

## Tesis de Posgrado

# Iniciación y evolución de la infección persistente con virus Tacaribe

D'Aiutolo, Ana Cristina

1984

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

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

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

**Cita tipo APA:**

D'Aiutolo, Ana Cristina. (1984). Iniciación y evolución de la infección persistente con virus Tacaribe. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1863\\_DAiutolo.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1863_DAiutolo.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

D'Aiutolo, Ana Cristina. "Iniciación y evolución de la infección persistente con virus Tacaribe". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1984.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1863\\_DAiutolo.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1863_DAiutolo.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INICIACION Y EVOLUCION DE LA INFECCION PERSISTENTE CON  
VIRUS TACARIBE

Ana Cristina D'Aiutolo

Director: Dra. Celia E. Coto

Lugar de trabajo: Laboratorio de Virología, Departamento  
de Química Biológica, Facultad de Cienci  
cias Exactas y Naturales, UBA.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

1984

1863  
Ej. 2

a la memoria de mi padre

## A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco muy especialmente a mi directora de Tesis, Dra. Celia E. Coto por haberme iniciado en la investigación científica, por el inapreciable apoyo que en todo momento me ha brindado y por la lectura crítica del manuscrito original.

A la Dra. Elsa B. Damonte por haberme introducido en la metodología de trabajo y por su constante estímulo y comprensión.

Al Dr. Oscar Larghi por los consejos recibidos que me permitieron resolver algunos problemas en las técnicas de inmunofluorescencia.

A mis compañeros del Laboratorio de Virología: Susana Mersich, Nélide Candurra y Laura Alché por sus valiosos comentarios y sugerencias en la realización del manuscrito y Jorge Lampuri, Félix Coulombie, Mónica Wachsman y Sofía Piccinalli por su desinteresada colaboración.

Al Lic. Claudio J. Bidau por la lectura crítica del manuscrito original y por la realización de las fotomicrografías incluídas en este trabajo.

A los integrantes de los Laboratorios de Inmunquímica y Microbiología e Inmunología por la colaboración prestada.

A mi esposo y a mis hijos Claudio Jr. y Pablo por haberme cedido horas de comprensión para realizar esta tesis.

## CONTENIDO

<u>Resumen</u> .....	1
<u>Introducción</u> .....	3
Infecciones persistentes in-vivo.....	4
Infecciones persistentes in-vitro.....	10
Mecanismos involucrados en la persistencia in-vitro...	13
Variabilidad de los ARN virus.....	17
La familia Arenaviridae.....	20
Persistencia de los Arenavirus in-vitro.....	24
Persistencia del virus LCM.....	25
<u>Objetivos de esta tesis</u> .....	27
<u>Materiales y métodos</u> .....	28
Virus.....	28
Cultivos celulares.....	28
Preparación de los cultivos celulares.....	29
Clonado de virus Tacaribe en células Vero.....	30
Determinación de la infectividad.....	31
Determinación de centros infecciosos.....	34
Ensayo de interferencia viral.....	34
Técnicas de inmunofluorescencia.....	35
Inactivación térmica.....	37
Obtención de los inmunosueros antiTacaribe.....	38
Adsorción de los inmunosueros.....	39
Titulación de los inmunosueros.....	39
Ensayo de neutralización viral.....	40
Pasajes concentrados de virus Tacaribe en células Vero.....	40
Animales.....	41
<u>Resultados</u> .....	42
<u>PRIMERA PARTE: Estudio de una línea celular persistentemente     infectada con virus Tacaribe</u>	
I: <u>Establecimiento y caracterización</u> .....	42

1: Iniciación.....	42
2: Producción de virus por el cultivo infectado.....	43
3: Resistencia del cultivo persistente a la sobreinfección con virus homólogo.....	47
4: Detección de células infectadas.....	48
5: Detección de células productoras.....	51
6: Rescate de virus de la línea VT <sub>8</sub> por el agregado de células sensibles.....	53
II: <u>Resistencia de la línea persistentemente infectada a la sobreinfección homotípica, heterotípica y heteróloga.....</u>	58
III: <u>Propiedades del virus liberado durante la infección persistente.....</u>	66
1: Neutralización de la progenie viral.....	66
2: Eficiencia de replicación a distintas temperaturas del virus persistente (VT).....	67
3: Inactivación térmica del virus VT.....	68
4: Propiedades biológicas del virus VT.....	72
4.1.: Acción sobre cultivo de tejidos.....	72
4.2.: Virulencia del virus VT para ratón lactante.....	78
5: Detección de interferencia en los sobrenadantes de la línea VT <sub>8</sub> .....	80
<u>Conclusiones parciales.....</u>	85
<u>SEGUNDA PARTE: Establecimiento de infecciones persistentes.....</u>	87
I: <u>Caracterización de líneas persistentemente infectadas con virus Tacaribe.....</u>	88
1: Obtención de las líneas.....	88
2: Producción de virus por las líneas persistentes.....	90
3: Análisis de la progenie viral liberada por las líneas persistentes.....	96
3.1.: Termolabilidad.....	96
3.2.: Termosensibilidad.....	97
3.3.: Virulencia para ratón lactante.....	101

3.4.:	Detección de interferencia en los sobrenadantes de las líneas persistentes.....	101
3.5.:	Habilidad del virus persistente para iniciar persistencia.....	103
4:	Análisis de la progenie liberada por la línea VT <sub>1</sub> : Variantes de crecimiento lento.....	107
	<u>Conclusiones parciales</u> .....	116
II:	<u>Factores que condicionan la iniciación de la infección persistente</u> .....	118
	Obtención de un stock de virus Tacaribe libre de PI.....	121
	Obtención de un stock rico en PI.....	123
III:	<u>Análisis de las líneas persistentes originadas por coinfección de PI y las mutantes VT<sub>8P4</sub> y VT<sub>2P2</sub></u> .....	132
	<u>Discusión</u> .....	137
	<u>Bibliografía</u> .....	151
	<u>Apéndice: Abreviaturas</u> .....	171

## R E S U M E N

### Persistencia del virus Tacaribe en células Vero

El virus Tacaribe genera durante su replicación en células Vero partículas interferentes capaces de inhibir a las partículas infectivas interfiriendo con su actividad citolítica y por consiguiente favoreciendo el establecimiento de una infección persistente.

La iniciación y establecimiento de la persistencia depende de la presencia de partículas interferentes en el inóculo o en su generación.

La infección persistente tiene un ciclo productivo y uno no productivo donde no puede rescatarse virus infectivo.

En algunas infecciones crónicas, la población viral modifica su comportamiento seleccionándose mutantes con características sensibles en la replicación. Estas mutantes no son capaces de producir infección persistente por sí mismas dando lugar a una infección virulenta. Parecería ser que dichas mutantes tienen un defecto en el gen responsable de la generación óptima de PI aunque son susceptibles a la actividad interferente de las mismas.

El cultivo persistente resulta refractario a la sobreinfección con virus homotípico. Esta resistencia total a la reinfección



fección en un cultivo donde la producción de PI es mínima significa que el estado refractario que adquieren se establece por un mecanismo diferente cuyo origen se desconoce. Las PI interfiriendo con el virus citolítico favorecerían el establecimiento de ese estado refractario.

La desaparición del virus liberado por el cultivo persistente no depende de la presencia de partículas interferentes ya que no hay un nivel detectable de interferencia en los sobrenadantes de los cultivos persistentes. La falta de células susceptibles es la que finalmente agota al cultivo.

## I N T R O D U C C I O N

La multiplicación de los virus animales depende de numerosos factores relacionados no sólo con el tipo de virus sino también con la célula huésped.

Según Fenner (34), los virus animales pueden dividirse en virus temperados y virus citolíticos; los primeros no reciben su nombre debido a una característica propia del virión sino que su denominación resulta de la interacción de ciertas cepas virales con determinadas células en la cuáles multiplican sin destrucción celular y en general con baja producción de virus progenie.

Los virus citolíticos, por el contrario, son aquellos que como resultado de su multiplicación lisan a la célula huésped liberando al medio extracelular una gran cantidad de viriones infecciosos capaces de iniciar un nuevo ciclo de replicación al encontrarse con células susceptibles no infectadas. La susceptibilidad celular a la infección viral depende, entre otros factores, de la presencia de receptores para la adsorción del virus infectante, del estado fisiológico de la célula huésped y de ciertas características genéticas de las mismas.

Dos tipos de respuesta pueden observarse luego de la multiplicación viral:

1) el desarrollo de una infección aguda y 2) el establecimiento de una infección persistente. El resultado de las infecciones agudas es la liberación de una nueva progenie viral acompañada de la lisis celular. En las llamadas infecciones persistentes se establece un equilibrio entre la patogenicidad viral y la destrucción celular. Las células infectadas persistentemente no presentan en general alteraciones fisiológicas aparentes de manera tal que el virus se asegura así una permanencia prolongada, estado que favorece a cualquier parásito obligado.

En la actualidad, y debido a que las infecciones virales agudas están siendo cada vez más controladas y en algunos casos erradicadas mediante el empleo de vacunas, el interés de los virólogos se ha enfocado hacia las infecciones persistentes. Este tipo de infecciones está asociada con una gran cantidad de mecanismos citopáticos y de manifestaciones clínicas que hacen bastante dificultosa su clasificación.

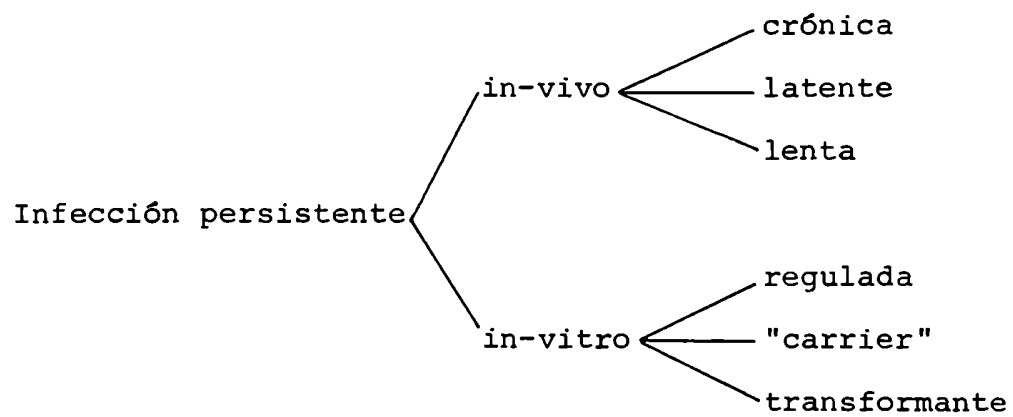
Según Fenner (34) y asumiendo que existe cierta superposición, las infecciones persistentes se agrupan en cinco categorías dependiendo si éstas ocurren in-vivo o in-vitro (Tabla 1)

#### Infecciones persistentes in-vivo

Las infecciones persistentes in-vivo resultan de gran interés debido a la importante incidencia que presentan entre

Tabla 1:

Clasificación de las infecciones persistentes según Fenner (34)



otras, en el hombre y en aquellos animales que tienen un alto valor económico.

La clasificación, según la Tabla 1, las agrupa en:

1) Crónicas: son infecciones persistentes en las que siempre se puede demostrar la presencia del virus que es, a menudo, parcialmente eliminado. No se observan signos de enfermedad o ésta aparece tardíamente asociada a disturbios inmunopatológicos.

2) Latentes: son infecciones que presentan episodios agudos intermitentes de enfermedad entre los cuales generalmente no puede aislarse virus.

3) Lentas: tienen un largo período de incubación durante el cual aumenta la concentración de virus gradualmente hasta que al final se manifiesta la enfermedad que resulta generalmente fatal.

Como ejemplo de infecciones persistentes que afectan al hombre puede citarse aquellas producidas por Citomegalovirus, Hepatitis B, Rubeola, Herpes, mientras que la anemia infecciosa equina, leucosis aviaria, leucemia murina y coriomeningitis linfocítica, esta última producida por el virus LCM miembro de la familia Arenaviridae, son infecciones persistentes que afectan a distintas especies animales.

De lo anteriormente citado, se desprende que hay una gran variedad de virus tanto ADN como ARN que pueden establecer in-

fecciones persistentes in-vivo pero, aún queda por determinar si es que existe algún mecanismo común a ellos que permite que este tipo de infecciones supere las defensas del huésped que aseguran la eliminación del virus. Varios son los mecanismos que parecerían estar involucrados en este tipo de equilibrio virus-huésped. Entre ellos, la deficiencia inmunitaria tanto humoral como celular y la síntesis defectiva de interferón y, la baja citopatogenicidad viral y la presencia de mutantes termosensibles y de partículas defectivas son algunos de los factores que dependen del huésped o del virus respectivamente y que han sido postulados como moduladores de la persistencia.

En las infecciones neonatales o intrauterinas, el animal infectado no tiene aún desarrollada su competencia inmunológica o está en los primeros estadios de la misma; por consiguiente, la enfermedad no se expresa clínicamente en la mayoría de los casos. Al infectar ratones neonatos con virus LCM, el virus multiplica pero el animal no muestra respuesta sintomatológica en los primeros meses de vida. En este tipo de infecciones se ha demostrado una tolerancia inmune celular (49). Los anticuerpos humorales aparecen como complejos inmunes infecciosos (79) (44) que tienen la capacidad de infectar otras células blanco (77) o pueden ser fagocitados por macrófagos en los cuales el virus es capaz de persistir y también replicar. De esta forma se previene

la eliminación del virus por los macrófagos y se inicia la infección persistente (78). Más aún, que la inmunodepresión inducida en el huésped juega un papel muy importante en el establecimiento de la persistencia se ha demostrado porque la respuesta de anticuerpos se encuentra deprimida luego de la inoculación experimental de animales con Herpesvirus (93), Paramixovirus (68), Arenavirus (71) (9) y con otros virus denominados lentos.

La deficiencia funcional del sistema inmune luego de una infección neonatal con virus incluye una reducida producción de interferón. Se ha podido demostrar que los ratones persistentemente infectados con LCM no sintetizan interferón aunque dichos ratones responden produciendo interferón ante la infección con otro virus (70). Este hecho explicaría que la incapacidad para producir interferón está restringida al virus que produce la infección persistente (69).

Los virus que inducen infecciones persistentes in-vivo no tienen efecto destructivo severo sobre las células que infectan y causan pocos cambios en el metabolismo celular (34). Este es el caso de los virus envueltos con períodos de incubación muy largos. En cambio aquellos virus citocídicos que causan infecciones persistentes están restringidos en cuanto a la destrucción celular a un pequeño número de células cuya pérdida no afecta en forma severa al organismo (69).

Dentro de los factores que pueden modular o limitar la multiplicación viral e inducir persistencia y que no dependen del huésped se encuentran las partículas defectivas interferentes (52).

Popescu y Lehmann-Grube (90) encontraron partículas interferentes (DI) en ratones "carrier" infectados neonatalmente con virus LCM. La proporción de DI a viriones infecciosos variaba de acuerdo al órgano estudiado, pero ese cociente siempre iba decayendo en el tiempo. Por su parte, Welsh y Oldstone (124) demostraron que los macrófagos peritoneales de ratones crónicamente infectados con LCM contenían DI que conferían protección contra la patología cerebelar producida por el virus cuando se coinfectaban ratas neonatas con virus infeccioso y partículas interferentes (122). También se ha obtenido evidencia de la presencia de DI en ratas neonatas infectadas con Reovirus en forma persistente (104).

Además de las partículas interferentes, las mutantes ts pueden regular la replicación viral y por consiguiente determinar cual va a ser el curso de la infección. Coto y col (16) aislaron mutantes ts del cerebro de Calomys musculinus persistentemente infectados con virus Junín y observaron que a mayor tiempo post-infección, había un aumento en la frecuencia de dichas mutantes, dato que permite suponer que esta selección viral estaría implicada de algún modo en el mantenimiento de la persis



tencia. Queda aún por demostrar si dichas mutantes ts presentan alguna alteración en la citopatogenicidad. También en el caso de los Reovirus, Fields (35) demostró que al infectar ratas recién nacidas con Reovirus tipo 3 salvaje y con una mutante ts del mismo, los animales infectados con la cepa salvaje murieron de encefalitis aguda mientras que aquellos infectados con la mutante sobrevivían a la infección y aparecían clínicamente sanos aunque persistentemente infectados.

#### Infecciones persistentes in-vitro

Al comienzo del siglo, con el advenimiento del cultivo de tejidos, se dispuso de un sustrato que, a diferencia de los organismos íntegros permitía observar la respuesta de las células a la infección viral sin la intervención de la respuesta inmunitaria. Aunque el comportamiento de los virus en cultivo de tejidos no es necesariamente un paralelo ni un modelo exacto de la infección causada por el mismo agente en su huésped natural, este sistema artificial permitió en la gran mayoría de los casos estudiar el fenómeno de la persistencia bajo distintos aspectos (103).

Según el tipo de relación que establezca el virus con el sistema celular, las infecciones persistentes in-vitro se pueden clasificar (114) en:

1) reguladas: son comúnmente producidas por virus ARN que brotan de la membrana celular. En este tipo de infecciones, la mayoría de las células del cultivo están infectadas y liberan grandes cantidades de viriones al medio. En general, las células se mantienen metabólicamente normales y no tienen alterado su patrón de multiplicación. La transmisión viral de célula a célula se produce en forma intracelular o sea que luego de la mitosis, la célula parental distribuye al agente viral a las células hijas. De esta forma, el agregado de anticuerpos específicos no puede curar la infección ni limitarla.

2) carrier: en este tipo de infecciones sólo una pequeña proporción de la población celular está infectada. En estas células tiene lugar un ciclo normal y regular de replicación viral que usualmente finaliza con la muerte celular. La progenie viral solamente infecta a un pequeño número de células y esta reinfección limitada depende de condiciones especiales del sistema virus-célula: resistencia parcial de las células a la infección, presencia de agentes antivirales (interferón) en el medio, interferencia, etc. Si se previene la reinfección continua por el agregado de anticuerpos específico, el cultivo generalmente se cura.

Las infecciones carrier son producidas no sólo por virus ARN envueltos sino por una amplia gama que comprende tanto ADN

como ARN virus (92). Debido a que este tipo de infecciones lo pueden presentar viriones con características tan distintas, en cada sistema virus-célula operan mecanismos diferentes que protegen a las células de la reinfección y algunas veces son varios los factores que cumplen un papel en la regulación. También se ha postulado que existe una evolución en el tipo de relación que establece la progenie viral con la célula infectada en el transcurso de la infección persistente.

3) transformantes: son aquellas producidas por virus tumorales. Este tipo de virus, que tiene la capacidad de inducir proliferación de las células infectadas que llevan al desarrollo de un tumor, pueden ser tanto ARN como ADN virus (34). Las células transformadas presentan ciertas características que las diferencian de las células normales: no tienen inhibición por contacto, requieren menor concentración de suero para crecer, inducen tumores al ser inoculadas en animales, presentan alteraciones a nivel de membrana, etc.

Los virus tumorales persisten en las células infectadas no como partículas infecciosas sino generalmente integrando su genoma al genoma celular de modo tal que al dividirse la célula huésped, cada célula hija recibe, en general, un genoma viral completo.

Mecanismos involucrados en la persistencia in-vitro

La persistencia de un virus en un cultivo celular es la forma que tiene dicho microorganismo de perpetuarse y no destruir a su huésped, dado que, al ser un parásito obligado, la muerte celular lo llevaría indefectiblemente a desaparecer. En las infecciones persistentes se establece un equilibrio entre la patogenicidad viral y la destrucción celular, pero esta interacción no está mediada por las mismas partículas virales a lo largo de toda la infección. Pueden visualizarse en todas las infecciones persistentes dos etapas que son perfectamente diferenciables: el establecimiento de la infección y el mantenimiento posterior de la misma de modo tal de asegurar la sobrevivencia del parásito en el tiempo. La importancia de estudiar cada una de estas fases reside en el hecho que las partículas virales implicadas en el establecimiento de la persistencia no siempre son las mismas que regulan el mantenimiento de la infección.

Han sido varios los mecanismos que se han sugerido como responsables del establecimiento y/o mantenimiento de las infecciones crónicas por virus que son normalmente virulentos y citolíticos (117) (45) (36). Estos incluyen a las partículas interferentes (53), a las mutantes termosensibles (131) y variantes virales poco citolíticas (107) como factores dependientes del virus infectante y al interfón (76) (95) y al estado fisiológico celular como aquellos que dependen del huésped.

Las partículas interferentes (PI) fueron descubiertas en la década del '40 en virus Influenza por von Magnus (113) quien las denominó inmaduras o incompletas. Estas partículas, de las cuales solo se conocía su capacidad de interferir con el virus infectivo, fueron posteriormente encontradas para otros virus y su caracterización biológica y bioquímica se realizó analizando la interferencia producida por el virus VSV (52) debido a que las PI de VSV fueron fácilmente separadas del virión estándar.

Las características generales de las partículas interferentes, que pueden aplicarse a casi todas las PI de los virus animales son:

- se las considera una clase de mutantes de los virus animales.

- no pueden replicar en ausencia de un virus helper por lo que se las considera defectivas.

- disminuyen el rendimiento del virus salvaje. Por este carácter son denominadas interferentes.

- tienen la capacidad de aumentar su rendimiento en células coinfectadas con virus salvaje.

Debido a todas las características anteriormente detalladas, la regulación de las infecciones persistentes por las PI es fácilmente comprensible. La producción de PI en cultivos crónicos, permite que dichas partículas infecten células de modo tal de im

pedir que viriones salvajes puedan multiplicar, o sea, interfiriendo con las partículas infectivas. De esta forma se establece un equilibrio entre la producción de viriones salvajes y viriones interferentes que regula la lisis celular permitiendo la sobrevivencia del cultivo. Se ha visto también, para el virus Sindbis (119) (118), LCM (54), Rabia (57) y VSV (48), que la alta producción de PI asegura la sobrevivencia viral en los cultivos crónicos, pero, la presión ejercida por la generación continua de las PI hace que se seleccionen mutantes virales que son resistentes a la interferencia producida por estas PI. De esta forma, habría ciclos de PI diferentes a lo largo de la infección persistente que interfieren con la replicación de las mutantes virales que se van seleccionando. Este sería un papel de las PI diferente del que juegan en la iniciación de la infección.

Los viriones termosensibles (ts), por otro lado, son mutantes letales condicionales (32) que presentan una mutación en el genoma de modo tal que a la temperatura permisiva se produce una proteína que, aunque funcional, está alterada. A la temperatura restrictiva, por otra parte, esta proteína o no se sintetiza o, si lo hace, no es funcional (34). La ventaja selectiva de un fenotipo ts en las infecciones persistentes no es inmediatamente obvia. Las condiciones de cultivo de las líneas crónicas (generalmente 37°C) son semipermisivas para la mutante ts. Pre-

sumiblemente, estos viriones se comportan como "leaky" (131) a dicha temperatura de modo tal de permitir la persistencia del virus sin lisis celular rápida, dado que, en general, estas mutantes son menos citopáticas y tienen una menor tasa de crecimiento que los viriones salvajes. De este modo, al replicar más lento y producir menor progenie por célula, permiten la supervivencia de la célula huésped.

Existirían dos mecanismos por los cuales las mutantes *ts* se amplificarían y mantendrían su dominancia en la población viral persistente. Una de ellas postula que serían buenas inductoras de interferón (100) y por lo tanto habría una modulación del daño celular por medio de la protección producida por esta proteína antiviral. La otra teoría, que se aplicaría a aquellos sistemas celulares que no sintetizan interferón, postula que las mutantes *ts* interferirían con la multiplicación del virus salvaje (133) aunque el mecanismo íntimo de la modulación no se conoce.

En varios sistemas virus-célula, la persistencia del virus se mantiene debido a la selección de variantes antigénicas tanto en presencia de anticuerpos (75) como en ausencia de los mismos (40), cuyo significado aún queda por esclarecer.

Dentro de los factores que dependen de la célula huésped y que modulan la persistencia del virus podemos citar al interfe-

rón, cuya función antiviral generalmente se presenta combinada con la selección de distintas partículas virales y el estado fisiológico del cultivo. Se ha podido demostrar que en ciertos sistemas celulares crónicamente infectados, el estado metabólico activo de la célula huésped modula la síntesis de PI aumentando su producción en función del tiempo post-infección (13).

Un hecho que debe tenerse siempre presente es que el equilibrio que se establece entre el virus y la célula en un cultivo persistente, es un proceso complejo donde son varios y no uno los mecanismos que están involucrados de modo tal que, para cada sistema virus-célula existe una gran cantidad de parámetros tanto virales como celulares que llevan al establecimiento y mantenimiento de la persistencia. La complejidad de las múltiples interrelaciones que ocurren en el mencionado sistema se ve incrementada por la gran variabilidad genética que presentan los ARN virus.

#### Variabilidad genética de los ARN virus

Se ha podido demostrar que los errores en la replicación de los cromosomas de eucariotes y virus ADN varían considerablemente, pero en promedio, la tasa de mutación oscila entre  $10^{-8}$  y  $10^{-10}$  por nucleótido incorporado. Estos valores son muy bajos debido a la presencia de exonucleasas reparadoras que eliminan la base



mal incorporada de la hebra de ADN recién sintetizada (59). En este caso, el templado se considera como hebra correcta debido a que está metilado a intervalos.

En contraste, estudiando bacteriófagos ARN se ha podido demostrar que el nivel de error al duplicarse el genoma es aproximadamente  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  en una dada base (27) (28). Esta baja fidelidad en la replicación de los genomas ARN se debe a la falta de enzimas reparadoras, dado que no se han podido encontrar exonucleasas reparadoras asociadas con las ARN polimerasas.

En base a otros resultados, Holland y colaboradores (46) han postulado que los ARN virus que exhiben una gran frecuencia de mutación tienen un grado tan alto de evolución (o sea la tasa a la cual se acumulan mutaciones viables en el genoma) que el concepto de partícula viral "salvaje" llega a tener un significado efímero en los genomas ARN.

La rápida evolución de los ARN virus, requiere que haya una continua aparición de alteraciones viables en el genoma, y, ésto lleva a una población viral heterogénea que alcanza un equilibrio generalmente estable (46) si se mantienen las condiciones del entorno. El concepto de "equilibrio" en una población viral fue analizado por Domingo y col (27) quienes estudiando la heterogeneidad de la secuencia nucleotídica del genoma del fago QB concluyeron que: "el genoma de QB no puede definirse como u-

na secuencia única sino como el promedio de una gran cantidad de secuencias individuales diferentes". La población viral llega a un equilibrio predecible con un predominio del genotipo salvaje. Ellos propusieron que hay una alta tasa de aparición de mutantes, pero estas mutantes son seleccionadas fuertemente en contra de modo tal que la población alcanza un equilibrio dinámico.

Trabajando con otro sistema, Semler y Holland (101) han demostrado también una gran heterogeneidad en el genoma de una población de VSV, aunque, algunas especies de ARN mostraron una alta aptitud que bajo condiciones apropiadas dominarían a la población en equilibrio. Esta plasticidad en los genomas ARN se ha podido observar para varias poblaciones de ARN virus (46) donde se ha visto un equilibrio estable aunque dinámico.

La gran variabilidad que presentan los genomas de los ARN virus permite que coexistan una amplia gama de secuencias nucleotídicas sobre las que pueden actuar distintas presiones selectivas de modo tal que cuando se alteran las condiciones de equilibrio se seleccionarán aquellas especies genómicas con mayor aptitud. Parecería ser que ciertas interacciones virus-célula promueven la rápida evolución de los genomas ARN que en otros sistemas tienden a mantener un equilibrio estable (130). Un tipo de interacción virus-célula que generalmente induce un dese

quilibrio en las poblaciones de ARN virus son las infecciones persistentes.

#### La familia Arenaviridae

En el año 1970, Rowe y col (99) definen un nuevo grupo de virus al que denominan Arenovirus que se compone de los virus LCM, Lassa y el Complejo Tacaribe que comprende ocho agentes virales: Tacaribe, Junín, Machupo, Amaparí, Latino, Paraná, Pichinde y Tamiami. El nombre Arenovirus (del latín arenosus: arenoso) se eligió debido a los gránulos característicos observados dentro de los viriones por microscopía electrónica. Posteriormente (87) el nombre se cambió a Arenavirus.

El comité internacional de Taxonomía de virus (67) elevó a este grupo de agentes a la categoría de género (Arenavirus) perteneciente a la familia Arenaviridae. El virus LCM fue definido como especie tipo (33) y hasta ahora (67) aún queda por establecer si los virus Mozambique (128) y Flexal Be AN (89) pertenecen a este género.

En la tabla 2 se enumeran las especies del género conjuntamente con sus huéspedes naturales.

La mayoría de estas especies virales presentan un único y restringido huésped que generalmente es un roedor, en el cual establecen una infección persistente y, a excepción del virus

Tabla 2:

Principales características de la Familia Arenaviridae.

Espece	Distrib. geográfica	Huésped natural	Infección al hombre	citas
LCM	mundial	<u>Mus musculus</u>	Coriomeningitis	2
Lassa	Africa	<u>Mastomys natalensis</u>	Fiebre de Lassa	12
Mozambique	Africa	<u>Mastomys natalensis</u>	?	128
Tacaribe	Trinidad	<u>Artibeus lituratus</u> <u>A. jamaicensis</u>	no#	29
Tamiami	Florida	<u>Sigmodon hispidus</u>	no	55
Pichinde	Colombia	<u>Oryzomys albigularis</u>	no#	110
Amaparí	Brasil	<u>Neacomys guianeae</u> <u>Oryzomys capito</u>	no	88
Machupo	Bolivia	<u>Calomys callosus</u>	F.H. Boliviana <sup>&amp;</sup>	56
Latino	Bolivia	<u>Calomys callosus</u>	no	116
Paraná	Paraguay	<u>Oryzomys buccinatus</u>	no	115
Junín	Argentina	<u>Calomys musculinus</u> <sup>*</sup> <u>C. laucha</u> <u>Akodon azarae</u>	F.H. Argentina <sup>&amp;&amp;</sup>	82

\* Huésped principal

# Infecciones humanas de laboratorio

& La Fiebre Hemorrágica Boliviana se autoextinguió y hace varios años que no se registran casos

&& Fiebre Hemorrágica Argentina

LCM que presenta una distribución mundial, el resto se encuentra restringido a regiones geográficas localizadas. La diseminación natural a otros mamíferos no es un fenómeno comúnmente descrito aunque algunos miembros de este grupo son patógenos para el hombre.

Varios autores han publicado estudios morfológicos sobre Arenavirus (72) (73) (74) (65) que llevaron a determinar que presentan una forma pleomórfica a esférica cuyo tamaño varía desde aproximadamente 50 a 300 nm. Presentan una envoltura lipoproteica (membrana) que contiene proyecciones espaciadas (73) en su superficie constituídas por las glicoproteínas virales (37) (112) (10). En el interior los viriones presentan gránulos densos que consisten en ribosomas celulares (14) (84) (85) (31) que varían en número y no se ha observado asociación específica entre ellos y otros componentes estructurales del virión.

La nucleocápside ha sido estudiada para los virus Tacaribe (81) y Pichinde (111) presentándose como filamentos circulares que están enrollados y que muestran subunidades globulares organizadas como "cuentas de rosario".

El ácido nucleico extraído de viriones purificados resultó ser ARN de cadena simple que se presenta en varios trozos (96). Para los virus Pichinde, LCM y Junín se encontraron especies de ARN con coeficientes de sedimentación 31 S, 28 S, 22 S, 18 S, y

4 S (14) (84) (1). Por medio del estudio de la composición de bases, tasa de metilación y acción de inhibidores, se demostró que los ARN de 28 S, 18 S y 4 S son de origen ribosomal (96), por lo que se asume que solamente los ARN de 31 y 22 S son virus específicos. Por estudios realizados por Leung y col. (63) se estableció que los Arenavirus tienen ARN de polaridad negativa debido a la ausencia de poli A en el extremo 3', la falta de "cap" y estructuras metiladas en el extremo 5' y la falta de actividad de ARN mensajero en un sistema in-vitro.

Las proteínas estructurales de los Arenavirus se estudiaron primero para los virus Pichinde (94) y LCM (83) (10) y posteriormente para Tamiami (37), Tacaribe (37) y Junín (66) (4) encontrándose una proteína mayor (N) asociada a nucleocápside responsable de la reactividad cruzada entre los miembros del complejo Tacaribe (11) y dos glicoproteínas ( $GP_1$  y  $GP_2$ ), además de una cuarta proteína (o bien varias proteínas menores) (61) de localización y funcionamiento desconocidos.

Las proyecciones superficiales de la membrana de los Arenavirus estarían involucradas en la neutralización de la infectividad (126) y estos antígenos son altamente tipo específicos (a pesar de haberse encontrado antígenos compartidos por los virus Junín y Tacaribe mediante neutralización cruzada (120). El antígeno mayor fijador de complemento se encuen-

tra en la ribonucleoproteína y es compartido por todos los miembros del complejo Tacaribe. Por inmunofluorescencia indirecta (127) pueden dividirse a los Arenavirus en dos grandes divisiones: virus del viejo mundo (LCM, Lassa y Mozambique) y los virus del nuevo mundo o Complejo Tacaribe (Tacaribe, Junín, Amaparí, Pichinde, Paraná, Tamiami, Latino y Machupo).

#### Persistencia de los Arenavirus in-vitro

Una característica común que presentan los miembros de la familia Arenaviridae es la facilidad con que establecen infecciones persistentes tanto in-vivo en su huésped natural como in-vitro.

Hasta el momento, en todas las infecciones crónicas de Arenavirus in-vitro que han sido estudiadas, el cultivo persistente no difiere en morfología ni fisiología de la célula normal, dado que presentan las mismas características de crecimiento y requerimientos nutritivos de las células no infectadas. Además son refractarias a la sobreinfección con virus homólogo.

Son varias las teorías que han sido propuestas para explicar la persistencia de los Arenavirus a nivel celular. El modelo más estudiado y que ha aportado la mayor información al respecto es la infección crónica con virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM).

### Persistencia del virus LCM

Son numerosos los grupos de investigadores que han tratado de dilucidar cuál es el o los mecanismos que interactúan en la persistencia del virus LCM en cultivos celulares (61). De los datos obtenidos por ellos surgen dos conceptos básicos: 1) la replicación viral es autorregulable y el proceso replicativo ocurriría sin destrucción celular y 2) las partículas defectivas interferentes (DI) que se producen durante la persistencia regularían la infección inhibiendo la replicación de las partículas infecciosas.

El concepto de autorregulación viral fue propuesto por Hotchin (50) quien sostiene que la infección transitoria de células L con virus LCM se debe a ciclos repetidos de infección celular. El virus cumple un ciclo replicativo normal sin producción de muerte celular solamente en algunas células del cultivo; luego, al cesar la síntesis de antígenos virales, las células aún serían resistentes a la sobreinfección. Finalmente, las células pierden toda evidencia del virus y se hacen susceptibles a la reinfección. Según este modelo, en cada célula se realiza un ciclo replicativo completo que finaliza con la pérdida del genoma viral. La persistencia se mantiene en la población celular por infecciones cíclicas repetidas.

Una segunda variante de la teoría de la autorregulación se-



ría que los cultivos persistentes liberan mutantes virales poco citolíticas con un bajo potencial replicativo que permitirían la supervivencia de la información genética viral por medio de un prolongado parasitismo de la célula. Estas mutantes han sido aisladas de células BHK y L persistentemente infectadas (62) (54) (51), producen placas turbias y tienen capacidad de interferir con la multiplicación del virus estándar.

El otro enfoque que se le ha dado a la persistencia del virus LCM es que el virus se perpetuaría en el cultivo por medio de la interferencia producida por las partículas DI en la producción de viriones infecciosos (62). Dado que las partículas DI se encuentran en abundancia en los sobrenadantes de líneas crónicamente infectadas con LCM (62) (125) es factible postular que dichas partículas juegan un papel importante en el mecanismo de regulación.

Los conceptos de autorregulación del ciclo replicativo viral y la interferencia producida por las partículas DI no tienen por qué ser mutuamente excluyentes y puede postularse un modelo de persistencia donde ambos mecanismos interactúen para permitir la supervivencia celular y la persistencia viral.

### Objetivos de esta Tesis

La persistencia de los Arenavirus en cultivos celulares es un fenómeno que presentan todos los miembros de la familia que no ha sido totalmente dilucidado.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo con el objeto de analizar cuál o cuáles son los factores que llevan a la persistencia del virus Tacaribe en cultivos de células Vero analizando las distintas propiedades que presenta el virus liberado por el cultivo persistente y las características que adquiere el cultivo en el cual el virus persiste.

La posibilidad de esclarecer el mecanismo íntimo de este tipo peculiar de interacción virus-célula huésped que permite un equilibrio entre la patogenicidad viral y la supervivencia celular, ampliaría el panorama del intrincado proceso de la persistencia de los Arenavirus in-vitro.

## M A T E R I A L E S   Y   M E T O D O S

### Virus

- a) Tacaribe: (TACV): Se empleó la cepa TRLV 11573 mantenida en el laboratorio por 11 pasajes en cerebro de ratón lactante. El título de los stocks utilizados fue del orden de  $10^8$  UFP/ml en células Vero.
- b) Junín: Se trabajó con la cepa atenuada denominada XJCl<sub>3</sub> (31) propagada en el laboratorio por 13 pasajes en cerebro de ratón lactante y con título de  $10^8$  UFP/ml en células Vero.
- c) Pichinde: Se empleó la cepa An-3739 crecida en cerebro de ratón lactante con un título de  $2 \times 10^7$  UFP/ml para células Vero.
- d) Virus de la estomatitis vesicular: (VSV): Se empleó la cepa Indiana. El stock se preparó en células Vero cosechando sobrenadante y células (Vero) a las 24 hs. p.i.. Su título fue de  $3 \times 10^8$  UFP/ml en células Vero.

### Cultivos celulares:

- a) Células Vero: Se utilizó una línea de células Vero (riñón de mono verde africano Cercopithecus aethiops) crecida en monocapa. Se la mantuvo por repiques semanales en medio MEM (medio mínimo esencial con sales de Earle y glutamina) suplementado con 10% de suero de ternera inactivado y 50 mg/ml de gentamicina. El medio de mantenimiento

utilizado fue MBE (medio basal de Eagle) con 3% de suero de ternera inactivado y antibióticos. Esta línea se utilizó para la titulación de los materiales en estudio y para la obtención de sublíneas persistentemente infectadas con virus Tacaribe. Se la empleó entre los pasajes 150 y 230.

- b) Células RK<sub>13</sub>: Se empleó la línea celular de riñón de conejo en monocapa, cedida gentilmente por la Dra. Betty Ayerra de Holstein del Instituto Nacional de Microbiología "Dr. Carlos A. Malbran". Las células se repicaron semanalmente en medio MEM adicionado con 7% de suero de ternera inactivado y antibióticos. El medio de mantenimiento utilizado fue el mismo que para las células Vero.

Sublíneas persistentemente infectadas con virus Tacaribe:

- a) Células VT: Se utilizaron 15 sublíneas de células Vero persistentemente infectadas con virus Tacaribe. Las condiciones de su establecimiento y las características de cada una de ellas se presentan en los resultados correspondientes.

Preparación de stocks de virus Tacaribe

- a) En cerebro de ratón lactante: (TACV-R): Se inocularon ratones albino suizos de 24-48 hs. de edad por vía i.c. con  $10^2$  UFP de virus Tacaribe. A los 7 días p.i. se sa-

crificaron los animales y se cosecharon los cerebros. Se preparó un homogenato al 10% (P/V) de cerebro de ratón en PBS isotónico (ph 7,4) conteniendo 10% de suero de ternera inactivado. El homogenato se centrifugó a 13.000 x g durante 1 hora a 4°C y el sobrenadante se fraccionó y se utilizó como fuente de virus (18). Se conservó a -70°C.

- b) En células Vero (TACV-C): Se infectaron células Vero con 0,2 ml de virus Tacaribe con una m.i. de 0,01 UFP/cél. El inóculo se dejó adsorber 1 hora a 37°C, se volcó y se agregó medio de mantenimiento. A los 4 días p.i. se cosechó el sobrenadante y se centrifugó a 1.500 rpm durante 15 min. para eliminar restos celulares. El sobrenadante se utilizó como fuente de virus y se conservó a -70°C. El título obtenido fue de aproximadamente  $10^6$  UFP/ml.

#### Clonado de virus Tacaribe en células Vero

Se infectaron monocapas de células Vero de 24 hs con 50 UPF de virus Tacaribe en botellas de 60 cm<sup>3</sup> de capacidad. El inóculo se dejó adsorber durante 2 hs a 37°C y luego se volcó, se lavó la monocapa celular con PBS y se cubrió con una mezcla de MEM 2x con 4% de suero fetal bovino inactivado y agar 2%. Se incubaron las células durante 6 días a 37°C invertidas. Al 6to. día p.i.

se agregó una mezcla de agar 1% y rojo neutro 1:1000. El colorante se dejó difundir 24 hs a 37°C y al 7mo. día p.i. se picaron aquellas placas nítidas y aisladas. El virus así recogido se amplificó en células Vero durante 4 días. Este procedimiento se repitió 3 veces y se obtuvieron 8 clones cuyos títulos oscilaron alrededor de  $10^5$  UFP/ml para células Vero.

#### Determinación de la infectividad

La infectividad de los distintos stocks de virus utilizados se determinó por observación del efecto citopático producido en células Vero ó RK<sub>13</sub> ; observando la muerte de ratones lactantes inoculados por vía i.c. o utilizando la técnica de formación de placas bajo agar en células Vero ó RK<sub>13</sub>.

##### a) Titulación por observación de la acción citopatogénica

(ACP): Se inocularon 0,2 ml de diluciones decimales seriadas de virus en cultivos celulares crecidos en tubos de ensayo a las 24-48 hs después de la siembra. El inóculo se dejó adsorber 1 hora a 37°C. Una vez finalizada la adsorción, se descartaron los inóculos y se agregó a cada tubo 1 ml de medio de mantenimiento que se renovó cada 3 ó 4 días. Se utilizaron 4 tubos por dilución. Los cultivos se observaron diariamente al microscopio óptico durante 10 días. Se registró la evolución e intensidad de la ACP. La dosis infectante 50% para

cultivo de tejido (DICT<sub>50</sub>) se calculó de acuerdo al método de Reed y Muench (98).

La ACP se tabuló arbitrariamente de +1 a +4 de acuerdo al siguiente criterio:

Grado +1: Aparición de focos de células redondeadas y oscuras en la monocapa. Pocas células en el sobrenadante.

Grado +2: Los focos involucran a todo el tejido celular con gran desprendimiento de células.

Grado +3: Todo el tejido está formado por células redondeadas y se observan grandes áreas de lisis. Muchas células en el sobrenadante.

Grado +4: Quedan pocas células adheridas a la superficie de vidrio. Estas células sobrevivientes a la infección son las que se multiplican y regeneran la monocapa celular dando origen a líneas persistentemente infectadas.

- b) Titulación en ratones lactantes: Se inocularon 0,02 ml de diluciones decimales seriadas de virus por vía i.c. en ratones de 24-48 hs. de edad. Se utilizaron lotes de 9 ratones por dilución. Se observó la aparición de sintomatología típica producida por el virus Tacaribe (excitación, lateralización de la marcha, parálisis del

tren posterior y muerte). Se tabuló el día y el porcentaje de muertes. La dosis letal 50% (DL<sub>50</sub>) se calculó de acuerdo al método de Reed y Muench (98).

- c) Titulación por el método de formación de placas bajo agar (UFP): Se utilizó el método de Damonte y Coto (22). Monocapas de células Vero o RK<sub>13</sub> se infectaron al 2do. día de sembradas con 0,2 ml de la dilución adecuada de la muestra a titular. Se dejó adsorber el inóculo durante 1 hora a 37°C con agitación periódica. Luego de la adsorción se retiró el inóculo, se lavó la monocapa con PBS y se cubrió con medio semisólido nutritivo. Las botellas se incubaron en forma invertida durante 7 días a 37°C en oscuridad. Al cabo de dicho tiempo, las células se fijaron con formol 10% durante 30 min., se extrajo el agar y las placas se revelaron con cristal violeta 1/1000 durante 15 min.. Se utilizaron dos botellas por dilución y los títulos se calcularon en base al número de placas, volumen del inóculo y dilución considerada.

El medio nutritivo utilizado para cubrir las células estuvo compuesto por medio MEM preparado al 2% con 4% de suero fetal bovino inactivado y 100 mg/ml de gentamicina. El pH se ajustó a 7,4 con bicarbonato de sodio 5%. Esta solución se mezcló en el momento de su uso con



volúmenes iguales de agar 2%.

Determinación de centros infecciosos:

La cantidad de centros infecciosos en los cultivos VT se midió de la siguiente manera. Monocapas de VT se tripsinaron, se resuspendieron en PBS y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 10 min.. Este procedimiento se repitió dos veces a fin de eliminar toda la tripsina. Finalmente las células se resuspendieron en medio nutritivo y se contaron las células viables en cámara de Newbauer. Se infectaron monocapas de células Vero con 0,2 ml de diluciones decimales de dicha suspensión celular. Se incubaron 2 horas a 37°C y luego se agregó cuidadosamente medio semisólido nutritivo. A los 7 días se revelaron los cultivos realizados por duplicado y se contaron las placas como en una titulación habitual. Se determinó el número de células formadoras de placas basándonos en el hecho que cada placa era producida por una célula infectada productora de virus. El porcentaje de centros infecciosos se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ CI} = \frac{\bar{n}}{N} \times 100 \quad \text{donde } \bar{n}: \text{ número promedio de placas}$$

N: número total de células sembradas

Ensayo de interferencia viral

Células Vero sembradas en botellas de 90 cm<sup>3</sup> de capacidad fueron inoculadas a las 24-48 hs después de la siembra con 0,4 ml del material concentrado cuya actividad interferente se que-

ría determinar. Se incubaron 1 hora a 37°C con agitación periódica. Al cabo de ese tiempo se descartaron los inóculos y las monocapas se lavaron con PBS. Los cultivos se desafiaron con 100 UFP de TACV. Como control se desafiaron células Vero sin tratar con el material interferente con la misma dosis de TACV. Se reincubaron los cultivos a 37°C por una hora adicional, se volcaron los inóculos y se lavaron las monocapas con PBS. Se cubrieron con 8 ml de medio de mantenimiento y se incubaron a 37°C. A las 20 horas p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se congelaron a -70°C hasta su titulación por el método de unidades formadoras de placas (UFP). La actividad interferente se calculó como el porcentaje de la relación del título inhibido respecto del control, es decir:

$$\% AI = \frac{E - I}{E} \times 100$$

donde I= título de TACV a las 20 horas p.i. en la infección mixta.

E= título de TACV a las 20 horas p.i. en el cultivo control.

#### Técnica de inmunofluorescencia

Se investigó la presencia de antígenos virales en cultivos de la línea VT mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Las células se sembraron en tubos de Leyton y a las 48

horas se procesaron para detectar antígeno viral citoplasmático y de membrana.

- a) Antígeno citoplasmático: Se utilizó la técnica de Larghi (60) modificada. Los cubreobjetos con las monocapas celulares se retiraron de los tubos y se lavaron dos veces con solución salina tamponada (SST) pH 7,2. Las células se fijaron en acetona fría durante 5 min. a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se realizaron 2 lavados con SST y se cubrieron con inmunosuero específico antiviral Tacaribe (STa 29) diluido 1/100 en SST. Los cubreobjetos se incubaron en cámara húmeda a  $37^{\circ}\text{C}$  para permitir la unión antígeno-anticuerpo. Luego de lavarlos 2 veces con SST, se trataron 30 min. a  $37^{\circ}\text{C}$  con antiglobulina de cobayo preparada en cabra conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Gibco, NY, USA) diluido 1/20 en SST y que contenía una solución de azul de Evans al 1%. Los cultivos así procesados se lavaron 2 veces con SST y una vez con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. Se montaron en una gota de glicerina tamponada pH 8,5 sobre un portaobjeto. La observación se realizó con un microscopio Zeiss con equipo de epiiluminación para fluorescencia.
- b) Antígeno de membrana: La reacción antígeno-anticuerpo se llevó a cabo sin fijar las células previamente. Para ello

se lavaron los cultivos de células VT con SST y los cubreobjetos se colocaron en cámara húmeda cubriéndolos con la dilución adecuada de suero inmune STa 29 (dil 1/100 en SST). Luego de 30 min. a 37°C se repitieron los lavados con SST y las células se fijaron con formol 10%. La reacción con la inmunoglobulina conjugada con el fluorocromo se realizó tal cual se describiera para antígeno citoplasmático.

En ambos casos (antígeno de membrana y citoplasmático) se utilizaron como control de células Vero sin infectar e infectadas con TACV a una m.i. de 1 UFP/cél a las 24 horas p.i.. El porcentaje de células fluorescentes se determinó mediante el recuento de 500 células por preparado.

#### Inactivación térmica

Para determinar la termolabilidad de los distintos stocks de virus, se prepararon diluciones al décimo de los mismos en PBS y se fraccionaron en volúmenes de 1 ml en tubos de hemólisis. Estos se calentaron a 50°C en baño de agua termostaticado durante diversos tiempos. Luego de enfriarlas en baño de hielo, las muestras se inocularon en células Vero para ser tituladas por UFP. La actividad infecciosa remanente de cada muestra luego del tratamiento por calor se calculó en función de los cocientes del

título de cada muestra calentada y el título del control que se mantuvo 60 min. en hielo. Se graficó el logaritmo de dicha actividad remanente en función del tiempo de calentado. El tiempo de vida media de las distintas muestras a 50°C se consideró como el tiempo necesario para que la infectividad residual fuera la mitad de la infectividad inicial (tiempo 0), o sea el tiempo para que:

$$V_t = \frac{1}{2} V_0 \quad \text{donde } V_t = \text{infectividad residual al tiempo } t.$$

$$V_0 = \text{infectividad al tiempo } 0.$$

#### Obtención del inmunosuero antiTacaribe

Se inocularon 7 cobayos machos con  $3 \times 10^6$  UFP de TACV. El esquema de inoculación fue el siguiente:

Día 0: 0,2 ml conteniendo  $10^6$  UFP por vía i.m.

Día 7: 0,2 ml conteniendo  $10^6$  UFP por vía i.m.

Día 14: 0,2 ml conteniendo  $10^6$  UFP por vía i.m.

Día 29: sangrado por punción cardíaca.

Día 35: sangrado a blanco.

La sangre obtenida se dejó coagular 1 hora a 37°C y luego se colocó a 4°C durante 20 horas para permitir la retracción del coágulo. Se centrifugó durante 20 min. a 1.500 rpm. El suero se fraccionó en alícuotas de 0,5 ml y se conservó a -20°C. Los sueros obtenidos a los 29 y 35 días se denominaron ST-29 y ST-35

respectivamente.

#### Adsorción de los inmunosueros

Los inmunosueros ST-29 y ST-35 se adsorbieron con células Vero para eliminar los anticuerpos que pudiesen interferir en la reacción de inmunofluorescencia. Para ello se tripsinaron  $8,1 \times 10^7$  células Vero y se suspendieron en medio de mantenimiento. Se centrifugaron a 1.800 rpm durante 15 min. y el sedimento celular se resuspendió en 10 ml de suero ST-29 ó ST-35. La suspensión celular se agitó manualmente durante 20 min. a 37°C y se centrifugó a 2.500 rpm durante 1 hora. El sobrenadante se fraccionó en alícuotas de 0,5 ml y se almacenó a -20°C denominándose STa29 y STa35 a los sueros obtenidos a los 29 y 35 días respectivamente.

#### Titulación de los inmunosueros

Los sueros STa29 y STa35 se inactivaron 30 min. a 56°C para descomplementarlos y se realizaron diluciones seriadas al 1/2 en medio de mantenimiento. Se mezclaron volúmenes iguales de las diluciones de los inmunosueros con una suspensión de TACV que contenía 100 UFP. Estas mezclas se incubaron a 37°C durante 30 min.. Simultáneamente, se incubaron muestras controles de 100 UFP de TACV con suero de cobayo normal. Se inocularon monocapas de células Vero con 0,2 ml de las muestras y de los controles. Se utilizaron 2 botellas por dilución y la infec-

tividad residual se tituló por el método de UFP. El título de los inmunosueros se calculó como la inversa de la mayor dilución de suero con capacidad de neutralizar el 80% de las placas del control. Los títulos obtenidos fueron:

STa29: 320

STa35: 640

#### Ensayo de neutralización viral

Se trabajó con el suero inmune STa 35 inactivado 30 min. a 56°C. Se mezclaron volúmenes iguales de STa 35 diluido 1/10 en medio nutritivo y diluciones decimales crecientes de la muestra de virus a ensayar. Estas mezclas y controles hechos con virus y suero normal de cobayo se incubaron a 30 min. a 37°C. Luego se tituló la infectividad residual por el método de placas bajo agar. El índice de neutralización se calculó como:

$$IN = \frac{\text{Título de la serie control}}{\text{Título de la serie con inmunosuero}}$$

y se consideraron positivos aquellos índices cuyos logaritmos fuesen mayores o iguales a 0,7.

#### Pasajes concentrados (a alta multiplicidad) de virus Tacaribe en cultivo de células

Obtención: Se inocularon células Vero de 24 horas con TACV a una m.i. de 1 UFP/cél durante 1 hora a 37°C. Se descartó el virus no adsorbido, se lavaron las células con PBS y se cubrieron con medio de mantenimiento reincubándose a 37°C. Al 4to.

día p.i. se cosechó el sobrenadante, se centrifugó a 1.500 rpm y se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Este material se denominó  $\text{PC}_1$  (pasaje concentrado N° 1) y fue el primer stock preparado en cultivo de tejidos. Para obtener  $\text{PC}_2$  se infectaron células Vero con 0,5 ml de  $\text{PC}_1$  sin diluír procediendo exactamente como en el caso anterior y así sucesivamente hasta obtener  $\text{PC}_5$ .

Irradiación con luz ultravioleta: Los pasajes concentrados se diluyeron al medio en PBS y se colocaron en cajas de Petri. Se irradiaron con una lámpara germicida de 15 Watts marca Phillips en cámara oscura a 10 cm de la fuente de energía durante 5 min. con agitación continua. Una vez finalizado el tratamiento, los stocks irradiados y sus controles que se mantuvieron 5 min. a temperatura ambiente se procesaron para determinar infectividad residual por UFP y capacidad interferente.

Animales:

- a) Ratones: Se utilizaron ratones albino suizos cepa  $\text{OF}_1$  Iffa Credo Lyon, Francia de 24-48 horas de edad mantenidos en el bioterio de la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. Se inocularon por vía intracerebral (i.c.) con 0,02 ml de la suspensión viral a titular.
- b) Cobayos: Se utilizaron cobayos machos de la cepa Harley de 450 a 500 g. de peso. Se inocularon por vía intramuscular (i.m.) con 0,2 ml de la suspensión viral.



## R E S U L T A D O S

### PRIMERA PARTE

#### Estudio de una línea celular persistentemente infectada con virus Tacaribe

##### I) Establecimiento y caracterización

###### 1) Iniciación

La línea celular persistentemente infectada con TACV se inició infectando un cultivo de células Vero de 48 horas con virus proveniente de cerebro de ratón lactante a una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,3. El cultivo se incubó a 37°C y se observó diariamente al microscopio óptico.

Al tercer día postinfección (p.i.) se observó el inicio de la citopática típica (ACP) producida por el virus Tacaribe con la aparición de focos aislados de células redondeadas altamente refringentes; este estado se consideró arbitrariamente como Grado +1. Estos focos aislados fueron aumentando de tamaño y número hasta involucrar a todo el tejido, que se vió acompañado de gran cantidad de células en el sobrenadante (Grado +2). Posteriormente aparecieron grandes áreas de lisis (Grado +3) que evolucionaron hasta la destrucción del 90-95% de las células al 6to. día p.i. (Grado +4).

Desde ese momento hasta el día 11 p.i., se realizaron cambios periódicos de medio nutritivo para favorecer la multiplicación

de las células que sobrevivieron a la infección. Estas fueron las responsables de recomponer completamente la monocapa celular (Figura 1).

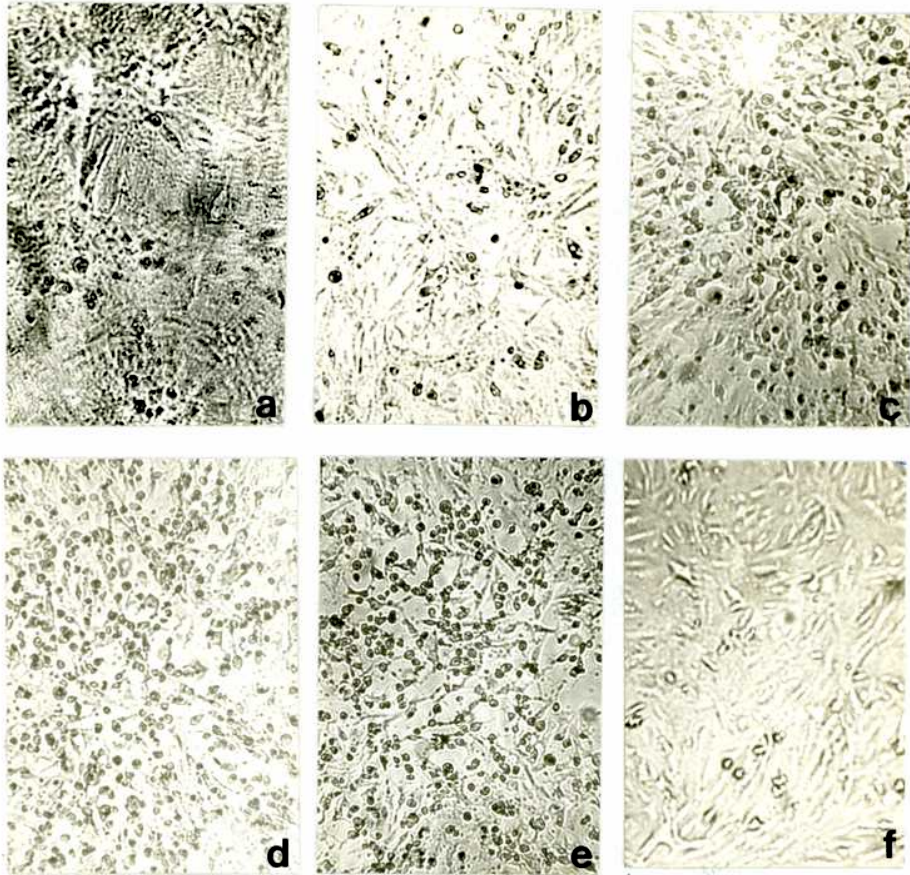
A los 12 días p.i., el cultivo se repicó siendo denominado VT<sub>8</sub>P<sub>1</sub> (células Vero línea 8 recuperadas de la infección con virus Tacaribe, pasaje 1). Este cultivo era morfológicamente similar a las células Vero normales, con igual tiempo de duplicación celular y los mismos requerimientos nutricionales. Cabe destacar que el cultivo VT<sub>8</sub> difería solamente de un cultivo normal porque acidificaba más lentamente al medio extracelular y por lo tanto era posible mantenerlo durante tiempos más prolongados sin cambio de medio.

Las células persistentemente infectadas se mantuvieron in-vitro a 37°C con repiques cada 5 días. Durante los 200 días que sobrevivió la línea VT<sub>8</sub> no pudo observarse ningún ciclo de ACP a diferencia de lo que ocurre en los cultivos estacionarios persistentemente infectados con el arnavirus Junín (6).

## 2) Producción de virus por el cultivo infectado

Las infecciones persistentes con virus de la familia Arenaviridae pueden caracterizarse por la liberación de virus en forma cíclica (23) (30) (62) (105) (106) o por la falta de infectividad en el medio extracelular (5) que sólo puede detectarse por inoculación en ratón lactante (43).

Figura 1: Evolución de la acción citopatógena producida por el virus Tacaribe en células Vero.



a. Células Vero de 48 hs.; b. Células Vero de 48 hs infectadas con virus Tacaribe (m.i.=0,3), ACP +1 a las 96 hs p.i.; c. ACP +2 a las 120 hs p.i.; d. ACP +3 a las 144 hs p.i.; e. ACP +4 a las 168 hs p.i.; f. células recuperadas de la infección a los 10 días p.i. Barra 100  $\mu$ m.

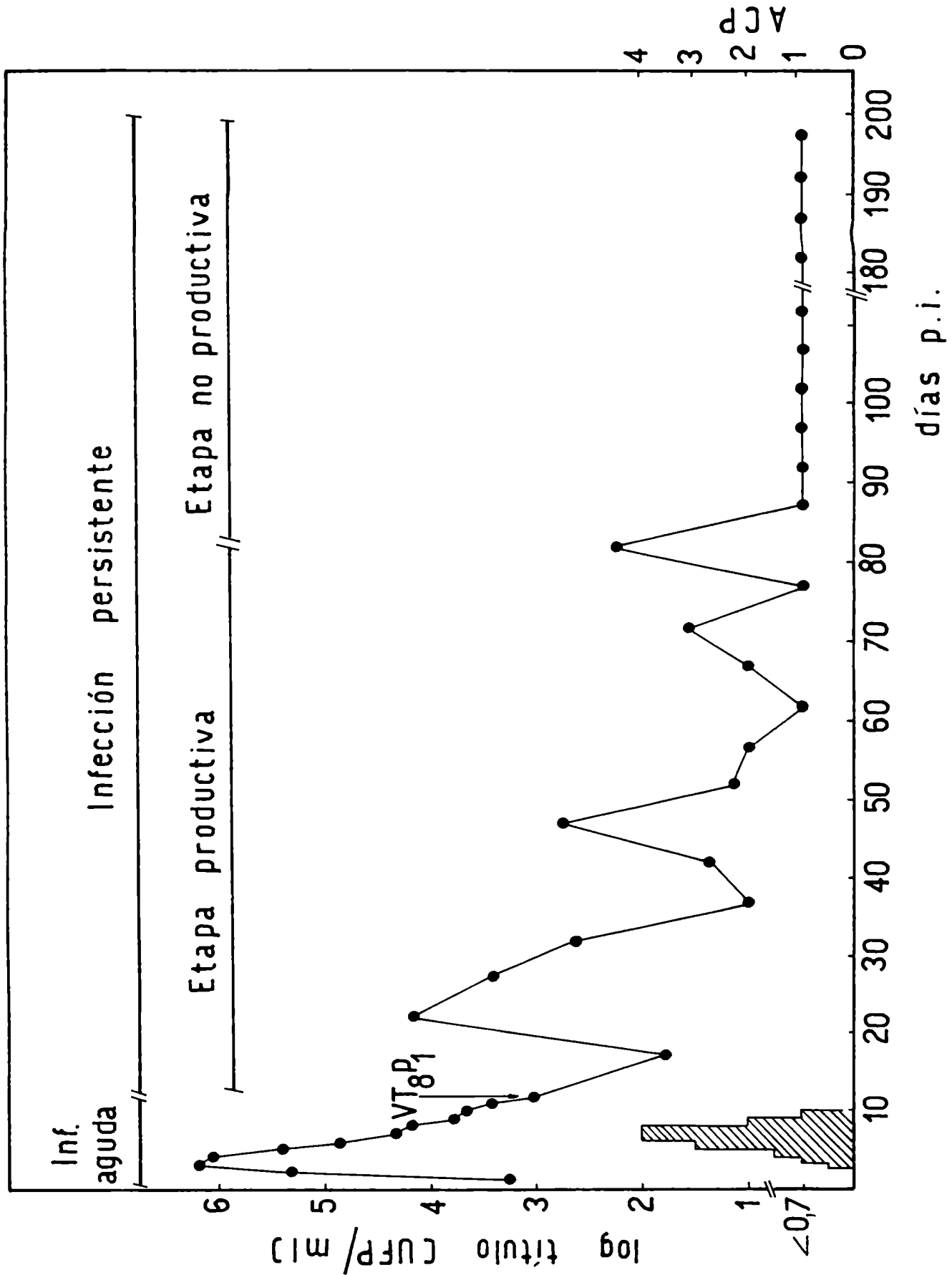
A fin de estudiar la producción de virus por las células VT<sub>8</sub> se cosechó el sobrenadante de las mismas a distintos tiempos p.i. y se titularon por UFP. En la figura 2 se presenta la producción de virus liberado por las células infectadas.

Puede observarse que durante la infección aguda (considerada hasta el día 12 p.i.) hubo una gran liberación de virus alcanzándose un título máximo de aproximadamente  $10^6$  UFP/ml al 3er día p.i. coincidentemente con la aparición de la acción citopática. El título de virus extracelular fue declinando a medida que aumentaba la intensidad de la ACP, que se hizo máxima a los 6 días p.i. (Grado +4).

Desde ese momento hasta el día 12, la producción viral, aunque continúa, fue disminuyendo durante todo el período de recuperación celular.

A los 12 días p.i. el cultivo se repicó dando origen a la línea VT<sub>8</sub>. Como se observa en la Figura 2, la producción de virus por la línea persistentemente ocurrió en forma cíclica en una primera Etapa Productiva que abarca aproximadamente 15 subcultivos. Durante este período, la línea liberó virus en menor cantidad que en la infección aguda (título máximo alcanzado  $1,5 \times 10^4$  UFP/ml en el pasaje 3) y con una marcada tendencia a liberar menos partículas infecciosas a medida que aumentaba el número de pasajes. Luego, la línea evolucionó a un Etapa no Pro-

Figura 2: Liberación de partículas infecciosas por células Vero infectadas con virus Tacaribe.



ductiva donde no hubo liberación de virus infectivo detectable.

El cultivo VT<sub>8</sub> fue similar morfológicamente como en requerimientos nutritivos tanto en la Etapa Productiva como en la no Productiva; asimismo, el cultivo no podía diferenciarse de las células Vero por observación directa al microscopio óptico.

3) Resistencia del cultivo persistente a la sobreinfección con virus homólogo

Una propiedad considerada indicadora del establecimiento de la persistencia con virus Tacaribe (21) y otros miembros de la familia Arenaviridae (8) (62) (106) es la resistencia de los cultivos persistentes a la sobreinfección con el virus que les dio origen.

Se pudo demostrar que esta característica la presentaba la línea VT<sub>8</sub>; para ello, cultivos de células VT<sub>8</sub> en los pasajes 12 y 20 fueron infectados con TACV a una m.i. de 1. Paralelamente se infectó un cultivo de células Vero con igual multiplicidad. A las 48 hs. p.i., los sobrenadantes de dichos cultivos se cosecharon y se titularon en forma simultánea por UFP. La eficiencia de plaqueo de TACV en células VT<sub>8</sub>, considerada como el cociente entre el título viral obtenido en las células VT<sub>8</sub> y el título obtenido en las células Vero, fue de  $1,6 \times 10^{-6}$  y  $7,0 \times 10^{-7}$  en los pasajes 12 y 20 respectivamente. Estos datos indicaron la resistencia de la línea VT<sub>8</sub> a la sobreinfección con virus homó-

logo y por lo tanto se tomaron como índice de su carácter de línea crónica.

#### 4) Detección de células infectadas

Con el objeto de determinar la proporción de células de la línea VT<sub>8</sub> capaces de sintetizar antígenos específicos del virus Tacaribe, se realizaron ensayos por inmunofluorescencia. Para ello, células VT<sub>8</sub> en el pasaje 8 y en el pasaje 19 se sembraron en tubos Leyton. A las 48 hs se procesaron las células para detectar antígeno viral citoplasmático y de membrana como se explicó en Materiales y Métodos.

Sobre un total de 500 células analizadas por cultivo, aproximadamente un 10% presentó fluorescencia positiva, siendo la misma exclusivamente citoplasmática, no detectándose fluorescencia en el núcleo (Figura 3). Las células positivas se encontraban aisladas en el cultivo y no como focos o áreas fluorescentes. Llamativamente se encontró la misma proporción (10%) de células fluorescentes en el cultivo que se encontraba en la Etapa no Productiva (VT<sub>8</sub>P<sub>19</sub>) como en la Etapa productiva (VT<sub>8</sub>P<sub>8</sub>).

Asimismo, entre el 8 y el 10% de las células de los cultivos en ambas etapas presentaron fluorescencia de membrana citoplasmática (Figura 4).

La presencia de antígenos virales daría idea de que las células que fluorescen son también productoras de virus pero sin

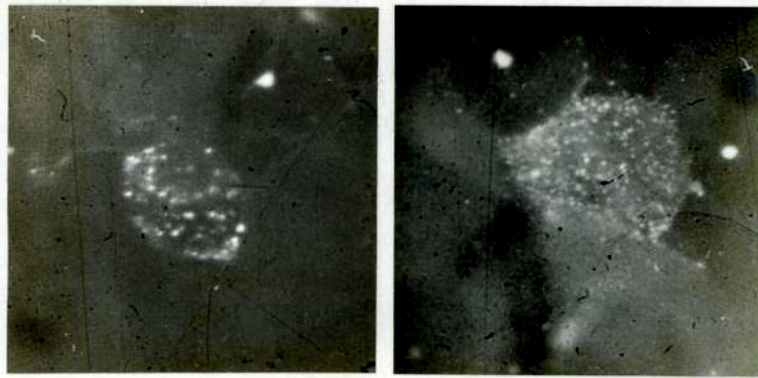
Figura 3: Fluorescencia citoplasmática del cultivo persistente-  
mente infectado (VT<sub>8</sub>).



25 μm



Figura 4 : Fluorescencia de membrana del cultivo persistente-  
mente infectado (VT<sub>8</sub>).



50 μm

embargo, sólo pueden detectarse partículas infecciosas en el sobrenadante del pasaje 8 y no en el pasaje 9.

##### 5) Detección de células productoras

La baja liberación de virus infectivo al medio extracelular en conjunto con la pequeña proporción de células portadoras de antígenos virales, planteó el problema de determinar la cantidad de células que estaban efectivamente liberando virus al medio. Cabía la posibilidad que todas las células que sintetizaban antígeno (10% del total) liberaran pequeñas cantidades de viriones o que una proporción de ellas liberara cantidades mayores.

El porcentaje de centros infecciosos en cultivos de células VT<sub>8</sub> se determinó plaqueando una suspensión de las mismas sobre monocapas de células RK<sub>13</sub> y Vero, siguiendo el procedimiento explicado en Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.

Puede observarse que la proporción de células productoras de virus fue muy baja en los ensayos realizados tanto en células Vero como en RK<sub>13</sub>, indicando que solamente entre un 0,01 y 0,0001% del total de células del cultivo VT<sub>8</sub> eran las responsables de la producción de virus extracelular. Si consideramos que sólo el 10% de las células persistentes era capaz de sintetizar antígenos virales (detectadas por inmunofluorescencia) por lo tanto los porcentajes de centros infecciosos deberían correlacionarse

Tabla 3:

Centros infecciosos producidos por las células VT<sub>8</sub> en cultivos de Vero  
y RK<sub>13</sub>

Número de pasaje	Título extracelular (UFP/ml)	N° de células sembradas	UFP*		% CI #
			Vero	RK <sub>13</sub>	
10	$1,0 \times 10^1$	$7,0 \times 10^5$	NH <sup>&amp;</sup>	32	$4,57 \times 10^{-3}$
11	<5	$7,2 \times 10^5$	NH	4	$5,55 \times 10^{-4}$
12	$1,0 \times 10^1$	$1,8 \times 10^5$	NH	20	$1,10 \times 10^{-2}$
13	$3,5 \times 10^1$	$3,2 \times 10^5$	26	NH	$8,12 \times 10^{-3}$
17	<5	$7,0 \times 10^5$	<5	NH	$7,14 \times 10^{-4}$

\* UFP: se consigna el promedio de tres determinaciones

& NH: no hecho

# %CI: se calculó como cociente entre el número de placas obtenidas y el número de células sembradas.

con esa pequeña proporción de células infectadas; es decir, que del 10% de las células con fluorescencia positiva, sólo entre un 0,1 a 0,001% de las mismas produjeron viriones infectivos.

Considerando estos valores en números absolutos, resulta que, de 100.000 células VT<sub>8</sub>, 10.000 sintetizan antígenos virales y menos de 10 células son capaces de liberar viriones infecciosos. Estos resultados corresponden a aquellas células que se encuentran en la Etapa Productiva de la persistencia, siendo los valores de centros infecciosos encontrados para la Etapa no Productiva mucho menores, aunque, hay que destacar, que en esta etapa también se encontró un 10% de células que sintetizaban antígenos virales.

Aún así, todos los valores hallados fueron marcadamente inferiores a los de la infección aguda, donde el porcentaje de centros infecciosos oscila en un 3% (19). Este hecho paradójico será discutido más adelante.

#### 6) Rescate de virus de la línea VT<sub>8</sub> por el agregado de células sensibles

Uno de los métodos comúnmente utilizados para rescatar virus presente en una infección crónica, es el cocultivo de las células infectadas con células sensibles al virus que originó la infección persistente (58), ya que éste método provee de un sustrato celular para que el posible virus extracelular pueda multiplicar.

En nuestro caso resultaba de interés conocer si la falla en detectar virus en etapas no productivas se debía a la carencia de células sensibles, teniendo en cuenta que, los experimentos de resistencia a la sobreinfección indican o sugieren que este podría ser el caso con la línea VT<sub>8</sub>.

Por esa razón, se realizaron cocultivos en una etapa productiva y una no productiva con el objeto de comparar la eficiencia en el rescate de virus.

Los cocultivos se realizaron sembrando 10<sup>6</sup> células VT<sub>8</sub> en los pasajes 15 y 19 conjuntamente con 10<sup>6</sup> células RK<sub>13</sub> que se incubaron a 37°C. A distintos tiempos luego de sembradas las mezclas, se cosechó el sobrenadante y se determinó su infectividad por UFP en células RK<sub>13</sub>. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Los resultados mostraron que las células en el pasaje 15 liberaban progresivamente menos virus al medio a medida que transcurría el tiempo post-siembra. Así, a las 24 hs post-siembra, la línea VT<sub>8</sub> liberaba 3,39 x 10<sup>3</sup> UFP/ml mientras que a las 72 hs. solamente se detectaron 8,91 x 10<sup>1</sup> UFP/ml. Este resultado es interesante ya que parecería que la producción viral se exacerbaba por el pasaje de las células y luego, el virus liberado al no encontrar células susceptibles no puede multiplicar. La adición de células sensibles alteró el patrón de liberación de viriones al medio extracelular por las células VT<sub>8</sub> solamente cuando estas

Tabla 4:

Influencia del cocultivo con células RK<sub>13</sub> en la producción de virus por la línea VT<sub>8</sub>

Células	logaritmo del título (UFP/ml)		
	24 hs	48 hs	72 hs
VT <sub>8</sub> P <sub>15</sub>	3,53	2,50	1,95
VT <sub>8</sub> P <sub>15</sub> + RK <sub>13</sub>	2,75	3,64	3,30
VT <sub>8</sub> P <sub>19</sub>	< 0,70	< 0,70	< 0,70
VT <sub>8</sub> P <sub>19</sub> + RK <sub>13</sub>	< 0,70	< 0,70	< 0,70

se encontraban en la etapa Productiva de su evolución (pasaje 15) ya que a las 72 hs el cocultivo liberó  $2,0 \times 10^3$  UFP/ml frente a  $5,62 \times 10^2$  UFP/ml a las 24 hs post-siembra, dando idea que la pérdida del título en los sobrenadantes de la línea VT<sub>8</sub> en función del tiempo post-siembra se debe a la falta de células susceptibles en el cultivo crónico.

Las células VT<sub>8</sub>p<sub>19</sub> (etapa no productiva) no liberaron virus durante las 72 hs posteriores a la siembra y permanecieron en ese estado aún cuando fueron cocultivadas.

Se consideró entonces la posibilidad que en la etapa no productiva el virus liberado no se detectase porque hubiese adquirido un carácter termosensible que no le permitiera multiplicar a 37°C pero si a 33°C.

Si esta era la razón, realizando el cocultivo a 33 y a 40°C simultáneamente se podrían detectar diferencias en los títulos de virus rescatados o lograr detectar virus en la etapa no productiva. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.

Los resultados muestran nuevamente que la liberación de virus disminuye en función del tiempo que transcurre después de la siembra. El cocultivo actúa como amplificador pero no rescata virus. Así, por ejemplo, a 33°C, el pasaje 15 a las 96 hs p.i. no libera virus ni se recupera por cocultivo. Además, se evidencia el carácter ts de virus liberado por VT<sub>8</sub> puesto que a 40°C

Tabla 5:

Producción de virus por la línea VT<sub>8</sub> por cocultivo con células RK<sub>13</sub> a distintas temperaturas.

N°	siembra	Logaritmo del título (UFP/ml)			
		33°C		40°C	
		control	cocultivo	control	cocultivo
15	24	3,48	2,71	2,84	1,24
	48	2,48	2,88	< 0,70	1,54
	72	2,06	2,88	< 0,70	1,76
	96	< 0,70	< 0,70	< 0,70	< 0,70
19	24	< 0,70	< 0,70	< 0,70	< 0,70
	48	1,35	< 0,70	< 0,70	< 0,70
	72	< 0,70	< 0,70	< 0,70	< 0,70
	96	< 0,70	< 0,70	< 0,70	< 0,70



ya no se detecta virus a las 48 hs post-siembra y el cocultivo eleva ligeramente los títulos aunque sólo se logran rescatar 7 y 12 UFP a las 48 y 72 hs postrepique respectivamente.

Las células que se encontraban en la Etapa no Productiva ( $VT_8P_{19}$ ) no liberaron virus aún cuando fueron incubadas a 33 y 40°C y no logra evidenciarse virus infectivo con el agregado de células sensibles. Cabe señalar que durante esta etapa, tampoco hubo liberación de viriones por la línea  $VT_8$  cuando los cocultivos se realizaron con células Vero y las mezclas se incubaron tanto a 33 como a 39°C.

II) Resistencia de la línea persistentemente infectada a la sobreinfección homotípica, heterotípica y heteróloga

La resistencia absoluta a la sobreinfección de las células  $VT_8$  con virus Tacaribe (homotípico) demostrada aquí, en concordancia con los datos obtenidos por otros autores trabajando con líneas persistentemente infectadas con Arenavirus (23), llevó a analizar más profundamente la inmunidad que presentaba  $VT_8$ .

Los ensayos de resistencia a la sobreinfección de las células  $VT_8$  (Parte I.3.) se realizaron cosechando los sobrenadantes de las mismas y de las células Vero normales a las 48 hs posteriores al desafío con virus Tacaribe. Mediante esta metodología no se podía demostrar si la multiplicación de TACV en células  $VT_8$  esta-

ba totalmente inhibida o si en ellas solamente ocurría un retraso en la replicación del mismo. Con el objeto de analizar si las células  $VT_8$  eran no permisivas o semipermisivas para la replicación del virus homotípico, se realizó una curva de crecimiento de TACV en células  $VT_8$  y en células Vero en forma comparativa.

Para ello, se infectaron células  $VT_{8P_{22}}$  y células Vero con TACV a una m.i. de 1. Se cosecharon los sobrenadantes de ambos cultivos para determinar el título de virus extracelular y las células se tripsinaron, congelaron y descongelaron 3 veces para detectar virus asociado a células.

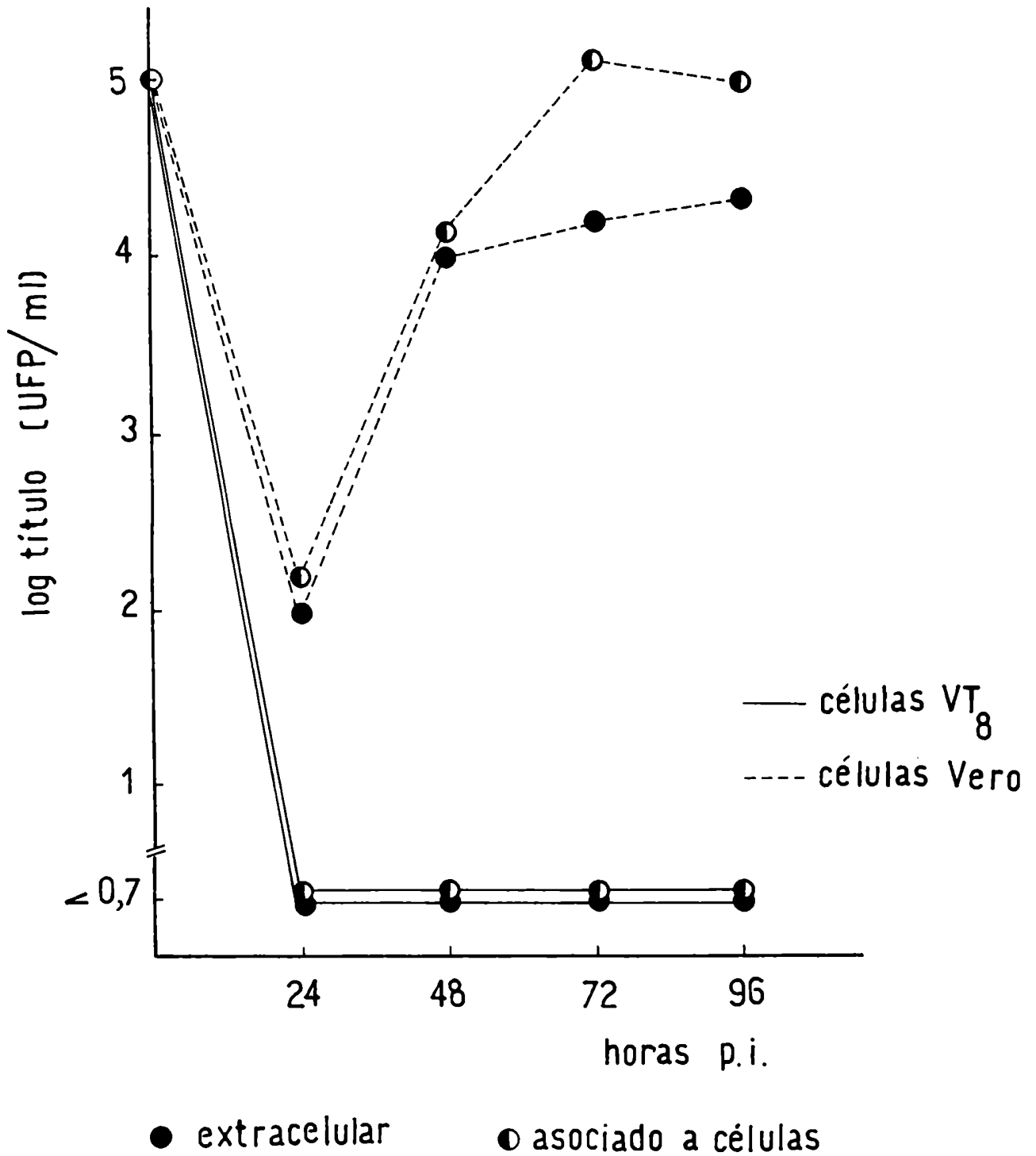
Los datos obtenidos se presentan en la Figura 5.

Como puede observarse, las curvas de crecimiento del virus Tacaribe en células normales siguieron los patrones esperados (21) mientras que la célula  $VT_8$  resultaron totalmente refractarias y no permisivas para el mismo, ya que no pudo detectarse actividad infectiva tanto en el extra como en el intracelular durante las 96 hs que duró el experimento. De esta forma se acentuaba más la idea de que la falta de células susceptibles es la que agota el cultivo.

En base a los resultados obtenidos (Figura 5), se consideró la posibilidad que el virus sobreinfectante no se adsorbiera a las células persistentes.

Para ello se infectaron células  $VT_8$  en el pasaje 23 y célu-

Figura 5: Multiplicación del virus Tacaribe en células Vero y VT<sub>8</sub>.



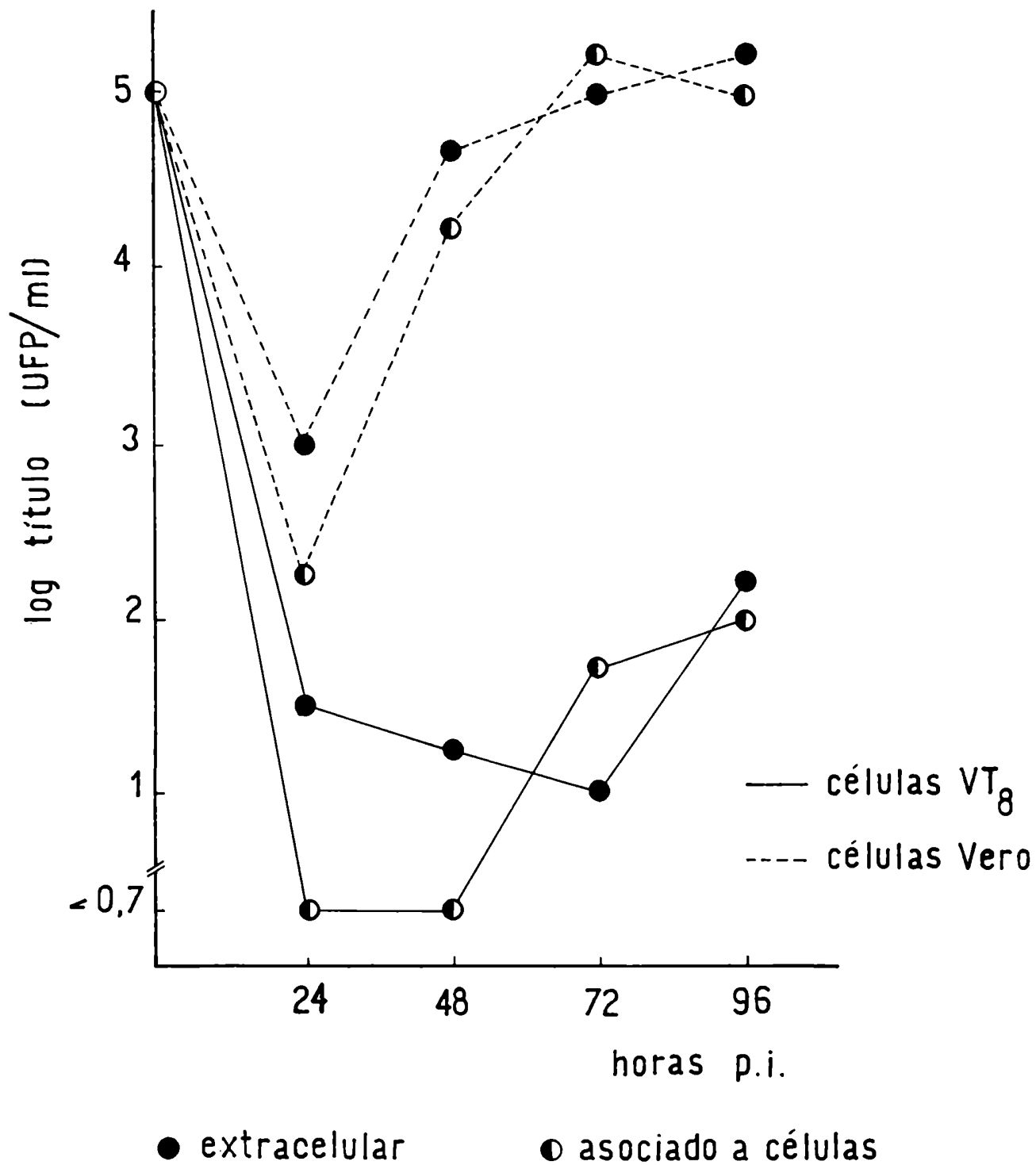
las Vero con la misma multiplicidad de infección (m.i.=3) de TACV. Luego de una hora a 37°C se retiró el inóculo de ambos cultivos y se titularon por UFP en células Vero. Los valores obtenidos no se diferenciaron entre sí ya que se encontró un título de  $1,6 \times 10^6$  UFP/ml para las células VT<sub>8</sub> y de  $1,2 \times 10^6$  UFP/ml para las células Vero. Estos resultados indican que la falta o el bloqueo de los receptores virales de la membrana celular no sería responsable de la resistencia específica y que la inhibición de la multiplicación de TACV estaría en un paso posterior a la adsorción viral.

Con el objeto de determinar si la resistencia observada a la reinfección con virus homólogo se extendía también a otros virus del complejo Tacaribe, se realizaron curvas de crecimiento de los virus Junín y Pichinde en células VT<sub>8</sub>.

Se infectaron células VT<sub>8</sub>p<sub>21</sub> con virus Junín cepa XJCl<sub>3</sub> a una m.i. de 1. Simultáneamente se infectaron células Vero a la misma m.i.. A distintos tiempos p.i. se cosecharon los sobrenadantes (virus extracelular) y se procesaron las células para titular virus asociado a ellas.

Como se observa en la Figura 6, los máximos títulos de virus Junín (intra y extracelular) en células Vero se alcanzaron a las 72 hs p.i.. En las células VT<sub>8</sub> el período "lag" del virus se prorrogó hasta las 48 hs, pero luego se observó el comienzo de

Figura 6: Multiplicación del virus Junín cepa XJCl<sub>3</sub> en células Vero y VT<sub>8</sub>.



la replicación alcanzándose un título máximo a las 96 hs p.i. que fue de 3 unidades logarítmicas menos comparado con el control. Por lo tanto, las células  $VT_8$  serían semipermissivas para el virus Junín.

El mismo ensayo de multiplicación viral se llevó a cabo infectando células  $VT_8P_{21}$  con virus Pichinde.

La replicación de Pichinde (Figura 7), analizando la liberación espontánea de viriones al medio extracelular, estuvo disminuída aunque no anulada. El virus asociado a células alcanzó valores semejantes tanto en células  $VT_8$  como en Vero, aunque los viriones no se liberaron de las células  $VT_8$  con la misma eficiencia que en la Vero, donde al cabo de 72 hs se alcanzaron títulos superiores en casi 2 a 3 unidades logarítmicas. Esta diferencia disminuyó a las 96 hs p.i.

Con el fin de analizar si la resistencia de las células  $VT_8$  era específica de familia solamente, se realizó una curva de crecimiento de virus VSV (familia Rhabdoviridae) como ejemplo de un virus heterólogo.

Para ello se infectaron células  $VT_8P_{21}$  y células Vero con un m.i. de 1 de virus VSV.

Las características de multiplicación del virus VSV en ambos cultivos celulares ( $VT_8$  y Vero) se presentan en la Figura 8. Puede observarse que el virus sobreinfectante multiplica en for-

Figura 7: Multiplicación del virus Pichinde en células Vero y VT<sub>8</sub>.

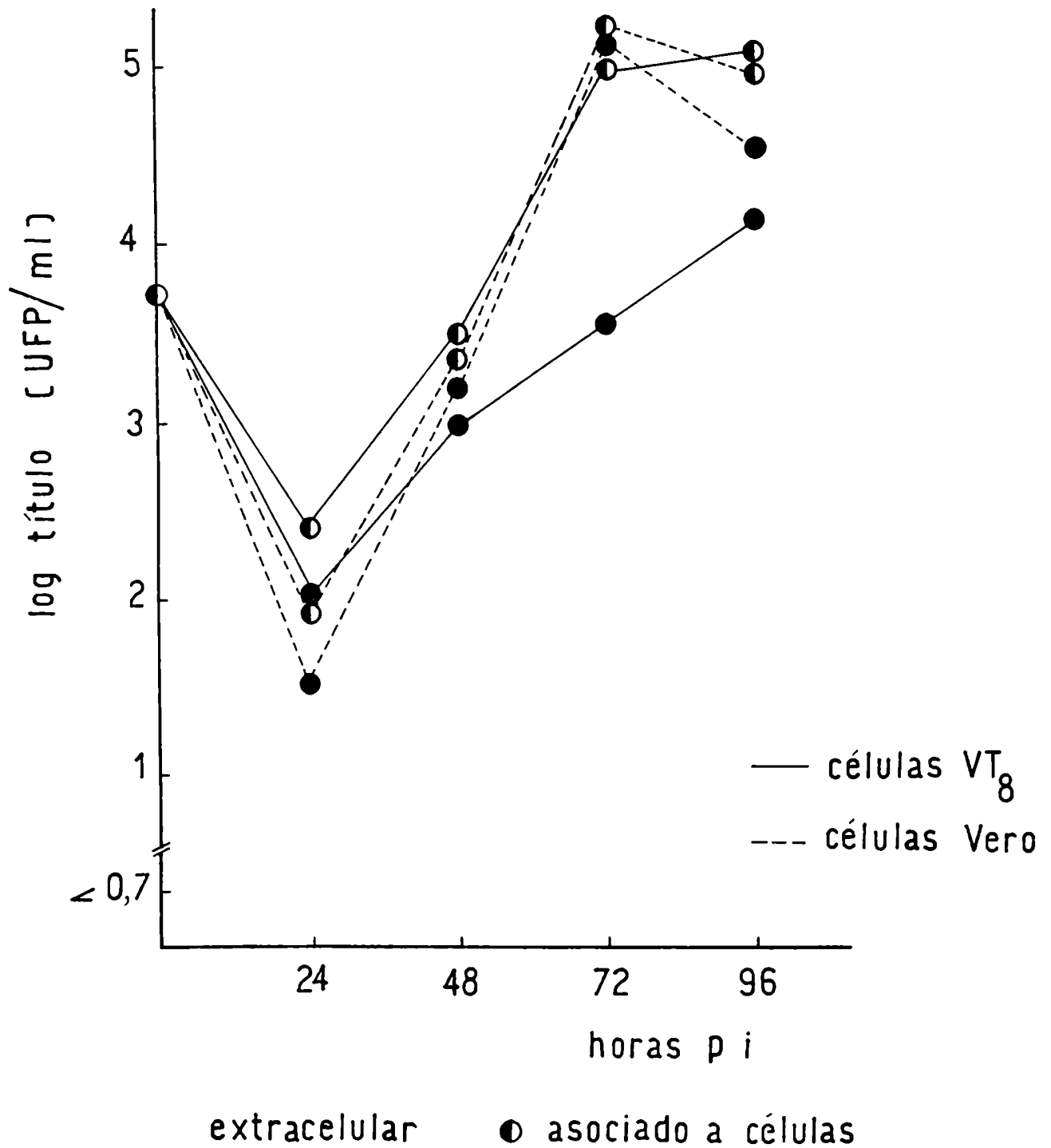
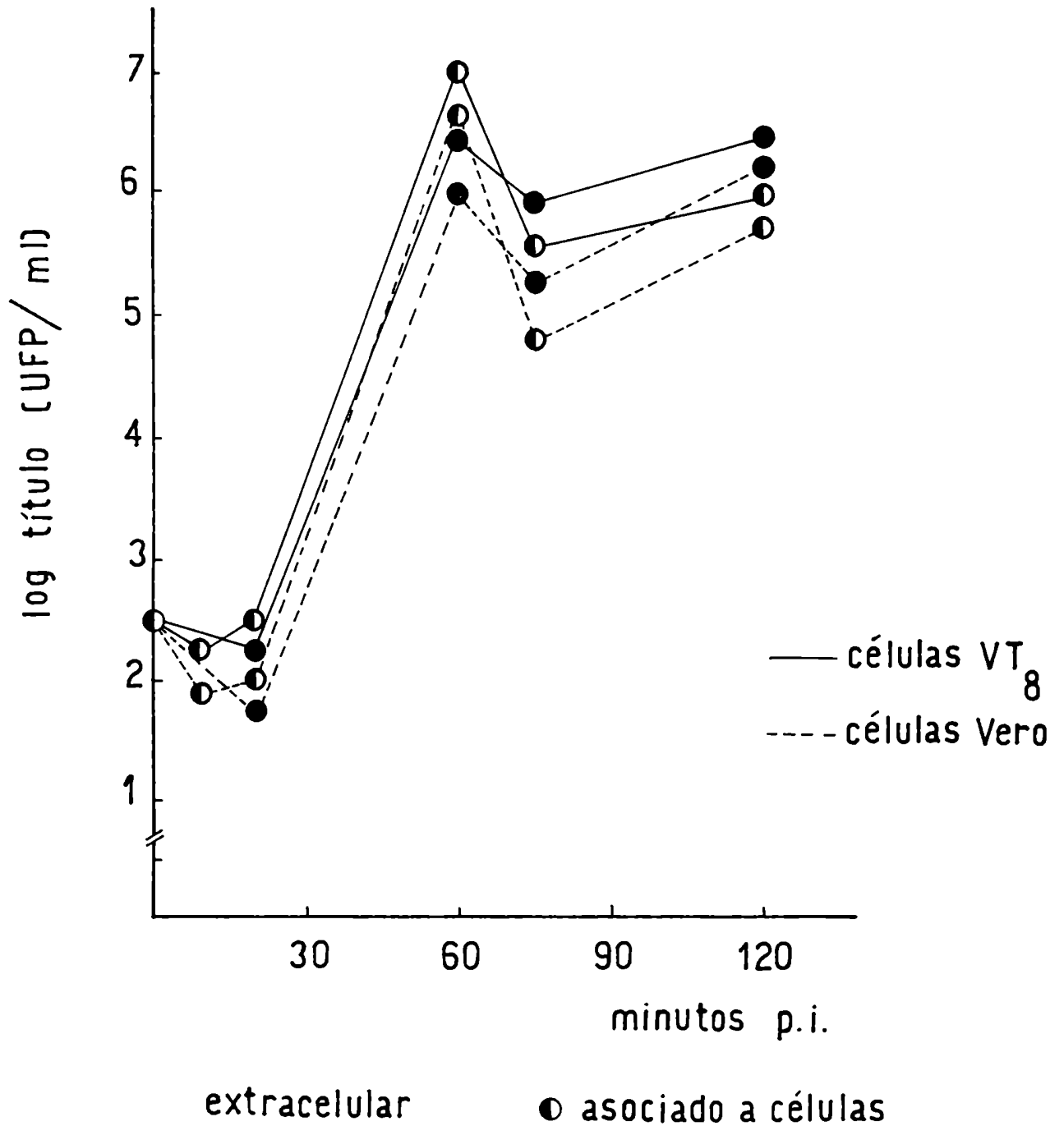


Figura 8: Multiplicación del virus VSV en células Vero y VT<sub>8</sub>.





ma similar en células Vero y VT<sub>8</sub>, dando un pico máximo a la hora p.i.. Este mismo patrón se encontró tanto para el virus extracelular como para el asociado a células.

Aunque el ciclo de multiplicación de VSV es mucho más corto (en pocos minutos se alcanza el título máximo), la similitud de las curvas de multiplicación del mismo en ambos cultivos dio idea de que la maquinaria enzimática de las células persistentes no estaba alterada.

Estos experimentos demuestran que la resistencia a la sobreinfección está relacionada con el parentesco antigénico y que es específica y no debida ni a un mecanismo general de interferencia ni a que las células no se encuentran en condiciones fisiológicas para soportar la multiplicación viral.

### III) Propiedades del virus liberado durante la infección persistente

#### 1) Neutralización de la progenie viral

Para confirmar la identidad del virus liberado por la línea VT<sub>8</sub>, se realizaron reacciones de neutralización con inmunosuero específico anti virus Tacaribe obtenido en cobayos (STa 29). La reacción se llevó a cabo como se explica en Materiales y Métodos utilizando VT-3 y VT-5 (virus liberado por la línea VT<sub>8</sub> en los pasajes 3 y 5 respectivamente). Luego de la incubación con inmunosuero y suero normal de cobayo a 37°C, se tituló la infectividad

residual. Los logaritmos de los índices de neutralización obtenidos fueron 3,92 y 2,75 para los virus liberados en el pasaje 3 y 5 respectivamente.

Estos datos confirmaron que el agente liberado por la línea VT<sub>8</sub> era virus Tacaribe.

2) Eficiencia de replicación a distintas temperaturas del virus persistente (VT)

Una característica que presentan algunos cultivos persistentemente infectados con distintos virus, es la selección positiva de mutantes termosensibles (ts) en el curso de la infección (92). Estas mutantes no pueden multiplicar a la temperatura restrictiva (generalmente 39-40°C) pero sí a la permisiva (33 a 37°C). Estas mutantes se van seleccionando positivamente en detrimento del virus salvaje (parental) durante la persistencia.

Los datos de la Tabla 3 y la experiencia de nuestro laboratorio con infecciones persistentes con virus Junín (23) nos llevó a considerar que también en nuestra línea podría ocurrir el mismo fenómeno y, para ello, se decidió estudiar la capacidad del virus liberado por la línea VT<sub>8</sub>, de multiplicar a diferentes temperaturas en comparación con el virus parental (TACV).

Células RK<sub>13</sub> a las 24 hs de sembradas fueron infectadas con sobrenadantes de distintos pasajes de la línea VT<sub>8</sub>. Luego de 1 hora de adsorción a 37°C, los cultivos se lavaron para eliminar

todo el virus no adsorbido. Se agregó medio de mantenimiento fresco y los cultivos se incubaron a 33, 37 y 40°C. A los 4 días p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se titularon los rendimientos por UFP en células Vero a 37°C.

Como se muestra en la Tabla 6, el virus que se liberó de las células VT<sub>8</sub> desde los 5 días hasta los 47 días de iniciada la infección persistente mostró una reducida eficiencia de multiplicación a la mayor temperatura (40°C). Esta eficiencia fue disminuyendo a medida que aumentaban los pasajes celulares. Así, a los 5 días de iniciada la infección, el virus liberado multiplicaba igual a todas las temperaturas ensayadas, pero, luego de 47 días, hubo una reducción de 3.000 veces en el rendimiento del virus crecido a 40°C respecto del obtenido a 37°C.

Puede observarse también que no se encontraron diferencias considerables entre los títulos encontrados a 33 y 37°C, aunque en todos los casos los títulos obtenidos a 37°C fueron superiores, dando idea de que ésta era la temperatura óptima.

Cabe señalar además, que las placas producidas bajo agar por el virus persistente fueron similares a las producidas por el virus parental, tanto en su tamaño y morfología como en el día de aparición.

### 3) Inactivación térmica del virus VT

Dado que la reducida eficiencia de plaqueo del virus recupe-

Tabla 6:

Sensibilidad a la temperatura del virus liberado por la línea VT<sub>8</sub> en distintos pasajes.

N°pasaje	Rendimiento (UFP/ml)			EDP 40°C/37°C
	33°C	37°C	40°C	
0(5)*	$4,90 \times 10^4$	$1,10 \times 10^5$	$1,75 \times 10^5$	1,60
3(22)	$1,35 \times 10^4$	$6,50 \times 10^4$	$1,25 \times 10^4$	$1,92 \times 10^{-1}$
4(27)	$5,22 \times 10^3$	$1,70 \times 10^4$	$5,00 \times 10^1$	$2,94 \times 10^{-3}$
8(47)	$2,25 \times 10^3$	$4,90 \times 10^3$	$2,50 \times 10^0$	$5,10 \times 10^{-4}$

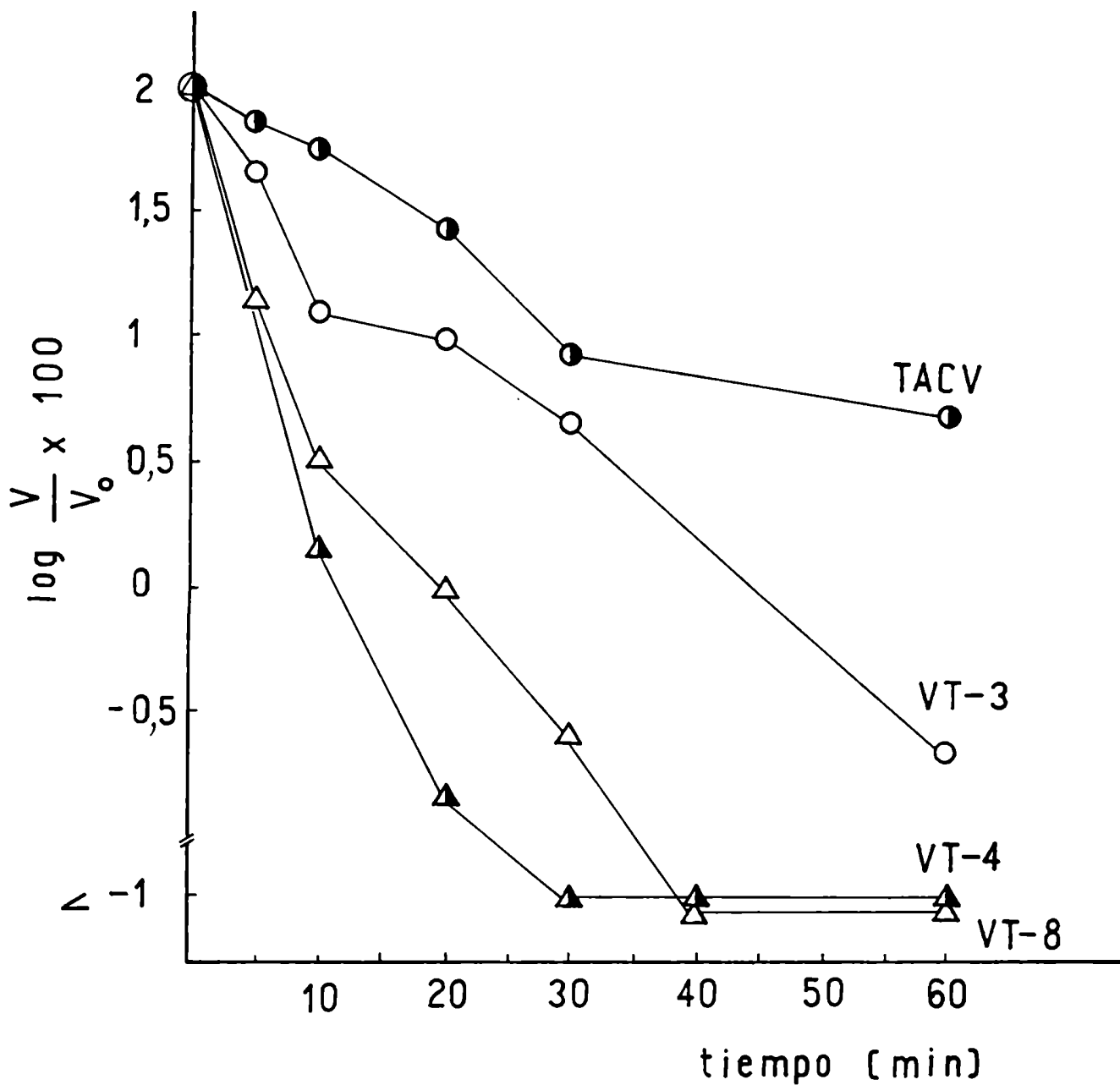
\* Número entre paréntesis es días posteriores a la iniciación de la línea VT<sub>8</sub>

rado de la línea sugería que estábamos en presencia de una variante ts, se consideró la posibilidad de analizar mediante experimentos simples si el defecto ts estaba asociado con alguna alteración de las proteínas estructurales del virión o bien se manifestaba durante la replicación en alguna proteína codificada durante el ciclo de replicación (proteína no estructural). Por esta razón, se comparó la estabilidad al calor del virus persistente obtenido en distintos pasajes de la línea VT<sub>8</sub> y de la cepa parental TACV.

Para ello se prepararon 4 ml de suspensión viral de VT-3, VT-4 y VT-8 y de TACV diluídas en PBS hasta contener aproximadamente  $10^4$  UFP. Se incubaron en un baño de agua termostatizado a 50°C. A distintos tiempos se tomaron alícuotas de 0,5 ml. Estas se mantuvieron en hielo hasta que todas las muestras fueron recogidas y se titularon por UFP en células RK<sub>13</sub>. Se calculó la infectividad residual como el logaritmo del cociente entre el título de la muestra tratada y el título del control que se mantuvo 60 min. en hielo.

Los resultados de la cinética de inactivación (Figura 9) mostraron que el virus persistente fue más termolábil que el virus parental que dio origen a la línea VT<sub>8</sub>. Puede observarse que luego de 60 min. a 50°C, el virus parental aún conservó aproximadamente un 5% de la infectividad y que VT-3 sólo retuvo un

Figura 9: Inactivación a 50°C del virus recuperado de la infección persistente.



0,2% de infectividad residual. Los virus VT-4 y VT-8 luego de 60 min. a 50°C fueron totalmente inactivados no pudiendo detectarse infectividad residual mediante esta experiencia.

Las cinéticas de inactivación térmicas presentan dos aspectos característicos: a) son casi lineales y b) el carácter de termolábil aumenta en función de la evolución de la población en el cultivo persistente. Debido a la linealidad de las gráficas, se pudo calcular, utilizando las pendientes de las curvas, el tiempo de vida media a 50°C de VT-3, VT-4, VT-8 y de TACV; esto es el tiempo necesario para inactivar al 50% de la infectividad residual. Los valores obtenidos fueron 13, 7, 3 y 2 minutos para TACV, VT-4 VT-4 y VT-8 respectivamente.

De los datos obtenidos se concluyó que la selección de mutantes termosensibles del virus Tacaribe obtenidas en el curso de la infección persistente iba acompañada de una alteración en algún componente estructural del virión que aumentaba su labilidad a la temperatura.

#### 4) Propiedades biológicas del virus VT

##### 4.1) Acción sobre cultivos de tejidos

Se realizaron estudios tendientes a caracterizar al virus recuperado de la línea persistente en cuanto a su capacidad para multiplicar en cultivos celulares y para analizar si su carácter termosensible le confería diferencias respecto del virus

estándar obtenido en cerebro de ratón lactante o en células Vero. Se estudiaron los siguientes parámetros: a) capacidad citolítica, b) capacidad para establecer persistencia y c) curva de replicación.

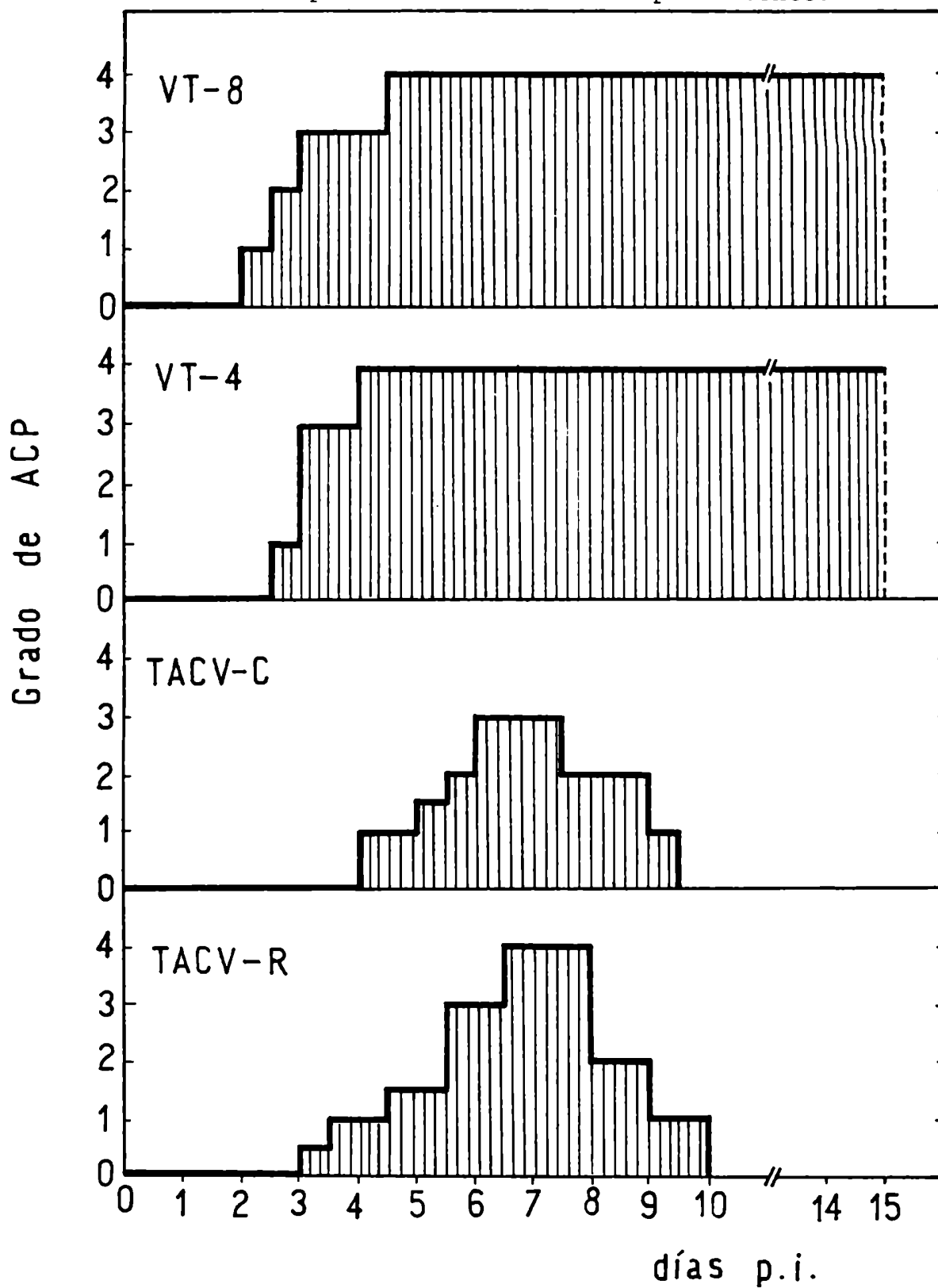
a) Para estudiar la capacidad citolítica del virus VT se infectaron en paralelo células Vero de 48 hs con 10 UFP de VT-4 y VT-8 y de TACV-R y TACV-C (virus Tacaribe crecido en cerebro de ratón lactante y en células Vero respectivamente). Los cultivos se incubaron a 37°C y se observaron al microscopio óptico durante 15 días.

Como se observa en la Figura 10, la aparición de la acción citopatogénica producida por los virus VT-4 y VT-8 fue anterior a la ACP producida por los virus TACV-C y TACV-R, dando idea de una mayor citopatogenicidad del virus persistente. Además, la evolución de la destrucción celular fue más rápida ya que se alcanzó a los 4 y 4 1/2 días p.i. para VT-4 y VT-8 respectivamente y recién a los 6 1/2 días se llegó al 99% de destrucción celular en los cultivos infectados con virus estándar de cerebro. Puede observarse además, que a la misma multiplicidad, el virus proveniente de células no llegó a destruir la monocapa celular.

La involución de la ACP se produjo en pocos días en las células infectadas con virus estándar (Figura 10) y, aunque



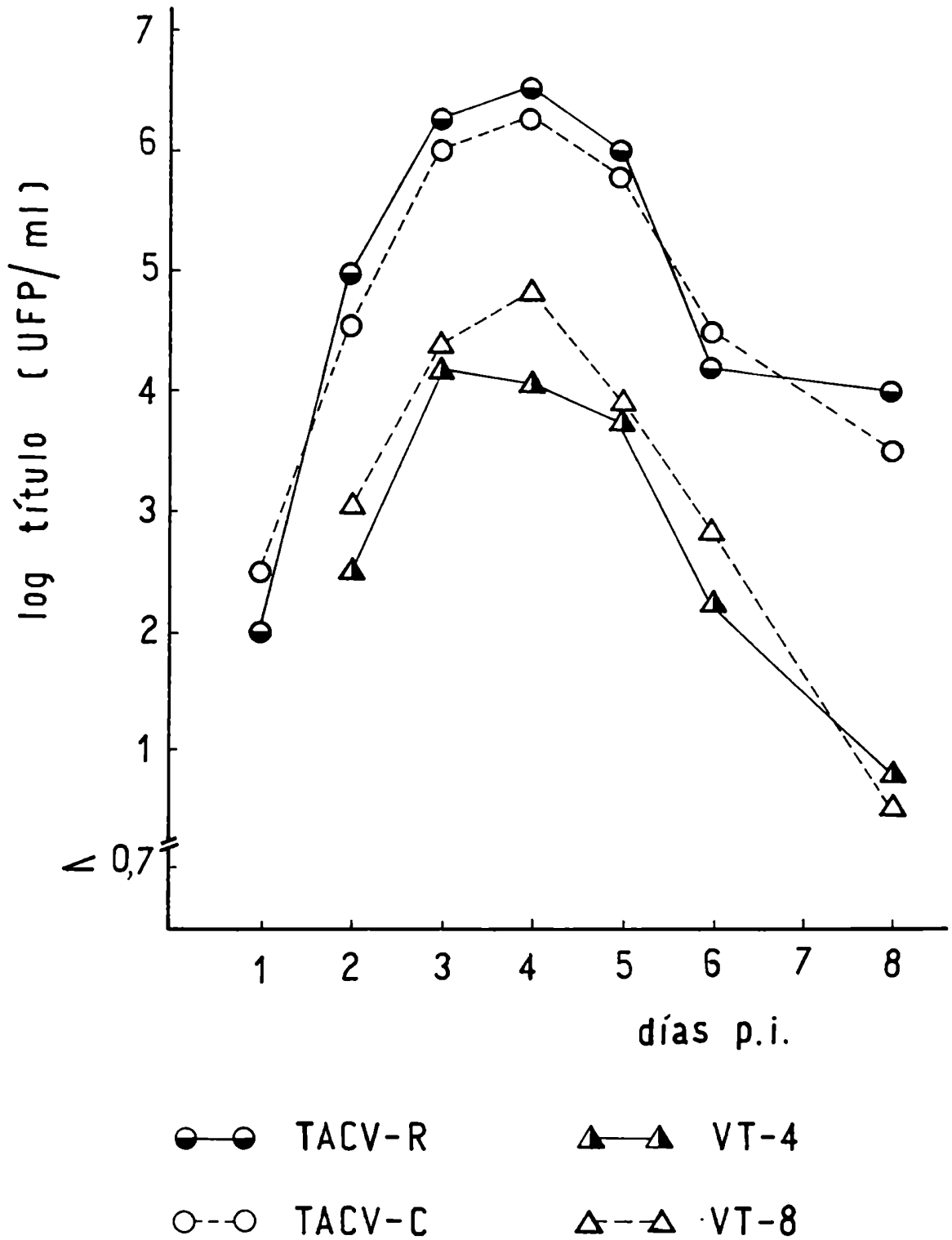
Figura 10: Grado y evolución de la acción citopatógena en células Vero infectadas con virus Tacaribe y virus recuperado de la infección persistente.



el cultivo recuperado conservó acúmulos oscuros de células muertas que lo diferenciaban de un cultivo normal, con posteriores cambios de medio nutritivo, estos fueron desapareciendo hasta alcanzar a los 12-15 días p.i. un aspecto muy similar a los cultivos sin infectar. Por el contrario, las células que se infectaron con los virus persistentes desarrollaron una ACP mucho más rápida y destructiva dado que no pudo recuperarse la monocapa celular a pesar de los continuos cambios de medio. De hecho, las pocas células que sobrevivieron a la destrucción inicial se fueron redondeando y desprendiendo del vidrio. Estas células no tuvieron la capacidad de adherirse nuevamente al sustrato y por lo tanto al no dividirse no pudieron dar origen a una monocapa celular.

- b) Al titular los sobrenadantes cosechados de las células Vero infectadas con VT-4, VT-8 y TACV-C y TACV-R, se observa (Figura 11) que los títulos máximos de virus extracelular se alcanzaron entre los días 3ero. y 5to. p.i. tanto para los virus estándar como para los persistentes, aunque los títulos obtenidos para estos últimos fueron menores en casi 2 unidades logarítmicas. Luego del 4to. día p.i. todos los títulos virales comienzan a decaer. A los 8 días p.i. se ve que las células infectadas con TACV (tanto de cerebro como de cultivo) li-

Figura 11: Replicación del virus persistente en células Vero.



beran mayor cantidad de viriones infectivos que las células infectadas con los virus persistentes (aproximadamente 3 unidades logarítmicas más) aunque estos valores son considerablemente menores que los obtenidos en el pico máximo a los 4 días p.i.

Debe considerarse que a los 8 días p.i. las células infectadas con los virus estándar se habían recuperado totalmente de la ACP producida por el virus (Figura 10) originándose una monocapa persistentemente infectada que resulta refractaria a la sobreinfección con virus homotípico que estaba en el sobrenadante y por lo tanto la caída del título se debe a una inactivación térmica de los viriones que no tienen un sustrato celular para multiplicar.

En el caso de las células infectadas con los virus persistentes a los 8 días p.i., tenían una intensa ACP (que había comenzado alrededor del 4to. día p.i.) (Figura 10) y que había destruído casi totalmente al tejido, no quedando células viables para que el virus extracelular multiplique.

- c) Una diferencia considerable que presentaban ambos inóculos (virus estándar y virus persistentes) y que resulta de la observación directa de la Figura 10, es la inhabilidad de los virus persistentes de originar una infección persistente, debido a la destrucción total que inducen en el tejido

infectado.

En ese momento, se relacionó la elevada citopatogenicidad que presentaba el virus persistente con la presencia de las mutantes termosensibles, aunque se sabía que las mutantes ts obtenidas en otros sistemas celulares infectados con diferentes virus en forma persistente (131), presentaban una atenuación para cultivos celulares.

#### 4.2.) Virulencia del virus VT para ratón lactante

La acentuada citopatogenicidad del virus persistente en células Vero, llevó a considerar la posibilidad de que dicha patogenicidad se reprodujese al inocular animales de laboratorio. En experiencias realizadas con mutantes ts recuperadas de células Vero persistentemente infectadas con virus Junín (21) se estableció que había una relación directa entre el título del virus obtenido en células Vero por UFP y la mortalidad producida en ratones lactantes.

Con el objeto de determinar la virulencia de las mutantes ts obtenidas de la línea VT<sub>8</sub>, se inocularon ratones lactantes por vía i.c. con diluciones decimales seriadas de VT-8 y de virus parental TACV y se calcularon las dosis letales 50% (DL<sub>50</sub>) para ambos inóculos. Paralelamente se titularon por UFP en células Vero. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7:

Virulencia para ratón lactante del virus liberado por la línea VT<sub>8</sub>

Inóculo	Título (UFP/ml)	Título (DL <sub>50</sub> /ml)	UFP/DL <sub>50</sub>
TACV-C	$3,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	1,45
VT-8	$1,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^5$	0,01

Como se observa en la Tabla 7, la mutante termosensible obtenida del cultivo persistentemente infectado presentó una acentuada virulencia para el ratón lactante respecto de la cepa estándar, dado que la relación UFP/DL<sub>50</sub> fué de aproximadamente 1,5 para TACV y 0,01 para VT, datos que muestran que se necesitan aproximadamente 0,01 UFP para producir una DL<sub>50</sub>.

5) Detección de interferencia en los sobrenadantes de la línea VT<sub>8</sub>.

Se ha descrito en numerosas oportunidades la existencia de partículas que interfieren con la multiplicación del virus salvaje en los sobrenadantes de líneas persistentemente infectadas con virus de la familia Arenaviridae (30) (105) (123)

Con el objeto de estudiar si la línea VT<sub>8</sub> liberaba al medio extracelular partículas interferentes (PI), se analizaron algunos sobrenadantes de la misma. Para ello, monocapas de células Vero crecidas en botellas de 90 cc de capacidad se infectaron por duplicado con 0,4 ml del sobrenadante obtenido en los pasajes 2, 4 y 8 de la línea VT<sub>8</sub> sin diluir. Luego de 1 hora de adsorción a 37°C se retiraron los inóculos y las células se lavaron exhaustivamente con PBS. La mitad de los cultivos infectados fueron desafiados con 100 UFP de TACV y la otra se la trató de igual forma pero inoculándola con medio de dilu-

ción solamente (rendimiento de virus persistente). En forma paralela se infectaron células Vero controles no tratadas con sobrenadante de VT<sub>8</sub> con igual multiplicidad de TACV. Los cultivos se reincubaron a 37°C durante una hora adicional, se volcaron los inóculos, se lavaron las monocapas y se cubrieron con 9 ml de medio de mantenimiento. Luego de 20 hs. a 37°C se cosecharon los sobrenadantes de todas las botellas a fin de titular el rendimiento de TACV en todos los casos (Tabla 8).

En la tabla 8 se observa que no hubo inhibición en los rendimientos del virus estándar por el pretratamiento con los tres sobrenadantes de VT<sub>8</sub> probados respecto del control hecho con medio de mantenimiento. Utilizando tanto los sobrenadantes de VT<sub>8</sub> de la Etapa Productiva (VT-2 y VT-4) como de la Etapa no Productiva (VT-18), los títulos de TACV obtenidos a las 20 hs en todos los casos oscilaron entre 6,5 y 6,86 x 10<sup>3</sup> UFP/ml, debiéndose las variaciones halladas a errores del método. Por lo tanto, los bajos porcentajes de actividad interferente obtenidos (entre 2,2, y 5,2%) no pueden considerarse representativos de la presencia de partículas interferentes. Aún así, no debe descartarse la presencia de PI en los sobrenadantes de la línea VT<sub>8</sub> ya que pueden encontrarse en niveles tan bajos que escapen de la sensibilidad del método.

En base a los resultados obtenidos, se decidió concentrar



Tabla 8:

Determinación de la interferencia de los sobrenadantes de la línea VT<sub>8</sub>

Material inoculado	Desafío*	Rendimiento <sup>#</sup>	%AI <sup>&amp;</sup>
VT-2	si	6,80 x 10 <sup>3</sup>	2,2
VT-2	no	96	-
VT-4	si	6,71 x 10 <sup>3</sup>	3,1
VT-4	no	68	-
VT-18	si	6,50 x 10 <sup>3</sup>	5,2
VT-18	no	< 5	-
Medio (control)	si	6,86 x 10 <sup>3</sup>	0
Medio (control)	no	< 5	

\* Desafío con 0,4 ml de TACV conteniendo 100 UFP

# Rendimiento a las 20 hs p.i. en UFP/ml

<sup>&</sup>%AI= Rendimiento sin interferente - rendimiento con interferente x 100  
rendimiento sin interferente

a los sobrenadantes de la línea VT<sub>8</sub>. Para ello se centrifugaron a 100.000 g durante 2 hs a VT-18 y VT-20. El pellet se sonicó y se resuspendió en medio de mantenimiento llevándolo a 1/100 del volúmen original. Con dichas suspensiones virales se realizó un ensayo de interferencia de la acción citopatogénica producida por TACV. Para ello se infectaron células Vero de 42 hs con 0,2 ml de los concentrados de VT-18 y VT-20. Luego de 1 hora a 37°C se volcó el inóculo, se lavó la monocapa con PBS y se desafió con 100 UFP de TACV; se dejó adsorber una hora adicional a 37°C pasada la cual se retiró el inóculo y se cubrieron las células con medio nutritivo. Se observó el desarrollo de la ACP utilizando como control células inoculadas con medio previo al desafío.

Pudo observarse que al 3er. día p.i. aparecieron focos de ACP en los controles que con el tiempo progresaron hasta desprender toda la monocapa (Grado +4). En ninguno de los cultivos preinfectados con VT-18 y VT-19 se observó ACP hasta los 10 días p.i. dando idea de la presencia de partículas interferentes (PI) en el material original. Esta actividad interferente debería estar en muy baja proporción en los sobrenadantes de VT<sub>8</sub> debido a que fue necesario concentrar 100 veces a los mismos para ponerla de manifiesto.

### Conclusiones parciales

De acuerdo a todos los resultados obtenidos en esta primera parte, podemos resumir las propiedades de la línea persistentemente infectada como:

- la línea VT<sub>8</sub> se originó de células Vero que sobrevivieron a la infección primaria con virus Tacaribe.
- el cultivo evoluciona de una Etapa Productiva con liberación cíclica de virus hacia una no Productiva donde no puede detectarse infectividad en el medio extracelular.
- el cultivo es morfológica y fisiológicamente similar a las células Vero normales durante todo su desarrollo.
- Presenta una resistencia total hacia la reinfección con virus homotípico.
- Solamente un 10% de las células sintetizan antígeno viral detectado en citoplasma y membrana celular tanto en la Etapa Productiva como en la no Productiva.
- Entre un 0,1 y 0,001% de las células infectadas son productoras de virus.
- El agregado de células sensibles aumentó la liberación viral en el tiempo sólo cuando el cultivo se encuentra en la Etapa Productiva. No pudo rescatarse virus por cocultivo en la Etapa no Productiva.
- El pasaje de VT<sub>8</sub> a 40°C disminuyó la liberación de virus. El

cocultivo permitió la multiplicación viral a la temperatura restrictiva aunque con menor rendimiento que a la temperatura permisiva.

- La resistencia a la sobreinfección con virus homotípico está dada en un paso posterior a la adsorción del mismo.
- Las células VT<sub>8</sub> resultan semipermisivas para el virus Junín que está antigénicamente muy relacionado con el virus Tacaribe.
- El cultivo VT<sub>8</sub> fue permisivo para el virus Pichinde (heterotípico) y para VSV (heterólogo).
- Los viriones liberados por VT<sub>8</sub> fueron confirmados como virus Tacaribe por neutralización.
- Durante la Etapa Productiva el virus liberado era ts.
- Las mutantes ts se seleccionaron positivamente en detrimento del virus estándar a medida que progresaba la persistencia.
- El enriquecimiento en mutantes ts fue acompañado de un aumento en la termolabilidad de las mismas.
- El virus persistente no fue capaz de iniciar persistencia en nuevos cultivos y mostró ser más citopático para cultivo y más virulento para ratón lactante que la cepa parental.
- No pudo detectarse interferencia en los sobrenadantes de la línea VT<sub>8</sub> sin tratar.
- La actividad interferente se puso de manifiesto luego de concentrar los sobrenadantes 100 veces.

## S E G U N D A P A R T E

### Establecimiento de infecciones persistentes

Como se expresara en la Introducción, en una infección persistente se pueden distinguir dos etapas perfectamente diferenciables; a) el establecimiento y b) el mantenimiento de la misma.

Los resultados presentados en la Primera Parte de esta tesis permitieron caracterizar los parámetros involucrados en el mantenimiento de la infección persistente de células Vero con virus Tacaribe sin analizar los factores que condicionan su establecimiento.

En esta Segunda Parte describiremos los resultados obtenidos como respuesta a los interrogantes planteados al finalizar la Primera Parte de nuestro trabajo y surgidos como corolario del mismo.

Nos preguntamos en primer lugar si la selección de partículas virales termosensibles era un evento regular en las infecciones persistentes de células Vero con virus Tacaribe.

Para contestar este interrogante decidimos establecer varias líneas persistentes siguiendo la metodología descrita pero utilizando virus proveniente de distintas fuentes.

En segundo lugar, quisimos determinar el papel de las

distintas partículas virales componentes de la población viral utilizada como inóculo en el establecimiento de la persistencia. El factor determinante de este planteo fue la observación que las mutantes ts obtenidas de la línea VT<sub>8</sub> no eran capaces de establecer persistencia. Los resultados obtenidos aplicando estos razonamientos, se describen a continuación.

I) Caracterización de líneas persistentemente infectadas con virus Tacaribe

1) Obtención de las líneas

Con el objeto de estudiar si la infección persistente de células Vero con TACV era un fenómeno común que se repetía en todas y cada una de las líneas que se establecen, y, si la progenie viral obtenida a partir de todas ellas presenta un fenotipo termosensible, se iniciaron 9 líneas persistentemente infectadas. Para ello se infectaron monocapas de células Vero de 48 hs con TACV proveniente de distintos orígenes y a distintas multiplicidades de infección. Las características de cada una de ellas se presentan en la Tabla 9.

Puede observarse que se obtuvieron líneas a partir de células infectadas con virus proveniente de cerebro de ratón lactante, de virus crecido 4 días en células Vero y de virus de cerebro clonado 3 veces en células Vero.

Tabla 9:

Origen y características de las células Vero persistentemente infectadas con virus Tacaribe

Denominación de la línea	Inóculo origen	m.i.	duración (días)	Nº de pasajes	Título de virus sobreinfectantes
VT <sub>1</sub>	CT*	0,001	210	46	∠ 5 <sup>#</sup> (p15) <sup>##</sup>
VT <sub>2</sub>	CT	0,001	200	44	∠ 5 (p10)
VT <sub>3</sub>	CR**	0,1	50	10	∠ 5 (p9)
VT <sub>4</sub>	CR	0,01	53	11	∠ 5 (p5)
VT <sub>5</sub>	CR	0,01	53	11	∠ 5 (p5)
VT <sub>6</sub>	CR	0,01	61	12	∠ 5 (p6)
VT <sub>7</sub>	CR	0,1	64	12	∠ 5 (p6)
VT <sub>10</sub>	CR	0,1	73	10	∠ 5 (p7)
VT <sub>9</sub>	C1***	0,1	63	12	∠ 5 (p6)

\*CT: Virus obtenido del sobrenadante de 4to día de células Vero (TACV-C)

\*\*CR: Virus obtenido en cerebro de ratón lactante a los 7 días p.i. (TACV-R)

\*\*\*C1: Virus de cerebro clonado en células Vero

# ∠ 5 UFP/ml

## Pasaje de la línea persistente en la que fué desafiada con 100 UFP de TACV  
El título de TACV obtenido en células Vero normales a las 72 hs p.i. fué de  $1,5 \times 10^6$  UFP/ml.

Las 9 líneas fueron similares tanto morfológica como fisiológicamente a VT<sub>8</sub> y a su vez no pudieron diferenciarse por observación microscópica de las células Vero normales. Además, ninguna línea de las obtenidas presentó ciclos de ACP durante toda su vida. Todas ellas se mantuvieron a 37°C y se repicaron cada 5 días.

Con el objeto de poner de manifiesto el carácter persistente que poseían las células infectadas, todas fueron desafiadas con TACV. Para ello, se sembraron células persistentes en botellas de 60 cm<sup>3</sup> y a las 24 hs post-siembra se infectaron con 0,2 ml de una suspensión de TACV conteniendo 100 UFP; paralelamente, se infectaron células Vero normales con la misma dosis de TACV. A las 72 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes de todos los cultivos y se titularon por UFP en células Vero. Como se observa en la Tabla 9, ninguna de las 9 líneas permitió la multiplicación del virus Tacaribe (título obtenido <5 UFP/ml) por lo que todas fueron consideradas como líneas persistentemente infectadas.

## 2) Producción de virus por las líneas persistentes

Con el objeto de analizar si las líneas persistentemente infectadas liberaban virus al medio extracelular, y si dicha liberación seguía el mismo patrón encontrado en la línea VT<sub>8</sub>



(es decir una etapa productiva seguida de una no productiva), se cosecharon los sobrenadantes de todas ellas luego de cada repique celular. Estos fueron titulados por UFP en células Vero y los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 12, 13 y 14.

Puede observarse que las 9 líneas liberaron virus en una primera Etapa Productora y luego evolucionaron a una no Productora donde no se detecta virus extracelular.

Las líneas VT<sub>1</sub> y VT<sub>2</sub> (Figura 12 a) fueron las estudiadas durante más tiempo. Ambas liberaron virus en forma cíclica en los primeros 8-9 pasajes celulares (que correspondían a 40-50 días in-vitro). Los títulos alcanzados fueron menores que los obtenidos de la línea VT<sub>8</sub> (Figura 2) y la producción viral siguió un patrón al azar durante la Etapa Productiva que llevó a la desaparición de la infectividad en el sobrenadante de dichas células.

El análisis de las otras líneas persistentes (VT<sub>3</sub>, VT<sub>4</sub>, VT<sub>5</sub>, VT<sub>6</sub>, VT<sub>7</sub>, y VT<sub>10</sub>) se llevó a cabo con el objeto de determinar si el origen del virus inoculado para iniciar la infección y la m.i. del inóculo modificaban el patrón de liberación viral por las líneas obtenidas.

Las líneas VT<sub>3</sub> y VT<sub>4</sub> se iniciaron con una m.i. de 0,1 y 0,01 respectivamente; las células inoculadas con la menor mul-

Figura 12: Producción del virus infeccioso por células Vero infectadas persistentemente con virus Tacaribe.

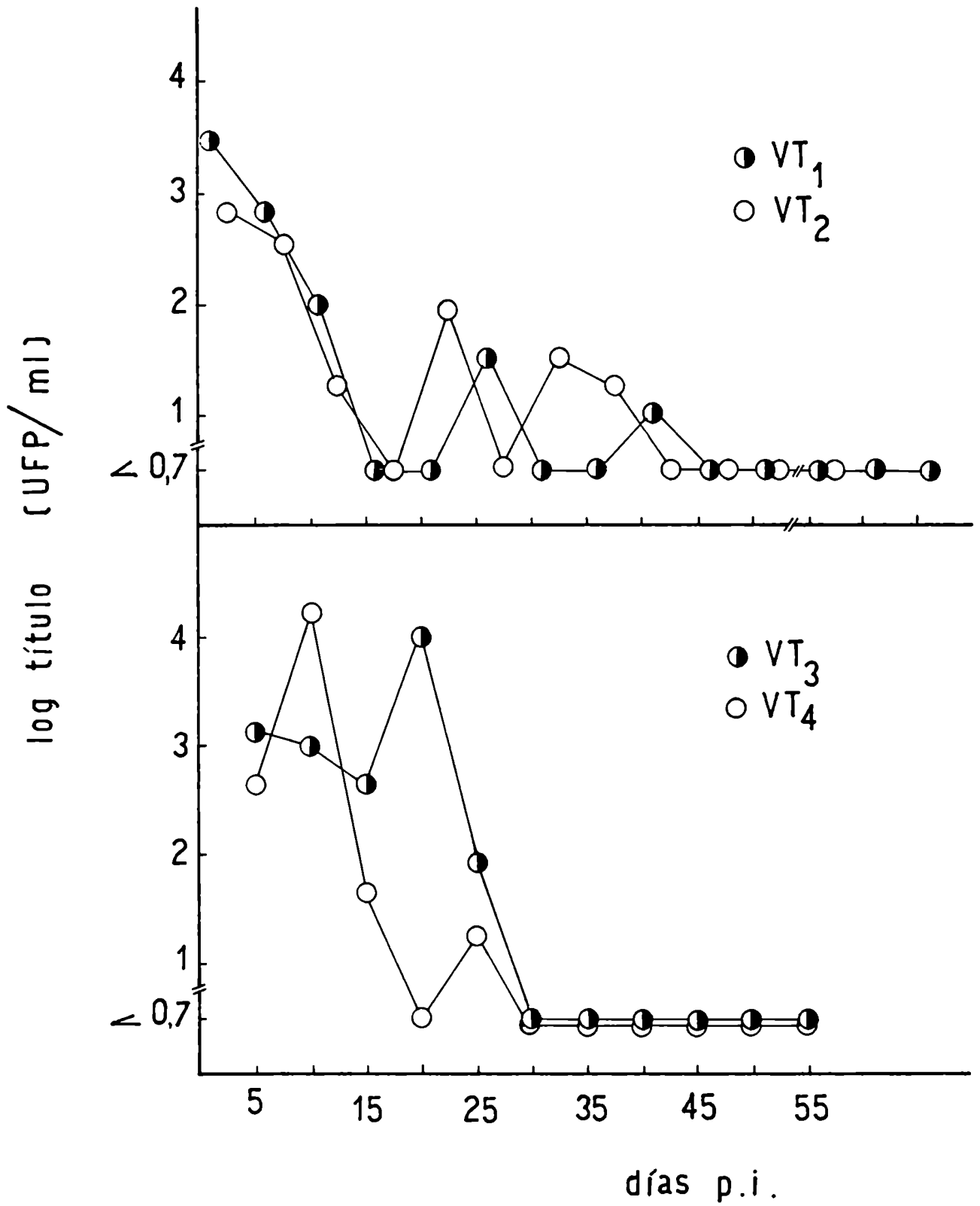
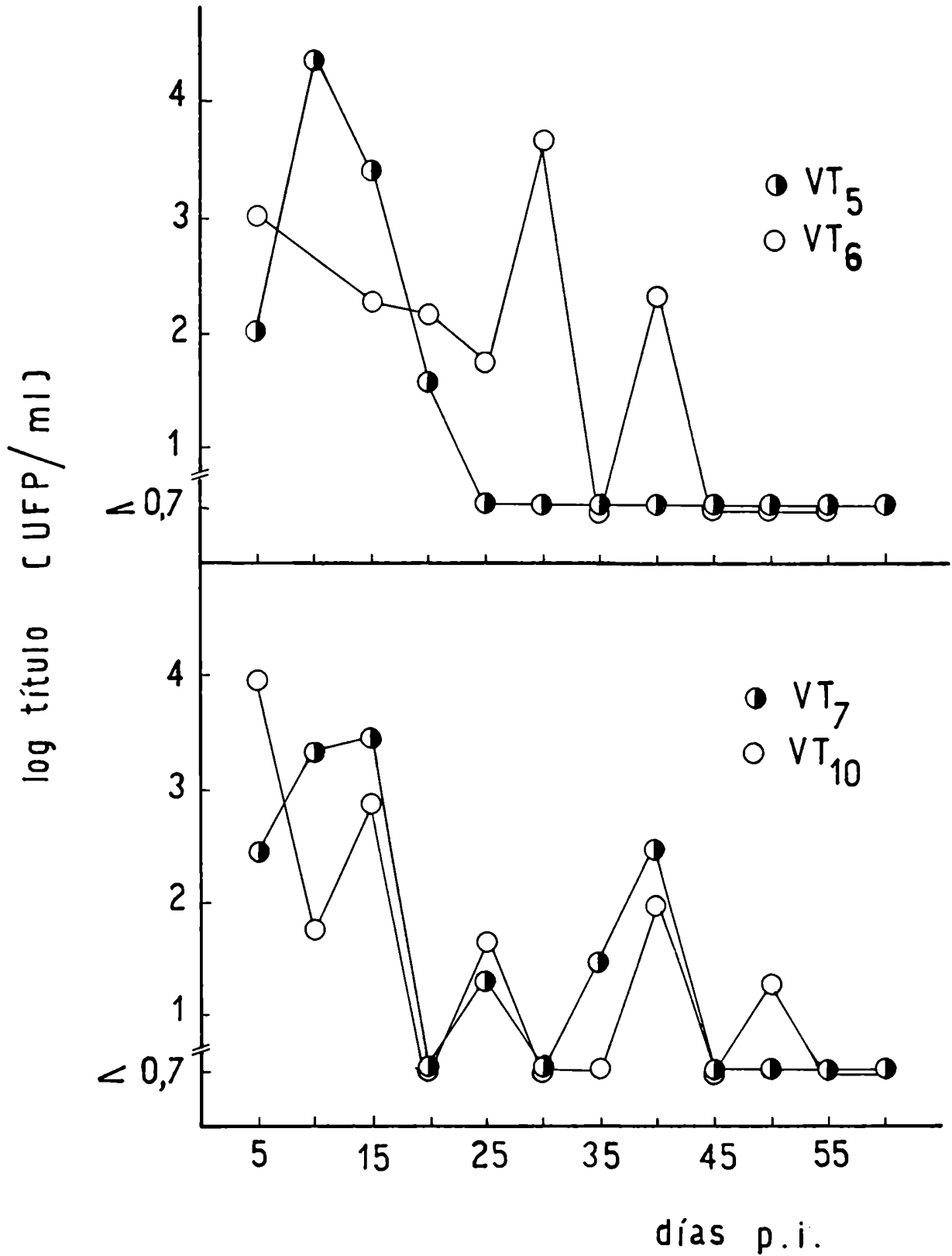


Figura 13: Producción de virus infeccioso por células Vero infectadas persistentemente con virus Tacaribe.



tiplicidad desarrollaron ACP más lentamente que las inoculadas con una m.i. de 0,01, pero ambas llegaron a una intensidad de +4 de ACP. Al titular los sobrenadantes de las mismas, (Figura 12 b) se observó que la etapa Productiva abarcaba menos días in-vitro que la línea VT<sub>8</sub>. La infectividad liberada en esta etapa fue bastante errática y puede observarse que la línea VT<sub>3</sub> liberó aproximadamente la misma cantidad de viriones infectivos ( $10^3$  UFP/ml) durante los tres primeros pasajes celulares.

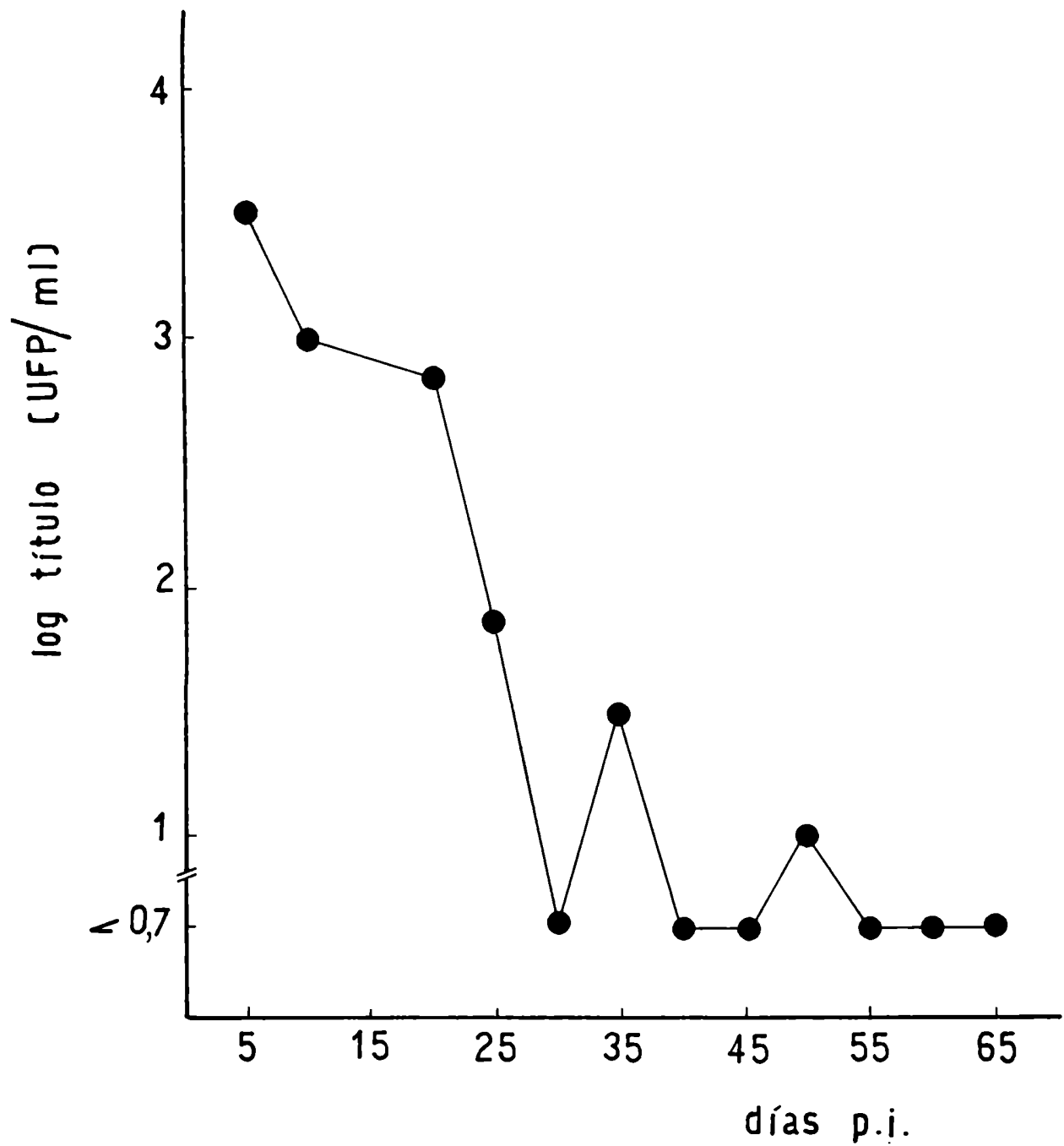
Posteriormente se obtuvieron las otras cuatro líneas (VT<sub>5</sub>, VT<sub>6</sub>, VT<sub>7</sub> y VT<sub>10</sub>) que presentaron también una Etapa Productiva aunque esta varió desde 5 pasajes en la línea VT<sub>3</sub> (Figura 13 a) hasta 10 pasajes celulares en la línea VT<sub>10</sub> (Figura 13 b).

No pudo encontrarse una relación en el tiempo que duró la Etapa Productiva con la multiplicidad de infección ni con el origen del virus utilizado para iniciar la línea persistente.

Hasta ese momento, todas las líneas persistentes obtenidas se iniciaron a partir de inóculos heterogéneos en cuanto a su composición de viriones; esto es, al no ser clonados presentaban una composición diferencial de viriones.

Con el objeto de obtener una población viral homogénea para utilizar como inóculo, se clonó el stock de TACV por 3 plaques sucesivos en células Vero. El clon obtenido se diluyó hasta obtener  $10^4$  UFP y se inoculó en células Vero. Estas cé-

Figura 14: Curva de producción viral de una línea de células Vero persistentemente infectada con un clon de virus Tacaribe.



lulas presentaron ACP al día 4to. p.i. y luego de una extensa destrucción (grado +4) la monocapa se regeneró dando origen a una línea denominada VT<sub>9</sub>. La curva de producción viral obtenida de la misma (Figura 14) no fue diferente a la de las células del cultivo VT<sub>8</sub>. La liberación de partículas infectivas al medio decayó al aumentar el número de pasajes celulares, y ya a los 50 días p.i. (pasaje 9) no se detectó virus infectivo.

### 3) Análisis de la progenie viral liberada por las líneas persistentes

Todas las experiencias llevadas a cabo con el fin de realizar un estudio lo más intensivo posible de los viriones liberados por las nuevas líneas obtenidas se hicieron utilizando los sobrenadantes de dichas líneas, y hay que tener en cuenta que la cantidad de sobrenadante era el material limitante; por lo tanto, el análisis de los distintos factores intervinientes no se pudo realizar siempre con la misma muestra o sea que no siempre pudo utilizarse sobrenadante del mismo pasaje y además, en general, no se ensayaron aquellos sobrenadantes que presentaban muy bajo título.

#### 3.1.) Termolabilidad

Basándonos en las observaciones realizadas sobre la proge-

nie liberada por las células VT<sub>8</sub>, decidimos analizar la termolabilidad del virus sintetizado en las nuevas líneas.

Para ello se realizó la inactivación térmica a 50°C de aquellos sobrenadantes que tenían un título superior a 10<sup>2</sup> UFP/ml y se siguió el mismo procedimiento realizado para VT<sub>8</sub>.

Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 10.

De los datos obtenidos se pudo concluir que todos los sobrenadantes analizados presentaban viriones termolábiles con excepción del virus liberado por la línea VT<sub>1</sub> que mostró luego de 30 min a 50°C una infectividad residual similar al control. Cabe destacar que la termolabilidad del virus liberado por VT<sub>9</sub> aumentó al aumentar el pasaje celular dado que hubo una fracción del 1,87% resistentes en el pasaje 3 y solamente una fracción menor del 0,86% en el pasaje 4, dando idea de un enriquecimiento de partículas termolábiles a medida que progresaba la persistencia. Esta característica no debe tomarse como totalmente cierta debida a los bajos títulos obtenidos.

### 3.2.) Termosensibilidad

Para poder determinar si la termolabilidad que presentaron algunos viriones persistentes era la expresión fenotípica de una mutación génica (ts), se hicieron crecer a dichos viriones a 37 y 40°C respectivamente. Los sobrenadantes del 3er. día de

Tabla 10:

Termolabilidad del virus liberado por las líneas persistentes

Línea	Pasaje	Título (UFP/ml)		Infectividad residual %*
		0 min	30 min	
VT <sub>1</sub>	2	6,72 x 10 <sup>2</sup>	2,80 x 10 <sup>1</sup>	4,16
VT <sub>2</sub>	2	1,65 x 10 <sup>2</sup>	0,15 x 10 <sup>1</sup>	0,90
VT <sub>3</sub>	4	1,00 x 10 <sup>4</sup>	2,10 x 10 <sup>1</sup>	0,21
VT <sub>6</sub>	6	4,82 x 10 <sup>3</sup>	1,10 x 10 <sup>1</sup>	0,20
VT <sub>9</sub>	3	1,60 x 10 <sup>3</sup>	3,00 x 10 <sup>1</sup>	1,87
VT <sub>9</sub>	4	5,80 x 10 <sup>2</sup>	∠ 5	∠ 0,86
TACV (control) -	-	1,93 x 10 <sup>5</sup>	1,50 x 10 <sup>4</sup>	7,77

\* Infectividad residual %:  $\frac{\text{Título 30 min}}{\text{Título 0 min}} \times 100$



dichos rendimientos se titularon por UFP en células Vero a 37°C y los datos obtenidos se presentan en la Tabla 11.

Se puede observar que el virus persistente liberado por las líneas VT<sub>2</sub> y VT<sub>6</sub> multiplica con menor eficiencia a 40°C (EDR  $4,8 \times 10^{-2}$  y  $3 \times 10^{-3}$  respectivamente) considerandose en ambos casos que dicha termosensibilidad se debía a la presencia de mutantes ts en ambos sobrenadantes.

La eficiencia de replicación del virus liberado por VT<sub>1</sub> fue menor que la obtenida para el control, aunque no puede afirmarse con certeza que dicho sobrenadante presente mutantes ts.

La línea VT<sub>4</sub> liberó al medio viriones que no presentaron diferencia en cuanto a su multiplicación a 40°C con respecto al control (EDR 1,08).

De las cuatro líneas analizadas, en dos se produjo la selección de mutantes ts, aunque el análisis del pasaje 2 de VT<sub>2</sub> no muestra un carácter ts muy elevado, hay que considerar que es un pasaje muy temprano y como ya se vio para VT<sub>8</sub>, la población ts se enriquece con los pasajes celulares desplazando a la población parental.

Pudo observarse una característica llamativa en aquellas células que se infectaron con el pasaje 1 de la línea VT<sub>1</sub>. Luego de cosechar el sobrenadante de tercer día tanto a 37°C como a 40°C para medir la eficiencia de multiplicación a ambas tem-

Tabla 11:

Termosensibilidad del virus persistente.

Línea	Pasaje	Título (UFP/ml) #		Eficiencia de replicación *
		37°C	40°C	
VT <sub>1</sub>	2	3,10 x 10 <sup>3</sup>	2,90 x 10 <sup>3</sup>	0,93
VT <sub>2</sub>	2	2,50 x 10 <sup>2</sup>	1,22 x 10 <sup>1</sup>	4,8 x 10 <sup>-2</sup>
VT <sub>4</sub>	2	3,00 x 10 <sup>3</sup>	3,10 x 10 <sup>3</sup>	1,08
VT <sub>6</sub>	6	2,12 x 10 <sup>4</sup>	6,36 x 10 <sup>1</sup>	3,0 x 10 <sup>-3</sup>
TACV	-	2,50 x 10 <sup>6</sup>	3,90 x 10 <sup>6</sup>	1,56

# El rendimiento de 96 hs a 37 y 40°C se tituló por UFP a 37°C.

\* Cociente entre el título del virus crecido a 40°C y el título a 37°C.

peraturas, las células se reincubaron a la misma temperatura y se observó que los cultivos adquirirían una morfología diferente de aquellas infectadas con los otros sobrenadantes persistentes. Este hecho será analizado más adelante.

### 3.3.) Virulencia para ratón lactante

Algunos de los sobrenadantes de las líneas persistentes fueron analizados en cuanto a su virulencia para el ratón lactante. Se titularon en paralelo los viriones liberados por VT<sub>6</sub> y VT<sub>2</sub> en células Vero y en ratones lactantes (UFP/ml y DL<sub>50</sub>/ml respectivamente). Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 12.

Puede observarse que la población de viriones persistentes presentaron una mayor virulencia para el ratón lactante que el virus estándar como ya se vió para el virus liberado por VT<sub>8</sub>.

### 3.4.) Detección de interferencia en los sobrenadantes de las líneas persistentes

Para poder determinar si los sobrenadantes de los cultivos persistentes contenían actividad interferente, se estudiaron algunos de ellos cosechados en distintos pasajes celulares. Se llevaron a cabo experiencias de interferencia de la replicación de TACV de acuerdo a la metodología descrita en Materia-

Tabla 12:

Virulencia del virus persistente para ratón lactante.

Línea	Pasaje	Título		
		UFP/ml	DL <sub>50</sub> /ml	UFP/DL <sub>50</sub>
VT <sub>2</sub>	2	1,90 x 10 <sup>3</sup>	1,90 x 10 <sup>3</sup>	0,48
VT <sub>6</sub>	6	2,00 x 10 <sup>2</sup>	2,21 x 10 <sup>2</sup>	0,87
VT <sub>6</sub>	8	2,12 x 10 <sup>2</sup>	1,23 x 10 <sup>3</sup>	0,17
TACV		3,20 x 10 <sup>8</sup>	2,20 x 10 <sup>8</sup>	1,45

les y Métodos y los resultados se muestran en la Tabla 13.

En la Tabla 13 se puede observar que solamente el sobrenadante del segundo pasaje de la línea VT<sub>1</sub> presentó actividad interferente dado que inhibió en un 89,84% el rendimiento de 20 hs de 100 UFP de TACV. Dado que el inóculo (VT<sub>1</sub>p<sub>2</sub>) contenía infectividad (95 UFP/ml), ésta se descontó para realizar los cálculos considerando que en el rendimiento de TACV a las 20 hs también había progenie originada por viriones infectivos de VT<sub>1</sub>p<sub>2</sub>. En los materiales provenientes de VT<sub>2</sub> y VT<sub>6</sub> no se pudo detectar la presencia de PI tanto en aquellos sobrenadantes que presentaron infectividad (VT<sub>2</sub>p<sub>2</sub> y VT<sub>6</sub>p<sub>6</sub>) como en aquellos que no la presentaron (VT<sub>2</sub>p<sub>4</sub> y VT<sub>6</sub>p<sub>7</sub>).

Debido a que los porcentajes de actividad interferente eran tan bajos, se consideró que las fluctuaciones obtenidas en los títulos en presencia y en ausencia del material supuestamente interferente fueron propias del método utilizado y no producto de una inhibición específica.

### 3.5.) Habilidad del virus persistente para iniciar persistencia

Una de las características que presentaba el virus liberado por la línea VT<sub>8</sub> era la gran actividad citolítica que poseía, que impedía que dichos viriones iniciasen una infección persistente al ser inoculados en células normales. Esta alta ci-

Tabla 13:

Detección de partículas interferentes (PI) en los sobrenadantes de algunas líneas persistentes.

Material inoculado	desafío con TACV*	rendimiento a las 20 hs (UFP/ml)	% AI <sup>#</sup>
VT <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	no	95	
	si	7,30 x 10 <sup>2</sup>	89,84
VT <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	no	92	
	si	6,34 x 10 <sup>3</sup>	0,03
VT <sub>2</sub> P <sub>4</sub>	no	∠ 5	-
	si	6,30 x 10 <sup>3</sup>	0
VT <sub>6</sub> P <sub>6</sub>	no	73	-
	si	6,21 x 10 <sup>3</sup>	1,80
VT <sub>6</sub> P <sub>7</sub>	no	∠ 5	-
	si	6,20 x 10 <sup>3</sup>	0,80
Medio de cultivo (control)	no	∠ 5	-
	si	6,25 x 10 <sup>3</sup>	-

\* 100 UFP de TACV

# %AI:  $\frac{\text{rendimiento sin interferente} - \text{rendimiento con interferente}}{\text{rendimiento sin interferente}} \times 100$

topatogenicidad se atribuyó en su momento a la presencia de mutantes ts en dichos sobrenadantes. Dado que las nuevas líneas obtenidas no liberaban todas mutantes ts, se analizó la capacidad del virus liberado por las mismas de iniciar infecciones persistentes. Es decir, permitir que las células sobrevivientes de la infección aguda primaria se dividan y formen una monocapa celular persistentemente infectada.

Para determinar si el virus persistente liberado por las nuevas líneas era capaz de iniciar persistencia, se infectaron cultivos de células Vero de 72 hs con los sobrenadantes de las líneas VT<sub>1</sub>, VT<sub>2</sub>, VT<sub>4</sub>, VT<sub>5</sub>, VT<sub>6</sub> y VT<sub>9</sub>. Se observó la aparición de ACP y la recuperación posterior de algunas de ellas. En la Tabla 14 se presentan los resultados obtenidos, destacando además, la termolabilidad, la termosensibilidad y la presencia de actividad interferente en dichos materiales.

Puede observarse que la imposibilidad para iniciar persistencia la presentaron aquellos sobrenadantes ricos en mutantes ts y con una acentuada termolabilidad (VT<sub>2</sub> y VT<sub>6</sub>) aunque también los sobrenadantes de VT<sub>3</sub> y VT<sub>9</sub> llevaron a la destrucción completa de las monocapas celulares infectadas luego de varios ciclos de replicación viral a pesar de no haberse determinado su termosensibilidad. En contraste, el virus liberado por la línea VT<sub>1</sub> no era ni termolábil ni termosensible y

Tabla 14:

Características de los viriones liberados por las líneas persistentes

Línea	Termolabilidad	Termosensibilidad	AI#	Habilidad para iniciar persistencia
-------	----------------	-------------------	-----	-------------------------------------

---

VT <sub>1</sub>	no	no	si	si
VT <sub>2</sub>	si	si	no	no
VT <sub>3</sub>	si	NH*	NH	no
VT <sub>4</sub>	NH	no	NH	si
VT <sub>5</sub>	NH	no	NH	si
VT <sub>6</sub>	si	si	no	no
VT <sub>9</sub>	si	NH	NH	no

---

# AI: Actividad interferente

\* NH: no hecho



fue capaz de iniciar una infección persistente. Cabe destacar además, que este sobrenadante fue el único que presentó actividad interferente de los materiales ensayados para detectar la presencia de PI.

Hasta ese momento, por lo tanto, no fue posible determinar si la acentuada citopatogenicidad de ciertos stocks era atribuible a una propiedad de las mutantes termosensibles o a la ausencia de partículas interferentes.

4) Análisis de la progenie liberada por la línea VT<sub>1</sub>: variantes de crecimiento lento.

Anteriormente (II Parte, 3.2.) se había descrito que el sobrenadante de la línea VT<sub>1</sub> producía una ACP que era distinta de la ACP característica de TACV y que hasta este momento habían presentado todos los viriones persistentes. Además, se sabía que dicha línea no liberaba al medio mutantes ts en el curso de la infección persistente y que el virus liberado no presentaba variación en cuanto a su termolabilidad comparado con el virus parental (TACV); también en el sobrenadante de VT<sub>1</sub> se pudo detectar una actividad interferente que inhibía en un 90% aproximadamente el rendimiento de TACV.

Con el fin de realizar un estudio más detallado de la población viral liberada por VT<sub>1</sub>, se realizaron curvas de creci-

miento del virus liberado en distintos pasajes de la línea a diferentes temperaturas.

Para ello se infectaron por triplicado células Vero de 48 hs con virus  $VT_1P_1$ ,  $VT_1P_2$  y  $VT_1P_3$ , que se diluyeron hasta obtener una m.i. de 0,01. Como control se infectaron células con virus Tacaribe de cerebro de ratón (TACV-R) y con un clon de Tacaribe obtenido por tres pasajes en células Vero (Cl 122) también a una m.i. de 0,01. Las células infectadas se incubaron a 33, 37 y 40°C y se cosecharon los sobrenadantes durante 10 días p.i.. Se observó y tabuló la ACP y los datos obtenidos se presentan en la Tabla 15.

La acción citopatógena producida por el virus persistente fue distinta de la producida por TACV-R y por el Cl 122 tanto en el momento de su aparición y grado que alcanza como por la morfología particular que adoptan las células infectadas. Estas comienzan a redondearse por focos que fueron aumentando en número y tamaño y el resto de la monocapa fue adquiriendo una apariencia de "empedrado" debido a que las células se volvieron hexagonales. No pudo detectarse la presencia de contaminantes fúngicos ni bacterianos en los sobrenadantes que pudiesen ser eventualmente los responsables de dicho cambio. Cabe señalar además, que la ACP apareció mucho más tardíamente en las células infectadas con virus persistente (6to-8vo día

Tabla 15:

Acción citopatógena producida en células Vero por el virus persistente liberado por la línea VT<sub>1</sub>.

Inóculo	Temp*	grado de ACP días p.i.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cl 122	33	0	0	0	0	1	1	2	4	4	3
	37	0	0	0	0	1	1	2	4	4	3
	40	0	0	0	0	1	1	2	4	3	3
VT <sub>1</sub> P <sub>1</sub>	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	37	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
	40	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2
VT <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	33	0	0	0	0	0	1	1	2	2	4
	37	0	0	0	0	0	1	2	3	4	4
	40	0	0	0	0	0	1	1	3	3	3
VT <sub>1</sub> P <sub>3</sub>	33	0	0	0	0	0	0	0	1	3	4
	37	0	0	0	0	0	0	0	1	4	4
	40	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
TACV-R	33	0	0	1	1	1	2	3	4	4	3
	37	0	0	1	2	2	2	3	3	4	4
	40	0	0	1	1	2	2	2	3	4	4

\*Temp.: °C

p.i.) que en las infectadas con Cl 122 y TACV-R (3ero-5to día p.i.).

Todos los sobrenadantes cosechados se titularon por UFP en células Vero a 37°C y los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 15, 16 y 17.

La multiplicación de virus proveniente de cerebro (Figura 15) mostró que el pico máximo de virus se obtiene entre el 4to. y el 6to. día p.i. a las tres temperaturas, aunque los títulos alcanzados a 40°C fueron en general, siempre menores a los obtenidos a 33 y 37°C. Se consideró, por lo tanto, que la temperatura óptima de replicación de TACV-R era 37°C.

En el caso del Cl 122 (Figura 16), debe tenerse en cuenta que era un stock muy homogéneo (provenía de tres clonados sucesivos) por lo que no fué sorprendente encontrar que había una gran similitud en los títulos a todas las temperaturas ensayadas. En este caso, se obtuvo el título máximo de virus entre el 5to. y el 7mo. día p.i. siendo los títulos alcanzados menores que los de TACV-R en casi una unidad logarítmica.

La idea de observar el crecimiento del virus persistente de tres pasajes sucesivos surgió con el objeto de analizar si a medida que aumentaba la persistencia había o no un enriquecimiento de viriones diferenciales. Pudo comprobarse, sin embargo (Figura 17), que no hubo una relación en cuanto a multi-

Figura 15: Multiplicación del virus Tacaribe obtenido de cerebro en células Vero a distintas temperaturas.

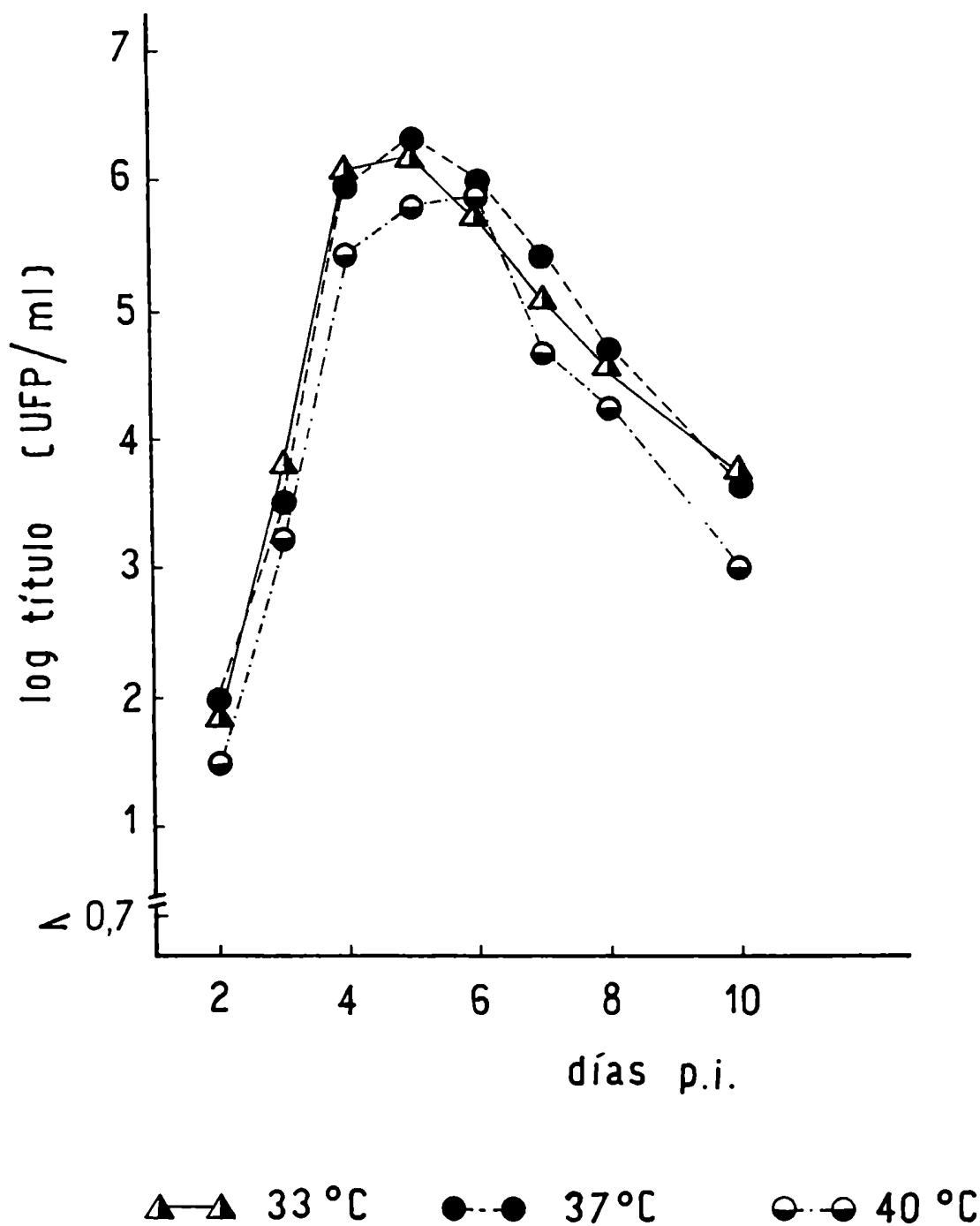
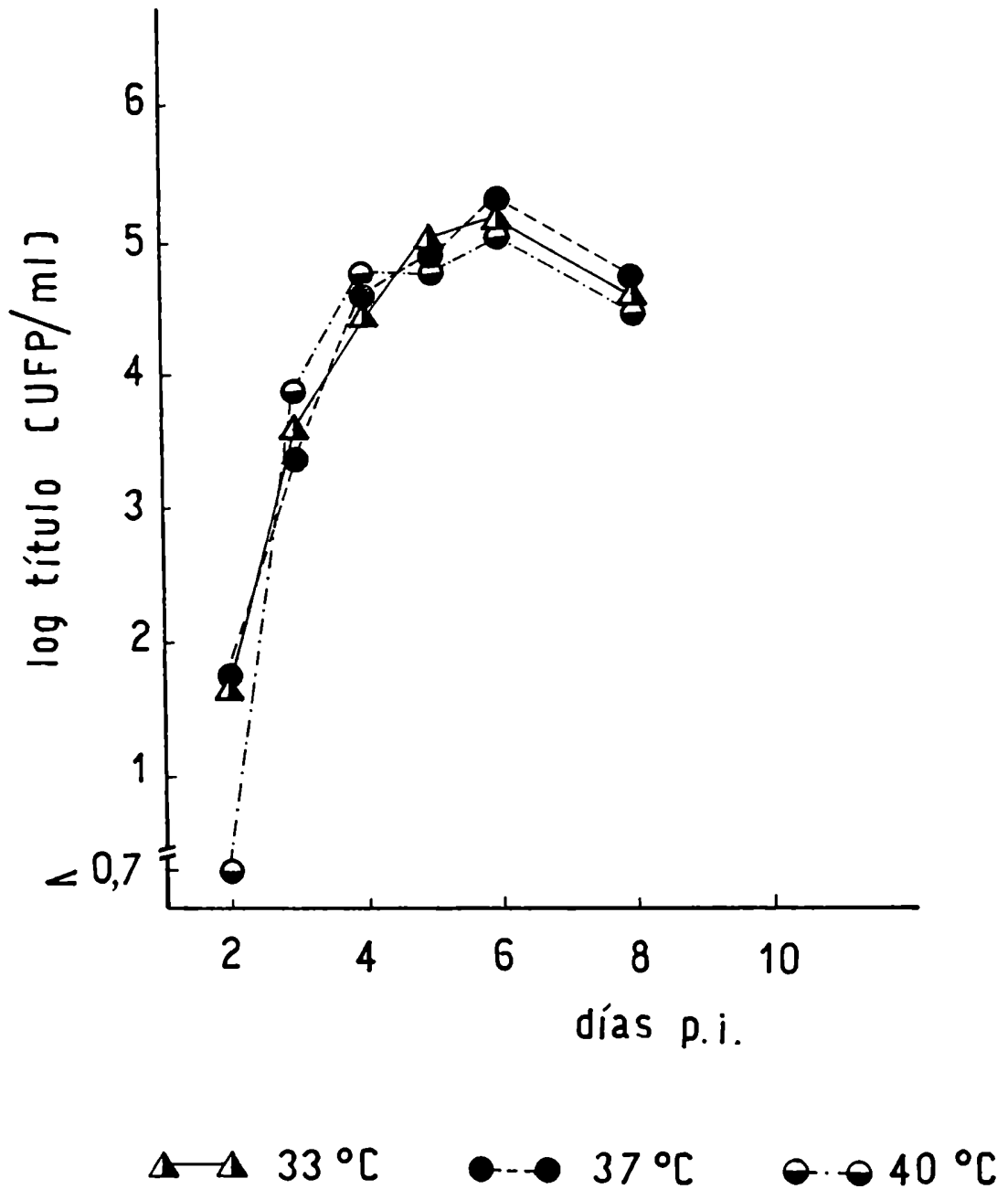


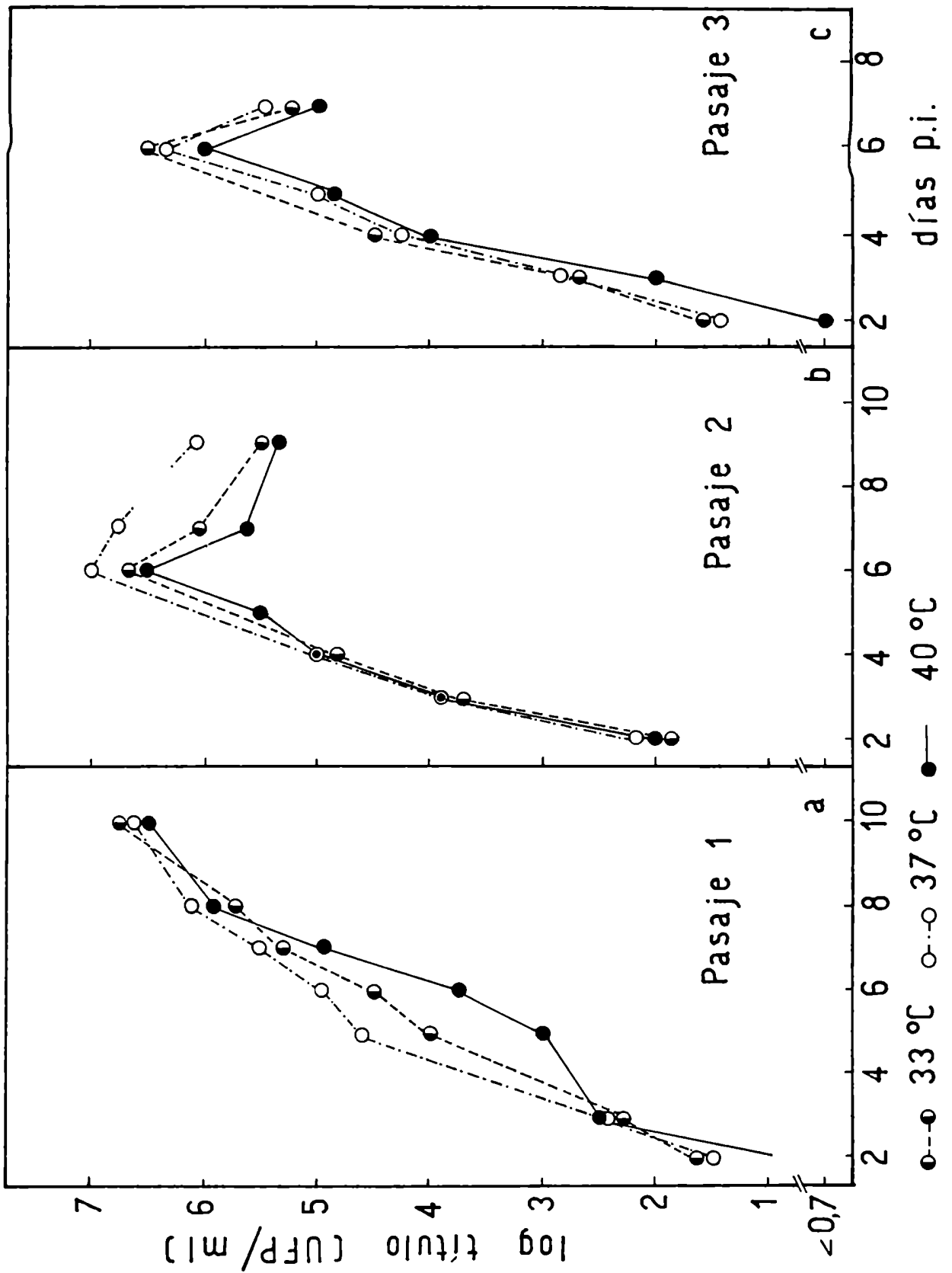
Figura 16: Multiplicación de un clon de virus Tacaribe en células Vero a distintas temperaturas.



plicación del virus liberado en los tres pasajes. El virus presente en el sobrenadante del pasaje 1 (Figura 17 a) multiplicó con igual eficiencia a 33 y 37°C aunque muy lentamente (el título máximo se alcanzó recién al 10mo. día p.i.). La multiplicación de VT<sub>1</sub>p<sub>1</sub> a 40°C fue siempre menor, dando idea de la presencia de algunos viriones termosensibles; pero puede observarse que la eficiencia de replicación 40°C/37°C fluctuó considerablemente a lo largo de los días ensayados. Así, al 3er. día p.i. fue de 2,2, (no considerándose la presencia de mutantes ts) mientras que al 5to. día fue muy inferior (EDR=0,03). En los días subsiguientes, la eficiencia de replicación fue aumentando debido a que las diferencias entre los títulos obtenidos a 40°C y a 37°C fueron siendo cada vez menores. Por lo tanto, se consideró que la línea VT<sub>1</sub> no había liberado viriones ts en el primer pasaje sino que el virus liberado fue considerado como una variante de crecimiento lento dado que, a pesar de no tener más datos posteriores, el título máximo se obtuvo recién a los 10 días p.i. con valores que superan en más de 1 logaritmo a los obtenidos al inocular Cl 122.

Sin embargo, puede observarse en las Figuras 17 b y 17 c que, aunque en ambos pasajes el título máximo se alcanza también a los 6 días p.i., este es superior en casi 2 unidades logarítmicas al título máximo alcanzado por Cl 122. Además, las

Figura 17: Multiplicación del virus liberado en diferentes pasajes por la línea VT<sub>1</sub> en células Vero a distintas temperaturas.





curvas de crecimiento de ambos sobrenadantes ( $VT_1P_2$  y  $VT_1P_3$ ) presentaron una cinética distinta en función del tiempo llegando más lentamente al pico máximo de virus. Las pendientes de dichas curvas fueron más pronunciadas que la obtenida para el Cl 122 (Figura 16) donde puede observarse que la diferencia de títulos entre el 4to. y el 6to. día p.i. (título máximo) es pequeña (menos de un logaritmo). Por el contrario, en el caso de  $VT_1P_2$  y  $VT_1P_3$  las diferencias entre el título al 4to. y al 6to. día son de aproximadamente 2 unidades logarítmicas.

De hecho, no pudo confirmarse la presencia de variantes de crecimiento lento en ambos sobrenadantes, por lo que, al no haber una selección de las mismas en función del tiempo no puede asegurarse que en el caso de la línea  $VT_1$ , la persistencia del virus sea mantenida por dichas variantes.

### CONCLUSIONES PARCIALES

Las características de las líneas persistentes analizadas pueden resumirse en:

- Todas se originan de células que sobrevivieron a la infección aguda con virus Tacaribe.
- El sustrato donde se origina el virus parental (cultivo de tejido o cerebro de ratón) no altera el establecimiento de la persistencia.
- Todas las líneas presentan una Etapa Productiva con liberación de virus y una no productiva sin liberación de viriones.
- La multiplicidad de infección del inóculo y el origen del virus parental no tienen relación con la duración de la Etapa Productiva.
- Los cultivos son morfológica y fisiológicamente iguales a las células Vero normales y a la línea VT<sub>8</sub>.
- Todos los cultivos son resistentes a la sobreinfección con virus homotípico.
- Algunas líneas liberaron viriones termosensibles que también presentaron un fenotipo termolábil.
- El virus persistente liberado por algunas líneas era más patógeno para el ratón lactante y esto concuerda con su carácter ts.
- Los sobrenadantes ricos en mutantes ts no fueron capaces de

iniciar persistencia.

- Solamente un sobrenadante (de la línea VT<sub>1</sub>) presentó una alta actividad interferente y fue posible iniciar una infección persistente con él.
- El sobrenadante del primer pasaje de la línea VT<sub>1</sub> era rico en variantes de crecimiento lento.
- Durante la persistencia se seleccionan variantes de diferente tipo.

II) Factores que condicionan la iniciación de la infección persistente

En general, todos los estudios realizados por otros investigadores hasta este momento tendían a analizar la progenie viral liberada por los cultivos persistentes (131) y demostrar cuáles eran los mecanismos involucrados en el mantenimiento de las infecciones crónicas (97).

Uno de los objetivos básicos de esta investigación fué analizar el o los factores responsables del establecimiento de la persistencia del virus Tacaribe en células Vero.

De los resultados obtenidos anteriormente nos planteamos dos hipótesis:

- a) La presencia de mutantes ts altamente citolíticas impedía el establecimiento de la persistencia.
  - b) Las partículas interferentes (PI) eran las responsables de modular la citólisis y permitir que se inicie la persistencia.
- a) Esta hipótesis plantea que las mutantes termosensibles tenían una citopatogenicidad tan acentuada que no permitían, luego de varios ciclos de multiplicación, el establecimiento de la persistencia porque las células del cultivo morían progresivamente.

Habíamos demostrado que el virus persistente aislado

de las líneas VT<sub>8</sub> y VT<sub>2</sub> eran citolíticos para las células Vero e incapaces de establecer persistencia. Dado que dichos sobrenadantes presentaban variantes virales con carácter termosensible cuya multiplicación era afectada a 40°C, se decidió por lo tanto, probar si al hacer crecer dichos viriones a la temperatura restrictiva, la capacidad citolítica se vería inhibida. Para ello se realizaron infecciones de células Vero con 0,2 ml de VT<sub>8</sub>p<sub>4</sub> (sobrenadante del 4to. pasaje de la línea VT<sub>8</sub>) y de VT<sub>2</sub>p<sub>2</sub> (sobrenadante del 2do. pasaje de la línea VT<sub>2</sub>) y como control se infectó un cultivo con 0,2 ml de TACV. Luego de 1 hora de adsorción a 37°C se volcaron los inóculos y se cubrieron las monocapas con medio de mantenimiento. Todos los cultivos se incubaron posteriormente a 40°C. Luego de 2 días se observó la presencia de focos de ACP en los tres cultivos. A medida que pasaban los días, esta progresaba pero siempre con mayor intensidad en los cultivos infectados con virus ts. Luego de 10 días en el control comenzaron a aparecer clones celulares que, con cambios periódicos de medio permitieron repoblar la monocapa. Llamativamente, las mutantes ts produjeron la destrucción total del cultivo sin recuperación celular.

Los resultados obtenidos pueden ser interpretados des-

de dos aspectos distintos: uno supone que los sobrenadantes persistentes no son homogéneos y, aunque son ricos en mutantes ts también pueden contener viriones revertantes (ts+) de modo tal que al realizar la incubación a la temperatura restrictiva (40°C) las mutantes ts tendrían inhibida su replicación pero no los viriones revertantes que replicarían normalmente y serían los que en definitiva llevarían a la destrucción celular. Por otro lado, y debido a que a la temperatura restrictiva hay algo de replicación de las mutantes ts aunque ésta está muy disminuída, se puede suponer que la mutación ts presenta un fenotipo "leaky"; o sea que la mutante puede replicar un poco a la temperatura restrictiva. Esa mínima multiplicación es suficiente para destruir al cultivo. Otra posibilidad sería que la temperatura restrictiva real para estas mutantes no sea exactamente 40°C sino otra temperatura algo superior, por lo que las mutantes podrían replicar algo a 40°C.

- b) La otra hipótesis se basó en los resultados que obtuvimos anteriormente; esto es, en las partículas interferentes. Dado que la presencia de PI era determinante del establecimiento de la persistencia en otros sistemas virus-célula y que también en nuestro caso su presencia permitía el establecimiento de la infección persistente, nos propusimos

obtener un stock de virus Tacaribe rico en PI y otro libre de las mismas.

#### Obtención de un stock de TACV libre de PI

Una metodología comúnmente utilizada para obtener stocks virales libres de partículas interferentes es clonar virus en cultivos celulares.

Dado que el virus Tacaribe que se utiliza de rutina proviene de un macerado de cerebro de ratón lactante infectado y que contiene una apreciable cantidad de PI se decidió clonarlo por tres pasajes en células Vero con el objeto de eliminarlas. Para ello se realizaron tres clonados sucesivos por el método de placas siguiendo los pasos explicados en Materiales y Métodos. Se inocularon 50 UFP de TACV en células Vero y a los 7 días se picaron dos placas aisladas (Cl 1 y Cl 2) que se amplificaron por un pasaje en células Vero. Estos clones se plaquearon nuevamente y se picó una placa de cada uno, que, luego de amplificadas (Cl 11 y Cl 22), se plaquearon y dieron origen a 5 clones cada uno. Todos los clones obtenidos fueron titulados por UFP y ensayados para determinar si estaban libres de PI. Para ello se realizaron ensayos de interferencia de cada uno. En la Tabla 16 se pueden observar los resultados obtenidos.

Puede observarse que el título de los clones fue disminu-

Tabla 16:

Obtención de clones de TACV.

Primer clonado	título (UFP/ml)	Segundo clonado	título (UFP/ml)	Tercer clonado	título (UFP/ml)	%AI*
Cl 1	$1,37 \times 10^6$	Cl 11	$1,30 \times 10^5$	Cl 111	$3,25 \times 10^3$	48
				Cl 112	$1,40 \times 10^4$	46
				Cl 113	$1,07 \times 10^4$	21
				Cl 114	$4,00 \times 10^4$	48
				Cl 115	$4,70 \times 10^3$	72
Cl 2	$2,40 \times 10^6$	Cl 22	$2,85 \times 10^5$	Cl 221	$3,20 \times 10^3$	79
				Cl 222	$2,50 \times 10^4$	35
				Cl 223	$1,45 \times 10^4$	42
				Cl 224	$4,52 \times 10^4$	81
				Cl 225	$3,50 \times 10^3$	73

Rendimiento 20 hs TACV =  $2,8 \times 10^4$  UFP/ml

---

\*%AI:  $\frac{\text{rendimiento 20 hs sin interferente} - \text{rendimiento 20 hs con interferente}}{\text{rendimiento 20 hs con interferente}} \times 100$



yendo a medida que se reclonaba y que, por esta metodología no pudo obtenerse un stock que no tuviese actividad interferente, dado que el menor porcentaje de interferencia obtenido fue de 21% que, aunque es un valor muy bajo y no muy representativo de la presencia de PI, indica que dicho clon no está libre de actividad interferente. Aún así, es de hacer notar que los distintos clones tienen diferente capacidad para inducir PI.

#### Obtención de un stock rico en PI

Para obtener un stock rico en partículas interferentes se realizaron pasajes concentrados de virus Tacaribe siguiendo la metodología descrita por Help (42).

Para ello se infectaron células Vero con TACV a una m.i. de 1 UFP/cél siguiendo en procedimiento explicado en Materiales y Métodos. Al 4to. día p.i. se cosechó el sobrenadante que se centrifugó a 1.500 rpm y se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se lo denominó  $\text{PC}_1$  (pasaje concentrado 1). Posteriormente se obtuvo  $\text{PC}_2$  y así sucesivamente hasta obtener  $\text{PC}_5$ . Estos pasajes concentrados fueron titulados por UFP y posteriormente se determinó su capacidad interferente mediante ensayos de interferencia de la replicación de TACV. Los datos se presentan en la Tabla 17.

Luego de 5 pasajes concentrados y contrariamente a lo que sucede con el virus Junín (41), no hubo un enriquecimiento en

Tabla 17:

Características de los pasajes concentrados de TACV en células Vero.

Pasaje	Título (UFP/ml)	%AI*
PC <sub>1</sub>	1,1 x 10 <sup>6</sup>	79,11
PC <sub>2</sub>	2,8 x 10 <sup>5</sup>	68,03
PC <sub>3</sub>	8,1 x 10 <sup>4</sup>	58,10
PC <sub>4</sub>	2,2 x 10 <sup>3</sup>	16,07
PC <sub>5</sub>	1,5 x 10 <sup>5</sup>	42,50
TACV	1,5 x 10 <sup>5</sup>	

\*%AI:  $\frac{\text{Rendimiento sin interferente} - \text{rendimiento con interferente}}{\text{Rendimiento con interferente}} \times 100$

partículas interferentes. El título descendió en los cuatro primeros pasajes para luego aumentar. El porcentaje de actividad interferente tuvo la misma variación que el título y acompañó en forma paralela a éste. No se observó la disminución de las UFP acompañada de un aumento en las PI como era de esperar debido a que estas últimas solamente pueden replicar a expensas de las partículas infecciosas.

Debido a la incapacidad de obtener un stock rico en partículas PI pero libre de viriones infecciosos, se decidió irradiar a los pasajes concentrados con luz ultravioleta con el objeto de inactivar las UPF ya que se sabía que éstas eran sensibles a dicha longitud de onda; con el fin de determinar si las PI de Tacaribe eran resistentes al UV como ocurría con la interferencia del virus Junín (42), se irradiaron los pasajes concentrados y se comparó la inactivación de la capacidad interferente y de la infectividad.

Las muestras se procesaron como se explica en Materiales y Métodos y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 18.

La irradiación abolió la infectividad de los stocks de los pasajes concentrados pero no su capacidad de producir interferencia. En este sentido, las partículas interferentes de Tacaribe se comportan como las del virus Junín (42). De

Tabla 18:

Sensibilidad de la interferencia a la luz ultravioleta.

Material inoculado	Título (UFP/ml)	%AI*
PC <sub>1</sub>	5,8 x 10 <sup>5</sup>	78
PC <sub>1</sub> + UV	∠ 5	79
PC <sub>2</sub>	1,5 x 10 <sup>5</sup>	68
PC <sub>2</sub> + UV	∠ 5	65
PC <sub>3</sub>	4,1 x 10 <sup>4</sup>	59
PC <sub>3</sub> + UV	∠ 5	60
PC <sub>4</sub>	1,1 x 10 <sup>3</sup>	16
PC <sub>4</sub> + UV	∠ 5	15
PC <sub>5</sub>	7,2 x 10 <sup>4</sup>	41
PC <sub>5</sub> + UV	∠ 5	42
Control	3,9 x 10 <sup>4</sup>	-

\*%AI:  $\frac{\text{rendimiento sin interferente} - \text{rendimiento con interferente}}{\text{rendimiento sin interferente}} \times 100$

este modo, se pudo lograr artificialmente un stock de virus TACV con actividad interferente y libre de UFP, que se utilizó para probar la participación de dichas partículas en la iniciación de la persistencia.

Con el objeto de analizar que clase ó clases de partículas intervenían en el establecimiento de las infecciones crónicas o sea, cuáles eran las partículas cuya presencia regulaba la lisis celular producida por el virus estándar y llevaba a la infección persistente, se realizaron infecciones con inóculos virales cuya composición estaba caracterizada cualitativamente.

Se diseñó entonces una experiencia en la cual se utilizaron inóculos de distinta procedencia para realizar las infecciones y se observó el progreso de la ACP hasta la recuperación de la monocapa celular. Los distintos stocks y sus características se detallan en la Tabla 19.

Se infectaron células Vero con 0,2 ml de cada uno de los stocks mencionados (Tabla 19) a una m.i. aproximada de 0,1 UFP/cél. En algunos casos se utilizó como inóculo una mezcla de dos de ellos. Luego de una hora de adsorción a 37°C se volcó el inóculo, se lavó la monocapa con PBS y se agregó medio de mantenimiento. Los cultivos se incubaron a 37°C y se observó la evolución de la ACP y posterior recuperación celular. Aque-

Tabla 19:

Características de los stocks utilizados para iniciar persistencia.

Stock	Origen	ts*	tl <sup>&amp;</sup>	AI <sup>#</sup>	Título (UFP/ml)
VT <sub>8</sub> P <sub>4</sub>	SN <sup>o</sup> del 4to pasaje de VT <sub>8</sub>	si	si	3,1%	2,5 x 10 <sup>3</sup>
VT <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	SN del 2ndo pasaje de VT <sub>2</sub>	si	si	0%	3,1 x 10 <sup>2</sup>
TACV-R	cerebro de ratón	no	no	43%	1,5 x 10 <sup>8</sup>
C1 <sub>122</sub>	TACV-R clona <u>na</u> en Vero	no	no	35%	2,4 x 10 <sup>4</sup>
PC <sub>2</sub>	2do pasaje concentrado	no	no	68%	2,8 x 10 <sup>5</sup>
PC <sub>2</sub> + UV	PC <sub>2</sub> irradia <u>do</u> con UV	no	no	65%	∠ 5

\*ts: Termosensibilidad

&tl: Termolabilidad

#AI: Actividad interferente

<sup>o</sup>SN: Sobrenadante

llos cultivos recuperados fueron repicados aproximadamente a los 12-14 días p.i. estableciéndose así líneas persistentes en cada caso.

Los resultados obtenidos con estas infecciones se presentan en la Tabla 20.

A esta altura de los resultados, se podría inferir que la presencia de las partículas interferentes jugaban un papel importante en el establecimiento de la persistencia; pero quedaban aún por resolverse algunas incógnitas.

En primer lugar y de acuerdo con estos resultados se puede suponer que las mutantes *ts* no establecen persistencia por sí solas porque a) no generan partículas interferentes o b) porque no son sensibles a su efecto interferente.

De acuerdo con los datos de la Tabla 18, la primera explicación parecería ser la correcta. Como la infección a 40°C con la mutante *ts* no genera infección persistente, entonces se puede suponer que o bien la temperatura absoluta de las mismas es superior a 40°C y por lo tanto no se generan PI pero el virus que multiplica igualmente es *ts* o bien que, como no está clonado, parte de población revierte al parental (*ts*<sup>+</sup>). Si este es nuestro caso, sabemos que el virus parental normalmente genera PI, entonces se podría suponer que la actividad interferente de las PI se anula a 40°C. Por ese motivo se diseñó el siguiente

Tabla 20:

Obtención de líneas persistentemente infectadas utilizando distintos inóculos

Inóculo	ACP <sup>&amp;</sup>	% destrucción celular	Recuperación celular	Repique	Sobreinf.*	Línea establecida
VT <sub>8</sub> P <sub>4</sub>	+4	100	no	no	-	
VT <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	+4	100	no	no		
TACV-R	+4	90	si	si	resist**	VT <sub>11</sub>
C1122	+4	90	si	si	resist	VT <sub>22</sub>
PC <sub>2</sub>	+2	20	si	si	resist	VT <sub>p</sub>
PC <sub>2</sub> +UV	0	0	-	si	sensible	VT <sub>pirr</sub> #
VT <sub>8</sub> P <sub>4</sub> +PC <sub>2</sub> +UV	+4	90	si	si	resist	VT <sub>8pi</sub>
VT <sub>2</sub> P <sub>2</sub> +PC <sub>2</sub> +UV	+4	90	si	si	resist	VT <sub>2pi</sub>

<sup>&</sup>ACP: grado de acción citopatogénica

\* Sobreinf: sobreinfección con 100 UFP de TACV

\*\* Resist: resistente a la sobreinfección

#VT<sub>pirr</sub>: línea Vero normal



experimento: se realizó un ensayo de interferencia en paralelo a 37°C y 40°C para determinar si la interferencia se mantenía a la temperatura restrictiva.

Para ello se infectaron células Vero con 0,2 ml de PC<sub>2</sub> + UV concentrado ó con medio de mantenimiento (control). Luego de 1 h a 37°C se desafiaron los cultivos con 100 UPF de TACV y de VT<sub>2</sub>P<sub>2</sub>. Se reincubaron las células a 37°C durante una hora y luego de volcar los inóculos y lavar las monocapas, se cubrieron con volúmenes iguales de medio de mantenimiento. Todas las infecciones se realizaron por duplicado y se incubaron en paralelo a 37 y a 40°C. Los cultivos se observaron durante 10 días y se vio que aquellos que fueron inoculados con el material interferente no presentaron ACP a ninguna de las 2 temperaturas, o sea que la interferencia producida por las PI fue efectiva tanto a la temperatura permisiva como a la restrictiva.

De esta forma se pudo demostrar que, dado que las mutantes no son capaces de generar partículas PI, las partículas interferentes serían las responsables del establecimiento de la persistencia de virus Tacaribe en células Vero.

III) Análisis de las líneas persistentes originadas por coinfección de PI y las mutantes ts

Uno de los aspectos de la coinfección con virus irradiado que se consideró fue la posibilidad de que las líneas persistentes originadas de la coinfección con virus persistente y  $PC_2 + UV$  no presentaran las características anteriormente estudiadas para todas las líneas establecidas que se analizaron.

Por ello se estudiaron los cultivos persistentes originados de la infección mixta. Las líneas obtenidas y sus características se presentan en la Tabla 21.

Puede observarse que al inocular  $VT_{8p_4}$  y  $VT_{2p_2}$  se desarrolló una intensa ACP (Grado +4) que destruyó totalmente al cultivo no pudiéndose recuperar la monocapa como vimos anteriormente. Cabe recordar que ambos inóculos eran ts y no presentaban actividad interferente. Cuando dichos stocks se mezclaron con el pasaje concentrado 2 ( $PC_2$ ) rico en PI e irradiado con luz ultravioleta y se realizó la coinfección de células Vero, se observó una gran ACP que no destruyó al cultivo y le permitió, con posteriores cambios de medio de mantenimiento, recuperarse dando origen a líneas persistentemente infectadas ( $VT_{8pi}$  y  $VT_{2pi}$ ). Este hecho, conjuntamente con la imposibilidad de  $PC_2 + UV$  de realizar una infección productiva (las células infectadas no desarrollaron ACP, no liberaron virus y

Tabla 21:

Características de las líneas persistentemente infectadas  
obtenidas por coinfección.

Inóculo	Línea	N° de pasajes	Días in-vitro
PC <sub>2</sub>	VT <sub>pi</sub>	11	110
VT <sub>8p<sub>4</sub></sub> +PC <sub>2</sub> +UV	VT <sub>8pi</sub>	14	140
VT <sub>2p<sub>2</sub></sub> +PC <sub>2</sub> +UV	VT <sub>2pi</sub>	14	120
TACV-R	VT <sub>11</sub>	13	118

fueron sensibles al desafío con 100 UFP de TACV) apoyaron la hipótesis de que las partículas interferentes eran las responsables de modular la citopatogenicidad de los viriones infectivos y lograr un equilibrio que permite el inicio de la persistencia.

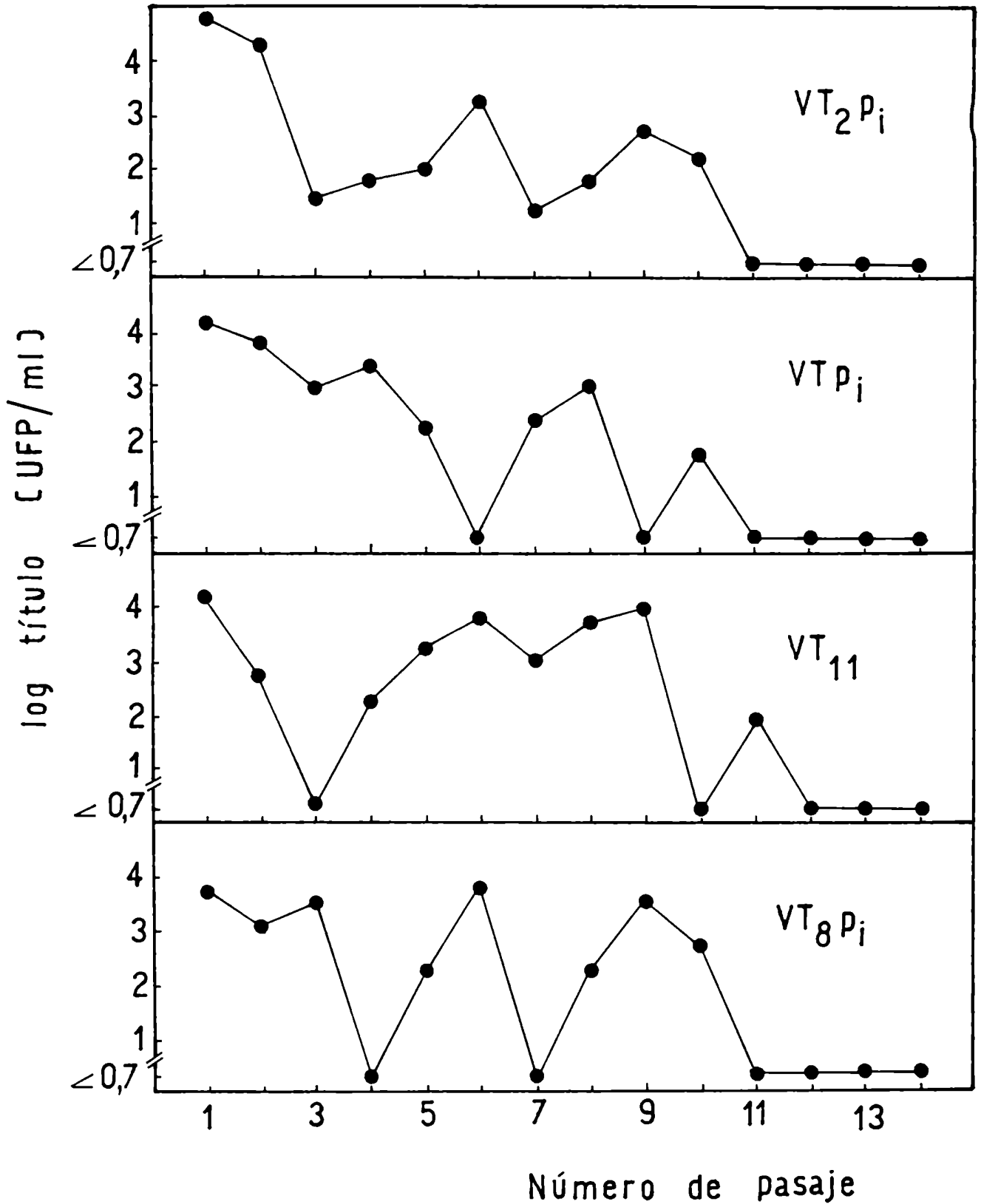
El stock de PC<sub>2</sub> sin irradiar, prácticamente no produjo ACP (+2) pero después de repicar a las células infectadas, éstas fueron resistentes al desafío con TACV. Luego de irradiar durante 5 min. a PC<sub>2</sub>, la infectividad se pierde totalmente y las células infectadas con el no presentan ACP. Al desafiar a dicho cultivo no hubo inhibición de la multiplicación de TACV por lo que fue considerado como un cultivo de células Vero normales (VT<sub>pirr</sub>). Este fenómeno permitió observar que el virus irradiado con luz ultravioleta no muestra reactivación de la infectividad al ser inoculado en células.

Los sobrenadantes de dichas líneas se titularon por UPF en células Vero y los resultados se presentan en la Figura 18.

Como se observa, las líneas VT<sub>8pi</sub> y VT<sub>2pi</sub> presentaron un patrón de liberación viral cíclico en una primera Etapa Productiva al igual que VT<sub>8</sub>. Luego de 11 pasajes y de 10 pasajes para VT<sub>8pi</sub> y VT<sub>2pi</sub> respectivamente, los cultivos entraron en una Etapa no Productiva.

En cuanto a la liberación de virus, estas líneas se com-

Figura 18: Producción de virus por distintas líneas de células Vero persistentemente infectadas con virus Tacaribe de diferentes orígenes.



portaron como las estudiadas anteriormente, por lo que se consideró que la mezcla in-vitro del inóculo que originó la infección puede considerarse como un artefacto que refleja la composición heterogénea que debe presentar un stock viral para dar origen a una infección persistente. Aún así, y para evitar que algún factor fisiológico celular pueda estar involucrado en este tipo de infecciones, al iniciar las nuevas líneas por coinfección, se iniciaron como control líneas persistentes utilizando como inóculo al virus parental (TACV-R) y al pasaje concentrado que luego fue irradiado para realizar la coinfección. Dado que estas líneas se iniciaron luego de casi 2 años de iniciada  $VT_8$ , cabía la posibilidad que el cultivo celular presentara alguna diferencia que aunque no se observaba a nivel morfo ni fisiológico pudiese estar enmascarado. De todos modos, dado que los cultivos celulares se utilizaron en pasajes similares, no resultó llamativo encontrar que tanto  $VT_{11}$  como  $VT_{pi}$  se comportaran exactamente igual a  $VT_8$  en cuanto a la evolución de la infección y al patrón de liberación de virus al medio extracelular.

## DISCUSION

La multiplicación del virus Tacaribe en células Vero genera tanto viriones infectivos (estándar) como partículas interferentes (PI). La posibilidad de liberar al virus estándar de las PI es dificultosa y hemos demostrado (Tabla 16) que utilizando el clonado viral como metodología resulta casi imposible obtener partículas virales infecciosas sin contaminación con PI. Se observa que (Tabla 16) la capacidad de generar dichas partículas es distinta para diferentes stocks virales.

La propiedad que presentan las PI de interferir con la multiplicación de las partículas virales citolíticas, favorece el establecimiento de una infección persistente, aunque el mecanismo íntimo de la interferencia de las PI del virus Tacaribe no se conoce.

Huang y Baltimore (53) han hecho un compendio de los mecanismos por los cuales las PI inhiben eficiente y específicamente el crecimiento del virus estándar, multiplicando a expensas de la replicación del genoma viral e inhibiendo indirectamente la transcripción secundaria y la traducción de los productos virales. En base a todos los datos compendiados, estos autores postulan que, para el virus VSV, las secuencias de ARN complementarias e invertidas que aparecen cuando se generan las PI serían importantes en su habilidad para competir

con el genoma viral por la replicasa. Ellos demostraron además que la interferencia mediada por PI no ocurre a nivel de adsorción o penetración viral.

Las partículas interferentes del virus Tacaribe han sido estudiadas por Giménez y Compans (38) quienes observaron por inmunofluorescencia e inmunoprecipitación y análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida que las PI presentaban un perfil de polipéptidos similar al de los viriones estándar de Tacaribe. Además, observaron que las PI obtenidas de células BHK persistentemente infectadas no presentaban los segmentos L y S de ARN pero en su defecto contenían 5 segmentos pequeños de ARN de PM  $1,1-0,2 \times 10^6$ . Estas PI perdían su capacidad de interferir con la replicación del virus salvaje al ser tratadas con inmunosuero antiviral Tacaribe o irradiadas con luz UV, por lo que postularon que la interferencia ocurría durante algún paso intracelular de la replicación que requiere un genoma funcional.

Nosotros hemos obtenido evidencia (Tabla 18) que las PI obtenidas por pasajes a alta multiplicidad del virus Tacaribe en células Vero son altamente resistentes a la luz UV por cuanto no pierden su actividad interferente al ser irradiadas. Esta observación concuerda con los resultados que se habían obtenido anteriormente para las PI de los virus Junín (42),



LCM (61)(125), Pichinde (24) y Paraná (105) por lo que se postula que la interferencia no necesitaría de un genoma funcional de las PI y que el mecanismo responsable de la interferencia de los Arenavirus es diferente y exclusivo de dicha familia debido a que, en general, la mayoría de las PI de los virus animales resultan sensibles a la luz UV (53).

Hemos demostrado que el establecimiento de la infección persistente de células Vero con virus Tacaribe depende de la presencia de las PI en el inóculo inicial (Tabla 20). Estas partículas modularían la infección interfiriendo con la multiplicación del virus estándar de tal forma que se establecería un equilibrio que permitiría que en ciertas células del cultivo infectado el ciclo de replicación viral sea menos dañino y destructivo para la célula. Estas células se dividirían en menor tiempo que el necesario para completar el ciclo lítico viral y sobreviviría a la infección.

La importancia de las PI en el establecimiento de la persistencia es un fenómeno que se ha descrito para varios sistemas virus-célula (53) aunque el mejor caracterizado es el sistema virus VSV-células L<sub>929</sub>. En este caso, Youngner y Col (129)(132) trataron pero sin éxito, de iniciar persistencia utilizando como inóculo viral virus VSV libre de PI; mientras que Holland y Villarreal (47) pudieron establecer una infec-

ción persistente cuando las células eran infectadas con virus estándar en presencia de un exceso de PI. Mediante estas experiencias postularon (47) la hipótesis que asigna a las PI un papel determinante en el establecimiento de la infección persistente de VSV en células L<sub>929</sub>.

Las células Vero que sobreviven a la infección aguda con virus Tacaribe son las responsables, luego de varias divisiones mitóticas de generar una monocapa celular persistentemente infectada (Vero-Tac). Este cultivo crónico presenta las mismas características culturales que las células sin infectar, por lo que postulamos que la presencia del virus Tacaribe en las células Vero-Tac no produce en ellas alteraciones aparentes en la morfología celular ni modifica ciertos parámetros como tiempo de duplicación celular y requerimientos nutritivos entre otros.

La apariencia normal de las células crónicamente infectadas es una característica observada en distintos sistemas celulares persistentemente infectados con Arenavirus. Damonte (21) (25) demostró que las células Vero portadoras de una infección crónica con virus Tacaribe no presentan alteraciones citogenéticas a nivel de los cromosomas celulares, y Oldstone y col. (80) estudiando células de neuroblastoma persistentemente infectadas con virus LCM no observaron alteraciones morfológicas de

las células, aunque estas presentaban pequeñas diferencias en la producción de enzimas no vitales que no afectaban la síntesis de ADN ni ARN ni de proteínas celulares.

Los cultivos Vero-Tac presentan dos fases fácilmente diferenciables durante su evolución: una primera etapa productiva que lleva, en función del tiempo, a una segunda etapa no productiva (Figuras 1, 12, 13 y 14). La primera etapa del cultivo está caracterizada por la liberación cíclica de virus al medio extracelular con títulos siempre inferiores a los de la infección aguda (Figura 1). La producción viral va declinando a medida que progresa la persistencia hasta que, la ausencia de virus infectivo en el extracelular marca el inicio de la etapa no productiva.

Este mismo patrón de liberación viral se encontró en diferentes cultivos portadores de infecciones crónicas con Arenavirus: células Vero-virus Junín (6) (23), BHK<sub>21</sub>-Paraná (106) y BHK<sub>21</sub>-LCM (106) en los cuales la etapa productiva tiene una duración diferente para cada sistema pero invariablemente lleva a la desaparición de la infectividad en el sobrenadante. Este tipo de comportamiento sin embargo, no fue el observado cuando los cultivos carrier se obtenían por infección de células Vero con virus Pichinde y Tamiami (24); en estos sistemas se puede detectar virus infeccioso durante todos los pa-

sajes celulares estudiados aunque con bajos títulos.

La resistencia total del cultivo Vero-Tac a la sobreinfección con virus homotípico (Figura 5), considerada como demostrativa de la persistencia viral y observada en todos los cultivos persistentes establecidos, y la falta de resistencia a la sobreinfección con virus heterólogos, es una característica común a cualquier sistema celular crónicamente infectado con Arenavirus descritos hasta el momento (17) (38) (54) (86) (121). Hemos demostrado que las células Vero-Tac permiten la adsorción del virus homotípico sobreinfectante por lo que postulamos que la resistencia se produciría en una etapa posterior de la replicación viral, posiblemente en la penetración o desnudamiento.

Por el contrario, los cultivos persistentes presentan una resistencia diferencial a la sobreinfección con virus heterotípicos. La respuesta celular a la sobreinfección con virus Junín o Pichinde es dependiente de la relación o parentesco antigénico entre estos virus y el virus Tacaribe. De hecho, el cultivo Vero-Tac excluye al virus Junín (Figura 6) aunque no totalmente, comportándose como un sistema semipermisivo para la replicación del mismo. La inhibición de la multiplicación del virus Junín en células Vero-Tac estaría apoyada por la cercanía antigénica encontrada por Casals y Col. (15) para los

virus Junín y Tacaribe por fijación de complemento y neutralización. El comportamiento del virus Pichinde en cultivos Vero-Tac (Figura 7) por el contrario, es completamente diferente al observado para el virus Junín; las células resultan permisivas para la replicación del mismo, aportando evidencia sobre la falta de relación entre estos dos miembros del complejo Tacaribe. Esta lejanía antigénica fue postulada por Damonte y Col. (24) mediante sobreinfección con virus Pichinde de cultivos persistentemente infectados con virus Tacaribe. Además, estos virus no presentan reacción cruzada por fijación de complemento (15) ni por neutralización (120).

La posibilidad que tiene el virus VSV (Rhabdoviridae) de replicar en las células Vero-Tac (Figura 8) descartan la posible acción del interferón como agente que confiere inmunidad al cultivo persistente. Además, Desmyster y Col. (26) demostraron que las células Vero son defectivas en la producción de interferón, aunque Ayerra de Holstein y Col. (3) trabajando en otro sistema celular concluyeron que el virus Tacaribe induce interferón aunque en bajos niveles al igual que el virus Junín (7).

Las observaciones realizadas mediante inmunofluorescencia de la expresión de antígenos virales en las células Vero-Tac resultaron llamativas. La proporción de células del cultivo

con antígeno citoplasmático como de membrana fue muy baja (10%) determinándose que esta misma proporción fue hallada en cultivos Vero-Tac que se encontraban tanto en la etapa productiva como en la no productiva. Este hecho contrasta llamativamente con los resultados obtenidos por Welsh y Buchmeier (121) quienes estudiando células L y BHK persistentemente infectadas con virus LCM encuentran en el sistema L-LCM que solamente un 4-10% de las células expresan antígenos de superficie, mientras que de un 60 a un 80% de las mismas contienen antígeno viral intracitoplasmático. Un resultado similar fue observado para el sistema BHK-LCM. El hecho que las células expresen más antígeno citoplasmático que de membrana, llevó a estos autores (121) a suponer que había una reducción generalizada en la síntesis de proteínas virales que se observaba con mayor facilidad en la superficie celular. Asimismo, Staneck y Col. (106) trabajando con infecciones persistentes de células BHK con virus Paraná y LCM encontraron que aproximadamente el 90% de las mismas presentaban antígeno viral detectable por inmunofluorescencia en citoplasma y en membrana celular tanto en la etapa productiva como en la no productiva de la infección. Más aún, en un trabajo realizado con células Vero persistentemente infectadas con virus Junín, Coto y Col. (17) encontraron que un 20% de las células presentaban antígeno vi-

ral localizado en el citoplasma mientras que solamente de un 3 a un 4% de las mismas expresaban antígeno viral en la membrana citoplasmática.

Todos los resultados anteriormente mencionados llevan a concluir que la persistencia de los Arenavirus in-vitro no es un fenómeno que se pueda generalizar sino que es o se expresa en forma diferente en distintos sistemas celulares y condiciones de mantenimiento de los mismos. Aún así, no podemos explicar ciertas observaciones realizadas en los cultivos de Vero-Tac. Por ejemplo, si los cultivos en la etapa productiva tienen la capacidad de liberar virus infectivo al medio extracelular es porque en todas o algunas células se produce el ciclo completo de replicación viral, pero, dado que solamente un 10% de las células sintetizan antígenos virales tanto citoplasmáticos como de membrana, serían estas las responsables de liberar viriones infecciosos. Sin embargo, durante la etapa no productiva también se observa que un 10% de las células presentan fluorescencia positiva aunque no hay síntesis de viriones infectivos. Podría suponerse que éstas células no liberan viriones infectivos pero si otro tipo de partículas virales como por ejemplo PI, pero más adelante se verá que aunque hay producción de PI en la etapa no productiva, esta es tan baja que sólo puede detectarse interferencia luego de concentrar los

sobrenadantes 100 veces.

Mediante la técnica de producción de centros infecciosos se estudió la proporción de células del cultivo Vero-Tac capaz de liberar viriones infecciosos. Los valores obtenidos fueron muy bajos en la etapa productiva ya que oscilaron entre 0,01 y 0,0001% del total de células sembradas (Tabla 1). Aunque esta técnica tiene una eficiencia muy baja, los valores obtenidos en este sistema son muy inferiores a los hallados en la infección aguda con virus Junín, donde se encontró que en aproximadamente un 3% de las células Vero infectadas se cumple un ciclo completo de multiplicación viral. Las células que se encontraban en la etapa no productiva de la persistencia no fueron capaces de liberar viriones infectivos (Tabla 3) aunque un 10% de ellas eran portadoras de antígenos virales. En infecciones persistentes de células BHK con virus LCM y Paraná, Stanek y Col. (106) encontraron valores muy elevados de centros infecciosos al comienzo de la infección crónica donde en los dos primeros pasajes celulares, el 90% de las células producían viriones infecciosos. Esta proporción iba disminuyendo hasta que al entrar ambos cultivos en la fase no productora no pueden detectarse centros infecciosos. Sin embargo, Stanwick y Kirk (109) para el mismo sistema BHK-LCM obtienen un valor de centros infecciosos que oscila entre 6 - 12% a lo



largo de toda la infección persistente. Este último caso presenta mayores similitudes con las células Vero-Tac aunque la proporción de células productoras encontrada por nosotros es mucho menor (Tabla 3).

Existe bastante evidencia que el virus persistente liberado de un cultivo crónico evoluciona en función del tiempo en respuesta a varias presiones selectivas del cultivo. En el sistema Vero-Tac, se observa que en algunas líneas la población viral modifica su comportamiento seleccionándose variantes virales con carácter termosensible (ts) en cuanto a su replicación (Tabla 6 y Tabla 11). Contrariamente a lo observado para otros cultivos persistentemente infectados (131), las mutantes ts obtenidas de Vero-Tac fueron altamente citolíticas no pudiendo por si mismas iniciar persistencia dando lugar a una infección virulenta (Figura 10). Asimismo, resultaron más patógenas para ratón lactante que la cepa parental (Tabla 7 y Tabla 12) y tenían la capacidad de producir placas bajo agar con igual eficiencia y morfología que ella. La mutación ts que presentaba el virus persistente le confería a éste una aumentada labilidad a la temperatura (Figura 9 y Tabla 10), indicando una alteración en dichas mutantes de ciertas proteínas estructurales. La alterada labilidad a la temperatura que presentan ciertas proteínas de las mutantes ts aisladas

de una infección persistente fue encontrada en el sistema L-NDV por Stanwick y Hallum (108) quienes demostraron que la actividad de ARN polimerasa asociada al virus ts seleccionado en cultivos de células L persistentemente infectadas era más lábil al calor que la del NDV parental.

En varios sistemas persistentemente infectados se ha observado que el fenotipo ts y los marcadores de virulencia y de morfología de placa son características generalmente coseleccionadas positivamente en la población viral (131), aunque varios estudios han demostrado que estos fenotipos son debidos a mutaciones independientes (91)(102). En el caso del cultivo Vero-Tac, las mutantes aisladas solamente presentaban una mutación que les confería un fenotipo ts y no se seleccionaron mutantes con atenuada citopatogenicidad ni con una morfología de placa diferente a la cepa parental.


La incapacidad de los stocks ricos en mutantes ts obtenidos de Vero-Tac de iniciar una infección persistente se atribuyó en un primer momento a la elevada citopatogenicidad que presentaban dichas mutantes, aunque posteriormente se observó que al no contener partículas interferentes, estos stocks no tenían la capacidad de modular la replicación de la ts. Sin embargo, pudo comprobarse en este estudio que las mutantes ts son susceptibles a la actividad interferente de las

PI. Esta observación llevó a postular que las mutantes ts carecerían de la capacidad de inducir la síntesis de PI posiblemente porque tendrían un defecto en el gen responsable de la generación óptima de las mismas. Esta hipótesis se basa en que para iniciar una infección persistente no sólo se necesita la presencia de PI en el inóculo sino también se necesita la síntesis de PI en la replicación viral como en el caso de aquellos clones (Tabla 16) que a pesar de tener valores muy bajos de interferencia (aproximadamente 20%) son capaces de modular la infección por medio de la génesis de PI durante su replicación.

La evolución de la infección en los cultivos persistentes (Vero-Tac) lleva a la desaparición del virus extracelular (etapa no productiva), pero la ausencia de infectividad en los sobrenadantes de Vero-Tac no se debe a la presencia de partículas virales interferentes ya que no se ha observado un nivel detectable de interferencia en los mismos, tanto en las líneas donde se seleccionan mutantes ts como en aquellas donde no hay selección de las mismas. Por lo tanto, el hecho de que haya una resistencia total a la reinfección con virus homotípico (Figura 5) en el cultivo donde la producción de PI es mínima significa que el estado refractario de las células se establecería por un mecanismo diferente. Una posibilidad po-

dría ser la falta de células susceptibles. Aunque el mecanismo íntimo no se conoce, al adquirir las células del cultivo persistente una resistencia genética específica, el cultivo tendería a agotarse en el tiempo debido a que el virus liberado no tendría sustrato para replicar. Esta teoría estaría apoyada por la disminución progresiva del virus en cada pasaje celular (Tabla 4 y Tabla 5). O sea, al replicar al cultivo Vero-Tac, el título de virus extracelular es máximo a las 24 hs. y disminuye hasta no detectarse infectividad hacia las 72-96 hs. post-repique.

Como puede observarse por lo anteriormente presentado, el mantenimiento de la persistencia del virus Tacaribe en células Vero es un proceso complejo donde son varios los factores que interrelacionados permiten que el virus persista en el tiempo. Aunque las PI son necesarias para el establecimiento de la persistencia, durante todo el curso de la infección pueden o no estar presentes. Estas partículas interferentes regularían la infección favoreciendo la persistencia. Sin embargo, la persistencia se mantendría por el estado refractario que adquieren las células a la reinfección cuyo origen se desconoce. En todo caso, las PI interfiriendo con las partículas virales citolíticas favorecerían el establecimiento de ese estado refractario.

  
\_\_\_\_\_  
CELIA E. COTO

  
\_\_\_\_\_  
A.C. D'AiUTOLO

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Añon, M.C.; Grau, O.; Martínez Segovia, Z.M. y Fernández M.T.F.  
RNA Composition of Junin Virus.  
J. Virol. 18: 833-838, 1976.
- 2.- Armstrong, C. and Lillie, R.D.  
Experimental LCM of Monkeys and Mice produced by a Virus Encountered in Studies of the 1933 St. Louis Encephalitis Epidemic.  
Public Health Rep. (Wash) 49: 1019-1027, 1934.
- 3.- Ayerra de Holstein, B.L.; Teyssie, A.R.; Knecker, L.M.; Samoilovich, S.; Coto, C.E. y Weissenbacher, M.C.  
Inducción de interferón por el virus Tacaribe.  
Medicina (Bs. As.) 41: 177-181, 1981.
- 4.- Bishop, D.H.L.  
Molecular and Genetic Properties of Arenavirus.  
Medicina (Bs. As.) 40: 275-288, 1980.
- 5.- Boxaca, M.C.  
Establecimiento y características de una sublínea de células Vero persistentemente infectada con virus Junín.  
Medicina (Bs. As.) 30 (supl. 1): 50-61, 1970.
- 6.- Boxaca, M.C. y Giovaniello, O.A.  
Células Vero persistentemente infectadas con virus Junín II. Recuperación de virus.  
Medicina (Bs. As.) 37: 112-121, 1977.
- 7.- Boxaca, M.C. y Savy, V.  
Estudios comparativos de la acción del virus Junín en distintos cultivos celulares.

- Medicina (Bs. As.) 32: 260-268, 1972.
- 8.- Boxaca, M.C.; Savy, V. y Giovaniello, O.A.  
Células Vero persistentemente infectadas con virus Junín  
I. Comportamiento de la línea Vero IR58 frente a la so-  
breinfección con dos cepas de virus Junín.  
Medicina (Bs. As.) 32: 269-278, 1972.
- 9.- Bro-Jørgenson, K.  
The Interplay Between LCM Virus Immune Function and  
Hemopoiesis in Mice.  
Adv. Virus Res. 22: 327-369, 1978.
- 10.- Buchmeier, M.J.; Elder, J.H. and Oldstone, M.B.A.  
Protein Structure of LCM: Identification of the Virus  
Structural and Associated Polypeptides.  
Virology 89: 133-145, 1978.
- 11.- Buchmeier, M.J. and Oldstone, M.B.A.  
Identity of the Viral Protein Responsible for Serological  
Cross-reactivity Among the Tacaribe Complex of the  
Arenaviruses.  
In: "Negative Strand Viruses and the Host Cell" pp 91-97  
B.W. Mahy and R.D. Barry Eds. Academic Press, NY, 1978.
- 12.- Buckley, S.M. and Casals, J.  
Lassa Fever: a New Virus Disease of Man from West Africa  
III. Isolation and Characterization of the Virus.  
Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 680-691, 1970.
- 13.- Candurra, N.A.; Damonte, E.B. y Coto, C.E.  
Influencia de la célula huésped sobre la evolución de las  
infecciones persistentes con virus Junín.  
I° Congreso Argentino de Virología. Libro de Res. pág. 35  
1983.

- 14.- Carter, M.F.; Biswal, N. and Rawls, W.E.  
Characterization of Nucleic Acid of Pichinde Virus.  
J. Virol. 11: 61-68, 1973.
- 15.- Casals, J.; Buckley, S.M. and Cedeno, R.  
Antigenic Properties of the Arenavirus.  
Bull. WHO 52: 421-427, 1975.
- 16.- Coto, C.E.; Lampuri, J.S. y Vidal, M.C.  
Calomys musculus Infected with Junin Virus: a Model  
of In-vivo Persistent Infection.  
Conferencia sobre el desarrollo mundial.  
I° Conferencia Internacional sobre el impacto de las  
enfermedades virales en el desarrollo de los países  
Latinoamericanos y de la Región del Caribe.  
Río de Janeiro 21-26 de marzo, 1982.
- 17.- Coto, C.E.; León, M.E.; Peralta, L.M.; Help, G.I. and  
Laguens, R.P.  
Induction of Infectious Virus and Viral Surface Antigen  
in Vero Cells Persistently Infected with Junin Virus.  
In: "Humoral Immunity in Neurological Diseases" pp  
405-415  
D. Karcher, A. Lowenthal and A.D. Strosbery Eds. Plenum  
Press Co. 1979.
- 18.- Coto, C.E. and Vombergar, M.D.  
The Effect of 5-Iododeoxyuridine and Actinomycin D on  
the Multiplication of Junin Virus.  
Arch. Ges. Virusforsch. 27: 307-310, 1969.
- 19.- Coto, C.E.; Vombergar, M.D. y Tkaczewski, L.Z.  
Interacción del virus Junín con células de riñón de mono.  
Medicina (Bs. As.) 30 (supl. 1): 38-44, 1970.

- 20.- Dalton, A.J.; Rowe, W.P.; Smith, G.H.; Wilsnack, R.E.  
and Pugh, W.E.  
Morphological and Cytochemical Studies on LCM Virus.  
J. Virol. 2: 1465-1478, 1968.
- 21.- Damonte, E.B.  
Arenavirus: Persistencia de los virus Junín (FHA) y  
Tacaribe en células cultivadas in-vitro.  
Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
UBA. 1978.
- 22.- Damonte, E.B. y Coto, C.E.  
Análisis de los factores que condicionan la formación de  
placas en células Vero infectadas con los virus Junín  
(FHA) y Tacaribe.  
Revta. Asoc. Arg. Microbiol. 6: 15-22, 1974.
- 23.- Damonte, E.B. and Coto, C.E.  
Temperature Sensitivity of the Arenavirus Junin Isolated  
from Persistently Infected Vero Cells.  
Intervirol. 11: 282-287, 1979.
- 24.- Damonte, E.B.; Mersich, S.E. and Coto, C.E.  
Response of Cells Persistently Infected with Arenaviruses  
to Superinfection with Homotypic and Heterotypic Viruses.  
Virol. 129: 474-478, 1983.
- 25.- Damonte, E.B.; de Salum, S.B.; Larripa, I. y Coto, C.E.  
Características virológicas y citogenéticas de células  
Vero persistentemente infectadas con virus Tacaribe.  
Medicina (Bs. As.) 39: 589-596, 1979.
- 26.- Desmyster, J.; Melnick, J.L. and Rawls, W.E.  
Defectiveness of Interferon Production and Rubella Virus



Interference in a Line of African Green Monkey Kidney Cells (Vero).

J. Virol. 2: 955-959, 1968.

- 27.- Domingo, E.; Favell, R. and Weissmann, C.  
In-vitro Site-directed Mutagenesis: Properties of an Infectious Mutant of QB.  
Gene 1: 3-25, 1977.
- 28.- Domingo, E.; Weissmann, C. and Batschelet, E.  
The Proportion of Revertant Phage in a Growing Population as a Function of Grow Rate.  
Gene 1: 27-32, 1977.
- 29.- Downs, W.G; Anderson, C.R.; Spencer, L.; Aitken, T.H.G. and Greenwall, A.H.  
Tacaribe Virus, a New Agent Isolated from Artibeus Bats and Mosquitoes in Trinidad West Indies.  
Am. J. Trop. Med. Hyg. 12: 640-646, 1963.
- 30.- Dutko, F.J.; Wright, E.A. and Pfau, C.J.  
The RNA's of Detective Interfering Pichinde Virus.  
J. Gen. Virol. 31: 417-427, 1976.
- 31.- Farber, F.E. and Rawls, W.E.  
Isolation of Ribosomes Like Structures from Pichinde Virus.  
J. Gen. Virol. 26: 21-31, 1975.
- 32.- Fenner, F.  
Conditional Lethal Mutants of Animal Viruses.  
Curr. Top. in Microbiol. and Imm. 48: 1-28, 1969.
- 33.- Fenner, F.  
Classification and Nomenclature of Viruses II. Report

- of the International Committee on Taxonomy of Viruses.  
Intervirolog. 7: N<sup>o</sup> 1-2, 1976.
- 34.- Fenner, F.; Mc Auslan, B.R.; Mims, C.A.; Sambrock, J.  
and White, D.O.  
The Biology of Animal Viruses.  
Academic Press, N.Y. 1974.
- 35.- Fields, B.N.  
Genetic Manipulation of Reovirus. A Model for Modification  
of Disease?  
New England J. Med. 287: 1026-1033, 1972.
- 36.- Friedman, R.M. and Ramseur, J.M.  
Mechanisms of Persistent Infections by Cytopathic Viruses  
in Tissue Culture.  
Arch. Virol. 60: 83-103, 1979.
- 37.- Gard, G.P.; Vezza, A.C.; Bishop, D.H.L. and Compans, R.W.  
Structural Proteins of Tacaribe and Tamiami Virions.  
Virol. 83: 84-95, 1977.
- 38.- Gimenez, H.B. and Compans, R.W.  
Defective Interfering Tacaribe Virus and Persistently  
Infected Cells.  
Virol. 107 229-239, 1980.
- 39.- Guerrero, L.B.; Weissembacher, M.C. y Parodi, A.S.  
Inmunización contra la FHA con una cepa atenuada de  
virus Junín. I. Estudio de una cepa modificada del virus  
Junín. Inmunización de cobayos.  
Medicina (Bs. As.) 29: 1-5, 1969.
- 40.- Hampar, B. and Keehn, M.A.  
Cumulative Changes in the Antigenic Properties of Herpes  
Simplex Virus from Persistently Infected Cell Cultures.

- J. Imm. 99: 554-557, 1967.
- 41.- Help, G.I.  
Biogénesis de partículas interferentes y su posible rol en las infecciones por virus Junín.  
Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. 1980.
- 42.- Help, G.I. y Coto, C.E.  
Propiedades de las partículas interferentes generadas por el virus Junín en células Vero.  
Medicina (Bs. As.) 41: 19-24, 1981.
- 43.- Help, G.I.; León, M.E. y Coto, C.E.  
Interferencia asociada a cultivos crónicamente infectados con virus Junín.  
Medicina (Bs. As.) 8: 45-53, 1976.
- 44.- Hirsh, M.S.; Mc Allison, A. and Harvey, J.J.  
Immune Complexes in Mice Infected Neonatally with Moloney Leukaemogenic and Murine Sarcoma Viruses.  
Nature (London) 223: 739-740, 1969.
- 45.- Holland, J.J. and Levine, A.  
Mechanisms of Viral Persistence. Meeting Review.  
Cell 14: 447-452, 1978.
- 46.- Holland, J.J.; Spindler, K.; Horodyski, F.; Grabau, E; Nichol, S. and Vande Pol, S.  
Rapid Evolution of RNA Genomes.  
Science 215: 1577-1585, 1982.
- 47.- Holland, J.J. and Villarreal, L.P.  
Persistent Noncytotoxic VSV Infections Mediated by Defective T Particles that Suppress Virion Transcriptase.  
Proc. Natl. Acad. Sc. 71: 2956-2960, 1974.

- 48.- Horodyski, F.T. and Holland, J.J.  
Viruses Isolated from Cells Persistently Infected with  
VSV Show Altered Interactions with Defective Interfering  
Particles.  
J. Virol. 36: 627-631, 1980.
- 49.- Hotchin, J.  
Tolerance to Lymphocytic Choriomeningitis Virus.  
Ann. N. Y. Acad. Sc. 181: 159-182, 1971.
- 50.- Hotchin, J.  
Cyclical Transient Infection. An Explanation of Persistent  
Virus Infection.  
In: "LCM and Other Arenaviruses" pp 85-99  
F. Lehmann Grube Ed. Springer Verlag, 1973.
- 51.- Hotchin, J. and Sikora, S.  
Low Pathogenicity Variants of LCM Virus.  
Infect. Imm. 7: 825-826, 1973.
- 52.- Huang, A.S.  
Defective Interfering Viruses.  
Ann. Rev. Microbiol. 27: 101-117, 1973.
- 53.- Huang, A.S. and Baltimore, D.  
Defective Interfering Animal Viruses.  
In: "Comprehensive Virology" Vol. 10 pp 73-116.  
H. Fraenkel Conrat and R.R. Wagner Eds. Plenum Press,  
N.Y. 1977.
- 54.- Jacobson, S.; Dutko, F.J. and Pfau, C.J.  
Determinants of Spontaneous Recovery and Persistence in  
MDCK Cells Infected with Lymphocytic Choriomeningitis Virus.  
J. Gen. Virol. 44: 113-121, 1979.
- 55.- Jennings, W.L.; Lewis, A.L.; Satler, G.E.; Pierce, L.U.

- and Bond, J.O.  
Tamiami Virus in the Tampa Bay Area.  
Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 527-536, 1970.
- 56.- Johnson, K.M; Mackenzie, R.B.; Webb, P.A. and Mims, M.L.  
Chronic Infection of Rodents by Machupo Virus.  
Science 150: 1618-1619, 1965.
- 57.- Kawai, A. and Matsumoto, S.  
Interfering and Non-interfering Defective Particles  
Generated by a Rabies Plaque Variant Virus.  
Virol. 76: 60-71, 1977.
- 58.- Knight, P.; Duff, R.; Glaser, R. and Rapp, F.  
Characteristics of the Release of Measles Virus from  
Latently Infected Cells after Co-cultivation with  
BSC-1 Cells.  
Intervirology. 2: 287-298, 1973/1974.
- 59.- Kunkel, T.A. and Loeb, L.A.  
Fidelity of Mammalian DNA Polymerases.  
Science 213: 765-767, 1981.
- 60.- Larghi, O.  
Técnica de Inmunofluorescencia.  
Comunicación personal.
- 61.- Lehmann Grube, F.; Martínez Peralta, L.; Bruns, M. and  
Löhler, J.  
Persistent Infection in Mice with Lymphocytic  
Choriomeningitis Virus.  
In: "Comprehensive Virology" Vol. 18 pp 43-103.  
H. Fraenkel Conrat and R.R. Wagner Eds. Plenum Press,  
NY. 1983.
- 62.- Lehmann Grube, F.; Slenczka, W. and Tees, R.

- A Persistent and Inapparent Infection of L Cells with the Virus of Lymphocytic Choriomeningitis.  
J. Gen. Virol. 5: 63-81, 1969.
- 63.- Leung, W.C.; Ghosh, H.P. and Rawls, W.E.  
Strandness of Pichinde Virus RNA.  
J. Virol. 22: 235-237, 1977.
- 64.- Luria, S.E. and Darnell, J.E.  
Virología General.  
Ed. Omega, Barcelona, 1977.
- 65.- Mannweiler, K. and Lehmann Grube, F.  
Electron Microscopy of LCM Virus Infected L Cells.  
In: "LCM and Other Arenaviruses" pp 37-48.  
F. Lehmann Grube Ed. Springer Verlag, 1973.
- 66.- Martínez Segovia, Z.M. and De Mitri, M.I.  
Junin Virus Structural Proteins.  
J. Virol. 21: 579-583, 1977.
- 67.- Matthews, R.E.F.  
Classification and Nomenclature of Viruses. IV Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.  
Interviol. 17: N<sup>o</sup> 1-3, 1982.
- 68.- Medzon, E.L. and Vas, S.I.  
Studies on In-vitro Antibody Production II. The Effect of NDV on Antibody Synthesis.  
Can. J. Microbiol. 10: 535-542, 1964.
- 69.- Mims, C.A.  
Immunofluorescence Study of the Carrier State and Mechanism of Vertical Transmission in LCM Virus Infection in Mice.  
J. Pathol. Bacteriol. 91: 935-402, 1966.

- 70.- Mims, C.A. and Subrahmayan, T.P.  
Immunofluorescence Study of the Mechanism of Resistance to Superinfection in Mice Carrying the LCM Virus.  
J. Pathol. Bacteriol. 91: 403-415, 1966.
- 71.- Mims, C.A. and Wainwright, L.  
The Immunodepressible Action of LCM Virus in Mice.  
J. Immunol 101: 717-724, 1968.
- 72.- Murphy, F.A.; Webb, P.A.; Johnson, K.M. and Whitfield, S.G.  
Morphological Comparison of Machupo with LCM: Basis for a New Taxonomic Group.  
J. Virol. 4: 535-541, 1969.
- 73.- Murphy, F.A.; Webb, P.A.; Johnson, K.M.; Whitfield, S.G. and Chappell, W.A.  
Arenoviruses in Vero Cells: Ultrastructural Studies.  
J. Virol. 6: 507-518, 1970.
- 74.- Murphy, F.A and Whitfield, S.G.  
Morphology and Morphogenesis of Arenaviruses.  
Bull. WHO 52: 409-419, 1975.
- 75.- Narayan, O.; Griffin, D.E. and Chase, J.  
Antigenic Shift of Visna Virus Persistently Infected Sheep.  
Science 197: 376-378, 1977.
- 76.- Nishiyama, I.  
Studies of L Cells Persistently Infected with VSV: Factors Involved in the Regulation of Persistent Infection.  
J. Gen. Virol. 35: 265-279, 1977.
- 77.- Norkin, A.L.; Mahar, S.; Scheele, C. and Goffman, J.  
Infectious Virus-antibody Complex in the Blood of Chronically Infected Mice.  
J. Exp. Med 124: 81-87, 1966.

- 78.- Oldstone, M.B.A.  
Virus Neutralization and Virus Induced Immune Complex  
Disease: Virus-antibody Union Resulting in Immunoprotection  
or Immunologic Injury. Two Different Sides of the Same Coin.  
Prog. Med. Virol. 19: 84-119, 1975.
- 79.- Oldstone, M.B.A. and Dixon, F.J.  
Persistent LCM Viral Infection III. Virus Anti-viral  
Antibody Complexes and Associated Chronic Disease Following  
Transplacental Infection.  
J. Immunol. 105: 829-837, 1970.
- 80.- Oldstone, M.B.A.; Holmstoen, J. and Welsh, R.M. Jr.  
Alterations of Acetylcholine Enzymes in Neuroblastoma  
Cells Persistently Infected with LCM Virus.  
J. Cell Physiol. 91: 459-472, 1977.
- 81.- Palmer, E.L.; Obijeski, J.F.; Webb, P.A. and Johnson, K.M.  
The Circular Segmented Nucleocapsid of an Arenavirus:  
Tacaribe Virus.  
J. Gen Virol. 36: 541-545, 1977.
- 82.- Parodi, A.S.; Greenway, D.J.; Rugiero, H.R.; Rivero, S.;  
Frigerio, M.; de la Barrera, J.M.; Guerrero, L.B. de y  
Nota, N.  
Sobre la etiología del brote epidémico de Junín.  
Día Médico 30: 2300-2302, 1958.
- 83.- Pedersen, I.R.  
LCM Virus: Its Purification and its Chemical and Physical  
Properties.  
In: "LCM and other Arenaviruses" pp 13-23  
F. Lehmann Grube Ed. Springer Verlag, 1973.
- 84.- Pedersen, I.R.



Different Classes of Ribonucleic Acid Isolated from LCM Virus.

J. Virol. 11: 416-423, 1973.

- 85.- Pedersen, I.R. and Königshöfer, E.P.  
Characterization of the Ribonucleoprotein and Ribosomes Isolated from LCM Virus.  
J. Virol. 20: 14-21, 1976.
- 86.- Pfau, C.J.  
The Role of Defective Interfering (DI) Virus in Arenavirus Infection.  
Medicina (Bs. As.) 37: 32-38, 1977.
- 87.- Pfau, C.J.; Bergold, G.H.; Casals, J.; Johnson, K.M.; Murphy, F.A.; Pedersen, I.R.; Rawls, W.E.; Rowe, W.P.; Webb, P.A. and Weissenbacher, M.C.  
Arenaviruses.  
Interviol. 4: 207-213, 1974.
- 88.- Pinheiro, F.P.; Shope, R.E.; Andrade, A.H.P. de; Beusabeth, G.; Cacios, G.V. and Casals, J.  
Amapari: A New Virus of the Tacaribe Group from Rodents and Mites of Amapara Territory, Brazil.  
Proc. Soc. Exp. Biol. (NY) 122: 531-535, 1966.
- 89.- Pinheiro, F.P.; Woodall, J.P.; Travassos da Rosa, A.P.A. and Travassos da Rosa, J.F.  
Studies on Arenaviruses in Brazil.  
Medicina (Bs. As.) 37 (supl. 3): 175-181, 1977.
- 90.- Popescu, M. and Lehmann Grube, F.  
Defective Interfering Particles in Mice Infected with LCM Virus.  
Virol. 77: 78-83, 1977.

- 91.- Preble, O.T. and Youngner, J.S.  
Selection of ts Mutants During Persistent Infection: Role  
in Maintenance of Persistent Newcastle Disease Virus  
Infection in L Cells.  
J. Virol 12: 481-491, 1973.
- 92.- Preble, O.T. and Youngner, J.S.  
ts Viruses and the Ethiology of Chronic and Inapparent  
Infections.  
J. Inf. Dis. 131: 467-473, 1975.
- 93.- Purchase, H.G.; Chubb, R.C. and Piggs, P.M.  
Effect of Lymphoid Leukosis and Marek's disease on the  
Immunological Responsiveness of the Chicken.  
J. Natl. Cancer Inst. 40: 583-592, 1968.
- 94.- Ramos, B.A.; Courtney, R.J. and Rawls, W.E.  
The Structural Proteins of Pichinde Virus.  
J. Virol. 10: 661-667, 1972.
- 95.- Ramseur, J.M. and Friedman, R.M.  
Prolonged Infection of Interferon-treated Cells with VSV.  
Possible role of ts Mutants and Interferon.  
J. Gen. Virol. 37: 523-533, 1977.
- 96.- Rawls, W.E. and Buchmeier, M.  
Arenaviruses: Purification and Physicochemical Nature.  
Bull. WHO 52: 393-402, 1975.
- 97.- Rawls, W.E.; Chan, M.A. and Gee, S.R.  
Mechanisms of Persistence in Arenavirus Infections: A  
Brief Review.  
Canad. J. Microbiol. 27: 568-574, 1981.
- 98.- Reed, L.J. and Muench, H.A.  
A Simple Method of Estimating 50% End Point.  
Am. J. Hyg. 27: 493-497, 1938.

- 99.- Rowe, W.P.; Murphy, F.A.; Bergold, G.H.; Casals, J.; Hotchin, J.; Johnson, K.M.; Lehmann Grube, F.; Mims, C.A.; Traub, E. and Webb, P.A.  
Arenoviruses: Proposed Name for a Newly Defined Virus Group.  
J. Virol. 5: 651-652, 1970.
- 100.- Sekellick, M.J. and Marcus, P.I.  
Persistent Infection II. Interferon-inducing Temperature-sensitive Mutants as Mediators of Cell Sparring: Possible Role in Persistent Infection by VSV.  
Virol. 95: 36-47, 1979.
- 101.- Semler, B.L. and Holland, J.J.  
Persistent VSV Infection Mediates Base Substitution in Viral RNA Termini.  
J. Virol. 32: 420-428, 1979.
- 102 - Simizu, B. and Takayama, N.  
Isolation of Two Plaque Mutants of WEE Virus Differing in Virulence for Mice.  
J. Virol. 4: 799-800, 1969.
- 103.- Smith, K.O.  
Adventitious Viruses in Cell Cultures.  
Prog. Med. Virol. 12: 302-341, 1970.
- 104.- Spandidos, D.A. and Graham, A.F.  
Generation of Defective Virus After Infection of Newborn Rats with Reovirus.  
J. Virol 20: 234-247, 1976.
- 105.- Staneck, L.D. and Pfau, C.J.  
Interfering Particles from a Culture Persistently Infected with Parana Virus.

- J. Gen. Virol. 22: 437-440, 1974.
- 106.- Staneck, L.D.; Trowbridge, R.S.; Welsh, R.M.; Wright, E.A.  
and Pfau, C.J.  
Arenavirus: Cellular Responce to Long-term In-vitro  
Infection with Parana and LCM Viruses.  
Inf. and Imm. 6: 444-450, 1972.
- 107.- Stanners, C.P.; Francoeur, A.M. and Lam, T.  
Analysis of VSV Mutant with Attenuated Cytophatogenicity:  
Mutation in Viral Function P for Inhibition of Protein  
Synthesis.  
Cell 11: 273-281, 1977.
- 108.- Stanwick, T.L. and Hallum, J.V.  
Comparison of RNA Polymerase Associated with NDV and a  
Temperature-sensitive Mutant of NDV Isolated from  
Persistently Infected L Cells.  
J. Virol. 17: 68-73, 1976.
- 109.- Stanwick, T.L. and Kirk, B.E.  
Analysis of Baby Hamster Kidney Cells Persistently  
Infected with LCM.  
J. Gen. Virol. 32: 361-367, 1976.
- 110.- Trapido, H. and San Martin G.  
Pichinde Virus: A New Virus of the Tacaribe Group from  
Colombia.  
Am. J. Trop. Med. Hyg. 20: 631-641, 1971.
- 111.- Vezza, A.C.; Clewly, J.P.; Gard, G.P.; Abraham, N.Z.;  
Compans, R.W. and Bishop, D.H.L.  
Virion RNA Species of the Arenaviruses Pichinde, Tacaribe  
and Tamiami.  
J. Virol. 26: 485-497, 1978.

- 112.- Vezza, A.C.; Gard, G.P.; Compans R.W. and Bishop, D.H.L.  
Structural Components of the Arenavirus Pichinde.  
J. Virol. 23: 776-786, 1977.
- 113.- von Magnus, P.  
Propagation of the PR-8 Strain of Influenza A Virus in  
Chick Embryos II. The Formation of Incomplete Virus  
Following Inoculation of Large Doses of Seed Virus.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 28: 278-293, 1951.
- 114.- Walker, D.L.  
The Viral Carrier State in Animal Cell Cultures.  
Prog. Med. Virol. 6: 111-148, 1964.
- 115.- Webb, P.A.; Johnson, K.M.; Hibbs, J.B. and Kuns, M.L.  
Parana a New Tacaribe Complex Virus from Paraguay.  
Arch. Ges Virusforsch. 32: 379-388, 1970.
- 116.- Webb, P.A.; Johnson, K.M.; Peters, C.J. and Justines, G.  
Behaviour of Machupo and Latino Viruses in Calomys callosus  
from Two Geographic Areas of Bolivia.  
In: "LCM and other Arenaviruses" pp 313-322.  
F. Lehmann Grube Ed. Springer Verlag, 1973.
- 117.- Weiss, R.  
Persistent Infection without Proviral DNA.  
Nature 265: 295-296, 1977.
- 118.- Weiss, B.; Levis, R. and Schlesinger, S.  
Evolution of Virus and Defective Interfering RNAs in BHK  
Cells Persistently Infected with Sindbis Virus.  
J. Virol. 48: 676-684, 1983.
- 119.- Weiss, B. and Schlesinger, S.  
DI Particles of Sindbis Virus do not Interfere with the  
Homologous Virus Obtained from Persistently Infected BHK

- Cells but do Interfere with Semliki Forest Virus.  
J. Virol. 37: 840-844, 1981.
- 120.- Weissenbacher, M.C.; Coto, C.E. and Calelo, M.A.  
Cross-protection Between Tacaribe Complex Viruses. Presence  
of Neutralizing Antibodies Against Junin Virus (Argentine  
Hemorrhagic Fever) in Guinea Pigs Infected with Tacaribe  
Virus.  
Interviol. 6: 42-49, 1975/1976.
- 121.- Welsh, R.M. and Buchmeier, M.J.  
Protein Analysis of DI LCM and Persistently Infected Cells.  
Virol. 96: 503-515, 1979.
- 122.- Welsh, R.; Lampert, P.W. and Oldstone, M.B.A.  
Prevention of Virus-induced Cerebellar Disease by Defective  
Interfering LCM Virus.  
J. Inf. Dis. 136: 391-399, 1977.
- 123.- Welsh, R.M.; O'Connell, C.M. and Pfau, C.J.  
Properties of Defective LCM Virus.  
J. Gen. Virol. 17: 355-359, 1972.
- 124.- Welsh, R. and Oldstone, M.B.A.  
Inhibition of Immunologic Injury of Cultured Cells  
Infected with LCM Virus: Role of DI Virus in Regulating  
Viral Antigenic Expression.  
J. Exp. Med. 145: 1449-1468, 1977.
- 125.- Welsh, R.M. and Pfau, C.J.  
Determinants of LCM Interference.  
J. Gen. Virol 14: 177-187, 1972.
- 126.- Welsh, R.M. Jr.; Lampert, P.W.; Burner, P.A. and Oldstone,  
M.B.A.  
Antibody-complement Interactions with Purified Lymphocytic

Choriomeningitis Virus.

Viol. 73: 59-71, 1976.

- 127.- Wulff, H.; Lange, J. and Webb, P.A.  
Interrelationship Among Arenaviruses Measured by Indirect  
Immunofluorescence.  
Intervirol. 9: 344-350, 1978.
- 128.- Wulff, H.; McIntosh, B.M.; Hammer, D.B. and Johnson, K.M.  
Isolation of an Arenavirus Closely Related to Lassa Fever  
from Mastomys natalensis in South East Africa.  
Bull. WHO 55: 441-444, 1977.
- 129.- Youngner, J.S.; Dubovi, E.J.; Quagliana, D.O.; Kelly, M.  
and Preble, O.T.  
Role of ts Mutants in Persistent Infections Initiated  
with VSV.  
J. Virol. 19: 90-101, 1976.
- 130.- Youngner, J.S.; Jones, E.; Kelley, M. and Frielle, D.  
Generation and Amplification of ts Mutants During Serial  
Indiluted Passages of VSV.  
Viol. 108: 87-97, 1981.
- 131.- Youngner, J.S. and Preble, O.T.  
Viral Persistence: Evolution of Viral Populations.  
In: "Comprehensive Virology" Vol. 16 pp 73-135.  
H. Fraenkel Conrat and R.R. Wagner Eds. Plenum Press,  
N.Y. 1980.
- 132.- Youngner, J.S.; Preble, O.T. and Jones, E.V.  
Persistent Infection of L Cells with VSV: Evolution of  
Virus Population.  
J. Virol 28: 6-13, 1978.

133.- Youngner, J.S. and Quagliana, D.O.

Temperature-sensitive Mutants of VSV are Conditionally  
Defective Particles that Interfere with and are Rescued  
by Wild Type Virus.

J. Virol. 19: 102-107, 1976.



A P E N D I C E

A B R E V I A T U R A S

ACP:	acción citopatogénica
ADN:	Acido desoxirribonucleico
ARN:	Acido ribonucleico
BHK:	Células de riñón de hamster bebé
Células VT:	Células Vero persistentemente infectadas con virus Tacaribe
DICT <sub>50</sub> :	Dosis infectante para cultivo de tejidos 50
DL <sub>50</sub> :	Dosis letal 50
g:	Gravedades
i.c.:	Intracerebral
i.m.:	Intramuscular
L:	Células de embrión ratón
LCM:	Virus de la coriomeningitis linfocítica
MEM:	Medio esencial mínimo
m.i.:	Multiplicidad de infección
Mutantes ts:	Mutantes termosensibles
NDV:	Virus de la enfermedad de Newcastle
PBS:	Buffer fosfato salino
p.i.:	Post-infección
PI:	Partículas interferentes
rpm:	revoluciones por minuto

SST: Solución salina de citrato  
S: Svedverg  
TACV: Virus Tacaribe  
UFP: Unidades formadoras de placas  
UV: Luz ultravioleta  
Vero-Tac: Células Vero persistentemente infectadas con virus Tacaribe  
VSV: Virus de la estomatitis vesicular