron inoculados por vía intracerebral con $1,4 \times 10^6$ CTDI₅₀. Al 7^o día p.i. se sacrificaron los animales y se preparó el macerado de cerebros al 10% en buffer según el método de rutina denominándolo C₁. Con este material sin diluir se inoculó un nuevo lote de ratones que fueron sacrificados 7 días más tarde, prosiguiendo de esta forma hasta el pasaje concentrado N°10 (C₁₀).

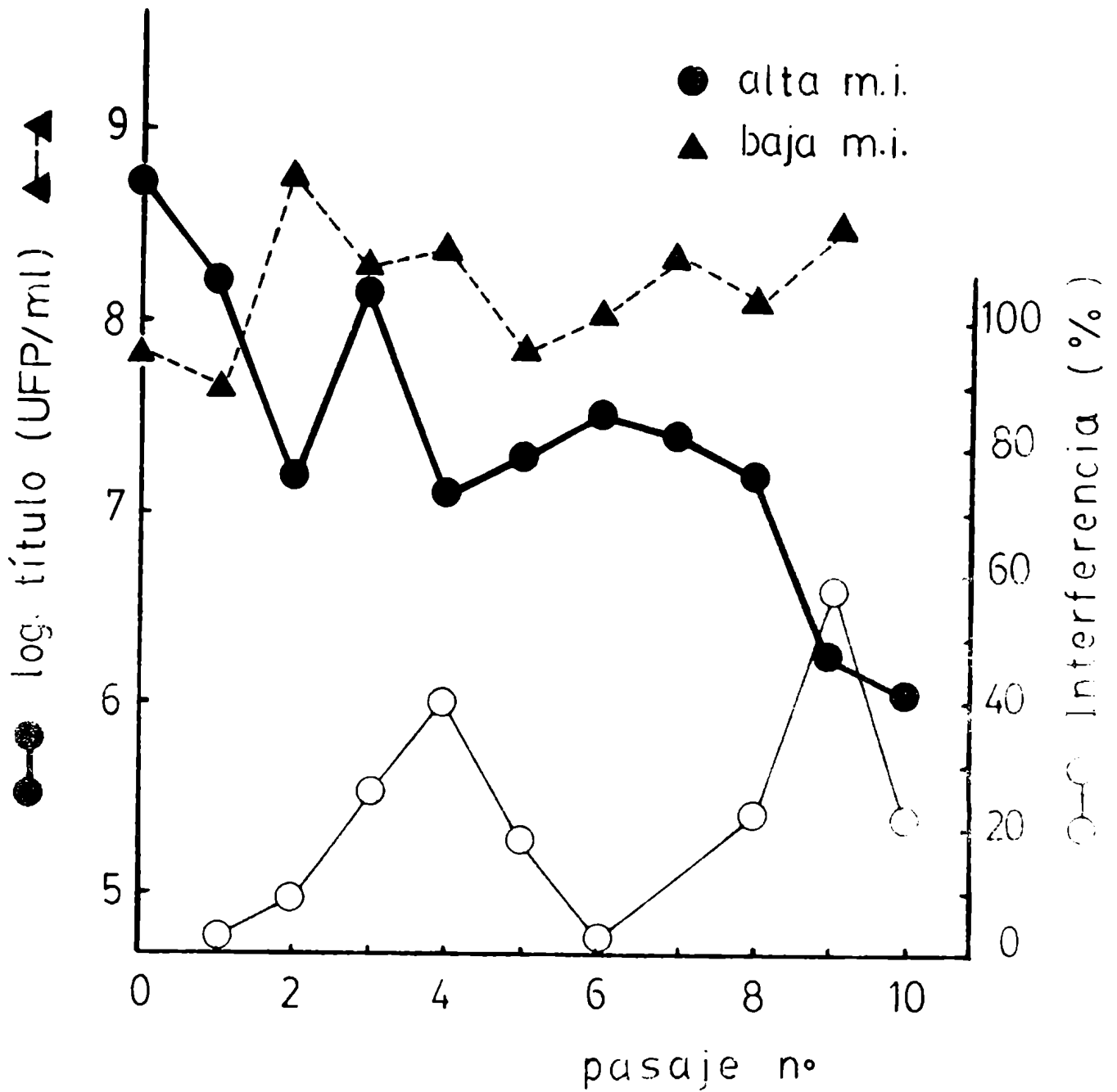
La infectividad se determinó por el método de UFP y el % de interferencia se calculó según la fórmula (I), donde E es el rendimiento del virus estándar inoculado solo e I es el rendimiento viral de la infección mixta, ambos a las 20 hs p.i. en cultivo de tejidos.

Los resultados obtenidos se presentan en el Gráfico N° 23 en el cual se incluyen comparativamente las variaciones de infectividad de stocks preparados por pasajes diluidos (Inóculo = 1 a 5×10^3 DL₅₀).

En los stocks concentrados C₁ y C₂ se produce una disminución inicial de la infectividad de aproximadamente 1,5 unidades logarítmicas siendo luego ésta fluctuante y no mayor de 1 unidad log en los subsiguientes C₃ y C₄. Las respectivas actividades interferentes muestran un incremento paulatino alcanzando un máximo de 40% en el pasaje C₄ disminuyendo luego a 0% en C₆. Este ciclo de interferencia dura 5 pasajes mientras que la infectividad sufre en ese mismo intervalo una pérdida global del 90% (1 unid log). A partir

Gráfico N° 23

Pasajes del virus Junín en ratón lactante
a alta multiplicidad de infección



de C_6 y hasta C_{10} se observa una disminución de la infectividad de 1,5 unidades log aproximadamente, acompañada por una evolución de la actividad interferente en sentido inverso. La pérdida de infectividad luego de 10 pasajes concentrados es de un 99,8%.

En base a esto podría pensarse que el título correspondiente a cada pasaje sería el resultado de la interacción entre un cierto valor de infectividad y el % respectivo de interferencia presentes en el inóculo. Sin embargo, si comparamos C_2 y C_4 vemos que para una misma dosis inicial ($2,2 \times 10^8$ UFP) el rendimiento viral es semejante ($1,6$ y $2,0 \times 10^7$ UFP/ml) independientemente de los valores de interferencia de C_1 y C_3 (0% y 26%). En los pasajes subsiguientes C_3 y C_5 nuevamente se administran cantidades equivalentes de virus ($4,0$ y $3,2 \times 10^4$ UFP) a pesar de lo cual la infectividad de los stocks obtenidos difiere en aproximadamente un 60%, lo cual podría atribuirse en este caso a actividades interferentes bastantes disímiles en los inóculos correspondientes (9% y 40%). Entonces recién a partir de C_3 pueden explicarse, por una interrelación de ambos parámetros, las variaciones de infectividad e interferencia de los stocks subsiguientes.

Es decir, que en el sistema "in vivo" es posible inducir partículas interferentes por sucesivos pasajes concentrados, aunque éstas no serían las únicas responsables de las fluctuaciones observadas en la infectividad de los primeros pasajes seriados.

SECCION III

IMPLICANCIA DE LAS PARTICULAS INTERFERENTES EN LAS INFECCIONES CON VIRUS JUNIN

Los experimentos presentados hasta el momento indican que durante la replicación del virus Junín en células Vero, tanto en la etapa primaria de la infección como en el estadio de persistencia viral, se generan partículas no infecciosas, capaces de interferir con la multiplicación del virus parental y con sus actividades citolíticas y citopatogénicas.

Como a estas partículas interferentes se les ha asignado un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de las infecciones persistentes (6), un análisis más detallado de su interacción con el virus estándar sería de utilidad para delimitar su participación en las infecciones con virus Junín tanto "in-vitro" como "in-vivo".

Con este propósito se estudió la cinética de aparición de la actividad interferente durante la multiplicación del virus Junín XJC13 en cultivo de tejidos y en cerebro de ratón lactante en los días posteriores a la infección. Asimismo, se analizó la influencia de distintas proporciones de partículas interferentes en el inóculo sobre la evolución de la infectividad del virus estándar en cultivo de tejidos.

Durante la etapa de persistencia viral se determinó la producción de partículas infecciosas, partículas interferentes y placas bajo agar en distintos niveles de pasaje de la sublínea VRJ-3, como así también la posibilidad de inducir la síntesis de antígenos virales y la liberación de virus

completo utilizando distintos tratamientos. El resultado de estas investigaciones darían una idea aproximada del mecanismo por el cual se mantiene el equilibrio entre el virus y la célula huésped.

PARTE I

INFECCION PRIMARIA

Aparición de actividad interferente durante la multiplicación de virus Junín XJC13 in-vivo

Se inocularon tres camadas de ratones lactantes albino-suizos con el stock concentrado C₈ puro ($3,8 \times 10^5$ UFP) por vía intracerebral. Los animales se observaron diariamente, tomando muestras de los mismos al azar en los días 5º, 7º y 10º p.i. en que se prepararon los correspondientes homogeneizados. En cada uno de ellos se determinaron la infectividad y la actividad interferente, las cuales se presentan en el Cuadro N° 18.

CUADRO N° 18

Aparición de actividad interferente durante la multiplicación de virus Junín en cerebro de ratón lactante

DIA p.i.	INFECTIVIDAD UFP/ml	INTERFERENCIA %
5º	$6,1 \times 10^6$	0
7º	$2,1 \times 10^6$	58
10º	$1,4 \times 10^6$	73



A diferencia de lo que ocurre cuando se prepara en forma habitual un stock de virus a partir de cerebros infectados (m.i. baja), en este caso el título mayor se obtiene al 5° día p.i.. La actividad interferente recién se detecta en el día 7° p.i. estando retrasada en 1 ó 2 días respecto del máximo de infectividad, la cual comienza a disminuir coincidentemente con el incremento de la interferencia.

Aparición de actividad interferente durante la multiplicación del virus Junín in-vitro

Se infectaron células Vero con el stock concentrado \overline{CT}_7 (m.i. = 0,01) durante 2 hs a 37°C. Finalizada la adsorción, se descartó el inóculo y se agregaron 9 ml de medio de mantenimiento. El cultivo se reincubó a 37°C y diariamente se cosecharon alícuotas del sobrenadante que se centrifugaron y congelaron -70°C. En cada una de esas alícuotas se determinaron la infectividad y la actividad interferente respectiva.

Los resultados obtenidos se muestran en el Gráfico N° 24.

La infectividad alcanza a partir del 2° día valores del orden de 5 a 7×10^3 UFP/ml en los cuales se mantiene hasta el 7° día p.i., descendiendo en el día 8° hasta 1×10^2 UFP/ml. La interferencia aparece en el 2° día p.i. aumentando gradualmente hasta un 50% en el cuarto día. El valor máximo de la actividad interferente muestra un retraso de 1 a 2 días respecto de la infectividad, en forma similar a lo postulado por Huang y Baltimore (25) y observado en otros sistemas generadores de partículas interferentes.

En el Gráfico N° 25 se presentan las curvas de crecimiento del virus estándar en los pasajes concentrados \overline{CT}_4 y \overline{CT}_8 . Si se las compara con una curva de crecimiento en condiciones normales (Gráfico N° 3) se observa que

Gráfico N° 24

Aparición de PI durante la multiplicación
del virus Junín "in vitro"

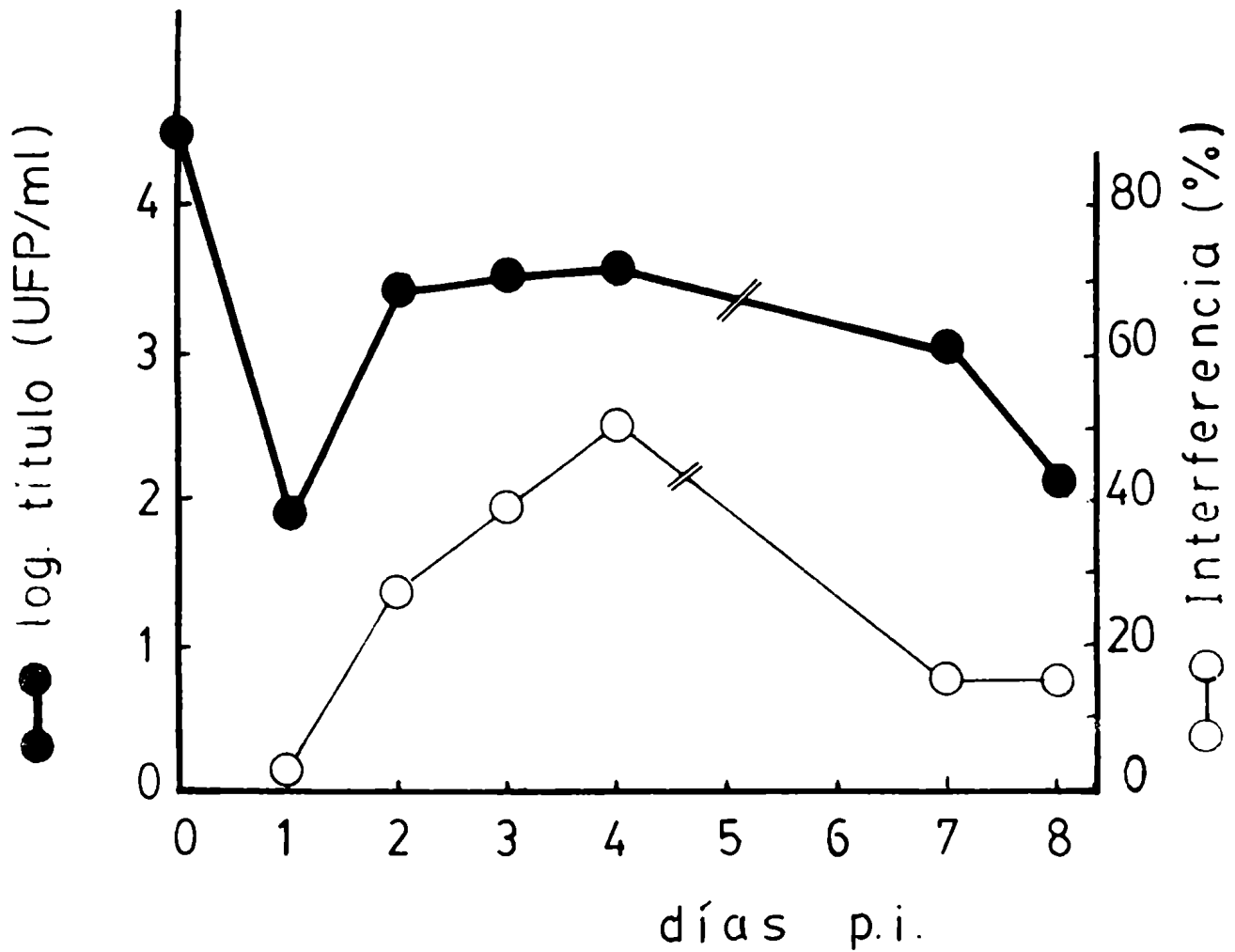
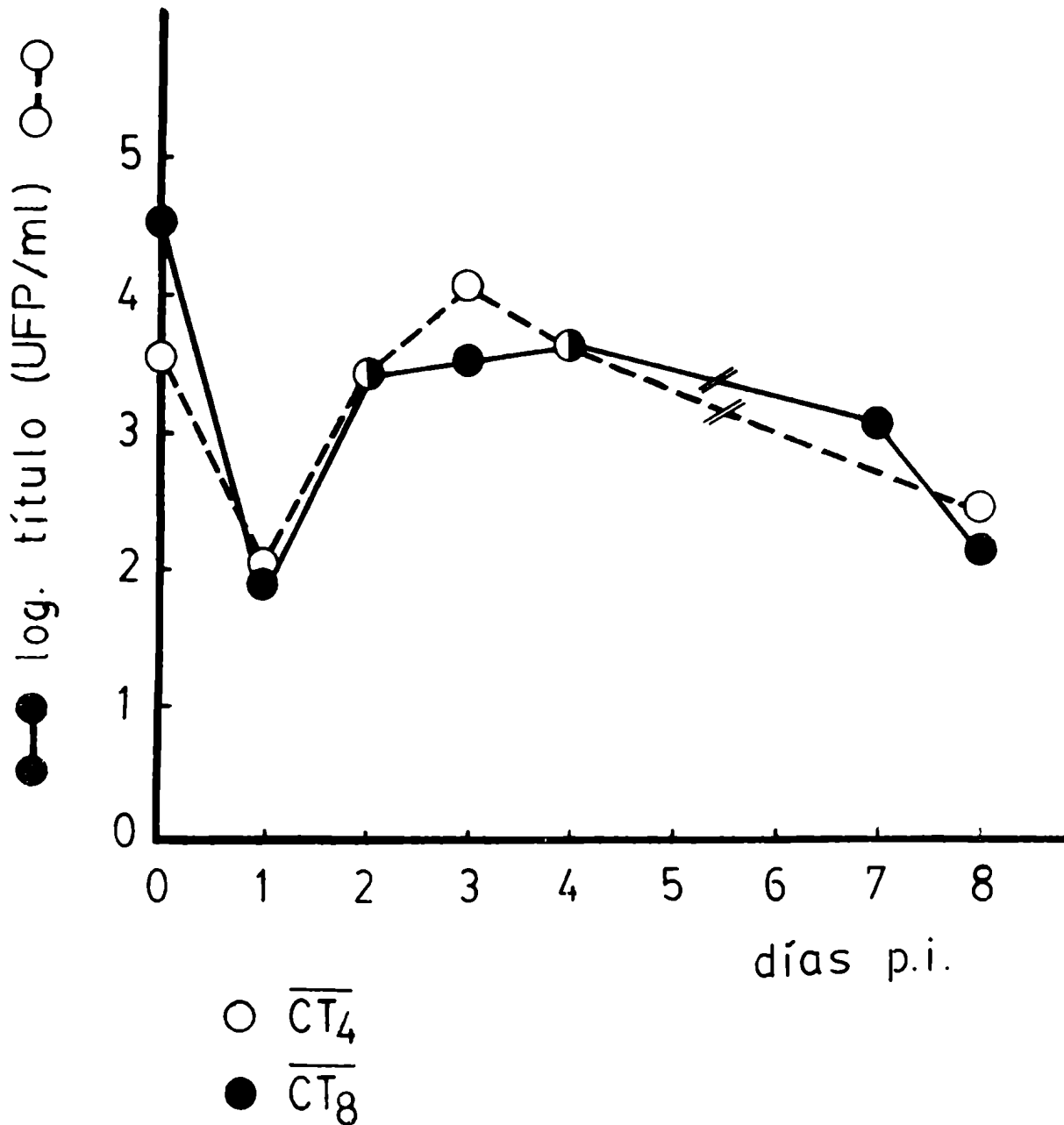


Gráfico N° 25

Influencia de los pasajes concentrados sobre
la multiplicación del virus Junín



a medida que aumenta el número de pasajes seriados in-vitro, tiende a desaparecer el pico de máxima infectividad localizado entre los días 2° y 4° p.i. para adquirir la curva un perfil de meseta como se advierte en el caso de \overline{CT}_8 (Gráficos N° 24 y 25). Asimismo, es menor la variación de infectividad entre el valor máximo alcanzado y el correspondiente al 8° día p.i., tomado éste como referencia común; esa variación es de 1,5 unid log para ambos pasajes concentrados y de aproximadamente 2,5 unid log en el caso de la curva de crecimiento normal.

Influencia de distintas proporciones de partículas interferentes
sobre el crecimiento del virus estándar

A fin de estudiar el efecto que producía el agregado de cantidades variables de partículas interferentes sobre la multiplicación del virus Junín, se inocularon células Vero con los stocks T₁ y T₃ sin diluir, y cuyas actividades interferentes eran 12% y 50% respectivamente. Luego de 1 h de adsorción a 37°C, se descartaron los inóculos, las células se lavaron con PBS y fueron desafiadas con $5,5 \times 10^5$ UFP (m.i. = 0,28) durante 1 h adicional a 37°C. Paralelamente se infectó un cultivo de células Vero normales con la misma multiplicidad de virus. Diariamente se los observó al microscopio óptico y se cosecharon alícuotas de los sobrenadantes, conservándolas a -70°C hasta su titulación por el método de unidades formadoras de placas.

Los resultados obtenidos se presentan en el Gráfico N° 26.

La curva de crecimiento del virus estándar es semejante en los tres casos (Gráfico N° 26A) observándose en las primeras 24 hs una disminución de la cantidad de virus en el sobrenadante, para alcanzar un valor máximo

GRAFICO N° 26

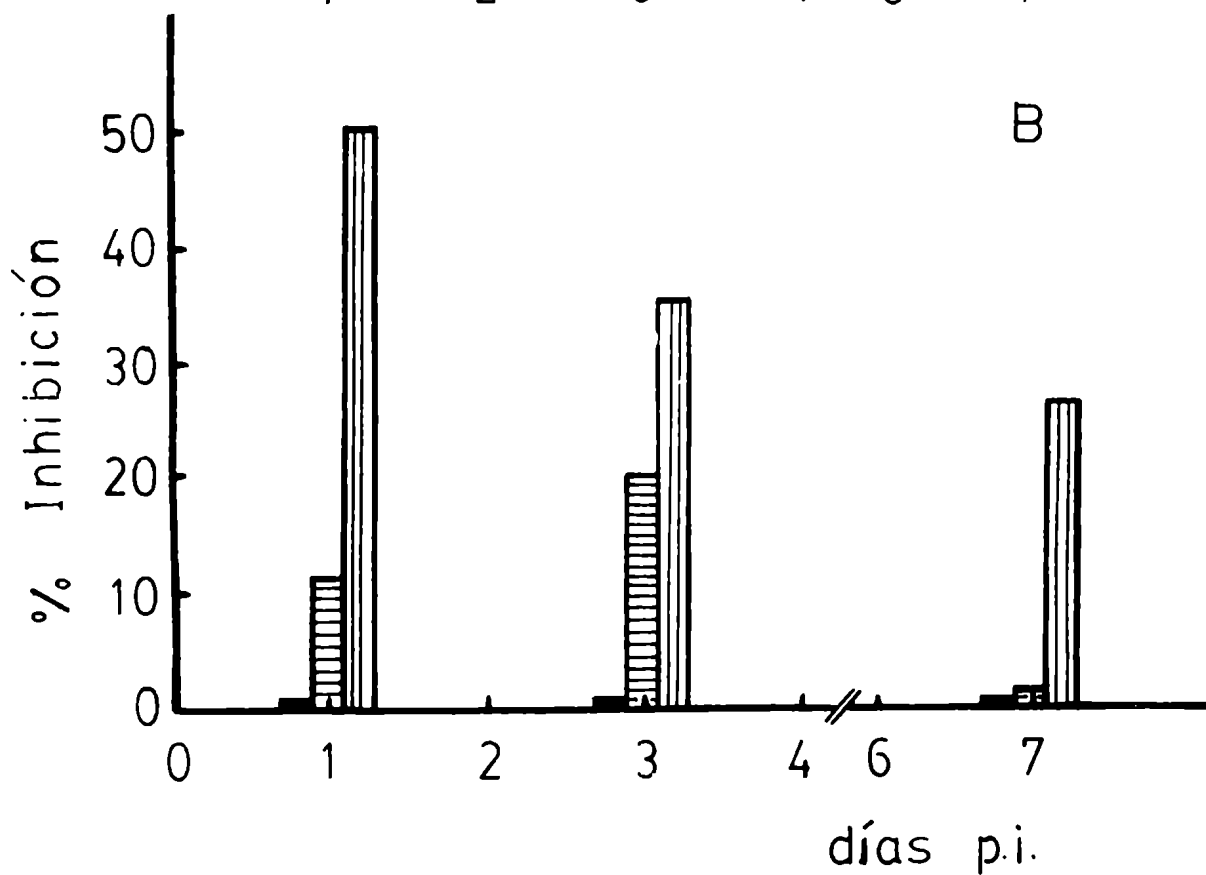
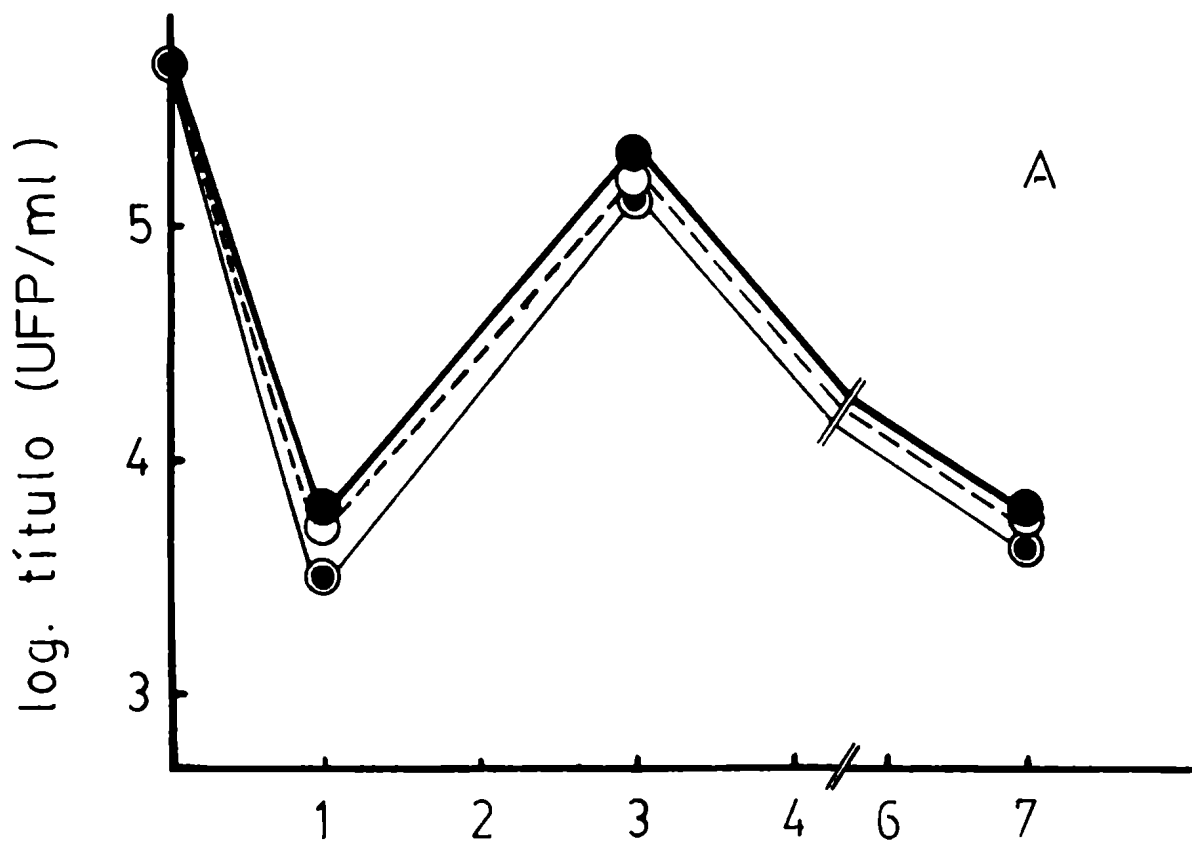
A.- Crecimiento del virus Junín sólo ó en presencia de cantidades variables de partículas interferentes

- VIRUS CONTROL (m.i.: 0,28)
- VIRUS + T₁ (12% de actividad interferente)
- VIRUS + T₃, [T₅] (50% de actividad interferente)

B.- Inhibición de la multiplicación del virus estándar mediada por las partículas interferentes

- VIRUS CONTROL
- ▨ VIRUS + T₁
- ▩ VIRUS + T₃, [T₅]

Influencia de distintas proporciones de PI sobre el crecimiento del virus estándar



al 3er día p.i. y luego descender hasta títulos del orden de 5×10^3 UFP/ml en el 7° día p.i.. Sin embargo, los rendimientos de virus en los días posteriores a la infección son cuantitativamente diferentes lo cual se ha esquematizado en el Gráfico N° 26B con barras verticales. Estas diferencias están directamente relacionadas con las proporciones de partículas interferentes presentes en los inóculos.

La producción de virus en los cultivos infectados con una mezcla de T_1 y virus estándar tienen su mayor inhibición al 3er día p.i. no existiendo diferencias con el control al 7° día p.i.. Es decir que con la concentración inicial de partículas interferentes usada en este caso, la actividad inhibitoria es máxima en el momento de mayor producción de virus y luego desaparece. Un comportamiento opuesto se observó en la infección mixta con T_3 (50% de interferencia) en la cual el % de inhibición fué mayor al 1er día p.i. (50%) descendiendo luego a valores de 35% en el 3er día y 27% en el 7° día p.i.. Esto indica que esa mayor concentración de partículas interferentes en el inóculo produce una inhibición mayor y más temprana de la multiplicación del virus, y cuyo efecto persiste durante más tiempo.

PARTE II

INFECCION PERSISTENTE

Las sublíneas VRJ-3 y VRJ-4 obtenidas según se describiera en Materiales y Métodos se utilizaron para analizar la relación entre el virus Junín y su célula huésped, en una etapa de equilibrio aparente, en la cual el virus espontáneamente liberado en algunos pasajes fué incapaz de destruir el cultivo debido a una resistencia intracelular específica. Asimismo, la persistencia de la información viral en las células de estas sublíneas (y de otras similares) demostró ser de una estabilidad tal como para mantenerse inalterada durante 110 subcultivos, equivalentes a 385 días in-vitro.

Características virológicas de las sublíneas VRJ-3 y VRJ-4

a.- Liberación espontánea de virus

A fin de investigar la presencia de partículas infectantes en el medio extracelular de la sublínea VRJ-3 fueron inoculados ratones lactantes y células Vero con alícuotas de los sobrenadantes de los sucesivos pasajes. Asimismo, cultivos paralelos de células persistentemente infectadas se cubrieron con agar nutritivo y se incubaron a 37°C durante 7 días para detectar la presencia de células o clones celulares espontáneamente productores de virus.

Los resultados obtenidos indican que la sublínea VRJ-3 es escasamente productora de virus, el cual sólo puede evidenciarse por su patogenicidad para ratón lactante ya que los mismos sobrenadantes inoculados en células

Vero no originan ACP o placas bajo agar.

En cuanto a la aparición de placas en las monocapas de VRJ-3 cubiertas con agar nutritivo, ocurre en forma esporádica y alternadamente; en algunas oportunidades, la presencia de estas placas coincide con la aparición de virus extracelular.

La sublínea VRJ-4, en cambio, se caracteriza por no liberar virus durante los 15 primeros pasajes ensayados.

b.- Producción de partículas interferentes

Un aspecto que nos interesaba investigar en la sublínea VRJ-3 era la génesis de las partículas interferentes y su relación con los otros parámetros ya considerados (producción de virus estándar, aparición de placas bajo agar). Para evaluar la capacidad interferente de los distintos sobrenadantes se recurrió al método de inhibición del número de placas producidas por el virus estándar en una infección mixta, en relación a un control. Los pasajes que se estudiaron fueron diez y los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro N° 19 en forma comparativa con la producción de virus y la aparición de placas en cultivos de esta sublínea.

La presencia de partículas interferentes se detecta sólo en pasajes no productores de virus estándar, con excepción del N°3 que resulta patógeno para ratón lactante a pesar de ser altamente interferente. Este comportamiento podría explicarse por el bajo nivel de pasajes de la sublínea, ya que recién a partir del N° 5 fue totalmente resistente a la sobreinfección con el virus parental u otros relacionados. Por el contrario, la ausencia de partículas interferentes en el medio extracelular no indica necesariamen-

te la liberación espontánea de virus infectante, como se observa en los pasajes 11 y 12. En el pasaje 101 la falta de interferencia coincide con la producción de virus estándar y la aparición de placas bajo agar en las monocapas VRJ-3.

CUADRO N° 19

Detección de virus infeccioso y partículas interferentes en sobrenadantes de la sublínea VRJ-3

PASAJE N°	INTERFERENCIA %	VIRUS EXTRACELULAR RATON	CULTIVO*	PLACAS EN VRJ-3 (UFP)
1-67**-79	100	0/15	0	—
2-74	0	—	—	—
3	100	8/9	0	—
11-12	0	0/15	0	—
30	20	0/15	—	—
101	0	3/9	0	117

* : UFP/ml

** : Interferencia determinada por inhibición de la ACP

La sublínea VRJ-4 presenta niveles de interferencia casi constantes (entre 17% y 30%) en los pasajes estudiados.

Es decir que el comportamiento de las dos sublíneas es diferente, ya que en una (VRJ-3) se producen brotes esporádicos de partículas infectantes e interferentes, mientras que la otra (VRJ-4) no libera virus y la interferencia, aunque baja, se mantiene casi constante de un pasaje a otro.

c.- Síntesis de antígenos virales en la sublínea VRJ-4

La presencia de antígenos específicos del virus Junín en los cultivos persistentemente infectados se investigó por medio de la reacción indirecta de inmunofluorescencia.

El número de células con antígenos intracelulares es de aproximadamente un 20%, siendo la localización de éste exclusivamente citoplasmática y de aspecto granular (Fotografía N° 3); en ningún momento se observó fluorescencia en el núcleo. Un 4-5% de las células del cultivo presenta además fluorescencia a nivel de membrana indicando la existencia de antígenos superficiales (Fotografía N° 4).

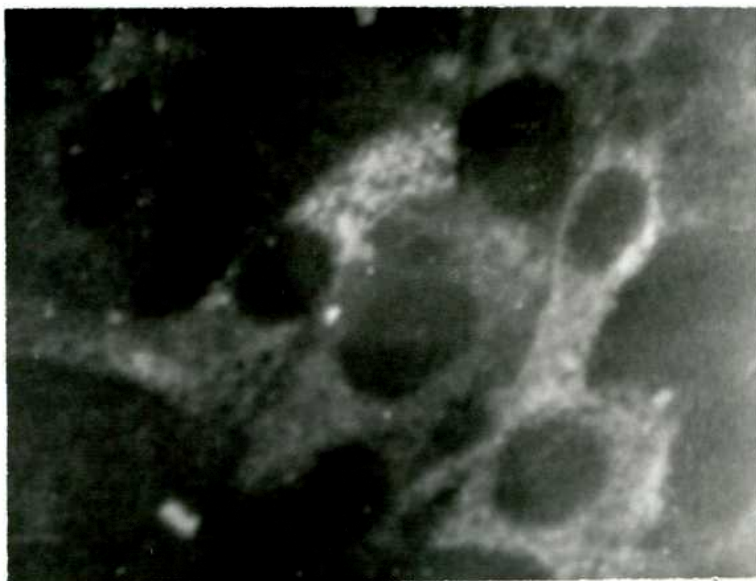
Cuando esos mismos cultivos se sobreinfectan con virus Junín XJC13 no se modifica la proporción de células fluorescentes; es decir que si bien el 80% de las células no poseen antígenos específicos tampoco son susceptibles a la sobreinfección con el virus parental.

Inducción de virus infeccioso en la sublínea VRJ-3

Los resultados de los experimentos presentados indican que la información genética de origen viral presente en la sublínea VRJ-3 es suficiente como para mantener una resistencia específica a la sobreinfección con el virus parental, y al mismo tiempo un estado de persistencia del mismo que en este caso se prolongó durante 110 pasajes in-vitro. Se observa, además, que las células pasan por etapas silenciosas en las cuales no se detectan partículas infectantes ni interferentes. Fue en algunos de esos pasajes no productores que se ensayó la inducción de virus mediante los distintos tratamientos descritos en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro N° 20.

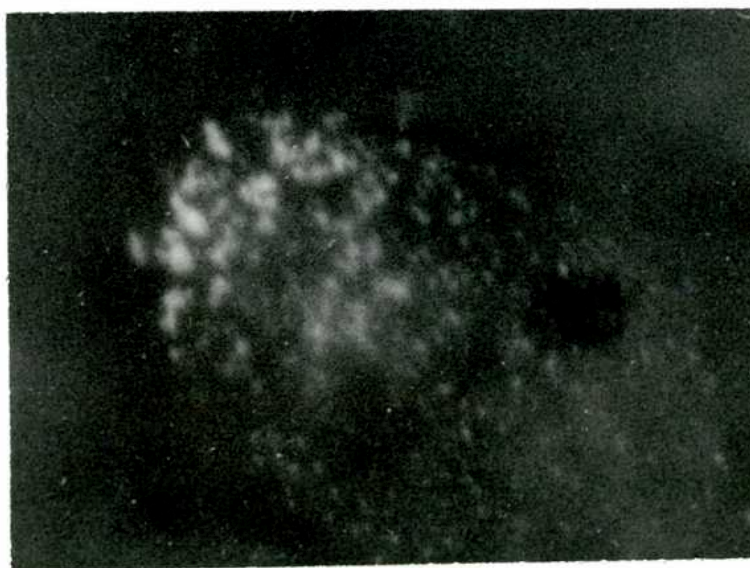
FOTOGRAFIA N° 3

ANTIGENO CITOPLASMATICO EN CELULAS VRJ-4



FOTOGRAFIA N° 4

ANTIGENO SUPERFICIAL EN CELULAS VRJ-4



CUADRO N° 20Inducción de virus infeccioso utilizando Actinomicina D y/o
células sensibles

PASAJE N°	TRATAMIENTO			
	NINGUNO	CELULAS SENSIBLES	AcD	COMBINADO
64	0*	0	74	80
66	0	NH**	0	130
67***	0	NH	0	NH
68	0	0	0	73
70	0	0	0	67
71	45	60	57	71
72	89	110	83	94
93	0	6	10	8
94	7	NH	4	6

* : UFP

** : NH = No Hecho

***: 100% de interferencia

El uso de inhibidores metabólicos como la Act D, ó el cultivo con células sensibles resultan técnicas apropiadas para rescatar virus infectante de la sublínea VRJ-3. En general, debe recurrirse a un tratamiento combinado para detectar la inducción viral; sin embargo, hay pasajes (64 y 93) en los cuales el empleo de uno ó ambos métodos en forma independiente, es suficiente para producir el mismo efecto. Se observa, además que en aquellos

pasajes en los cuales hay liberación espontánea de virus (71, 72 y 94) el agregado de Act D ó de células sensibles no modifica significativamente la proporción de células productoras en el cultivo.

Inducción de virus infeccioso y/o partículas interferentes
en la sublínea VRJ-4

Se investigó la presencia de partículas infecciosas y/o interferentes en algunos sobrenadantes de la sublínea VRJ-4, antes y después del tratamiento con inhibidores metabólicos.

Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro N° 21.

Cuando las células de esta sublínea se pretratan, ya sea con Act D o con cicloheximida en concentraciones y por tiempos variables, y los sobrenadantes correspondientes se inoculan en ratones lactantes no se detecta virus infeccioso. Sin embargo la interferencia asociada a esos sobrenadantes muestra un incremento significativo en el caso de los cultivos tratados con cicloheximida. Este aumento de la actividad interferente podría enmascarar, si es que la hay, la liberación de virus infeccioso resultante del tratamiento con los inhibidores.

CUADRO N° 21Inducción de virus infeccioso y/o partículas interferentes en la sublínea VRJ-4

SOBRENADANTE DE:	INFECTIVIDAD	INTERFERENCIA %
VRJ-4 p 11	0/10*	N.H.**
VRJ-4 p 11 + Vero	0/15	N.H.
VRJ-4 p 12	0/18	28
VRJ-4 p 13	0/6	27
VRJ-4 p 13 + AcD (1 ug/ml,3 hs)	0/15	22
VRJ-4 p 13 + AcD (1 ug/ml,24 hs)	N.H.	33
VRJ-4 p 13 + Ciclh (50 ug/ml 2 hs)	N.H.	44
VRJ-4 p 13 + Ciclh (50 ug/ml,24hs)	0/15	N.H.
VRJ-4 p 13 + Ciclh (100ug/ml,24hs)	N.H.	50

*: Infectividad determinada en ratón lactante, n°de muertos/n°de inoculados

** : N.H.: No Hecho

Inducción de antígenos virales en la sublínea VRJ-4

a.- Cocultivo con células Vero

El tratamiento de los cultivos persistentemente infectados con inhibidores metabólicos o con células sensibles permite recuperar virus activo en aquellos pasajes en que no hay liberación espontánea del mismo.

Cuando cocultivos de células VRJ-4 y Vero se procesan según la técnica de inmunofluorescencia, los resultados que se obtienen indican un incremento significativo en el % de células con antígeno viral de superficie (Cuadro N° 22).

CUADRO N° 22

Inducción de antígeno de superficie en las células VRJ-4 por
cocultivo con células Vero

CULTIVOS CELULARES	ANTIGENO FLUORESCENTE	
	CITOPASMÁTICO %	SUPERFICIAL %
VRJ-4 p 10	19	3
VRJ-4 p 10 + Vero	22	14
VRJ-4 p 12	20	4
VRJ-4 p 12 + Vero	26	13

Los valores correspondientes al antígeno citoplasmático son ligeramente superiores a los controles respectivos, aún cuando esto podría atribuirse al error del método.

b.- Tratamiento con Actinomicina D

Monocapas confluentes de células VRJ-4 p 13 fueron tratadas con 0,01, 1,0 y 1,5 ug de Act D/ml durante 3 hs ó 24 hs, según se describiera en Materiales y Métodos; los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro N° 23.

CUADRO N° 23

Inducción de antígeno de superficie mediante tratamiento con Act D

CONCENTRACION Act D ug/ml	TIEMPO hs	ANTIGENO FLUORESCENTE	
		CITOPLASMATICO %	SUPERFICIAL %
0	3	19	4
0,01	3	20	3
1,0	3	19	10
1,5	3	17	11
0	24	20	4
0,01	24	18	11
1,0	24	18	11
1,5	24	17	11

El agregado de distintas concentraciones de Act D a cultivos de la sub-línea VRJ-4 produce un incremento del número de células con antígeno viral de superficie, sin modificar apreciablemente el % correspondiente a células con antígeno citoplasmático. El tratamiento de los cultivos con 0,01 ug/ml del inhibidor es efectivo únicamente cuando el contacto se mantiene durante 24 hs.

c.- Tratamiento con cicloheximida

Se prepararon cultivos de la sublínea VRJ-4, los cuales una vez alcanzada la confluencia fueron tratados con 50 y 100 ug/ml de la droga tal como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados que se obtuvieron se presentan en el Cuadro N° 24.

CUADRO N° 24

Inducción de antígeno de superficie mediante tratamiento con cicloheximida

CONCENTRACION CICLOHEXIMIDA ug/ml	TIEMPO hs	ANTIGENO FLUORESCENTE	
		CITOPLASMÁTICO %	SUPERFICIAL %
0	—	19	4
50	2	21	10
100	2	19	13
0	—	19	4
50	24	19	10
100	24	21	10

La presencia de cicloheximida durante 2 hs en el medio de cultivo, es suficiente para inducir la síntesis del antígeno viral de superficie, sin modificar la correspondiente al antígeno citoplasmático, cuyos valores se mantienen dentro de los límites normales. Si el mismo tratamiento se prolonga hasta las 24 hs, no produce variaciones adicionales en el % de células fluorescentes.

DISCUSION

El virus Junfín produce en células Vero un efecto citopático que se caracteriza por la formación de acúmulos de células redondeadas, que en los días posteriores a la infección aumentan en número y tamaño y se desprenden dejando áreas de lisis en la monocapa. Este efecto está directamente relacionado con las dosis de virus inoculadas. Sin embargo, cuando la multiplicidad de infección supera las 0,2 UFP/cél la linealidad de la respuesta se pierde a consecuencia de un fenómeno de interferencia que se manifiesta cuando se trabaja con concentraciones altas de virus. Por este motivo, la intensidad de la ACP producida en cultivos infectados con multiplicidades de 0,2 a 20 UFP/cél es relativamente independiente de la dosis de virus administrada (Gráfico N° 1), ya sea que la titulación se haga por el método de dilución al punto final o por formación de placas bajo agar. Un resultado similar se obtiene si se grafica el día de aparición de la ACP en función de la concentración relativa de virus (Gráfico N° 2). La proporcionalidad entre dosis y respuesta se presenta sólo para m.i. $< 0,02$ UFP/cél, cantidades mayores de virus que deberían inducir un efecto citopático más temprano, se comportan tal cual la multiplicidad de 0,2 UFP/cél. Es decir que la cantidad efectiva de virus en el inóculo es inferior en 2 ó 3 unidades logarítmicas respecto de la concentración real.

Por otro lado, si observamos la evolución del efecto citopático en cultivos infectados con multiplicidades altas vemos que no sólo está retrasado su comienzo sino también muy disminuída su intensidad, de tal forma que las monocapas inoculadas con 20 UFP/cél y 2 UFP/cél se asemejan a un control

normal (fotografías 1 y 2). Existe entonces, en los stocks de virus preparados "in vivo" e "in vitro", un factor que produce este fenómeno de interferencia y que es capaz de inhibir total ó parcialmente la actividad citolítica del virus Junín.

Las curvas de crecimiento de este virus en células Vero y en cerebro de ratón lactante también dependen de la m.i.. Si analizamos el Gráfico N° 4 y el Cuadro N° 5 vemos que cuanto más diluído está el inóculo, mayor es el rendimiento viral. Esta relación se visualiza mejor en los Gráficos N° 5 y 7 donde la eficiencia de multiplicación da una idea de la cantidad de viriones producidos por cada virus parental. La pendiente negativa de las rectas indica nuevamente la presencia de un factor interferente asociado a los stocks de virus, con la particularidad de que en este caso la inhibición se produce a nivel de la multiplicación viral. Se descarta que el mecanismo de interferencia sea mediado por interferón puesto que las células Vero no lo producen (152).

Las pendientes de estas rectas tienen valores de 0,55 y 0,65 respectivamente, lo cual indica que una disminución en la multiplicidad de infección se refleja en una mayor eficiencia de multiplicación del virus en el ratón que en cultivo de tejidos, y viceversa.

El comportamiento de ratones lactantes inoculados con dosis elevadas de virus Junín (Gráfico N° 6) también es irregular; vemos que con $2,2 \times 10^5$ DL_{50} si bien muere el 100% de los animales, lo hace en forma retrasada respecto de las otras concentraciones. El % acumulativo de mortalidad en este caso muestra una evolución intermedia a la correspondiente a inóculos de $2,2 \times 10^2$ y $2,2 \times 10^1$ DL_{50} , es decir que los ratones que recibieron

$2,2 \times 10^5$ DL_{50} mueren como si hubieran sido inoculados con aproximadamente 100 DL_{50} ; esto equivale a una reducción de la cantidad original de virus de 2×10^3 veces. Este fenómeno de interferencia está directamente relacionado con la concentración de virus administrada a los ratones, ya que por dilución el efecto se revierte y las curvas de mortalidad correspondientes muestran el ordenamiento lógico.

Este fenómeno de interferencia es conocido empíricamente desde hace unos cuantos años no sólo para el virus Junín (145) sino también para otros miembros del grupo Arena (153). Así por ejemplo, el virus LCM presenta una baja eficiencia en la formación de centros infecciosos cuando se utilizan multiplicidades elevadas (153). Sin embargo, Welsh y Pfau (11) demostraron que a altas m.i. la eficiencia de un stock de LCM para formar centros infecciosos depende no tanto del título del virus, sino del momento en que éste se cosecha. Los mejores resultados se obtienen con stocks de virus preparados en una etapa temprana de la infección, antes que se alcance el título máximo.

A causa de esa interferencia con la actividad citolítica del virus LCM y la baja eficiencia de los stocks para formar centros infecciosos, estos autores (11) estudiaron el crecimiento de LCM en función de la multiplicidad de infección. Las curvas de crecimiento exhibían el clásico fenómeno de Von Magnus y los valores máximos de infectividad se obtenían cuando los stocks virales se diluían previamente a la infección. En esos stocks se detectó la presencia de un componente interferente que inhibía la capacidad de formar centros infecciosos, la actividad citolítica en células L y la síntesis de virus en medio líquido.

La actividad interferente se encuentra también con cierta frecuencia

asociada a sobrenadantes de líneas celulares persistentemente infectadas (6).

Durante el trabajo de tesis se trató de establecer la frecuencia de aparición de dicha interferencia en varias sublíneas, como así también en distintos pasajes de cada una de ellas.

En general, se observa (Cuadros N° 6, 7, 8 y 13) que algunos sobrenadantes de VRJ-1, VRJ-2 y VRJ-3 son capaces de inhibir la ACP o las placas producidas por el virus Junín. Esta inhibición es del orden del 100% (frente a 80-100 UFP) en los primeros pasajes, observándose luego una disminución en el 5° y el 6°, coincidentemente con la aparición de virus infectante. El análisis de la sublínea VRJ-3, que por su duración permitió un estudio más riguroso, indica que la actividad interferente aparece en forma esporádica con valores máximos en sus comienzos y en pasajes intermedios (67° y 79°), coincidiendo en algunos casos con la detección de virus estándar (VRJ-3p3). Los sobrenadantes VRJ-3p67 y VRJ-3p79 se ensayaron además frente a 20 DL₅₀ de virus Junín en ratones lactantes. Ambos fueron capaces de disminuir el % de mortalidad de estos animales y retrasar el día promedio de muerte (Gráficos N° 9 y 10).

Características de la actividad interferente

Para caracterizar la actividad interferente detectada en los stocks de virus y en sublíneas persistentemente infectadas se recurrió a algunos sobrenadantes de estas sublíneas, como ser el VRJ-3p79 y el VRJ-4p26 cuyo poder inhibitorio y falta de patogenicidad ya habían sido comprobados. En ningún caso se utilizaron stocks virales debido a la imposibilidad de eliminar las partículas infectantes presentes en la suspensión que podrían alterar

los resultados obtenidos.

La actividad interferente fue neutralizada por inmunosuero anti-Junín y resultó sensible a solventes de lípidos, lo cual indica que comparte antígenos con el virus estándar y que posee componentes lipoproteicos cuya integridad es esencial para que se manifieste dicha actividad.

Las características de sedimentación y filtración indicaron que la interferencia está asociada a elementos particulados de naturaleza semejante al virus; sin embargo, a diferencia de éste, no es patógeno para ratones lactantes, ni citolítico para cultivos de células Vero. Es decir que el agente responsable del fenómeno de interferencia sería una partícula de virus, sin capacidad infectiva para los huéspedes ensayados, con propiedades físicas y químicas similares al virión estándar y ligeramente más estable al calentamiento.

El Cuadro N° 25 resume las características principales de las partículas interferentes del virus Junín.

Se pueden proponer dos hipótesis acerca de la naturaleza de estas partículas:

1) Las partículas interferentes carecen de potencial replicativo y sólo lo hacen en presencia de un virus "helper". En ausencia de éste, son incapaces de completar su ciclo de crecimiento y la infección aborta.

2) Las partículas interferentes son variantes de crecimiento lento, difíciles de detectar, pero capaces de multiplicar e interferir con la replicación del virus estándar.

Con respecto a la primer hipótesis, existen numerosos sistemas virus-célula huésped (6) en los cuales se han encontrado partículas defectivas

PROPIEDADES COMPARATIVAS ENTRE EL VIRUS INTERFERENTE Y EL ESTANDAR

PROPIEDADES	PARTICULA INTERFERENTE	VIRUS ESTANDAR
NEUTRALIZABLE POR I.S. ANTIJUNIN	SI	SI
FILTRACION POR 50 nm DE DIAMETRO	RETENIDO	RETENIDO
SENSIBILIDAD A LA TEMPERATURA :		
37°C, 1 h	ESTABLE	ESTABLE
56°C, 1 h	PARCIALMENTE SENSIBLE	SENSIBLE
SENSIBILIDAD A LA LUZ UV	ESTABLE	SENSIBLE
CAPACIDAD INTERFERENTE	SI	NO
SENSIBILIDAD A SOLVENTES DE LIPIDOS	SI	SI
POTENCIAL CITOLITICO	NO TIENE	SI
PATOGENICIDAD PARA RATON LACTANTE	NO TIENE	SI
POTENCIAL REPLICATIVO	?	SI

involucradas en la infección primaria y/o persistente. Las variaciones cíclicas y desfasadas de los títulos del virus estándar y de la actividad interferente en los días posteriores a la infección o luego de pasajes concentrados del virus indican una mutua dependencia entre ambos, que en el caso de la partícula defectiva se relaciona con la función "helper" provista por el virus parental y sin la cual aquélla no puede persistir.

La familia Arenaviridae, a la cual pertenece el virus Junín, presenta varios ejemplos de producción de partículas defectivas (12)(38)(60), de las cuales, las más estudiadas son probablemente las de LCM; en el Cuadro N° 2 (INTRODUCCION) se han esquematizado sus propiedades más importantes.

Existe bastante similitud con las características presentadas en el Cuadro N° 25 para el virus Junín, lo cual permite suponer que también este virus genera partículas interferentes defectivas.

No se dispone sin embargo, de datos concluyentes acerca del potencial replicativo de estas partículas. Se sabe que la actividad interferente aumenta en función del tiempo transcurrido luego de la inoculación de células Vero o ratones lactantes con sobrenadantes de líneas persistentemente infectadas (Gráfico N° 15, Cuadro N° 13). Este incremento podría explicarse ya sea porque las partículas interferentes son capaces de replicar en forma autónoma del virión estándar, o porque los sobrenadantes ensayados contienen una pequeña cantidad de virus parental, cuya replicación es suficiente para originar el incremento observado, pero su infectividad resulta enmascarada por la actividad interferente de las partículas en estudio. Aunque nuestra metodología no nos permite detectar niveles bajos de virus estándar, el conjunto de los resultados obtenidos sugiere que la primer hipótesis se-

ría la correcta.

La segunda se debe tener en consideración al analizar el fenómeno de persistencia viral puesto que existen datos en la bibliografía acerca de una variante del Arnavirus LCM, de crecimiento lento (154). Esta variante, que se detectó en pequeñas cantidades en células L persistentemente infectadas, estaba siempre asociada a cultivos no productores de virus infeccioso que presentaban inmunofluorescencia específica positiva, y era capaz de inmunizar ratones y cobayos contra la cepa salvaje de LCM.

Las conclusiones de Hotchin (154) fueron posteriormente confirmadas y extendidas por Lehmann-Grube y col. (155). Según estos autores, el cultivo prolongado de células infectadas ejercería una presión selectiva favoreciendo la multiplicación del virus que menos daño provoque a la célula huésped. En general, estas variantes que se seleccionan conservan toda su patogenicidad cuando se inoculan en ratones adultos. En algunos casos, sin embargo, la pérdida del potencial citolítico para las células va acompañada por una reducción de la patogenicidad "in vivo". Como estas variantes "atenuadas" también interfieren con la multiplicación del virus estándar pueden ser consideradas erróneamente como partículas defectivas interferentes.

Recientemente, Jacobson y col. (160) comunicaron el aislamiento de una variante de LCM no citopática, difícil de detectar ya que sólo plaquea en células MDBK, pero con capacidad replicativa. Esta partícula viral no se encuentra en los stocks del virus estándar, sino que emerge de cultivos celulares persistentemente infectados. La propiedad más interesante que posee es la resistencia a la inhibición por partículas DI lo cual le permite multiplicar aún en su presencia.

Desconocemos si en las sublíneas de células Vero persistentemente infectadas con virus Junín se sintetiza esta variante de crecimiento lento, ya que sólo se han detectado mutantes t_s que se seleccionan espontáneamente (140).

En base a los resultados obtenidos podemos concluir entonces que el virus Junín genera partículas interferentes durante la infección primaria tanto "in vivo" como "in vitro", motivo por el cual se las detecta en stocks preparados en cerebro de ratón o en células Vero, o asociadas a sublíneas persistentemente infectadas.

Inducción de partículas interferentes

La presencia de estas partículas en cultivos o roedores infectados con virus Junín nos indujo a buscar las condiciones experimentales que favorecieran su síntesis en detrimento del virus estándar. A tal fin se iniciaron pasajes de virus en cultivos celulares y en ratones lactantes a alta multiplicidad de infección. Esta técnica es utilizada habitualmente para inducir partículas DI y se la conoce desde hace muchos años, ya que es la que originó el clásico fenómeno de Von Magnus (5).

Los resultados obtenidos en el sistema Junín-células Vero (Gráfico N° 17) indican que estas partículas emergen con suma facilidad y se pueden detectar a partir del 3er pasaje. Sin embargo, como los stocks concentrados se prepararon al 3er día p.i., que regularmente coincide con el máximo de infectividad viral pero no necesariamente con el de interferencia, ésta se

podría haber detectado antes modificando el tiempo de cosecha. Así por ejemplo, en el caso del virus de Influenza (156) la progenie producida es distinta según el momento en que se cosecha el virus, de tal forma que luego de 5 pasajes cada 8 hs la infectividad se pierde totalmente, mientras que en los pasajes hechos cada 16 o 24 hs, la evolución de la infectividad y de la relación I/UHA (Infectividad/Unidades hemoaglutinantes) ocurre en forma cíclica.

Existen otros factores, además del tiempo en que se cosecha el virus, que condicionan la aparición y/o enriquecimiento de partículas interferentes durante una infección. Uno de ellos es el sistema celular utilizado para propagar el virus. Los gráficos Nos. 18 y 19 muestran, comparativamente con el N° 17, las modificaciones producidas en la infectividad e interferencia al cambiar de célula huésped. El efecto más notable se observa con las Vero U (Gráfico N° 19), las cuales al no generar partículas interferentes, permiten un incremento del título de virus de 3 unid. log., luego de 3 pasajes concentrados.

El papel de la célula huésped en la expresión de la interferencia mediada por partículas ya ha sido comentado en la INTRODUCCION (pág 6) y se sabe que no sólo condiciona la manifestación de la actividad interferente, sino también la génesis de estas partículas.

Otro de los factores estudiados por su participación en el fenómeno de interferencia se relaciona con el stock de virus utilizado para iniciar los pasajes concentrados.

Lehmann-Grube y colaboradores demostraron que, en el caso de LCM, la historia previa del virus modificaba su comportamiento "in vitro", pero no

alguna de sus propiedades como ser, el establecimiento de infecciones persistentes en ratones recién nacidos.

Los resultados que se obtienen cuando los pasajes se inician con un stock de virus Junín preparado en células Vero (Gráfico N° 20) indican que las partículas interferentes se generan mucho más rápidamente (se detectan en el 1er pasaje) y su efecto se manifiesta más temprano (en el 2° pasaje desaparece el virus) que cuando el virus parental proviene de cerebro de ratón lactante (Gráfico N° 17).

Esto explica las dificultades que se tienen en el laboratorio cada vez que se intenta obtener una suspensión de virus con altos títulos infectivos a partir de cultivos celulares.

Los valores de interferencia se estabilizan en aproximadamente un 50% durante 4 pasajes sucesivos en los cuales el virus desaparece como partícula infecciosa. En el pasaje N°7 hay una pérdida brusca de actividad interferente, lo cual podría ser consecuencia de:

- a) una modificación en las condiciones metabólicas de la célula huésped que favorecería la expresión del virus parental,
- b) una disminución excesiva de la cantidad de viriones estándar durante los pasajes anteriores, que resultaría insuficiente para mantener la replicación de las partículas interferentes.

El Gráfico N° 20 muestra que la concentración de virus en el stock T_9 es sumamente baja, lo cual estaría de acuerdo con la 2° proposición; sin embargo, no nos parece que ambas hipótesis sean excluyentes.

Un dato adicional acerca de la importancia del stock de virus utilizado sobre la posterior evolución de la infección lo proporciona el trabajo de

Avila y Coto (161) en el cual únicamente se recupera el 100% de los cultivos infectados cuando el inóculo es rico en partículas interferentes.

Las partículas generadas durante la etapa primaria de la infección son semejantes, en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, a las provenientes de cultivos persistentemente infectados. Un resultado que llama la atención, a pesar de existir antecedentes con otros virus, es la resistencia de la actividad interferente a la irradiación con luz UV. En general, la mayoría de las DI resultan sensibles a este tratamiento (6) lo cual indica que se necesita un genoma funcional para que la interferencia se produzca. La resistencia observada en nuestro caso, y también con LCM (11) y Parana (60), parece ser una característica común de las partículas interferentes de los Arenavirus, lo cual sugiere que en esta familia el mecanismo responsable de la interferencia es diferente y exclusivo.

El Gráfico N° 22 muestra que el momento de la multiplicación del virus Junín sensible a las partículas interferentes es posterior a la adsorción y penetración, ya que la interferencia se mantiene aún cuando las partículas se agreguen 2 ó 3 hs después que el virión estándar. Sin embargo, debe producirse en una etapa temprana del ciclo, posiblemente antes o durante la replicación del ARN viral, puesto que en la 4ta h p.i. comienza a disminuir. Esta caída gradual de la actividad interferente entre la 4ta y 6ta hora p.i. puede atribuirse a la falta de sincronización de los cultivos en el momento de la infección.

Pfau y col. encontraron resultados similares con los virus LCM (12) y Parana (60).

Cuando se somete el virus Junín a pasajes concentrados en cerebro de ratón lactante (Gráfico N° 23) se observa una pérdida progresiva de infectividad con alternativas cíclicas, de tal forma que luego de 10 pasajes se recupera sólo el 0,2% del título inicial de virus. En ese intervalo se producen dos ciclos de actividad interferente con valores máximos de 40% y 58%.

A diferencia de lo que ocurre en cultivo de tejidos (Gráfico N° 17) donde hay pasajes en que la infectividad se negativiza y la interferencia llega hasta un 80%, en el ratón lactante la oscilación de los parámetros considerados es menos acentuada; a pesar de ello, esta detección de partículas interferentes tiene singular importancia dado que son escasos los sistemas "in vivo" en los que se ha observado la producción de dichas partículas. Existen evidencias experimentales proporcionadas por Popescu y Lehmann-Grube (66) acerca de la génesis y funcionamiento de las partículas DI en ratones inoculados con LCM. Por su parte, Pfau (157), analizando los factores involucrados en la iniciación y mantenimiento de las infecciones crónicas en la naturaleza y con especial referencia al grupo de los Arenavirus, concluyó que las partículas interferentes debían ser de fundamental importancia al comienzo de la infección por su capacidad de proteger a la célula infectada de la actividad citolítica del virus estándar.

Interrelación entre partículas infectantes e interferentes durante la infección primaria

Al estudiar la aparición de estas partículas durante el crecimiento del virus Junín en ratones lactantes (Cuadro N° 18), se observa que utili-

zando inóculos concentrados los títulos obtenidos son inferiores en aproximadamente 2 unid.log. respecto de los originados por concentraciones bajas de virus (Gráfico N° 23). Estas diferencias se pueden atribuir a la aparición de actividad interferente a partir del 7° día p.i., y a su posterior incremento en el día 10° p.i., motivo por el cual los títulos máximos, en estas condiciones experimentales, se obtienen al 5° día p.i. cuando todavía las partículas interferentes no se detectan.

Cuando ese mismo estudio se hace en células Vero (Gráfico N° 24) se observa que el máximo de actividad interferente se alcanza dos días después que el de infectividad, en forma similar a lo que ocurre "in vivo".

En ambos sistemas entonces, las partículas interferentes aparecen en el momento en que el virus comienza a multiplicar activamente y su efecto se visualiza mejor cuando la concentración de ambas partículas es alta, es decir, cuando hay mayor probabilidad de que dos de ellas infecten una misma célula.

El gráfico N° 26 (A y B) muestra el efecto que produce el agregado de distintas concentraciones de partículas interferentes a un cultivo celular infectado con virus Junín.

La evolución de la infectividad es similar en los tres casos (Control, T₁ y T₃), presentando un título máximo al 3er día p.i.. Sin embargo, se observan diferencias significativas entre los valores de infectividad correspondientes a cada día, de tal forma que cuando la infección se inicia en presencia de un % bajo de PI (12%) el efecto inhibitorio mayor se observa en el momento de máxima producción viral (3er día p.i.); esta inhibición es relativamente pobre (20%) ya que los títulos del control y del infectado

en presencia de T_1 son de $2,0 \times 10^5$ UFP/ml y $1,6 \times 10^5$ UFP/ml. La interferencia desaparece en los días subsiguientes, lo cual indica que si bien la cantidad de partículas interferentes es suficiente para que se detecte su actividad sobre la multiplicación del virus, no lo es para que se produzca su amplificación posterior.

Si el inóculo contiene en cambio una proporción mayor de PI (50%) la interferencia con la replicación del virus es máxima en las primeras 24 hs del ciclo, de tal forma que su título en la coinfección con T_3 ($3,0 \times 10^3$ UFP/ml) es tan solo la mitad del control correspondiente ($6,0 \times 10^3$ UFP/ml). En este caso además, el efecto inhibitorio se mantiene por más tiempo ya que al 7° día p.i. es de un 27%.

El mismo experimento hecho con T_1 y T_3 se repitió con T_5 (50% de interferencia) observándose que la evolución e intensidad de la inhibición que se producía eran exactamente iguales a las ocasionadas por T_3 . Es decir que una concentración de PI equivalentes a un 50% de actividad es apropiada para moderar la multiplicación del virus Junín y al mismo tiempo persistir en cantidades detectables hasta por lo menos el 7° día p.i.

Los resultados obtenidos con T_1 , T_3 y T_5 indican que la multiplicación del virus Junín en presencia de cantidades variables de partículas interferentes resulta inhibida en proporción directa a la concentración de dichas partículas en el inóculo.

Relación entre partículas infectivas e interferentes en la etapa de persistencia viral

En un cultivo persistentemente infectado la relación que existe entre partículas infecciosas e interferentes es sumamente compleja.

No se puede dejar de considerar además, cuando se estudia el estadio de persistencia del virus Junín en células Vero, la presencia de mutantes termosensibles (140) que se seleccionan espontáneamente en estos cultivos. Este es un hecho observado reiteradamente, con la particularidad de que esas t_s , que son termolábiles, llegan a convertirse en la población predominante en las sublíneas persistentemente infectadas.

Aunque en las sublíneas estudiadas durante el desarrollo de esta tesis no se investigó la presencia de t_s , todas ellas fueron malas productoras de virus (Cuadro N° 3), a diferencia de los cultivos en los cuales se detectaron aquéllas y que mostraban una evolución cíclica de la infectividad.

Así por ejemplo, la VRJ-3 liberó partículas infecciosas en los primeros pasajes y luego alternadamente del 75° en adelante (Cuadro N° 9) en momentos en que también se producían partículas interferentes en pasajes cercanos.

Se puede suponer que estos dos tipos de partículas junto con otros no considerados en estos experimentos, y algún(os) factor(es) específico(s) de la célula huésped establecerían inicialmente una relación de dependencia mutua cuyo resultado sería la infección persistente del cultivo. La liberación espontánea y esporádica de partículas infecciosas o interferentes en un estadio tardío de la sublínea indicaría una perturbación del equilibrio antes mencionado provocado por alteraciones del metabolismo celular o modificaciones en las condiciones culturales.

Algo similar debe ocurrir en la sublínea VRJ-4 a pesar de mostrar un comportamiento diferente. En efecto, en ninguno de sus pasajes se detecta virus infectante y todos ellos presentan niveles bajos de interferencia

(14% a 30%), de tal modo que el origen de la relación estable entre ambos parámetros sería anterior al inicio de la sublínea, es decir, habría surgido a posteriori de la infección primaria, durante la recuperación del cultivo.

Sin embargo, una modificación del metabolismo celular de las dos sublíneas mediante el empleo de inhibidores tales como Act D o cicloheximida, o el agregado de células sensibles, provoca la liberación de partículas infecciosas o interferentes (Cuadros N° 20 y 21) corroborando, en cierta medida, la hipótesis planteada en párrafos anteriores. Este desequilibrio, que tiene como consecuencia la producción de partículas de una clase u otra, se detecta también por medio de la reacción de inmunofluorescencia. En los cuadros N° 22, 23 y 24 se observa que el tratamiento de la sublínea VRJ-4 con células sensibles, Act D ó cicloheximida produce un incremento del antígeno de superficie sin modificar el citoplasmático, lo cual parece indicar que el aumento de aquél ocurre en el % de células que presentan fluorescencia en el citoplasma. En estas células la replicación del virus estaría bloqueada por algún factor de origen celular que en presencia de Act D o cicloheximida no se sintetiza, permitiendo así que se complete el ciclo de multiplicación del virus ó de la partícula interferente.

El hecho de que la inducción se produzca utilizando inhibidores de la síntesis de macromoléculas indica que en la célula persistentemente infectada la información genética viral está presente en su totalidad; que el producto de la inducción sean partículas de virus o interferentes depende probablemente de otro tipo de mecanismo y de las concentraciones relativas de ambas en la sublínea.

El papel de la célula huésped durante la multiplicación de un virus es suficientemente conocido, y su relación con la génesis y expresión de la interferencia ya fue comentado en la INTRODUCCION, sin embargo, existen evidencias adicionales sobre su participación en el mantenimiento de la persistencia viral. Tal es el caso de células BGM persistentemente infectadas con Sarampión (158) o células de conjuntiva con virus de las Paperas (75)(159) las cuales al ser tratadas con inhibidores metabólicos responden liberando partículas infectantes y/o hemoaglutininas virales, sugiriendo que el mantenimiento de la persistencia está vinculado estrechamente a la expresión de funciones celulares.

Las evidencias obtenidas durante este trabajo de tesis acerca de la interferencia observada tanto "in vivo" como "in vitro" nos permiten afirmar que ésta es producida por partículas que se sintetizan en células Vero o ratones lactantes durante la etapa primaria de la infección con virus Junín, o que emergen de cultivos persistentemente infectados con este virus.

La importancia de las partículas interferentes reside en sus propiedades moderadoras de la replicación y de la acción citopatogénica del virus, las cuales permiten el establecimiento de infecciones persistentes "in vitro".

Si consideramos que además han sido detectadas en ratones lactantes y que es justamente un roedor, el *Calomys musculinus*, el reservorio del virus Junín en la naturaleza, se podría pensar que las partículas interferentes estarán involucradas también en la infección crónica de este huésped.

RESUMEN

El virus Junín genera, en ratones lactantes y en cultivos de células Vero, partículas capaces de inhibir su actividad citolítica y citopatogénica, como así también su multiplicación "in vivo" e "in vitro".

Estas partículas se encuentran presentes en los stocks de virus y en cultivos persistentemente infectados, y se las puede inducir mediante pasajes concentrados ya sea en ratón o en células Vero.

En este último huésped se obtienen los valores más altos de interferencia, aunque su proporción varía significativamente según la línea celular que se emplee y la procedencia del inóculo.

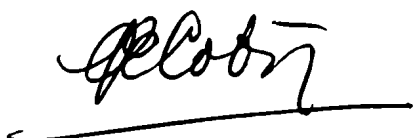
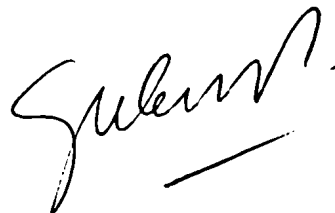
Entre sus propiedades más importantes están las de ser neutralizables por inmunosuero anti-Junín, sensibles a solventes de lípidos y a temperaturas superiores a 50°C, estables a la radiación UV y al calentamiento a 37°C, tener un tamaño mayor o igual a 50 mu de diámetro y una velocidad de sedimentación similar a la del virus estándar.

La interferencia que exhiben sobre la multiplicación del virus parental se produce en una etapa temprana del ciclo de crecimiento (dentro de las primeras 4 hs p.i.) y sólo se expresa con virus homo y heterotípicos, pero no heterólogos.

El comportamiento biológico más significativo de las partículas interferentes consiste en moderar la replicación del virus estándar, protegiendo las células infectadas de su efecto citolítico, y prolongando el tiempo de sobrevivencia del ratón lactante. Cuando en ambos huéspedes se incrementa el intervalo entre la inoculación de PI y virus estándar se observa un aumento

del efecto inhibitorio, ya sea porque disminuye la mortalidad del ratón en un 50%, o anula por completo el efecto citopático en los cultivos infectados.

La presencia espontánea y habitual de estas partículas en las infecciones causadas por el virus Junín sugiere que ellas formarían parte de la estrategia utilizada por el virus para replicar y persistir en el huésped infectado.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Pablo", with a horizontal line underneath.A handwritten signature in black ink, appearing to read "Guler", with a horizontal line underneath.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- "The biology of animal viruses". Cap 2
Fenner, F.; Mc Auslan, B.R.; Mims, C.A.; Sambrook, J. and White, D.O.
Academic Press, New York, 1974.
- 2.- "The biology of animal viruses". Cap 7
Fenner, F.; Mc Auslan, B.R.; Mims, C.A.; Sambrook, J. and White, D.O.
Academic Press, New York, 1974.
- 3.- "The biology of animal viruses". Cap 8
Fenner, F.; Mc Auslan, B.R.; Mims, C.A.; Sambrook, J. and White, D.O.
Academic Press, New York, 1974.
- 4.- "Studies on interference in experimental influenza. I. Biological observations".
Von Magnus, P.
Mineral. Geol. 24 (7), 1, 1947.
- 5.- "Propagation of the PR-8 strain of Influenza A virus in chick embryos. III. Properties of the incomplete virus produced in serial passages of undiluted virus".
Von Magnus, P.
Acta Phatol.Microbiol.Scand. 29:157, 1951.

6.- "Defective interfering animal viruses".

Huang, A.S. and Baltimore, D.

"Comprehensive Virology" Vol 10, Cap 2, 73, 1977, editado por H. Frankel-Conrat y R.Wagner, Plenum Press, New York.

7.- "Defective interfering viruses".

Huang, A.S.

Annu.Rev.Microbiol. 27:101, 1973.

8.- "A deletion mutant of bacteriophage f_1 containing no intact cistrons".

Enea, V. and Zinder, N.D.

Virology. 68:105, 1975.

9.- "The role of defective interfering particles in persistent infection of Vero cells by Measles virus".

Rima, B.K.; Davidson, W.B and Martin, S.J.

J.Gen.Virol. 35:89, 1977.

10.- Defective T particles of vesicular stomatitis virus. III. Biologic role in homologous interference".

Huang, A.S. and Wagner, R.R.

Virology. 30:173, 1966.

11.- "Determinants of lymphocytic choriomeningitis interference".

Welsh, R.M. and Pfau, C.J.

J.Gen.Virol. 14:177, 1972.

- 12.- " Properties of defective lymphocytic choriomeningitis virus"
Welsh, R.M.; O'Connell, C.M. and Pfau, C.J.
J.Gen. Virol. 17:355, 1972.
- 13.- " Viral interference induced in mice by acute or persistent infection
with virus of lymphocytic choriomeningitis (LCM)"
Wagner, R.R. and Snyder, R.M.
Nature (London). 196:393, 1962.
- 14.- " Persistent infection. I. Interferon - inducing defective interfering
particles as mediators of cell sparing: Possible rol in persistent
infection by vesicular stomatitis virus".
Sekellick, M.J. and Marcus, P.I.
Virology. 85: 175. 1978.
- 15.- " Vesicular stomatitis virus: Defectiveness and disease".
Huang, A.S. and Palma, E.L.
"Mechanisms of virus disease INC-UCLA Symposia on molecular and cellular
Biology". Vol 1 (W.S.Robinson and C.F. Fox, eds.) 87, 1974. Academic
Press, New York.
- 16.- " Identification of transcriptive and replicative intermediates in
Sendai virus - infected cells".
Portner, A. and Kingsbury, D.W.
Virology. 47:711, 1972.

- 17.- " Defective interfering particles of Semliki Forest virus. Intracellular events during interference".
Bruton, C.J.
J.Gen.Virol.31:397, 1976.
- 18.- " Cyclic appearance of defective interfering particles of Herpes simplex virus and the concomitant accumulation of early polypeptide VP 175".
Murray, B.K.; Biswal, N.; Bookout, J.B.; Lanford, R.E.; Courtney, R. J. and Melnick, J.L.
Intervirology. 5:173, 1975.
- 19.- "Defective interfering particles of poliovirus. III. Interference and enrichment".
Cole, C.N. and Baltimore, D.
J.Mol.Biol.76: 345, 1973.
- 20.- "Poliovirus defective interfering particles".
Baltimore, D.; Cole, C.N.; Villa-Komaroff, L. and Specter, D.
"Mechanisms of virus disease: ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology". Vol 1 (W.S.Robinson and C.F.Fox, eds.), 117, 1974.
Academic Press, New York.
- 21.- "Properties of incomplete Sendai virions and subgenomic RNA_S".
Kingsbury, D.W.; Portner, A. and Darlington, R.W.
Virology. 42:857, 1970.

- 22.- "Homologous interference by incomplete Sendai virus particles".
Portner, A. and Kingsbury, D.W.
J.Virol. 8:388, 1971.
- 23.- "The RNA_s of infective and incomplete Influenza virions grown in MDBK and HeLa cells".
Choppin, P.W. and Pons, M.W.
Virology. 42:603, 1970.
- 24.- "Replication of Influenza virus in a continuous cell line:high yield of infective virus from cells inoculated at high multiplicity".
Choppin, P.W.
Virology. 39:130, 1969.
- 25.- "Defective viral particles and viral disease processes".
Huang, A.S. and Baltimore, D.
Nature (London) 226:325, 1970.
- 26.- "Variability of vesicular stomatitis virus autointerference with different host cells and virus serotypes".
Perrault, J. and Holland, J.J.
Virology. 50:148, 1972.

- 27.- "Defective interfering particles in monolayer-propagated Newcastle disease virus".
Roman, J.M. and Simon, E.H.
Virology. 69:298, 1976.
- 28.- "Factors involved in the generation and replication of Rhabdovirus defective T particles".
Holland, J.J.; Villareal, L.P. and Breindl, M.
J.Virol. 17:805, 1976.
- 29.- "Arenavirus defective interfering particles mask the cell-killing potential of standard virus".
Dutko, F.J. and Pfau, C.J.
J.Gen.Virol. 38:195, 1978.
- 30.- "Genetically determined resistance to infection with group B Arboviruses. II. Increased production of interfering particles in cell cultures from resistant mice".
Darnell, M.B. and Koprowsky, H.
J.Infect.Dis. 129:248, 1974.
- 31.- "Host effect on Arbovirus replication: Appearance of defective interfering particles in murine cells".
Levin, J.G.; Ramseur, J.M. and Grimley, P.M.
J.Virol. 12:1401, 1973.

- 32.- "Host function - dependent induction of defective interfering particles of VSV".
Kang, Y. and Allen, R.
J.Virol.25:202, 1978.
- 33.- "Defective interfering particles of Poliovirus. I. Isolation and physical properties".
Cole, C.N.; Smoler, D.; Wimmer, E. and Baltimore, D.
J.Virol. 7:478, 1971.
- 34.- "Defective interfering particles of Semliki Forest virus: Structural differences between standard virus and defective interfering particles".
Bruton, C.J. and Kennedy, S.I.T.
J.Gen.Virol. 31:383, 1976.
- 35.- "Comparative sedimentation coefficients of RNA extracted from plaque forming and defective particles of vesicular stomatitis virus".
Huang, A.S. and Wagner, R.R.
J.Mol.Biol. 22:381, 1966.
- 36.- "Appearance of defective virions in clons of reovirus".
Nonoyama, M. and Graham, A.F.
J.Virol. 6: 693, 1970.

- 37.- "The single and double - stranded RNA_s and the proteins of incomplete Influenza virus".
Pons, M. and Hirst, G.K.
Virology. 38:68, 1969.
- 38.- "The RNA_s of Defective Interfering Pichinde virus".
Dutko, F.J.; Wright, E.A. and Pfau, C.J.
J.Gen.Virol. 31:417, 1976.
- 39.- "The evolution of new species of viral DNA during serial passage of Simian virus 40 at high multiplicity".
Brockman, W.W.; Lee, T.N.M. and Nathans, D.
Virology. 54: 384, 1973.
- 40.- "Studies on DNA from low - density particles of SV40"
"I. Heterogeneous defective virions produced by successive undiluted passages".
Virology. 34:391, 1968.
"II. Non infectious virions associated with a large plaque variant"
Virology. 34:402, 1968.
Yoshiike, K.
- 41.- " Isolation and characterization of individual clones of simian virus 40 mutants containing deletions, duplications and insertions in their DNA".

Mertz, J.E.; Carbon, J.; Herzberg, M.; Davis, R.W. and Berg, P.
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 39:69, 1975.

42.- "Amplification of a specific region of the polyoma virus genome".

Griffin, B.E. and Fried, M.

Nature (London) 256:175, 1975.

43.- "Characterization of defective interfering viral particles present in a population of Pseudorabies virions".

Ben-Porat, T.; Demarchi, J.M. and Kaplan, A.S.

Virology. 60:29, 1974.

44.- "Defective particles in BHK cells infected with t_s mutants of vesicular stomatitis virus".

Reichman, M.E.; Pringle, C.R. and Follet, E.A.C.

J.Virol. 8:154, 1971.

45.- "Absence of transcriptase activity and transcription - inhibiting ability in defective interfering particles of vesicular stomatitis virus".

Perrault, J. and Holland, J.J.

Virology. 50:159, 1972.

46.- "Diversity and generation of defective interfering Influenza virus particles".

Janda, J.M.; Davis, A.R.; Nayak, D.P. and De B.K.

Virology. 95:48, 1979.

- 47.- "The isolation of Simian virus 40 variants with specifically altered genomes".
Brockmann, W.W. and Nathans, D.
PNAS, USA. 71: 942, 1974.
- 48.- "Defective interfering particles of poliovirus. IV. Mechanisms of enrichment".
Cole, C.N. and Baltimore, D.J.
J.Virol. 12:1414, 1973.
- 49.- "Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus. VI. Correlation of defective particles RNA synthesis with standard RNA replication".
Palma, E.L.; Perlman, S.M. and Huang, A.S.
J.Mol.Biol. 85:127, 1974.
- 50.- "Properties of Defective Lymphocytic Choriomeningitis virus".
Welsh, R.M.; O'Connell, C.M. and Pfau, C.J.
J.Gen.Virol. 17:355, 1972.
- 51.- "Homologous interference by incomplete Sendai virus particles: Changes in virus - specific ribonucleic acid synthesis".
Portner, A. and Kingsbury, D.W.
J.Virol. 8:388, 1971.

- 52.- "Evolutionary variants of Simian virus 40: Characterization of cloned complementing variants".
Brockman, W.W.; Gutai, M.W. and Nathans, D.
Virology. 66: 36, 1975.
- 53.- "Purification of rabies virus grown in tissue culture".
Sokol, R.; Kuwert, E.; Wiktor, J.J.; Hummeler, K. and Koprowski, H.
J.Virol. 2: 836, 1968.
- 54.- "Characterization of rabies virus recovered from persistently infected BHK cells".
Kawai, A.; Matsumoto, S. and Tanabe, K.
Virology. 67: 520, 1975.
- 55.- "Defective T particles of vesicular stomatitis virus.I. Preparation, morphology and some biological properties".
Huang, A.S.; Greenawalt, J.W. and Wagner, R.R.
Virology. 30: 161, 1966.
- 56.- "Prophylaxis and immunization in mice by use of virus free defective T particles to protect against intracerebral infection by VSV".
Doyle, M. and Holland, J.J.
P.N.A.S. 70: 2105, 1973.

- 57.- "Defective Simian virus 40 genomes: Isolation and growth of individual clones".
Mertz, J.E. and Berg, P.
Virology. 62:112, 1974.
- 58.- "Complementation of defective reovirus by t_s mutants".
Spandidos, D.A. and Graham, A.F.
J.Virol. 15:954, 1975.
- 59.- "Complementation between t_s and deletion mutants of reovirus".
Spandidos, D.A. and Graham, A.F.
J.Virol.16: 1444, 1975.
- 60.- "Interfering particles from a culture persistently infected with Parana virus".
Staneck, L.D. and Pfau, C.J.
J.Gen.Virol 22: 437, 1974.
- 61.- "Arenaviruses: Cellular response to long-term in vitro infection with Parana and lymphocytic choriomeningitis viruses".
Staneck, L.D.; Trowbridge, R.S.; Welsh, R.M.; Wright, E.A. and Pfau, C.J
Infect. Immun. 6: 444, 1972.
- 62.- "A comparison of biochemical and biological properties of standard and defective lymphocytic choriomeningitis virus".
Welsh, R.M.; Burner, P.A.; Holland, J.J.; Oldstone, M.B.A.; Thompson, H.A.

and Villareal, L.P.

Bull W.H.O. 52: 403, 1975.

63.- "Homologous interference of LCM virus. Detection and measurement of interference focus-forming units".

Popescu, M.; Schaefer, H. and Lehmann-Grube, F.

J.Virol. 20:1, 1976.

64.- "Purification of defective interfering T particles of VSV and rabies viruses generated in vivo in brains of new born mice".

Holland, J.J. and Villareal, L.P.

Virology. 67: 438, 1975.

65.- "Incomplete forms of influenza virus".

Von Magnus, P.

Adv.Virus.Res. 2: 59, 1954.

66.- "Defective interfering particles in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus".

Popescu, M. and Lehmann-Grube, F.

Virology. 77: 78, 1977.

67.- "Study of infectivity and hemagglutination of influenza virus in deembryonated eggs".

Bernkopf, H.

J.Immunol. 65: 571, 1950.

68.- "Studies on the sedimentation of Influenza virus".

Gard, S.; Von Magnus, P.; Svedmyr, A. and Birch Andersson, A.

Arch.Ges.Virusforsch. 4: 591, 1952.

69.- "Murine Influenza virus encephalomyelitis. III. Effect of defective interfering particles".

Gamboa, E.T.; Harter, D.H.; Duffy, P.E. and Hsu, K.S.

Acta Neuropathol. 34: 157, 1975.

70.- "Attempts to detect homologous interference "in-vivo" with Influenza virus and vesicular stomatitis virus".

Holland, J.J. and Doyle, M.

Infect.Immun. 7: 526, 1973.

71.- "Defective interfering particles as mediators of slower, and persistent noncytotoxic VSV infections in vivo and in vitro".

Holland, J.J.; Villareal, L.P. and Etchison, J.R.

"Mechanisms of virus disease. ICN-UCLA Symposia on molecular and cellular biology. 1: 131, 1974.

W.A.Benjamin, Inc, Melno Park, Calif.-W.S.Robinson and C.F.Fox (ed.)

72.-"In vivo interference in vesicular stomatitis virus infection".

Crick, J. and Brown, F.

Infect. and Immun. 15: 354, 1977.

- 73.- "Prevention of virus-induced cerebellar disease by defective interfering lymphocytic choriomeningitis virus".
Welsh, R.M.; Lampert, P.W. and Oldstone, M.B.A.
J.Infect.Dis. 136: 391, 1977.
- 74.- "Defective interfering particles from poliovirus vaccine and vaccine reference strains".
Mc Laren, L.C. and Holland, J.J.
Virology. 60: 579, 1974.
- 75.- "The viral carrier state in animal cell cultures".
Walker, D.L.
Prog,Med.Virol. 6: 111, 1964.
- 76.- "Temperature-sensitive viruses and the etiology of chronic and inapparent infections".
Preble, Q.T. and Youngner, J.S.
J.Infect.Dis. 131: 467, 1975.
- 77.- "Mechanisms of persistent infections by cytophatic viruses in tissue culture".
Friedman, R.M. and Ramseur, J.M.
Arch.Virol. 60: 83, 1979.

- 78.- "Studies of L cells persistently infected with VSV: Factors involved in regulation of persistent infection".
Nishiyama, Y.
J.Gen.Virol. 35: 265, 1977.
- 79.- "Prolongued infection of interferon-treated cells by VSV: Possible role of temperature-sensitive mutants and interferon".
Ramseur, J.M. and Friedman, R.M.
J.Gen.Virol. 37: 523, 1977.
- 80.- "Recovery of infectious proviral DNA from mammalian cells infected with respiratory syncytial virus".
Simpson, R.W. and Inuma, M.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 72: 3230, 1975.
- 81.- "Infectious DNA of tickborne encephalitis virus".
Zhdanov, V.M.; Bogomolova, N.N.; Gavrilov, V.I.; Andyhaparidze, O.G.;
Derijabin, P.G. and Astakhova, A.N.
Arch.Des.Virusforsch. 45: 215, 1974.
- 82.- "Integration of measles virus nucleic acid into the cell genome".
Zhdanov, V.M. and Parfanovich, M.I.
Arch.Des.Virusforsch. 45: 225, 1974.
- 83.- "Genesis and maintenance of a persistent infection by Canine Distemper virus".

Ter Meulen, V. and Martin, S.J.

J.Gen.Virol. 32: 431, 1976.

- 84.- "Novel antiviral activity found in the media of Sindbis virus persistently infected Mosquito (*Aedes albopictus*) cell cultures".

Riedel, B. and Brown, D.T.

J.Virol. 29: 51, 1979.

- 85.- "A persistent and innaparent infection of L cells with LCMV".

Lehmann-Grube, F.; Slenczka, W. and Tees, R.

J.Gen.Virol. 5: 63, 1969.

- 86.- "Persistent infection of mouse cells with Sindbis virus: Role of virulence of strains, auto-interfering particles and interferon".

Inglot, A.D.; Albin, M. and Chudzio, T.

J.Gen.Virol. 20: 105, 1973.

- 87.- "Role of defective interfering particles of Sendai virus in persistent infections".

Roux, L. and Holland, J.J.

Virology. 93: 91, 1979.

- 88.- "Persistent infection of cultured mammalian cells by JEV".

Schmaljohn, C. and Blair, C.D.

J.Virol. 24: 580, 1977.

- 89.- "Persistent noncytotoxic vesicular stomatitis virus infection mediated by defective T particles that suppress virion transcriptase".
Holland, J.J. and Villareal, L.P.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 71: 2956, 1974.
- 90.- "Long term persistent vesicular stomatitis virus and rabies infection of cells in vitro".
Holland, J.J.; Villareal, L.P.; Welsh, R.M.; Oldstone, M.B.A.; Kohne, D. Lazzarini, R. and Scolnick, E.
J.Gen.Virol. 33: 193, 1976.
- 91.- "A carrier state in HeLa cells with measles virus (Edmonston strain) apparently associated with non infectious virus".
Rustigian, R.
Virology. 66: 101, 1962.
- 92.- "On the hemagglutinating and hemolytic activity of measles virus variants".
Oddo, F.G.; Chiarini, A. and Sinatra, A.
Arch.Ges.Virusforsch. 22: 35, 1967.
- 93.- "Replication of measles virus: Distinct species of short nucleocapsids in cytoplasmic extract of infected cells".
Kiley, M.P.; Gray, R.H. and Payne, F.E.
J.Virol. 13: 721, 1974.

- 94.- "Recent advances in the use of tissue culture methods in virus research".
Sanders, F.K.
Proc.R.Soc.Med. 50: 911, 1957.
- 95.- "Biologic properties of two plaque variants of vesicular stomatitis virus".
Wagner, R.R.; Levy, A.H.; Snyder, R.M.; Ratcliff, G.A. and Hyatt, D.F.
J.Immunol. 91: 112, 1963.
- 96.- "Response of different mouse cell strains to polyoma infection "in-vitro": Latency and self-inhibition effect in infected cultures".
Barsky, G. and Cornefert, F.
J.Natl.Cancer Inst. 28: 823, 1962.
- 97.- "Chronic rabies virus infection of cell cultures".
Wiktor, T.J. and Clark, H.F.
Infect.Immun. 6: 988, 1972.
- 98.- "The production of a temperature-sensitive persistent measles virus infection".
Gould, E.A. and Linton, P.E.
J.Gen.Virol. 28: 21, 1975.
- 99.- "Homologous interference induced by a temperature-sensitive mutant derived from an HJV (Sendai virus) carrier culture".
Kimura, Y.; Norby, E.; Nagata, I.; Shimokata, K. and Nishiyama, Y.
J.Gen.Virol. 33: 333, 1976.

- 100.- "Homologous interference mediated by defective interfering influenza virus derived from a temperature-sensitive mutant of Influenza virus".
Nayak, D.P.; Tobita, K.; Janda, J.M.; Davis, A.R. and De, B.K.
J.Virol. 28: 375, 1978.
- 101.- "Temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus and conditionally defective particles that interfere with and are rescued by wild-type virus".
Youngner, J.S. and Quagliana, D.O.
J.Virol. 19: 102, 1976.
- 102.- "Prolonged infection of L cells with vesicular stomatitis virus. Defective interfering forms and temperature-sensitive mutants as factors in the infection".
Ramseur, J.M. and Friedman, R.M.
Virology. 85: 253, 1978.
- 103.- "Studies on persistent infection of tissue cultures. V: The initial stages of infection of L(MCN) cells with Newcastle disease virus".
Rodriguez, J.E. and Henle, W.
J.Exp.Med. 119: 895, 1965.
- 104.- "Role of temperature-sensitive mutants in persistent infections initiated with vesicular stomatitis virus".
Youngner, J.S.; Dubani, E.J.; Quagliana, D.O.; Kelly, M. and Preble, O.T.
J.Virol. 19: 90, 1976.

- 105.- "Temperature-sensitive mutants isolated from L cells persistently infected with Newcastle disease virus".
Preble, O.T. and Youngner, J.S.
J.Virol. 9: 200, 1972.
- 106.- "Persistent infection of cells in culture by measles virus. I: Development and characteristics of HeLa sublines persistently infected with complete virus".
Rustigian, R.
J.Bacteriol. 92: 1972, 1966.
- 107.- "Persistent infection of L cells with vesicular stomatitis virus: Evolution of virus populations".
Youngner, J.S.; Preble, O.T. and Jones, E.V.
J.Virol. 20: 6, 1978.
- 108.- "Epidemiology of lymphocytic choriomeningitis in a mouse stock observed for four years".
Traub, E.
J.Exp.Med. 69: 801, 1939.
- 109.- "Tamiami virus in the Tampa bay area".
Jennings, W.L.; Lewis, A.L.; Satter, G.E.; Pierce, L.V. and Bons, J.O.
Am.J.Trop.Med.Hyg. 19: 527, 1970.

- 110.- "Immunotolerance in *Calomys callosus* infected with Machupo virus".
Justines, G. and Johnson, K.M.
Nature (London). 222: 1090, 1969.
- 111.- "Los reservorios del virus de la Fiebre Hemorrágica Epidémica de la Provincia de Buenos Aires".
Parodi, A.S.; De la Barrera, J.M.; Rugiero, H.R.; Greenway, D.J.; Yerga, M.; Mettler, N.; Boxaca, M. y Frigerio, M.
Prensa Méd. Argn 46: 554, 1959.
- 112.- "Pichinde virus, a new virus of the Tacaribe Group from Columbia".
Trapido, H. and San Martín, C.
Am.J.Trop.Med.Hyg. 20: 631, 1971.
- 113.- "Amapari, a new virus of the Tacaribe Group from rodents and mites of Amapa territory, Brazil".
Pinheiro, F.P.; Shope, R.E.; Andrade, A.H.P. de; Bensabeth, G.; Cacios, G.V. and Casals, J.
Proc.Soc.exp. Biol (N.Y.) 122: 531, 1966.
- 114.- "Establecimiento y características de una sublínea de células Vero persistentemente infectadas con virus Junín".
Boxaca, M.C.
Medicina (Buenos Aires) 30: Supl.Nº 1, 50, 1970.

- 115.- "Interferencia asociada a los cultivos celulares crónicamente infectados con virus Junín".
Help, G.I.; León, M.E. y Coto, C.E.
Rev.Asoc.Arg.Microbiol. 8: 45, 1976.
- 116.- "Infección crónica "in vitro" con virus Junín".
Coto, C.E.; Damonte, E.B.; Help, G.I. y León, M.E.
Medicina (Buenos Aires) 37: Supl.Nº 3, 39, 1977.
- 117.- "Susceptibilidad viral de células Vero infectadas persistentemente con Arenavirus: Formación aparente de seudotipos".
Damonte, E.B.; Mersich, S.E. y Coto, C.E.
Rev.Asoc.Arg.Microbiol. 10: 78, 1978.
- 118.- "Factors influencing the persistence of choriomeningitis virus in the blood of mice after clinical recovery".
Traub, E.
J.Exp.Med. 68: 229, 1938.
- 119.- "Immunofluorescence study of the mechanism of resistance to super-infection in mice carrying the lymphocytic choriomeningitis virus".
Mims, C.A. and Subrahmanyam, T.P.
J.Pathol.Bacteriol. 91: 403, 1966.
- 120.- "Tacaribe virus, a new agent isolated from Artibeus bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies".

Downs, W.G.; Anderson, C.R.; Spence, L.; Aitken, T.H.G. and Greenhall, A.H.

Amer.J.Trop.Med.Hyg. 12: 640, 1963.

121.- "Sobre la etiología del brote epidémico de Junín".

Parodi, A.S.; Greenway, D.J.; Rugiero, H.R.; Rivero, S.; Frigerio, M.; De la Barrera, J.M.; Mettler, N.; Garzon, F.; Boxaca, M.; Guerrero, L.B. de y Nota, N.

Día méd. 30: 2300, 1958.

122.- "Chronic infection of rodents by Machupo virus".

Johnson, K.M.; MacKenzie, R.B.; Webb, P.A. and Kuns, M.L.

Science. 150: 1618, 1965.

123.- "Parana, a new Tacaribe complex virus from Paraguay".

Webb, P.A.; Johnson, K.M.; Hibbs, J.B. and Kuns, M.L.

Arch.Ges.Virusforsch. 32: 379, 1970.

124.- "Lassa fever. A new virus disease of man from West Africa. III.

Isolation and characterization of the virus".

Buckley, S.M. and Casals, J.

Amer.J.Trop.Med.Hyg. 19: 680, 1970.

125.- "Infección natural y experimental de roedores con virus Junín".

Sabattini, M.S.; Ríos, L.G. de; Díaz, G. y Vega, V.R.

Medicina (Buenos Aires), 37: Supl.N° 3, 149, 1977.

- 126.- "Comparative pathology of Lassa virus infection in Monkeys, Guinea pigs and *Mastomys Natalensis*".
Walker, D.H.; Wulff, H.; Lange, J.V. and Murphy, F.A.
Bull. WHO. 52: 523, 1975.
- 127.- "Tamiami virus infection in mice and cottons rats".
Winn, N.C. and Murphy, F.A.
Bull.WHO. 52: 501, 1975.
- 128.- "Some aspects of induced latent infection of mice with the virus of lymphocytic choriomeningitis".
Hotchin, J.
Symposium on latency and masking in viral and rickettsial infections.
pág 59 (Burgess, Minneapolis, 1958).
- 129.- "Autointerference due to lymphocytic choriomeningitis virus in tissue cultures".
Benson, L.M.
Ann.Rep.Div.Lab.Res. pag 46 (N.Y. State Dept. Health, New York, 1961)
- 130.- "Multiplication of LCM virus in lymph node and embryo cells from non-tolerant mice".
Traub, E.
Arch.Ges.Virusforsch. 11: 473, 1961,

- 131.- "Experiments on heterologous and homologous interference in LCM-infected cultures of murine lymph node cells".
Traub, E. and Kesting, F.
Arc.Ges.Virusforsch. 14: 55, 1963.
- 132.- "A carrier state of lymphocytic choriomeningitis virus in L cells cultures".
Lehmann-Grube, F.
Nature, London. 213: 770, 1967.
- 133.- "Persistent LCM virus infection in the mouse. Immunity and tolerance".
Volkert, M.; Bro-Jorgensen, K. and Marker, O.
Bull.WHO. 52: 471, 1975.
- 134.- "Lymphocytic choriomeningitis virus carrier mice. Factors determining virus persistence".
Lehmann-Grube, F.
Medicina (Buenos Aires) 37: Supl. N° 3, 78, 1977.
- 135.- "Defective interfering viruses".
Huang, A.S.
Annu.Rev.Microbiol. 27: 101, 1973.
- 136.- "Presence of viral particles in the salivary gland of *Calomys musculus* infected with Junin virus by a natural route".

Martínez Peralta, L.A.; Laguens, R.P.; Cossio, P.M.; Sabbatini, M.S.;
Maiztegui, J.I. and Arana, R.M.
Intervirology. 11: 111, 1979.

137.- "Junín virus".

Coto, C.E.

Prog.Med.Virol. 18: 127 (Karger, Basel, 1974).

138.- "Células Vero persistentemente infectadas con virus Junín. I. Compor-
tamiento de la línea Vero IR 58 frente a la sobreinfección con dos
cepas del virus Junín".

Boxaca, M.; Savy, V. y Giovannello, O.A.

Medicina (Buenos Aires) 32: 269, 1972.

139.- "Induction of infectious virus and viral surface antigen in Vero cells
persistently infected with virus Junin".

Coto, C.E.; León, M.E.; Martínez Peralta, L.; Help, G.I. and Laguens,
R.P.


Humoral immunity in neurological diseases. 24: 405, 1979. Plenum Press.

140.- "Temperature-sensitive of the Arenavirus Junin isolated from persistent-
ly infected Vero cells".

Damonte, E.B. and Coto, C.E.

Intervirology. 11: 282, 1979.

- 141.- "Inmunización contra la Fiebre Hemorrágica Argentina con una cepa atenuada del virus Junín. I. Estudio de una cepa modificada del virus Junín. Inmunización de cobayos".
Guerrero, L.B.de; Weissembacher, M.C. y Parodi, A.S.
Medicina (Buenos Aires). 29: 1, 1969.
- 142.- "A simple method of estimating 50% end points".
Reed, L.J. and Muench, H.A.
Am.J.Hyg. 27: 493, 1938.
- 143.- "Análisis de los factores que condicionan la formación de placas en células Vero infectadas con los virus Junín y Tacaribe".
Damonte, E.B. y Coto, C.E.
Rev.Asoc.Arg.Microbiol. 6: 15, 1976.
- 144.- "Studies on the mechanism of poliovirus-induced cell damage. I. The relation between metabolic and morphological alterations of cultured cells".
Bablanian, R.; Eggers, H.J. and Tamm, I.
Virology. 26: 100, 1965.
- 145.- "Interacción del virus Junín con células de riñón de mono".
Coto, C.E.; Vombergar, M.D. de y Tkaczewski, L. de
Medicina, Buenos Aires, 30: 38, 1970.

- 146.- "Modified virus particles in undiluted passages of HVJ. I. The production of modified particles".

 Tadokoro, J.
 Biken's J. 1: 111, 1958.
- 147.- "A transmissible interfering component of vesicular stomatitis virus preparations".
 Cooper, P.D. and Bellet, A.J.D.
 J.Gen.Microbiol. 21: 485, 1959.
- 148.- "Diversity of lymphocytic choriomeningitis virus: variation due to replication of the virus in the mouse".
 Popescu, M. and Lehmann-Grube, F.
 J.Gen.Virol. 30: 113, 1976.
- 149.- "The biology of animal viruses".
 Fenner, F.; Mc Auslan, B.R.; Mims, C.A.; Sambrook, J. and White, D.O.
 Academic Press, New York, pag 226, 1974.
- 150.- "Inhibition of Pichinde virus replication by Actynomicin D".
 Rawls, W.E.
 J.Gen.Virol. 33: 421, 1976.
- 151.- "The biology of animal viruses".
 Fenner, F.; Mc Auslan, B.R.; Mims, C.A.; Sambrook, J. and White, D.O.
 Academic Press, New York, pag 199, 1974.

- 152.- "Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey Kidney cells (Vero)".
Desmyter, J.; Melnick, J.L. and Rawls, W.E.
J.Virol. 2: 955, 1968.
- 153.- "Plaque assays and current concepts of regulation in Arenavirus infections".
Pfau, C.J.; Welsh, R.M. and Trowbridge, R.S.
in "Lymphocytic Choriomeningitis Virus and other Arenavirus". pag 101,
1973. Ed.F. Lehmann-Grube.
- 154.- "Low-pathogenicity variant of lymphocytic choriomeningitis virus".
Hotchin, J. and Sikora, E.
Infect.Immun. 7: 825, 1973.
- 155.- "LCM virus infection of cells in vitro".
Lehmann-Grube, F.; Popescu, M.; Schaefer, H. and Gschwender, H.H.
Bull. WHO. 52: 443, 1975.
- 156.- "Production of infective virus as a function of the post infection time in foetal bovine cell cultures serially infected with undiluted influenza B virus".
Ramos, B.A.; de Torres, R.A. and Carlomagno, M.
Rev.Asoc.Arg.Microbiol. 5: 2, 1973.

- 157.- "The role of defective interfering (DI) virus in Arenavirus infections".
Pfau, C.J.
Medicina (Buenos Aires). 37: Supl.N° 3, 32, 1977.
- 158.- "Induction of Measles Virus Hemagglutinin in a Persistently Infected, Nonvirogenic Line of Cells (BGM/MV)".
Flanagan, T.D. and Menna, J.H.
J.Virol. 17: 1052, 1976.
- 159.- "Persistent noncytotoxic virus infection: Nonsynchrony of viral and cellular multiplication".
Walker, D.L.; Chang, P.P.; Northrup, R.L. and Hinze, H.C.
J.Bacteriol. 92: 983, 1966.
- 160.- "Determinants of spontaneous recovery and persistence in MDCK cells infected with choriomeningitis virus".
Jacobson, S.; Dutko, F.J. and Pfau, C.J.
J.Gen.Virol. 44: 113, 1979.
- 161.- "Influencia de las condiciones culturales sobre la involución del efecto citopático producido por el virus Junín en células Vero".
Avila, R.T.de y Coto, C.E.
Rev.Asoc.Argent.Microbiol. 10: 94, 1978.