Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Infección experimental de Calomys musculinus, reservorio natural del virus Junín : Aislamiento y caracterización de variantes antigénicas

Alche, Laura Edith

1989

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. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:
Alche, Laura Edith. (1989). Infección experimental de Calomys musculinus, reservorio natural del virus Junín : Aislamiento y caracterización de variantes antigénicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2231_Alche.pdf

Cita tipo Chicago:
Alche, Laura Edith. "Infección experimental de Calomys musculinus, reservorio natural del virus Junín : Aislamiento y caracterización de variantes antigénicas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2231_Alche.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

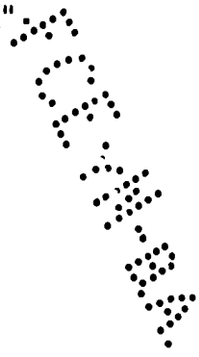
Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"INFECCION EXPERIMENTAL DE Calomys musculinus, RESERVORIO NATURAL DEL VIRUS JUNIN: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE VARIANTES ANTIGENICAS"



AUTOR: LIC. LAURA EDITH ALCHE

DIRECTOR: DRA. CELIA E. COTO

LUGAR DE TRABAJO: LABORATORIO DE VIROLOGIA. DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLOGICA. FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES. U.B.A.

Tesis presentada para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

- 2231 -

y.2

-1989-

A KUKY Y MATIAS

A MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Celia Coto, por haberme brindado la oportunidad de iniciarme en la investigación científica, y por su incondicional y constante apoyo en la realización del presente trabajo de tesis.

Al Dr. Jorge Lampuri, por cederme su experiencia profesional en el aprendizaje y realización de estudios virológicos in-vivo, en especial sobre el modelo de infección aquí estudiado.

Al Dr. Félix Coulombié, amigo y colaborador permanente, por sus valiosos aportes.

A la Dra. Susana Mersich, por su ayuda y participación en la realización del análisis bioquímico de las proteínas virales.

A todos mis compañeros del laboratorio, y en especial a Graciela Andrei, Nelly Candurra, Viviana Castilla, Juan Claus, Silvia Coronato, Elsa Damonte, Luis Scolaro, Noemí Steyerthal y Mónica Wachsman.

A la Lic. Gabriela Bergonzelli y a la Dra. Beatriz Sassetti, por las importantes sugerencias acerca de la técnica de inmunoelectroforesis bidimensional cruzada.

A los integrantes del laboratorio de Inmunoquímica, por la colaboración prestada.

A Miguel Salem, por su valiosa colaboración en la edición del presente trabajo de tesis.

A la Sra. Sofía de Piccinalli, cuyo recuerdo permanecerá imborrable.

INDICE

1. INTRODUCCION..... 1

1.1. PRIMERA PARTE: PERSISTENCIA VIRAL Y VARIABILIDAD GENETICA..... 1

1.1.1. Infecciones virales persistentes..... 1

1.1.2. Acerca de la variabilidad de los RNA virus.... 4

1.1.2.1. "Drift" antigénico en virus RNA..... 7

1.1.2.1.1. Influenza..... 7

1.1.2.1.2. Lentivirus..... 9

1.1.2.1.2.1. Virus Visna..... 9

1.1.2.1.2.2. Virus de la anemia infecciosa equina....14

1.1.3. CONSIDERACIONES FINALES DE LA PRIMERA PARTE...17

1.2. SEGUNDA PARTE: ASPECTOS BIOLOGICOS DE LOS ARENAVIRUS.....18

1.2.1. Introducción.....18

1.2.2. Los arenavirus como agentes causales de infecciones in-vivo.....21

1.2.2.1. Virus de la coriomeningitis linfocítica.....22

1.2.2.2. Virus Junín.....30

1.2.2.2.1. Infección experimental de C. musculinus con la cepa XJCl$_3$ de virus Junín.....34

1.2.3. CONSIDERACIONES FINALES DE LA SEGUNDA PARTE...39

2. OBJETIVOS.....40

3. MATERIALES Y METODOS.....42
3.1. Virus.....42
3.2. Cultivo de tejidos.....42
3.3. Animales.....43
3.3.1. Calomys musculinus.....43
3.3.2. Ratones.....43
3.4. Determinación de la infectividad.....44
3.4.1. Titulación por formación de placas bajo agar..44
3.4.2. Titulación por dosis letal 50 (DL_{50}).....45
3.5. Preparación de los stocks de VJ.....45
3.5.1. Clonado en células Vero.....45
3.5.2. En cerebro de C. musculinus neonatos.....46
3.5.3. En cultivos de macrófagos peritoneales de C. musculinus.....47
3.6. Aislamiento de virus.....47
3.6.1. A partir de sangre.....47
3.6.2. A partir de cerebro.....48
3.6.3. Determinación de la infectividad en los aislamientos virales.....48
3.7. Ensayo de citotoxicidad de sangre.....49
3.8. Estudios serológicos.....50
3.8.1. Ensayo de cinética de neutralización.....50
3.8.2. Ensayo de neutralización.....51
3.9. Obtención de un suero hiperinmune anti VJ en cobayo.....52
3.10. Obtención de la fracción de inmunoglobulinas

séricas por precipitación con sulfato de amonio.....53
3.11. Amplificación de suspensiones virales.....53
3.12. Purificación de VJ.....54
3.13. Inmunodifusión doble bidimensional.....54
3.14. Inmunoelectroforesis cruzada bidimensional.....55
3.15. Electroforesis en gel.....56
3.15.1. Detección de proteínas iodinadas.....57
3.16. Mapeo peptídico a través de proteólisis controlada.....58

4. RESULTADOS.....59
Parte I: DETECCION DE VARIANTES ANTIGENICAS DEL VJ.....59
4.1. Aislamiento de VJ a partir de Calomys musculinus infectados.....59
4.1.1. Selección de un clon de VJ.....59
4.1.2. Establecimiento de una infección experimental en C. musculinus neonatos.....61
4.1.3. Búsqueda de vías de eliminación de virus.....64
4.1.3.1. A partir de saliva y orina.....64
4.1.3.2. A partir de sangre.....66
4.1.3.2.1. Aislamiento de virus de sangre de C. musculinus agudos y persistentemente infectados.....67
4.1.3.3. Detección de anticuerpos neutralizantes y VJ en sangre y cerebro de C. musculinus

infectados.....70
4.2. Detección de variantes antigénicas del VJ in-vivo.....72
4.2.1. Ensayo de cinética de neutralización.....74
4.2.2. Cinética de neutralización de un aislamiento viral del cerebro de un cricétido infectado...79
4.2.3. Amplificación de los aislamientos de sangre virus positivos en células Vero.....82
4.2.4. Cinética de neutralización de aislamientos virales de sangre de C. musculinus infectados.84
4.2.5. Búsqueda de complejos inmunes circulantes.....87
4.2.6. Los macrófagos peritoneales como fuente de variantes antigénicas in-vivo.....89
4.2.7. Neutralización de aislamientos virales provenientes de macrófagos de C. musculinus infectados.....93
4.2.8. Ensayo de neutralización cruzada con variantes antigénicas aisladas de sangre de cricétidos infectados.....95
4.2.8.1. Comportamiento antigénico de distintos aislamientos virales provenientes de un mismo animal.....96
4.3. ¿Es posible seleccionar variantes antigénicas in-vitro?.....100
4.3.1. A través de la presión selectiva de anticuerpos.....100

4.3.2. A partir de cultivos primarios de embrión de *Calomys* infectados.....106

Parte II: PROPIEDADES BIOLOGICAS, INMUNOLOGICAS Y BIOQUIMICAS DE LAS VARIANTES ANTIGENICAS DEL VJ.....109

4.4. Propiedades biológicas.....109

4.4.1. Acción citopática sobre cultivo de tejidos...109

4.4.2. Ensayo de interferencia viral.....110

4.4.3. Curvas de crecimiento viral.....112

4.4.4. Termosensibilidad.....114

4.4.5. Virulencia de las variantes antigénicas para *C. musculinus* neonatos.....117

4.5. Propiedades inmunológicas y bioquímicas.....118

4.5.1. Inmunodifusión doble bidimensional.....120

4.5.2. Inmunoelectroforesis bidimensional cruzada...121

4.5.3. Mapeo de proteínas virales en geles de poliacrilamida.....126

4.5.3.1. Digestión de la glicoproteína G2 por acción de proteasas.....129

5. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....132

6. BIBLIOGRAFIA.....160

7. APENDICE.....191

1. INTRODUCCION

1.1. PRIMERA PARTE: PERSISTENCIA VIRAL Y VARIABILIDAD ANTIGENICA

1.1.1. Infecciones virales persistentes

Las infecciones provocadas por virus animales involucran una serie de complejas interacciones virus-huésped cuyo resultado es la multiplicación y la diseminación del agente infeccioso tratando de eludir los múltiples mecanismos de defensa del huésped. El sistema inmune es altamente efectivo como defensa antiviral y usualmente logra eliminar a los patógenos luego de breves períodos de infección. Tal es el caso de las infecciones agudas, caracterizadas por un período de incubación seguido de una sintomatología propia del sistema virus-huésped en cuestión. El desenlace de la infección puede ser fatal, o bien puede lograrse la eliminación del agente del organismo como consecuencia de la activación de la respuesta inmune específica.

Por ende, y en términos generales, esta clase de infecciones se autolimitan.

Sin embargo, en determinadas circunstancias, el virus puede no ser rápidamente eliminado luego de una infección aguda, logrando persistir en algún órgano blanco

por lapsos variables, y aún durante toda la vida del huésped infectado.

Las infecciones virales persistentes pueden ser caracterizadas por la producción continua o intermitente de virus infeccioso en bajos o altos títulos, o por ausencia completa de viriones maduros con detección de genomas virales en las células infectadas, o bien la expresión limitada de antígenos virales. Este tipo de infecciones puede transcurrir con o sin evidencia de enfermedad clínica.

Una amplia variedad de factores inherentes al hospedador tales como la edad, factores genéticos, grado de madurez inmunológica, tipo de células infectadas por el virus pueden, eventualmente, contribuir al establecimiento de una infección viral persistente y a la producción de lesiones.

Si bien aún no están completamente dilucidados, los diversos factores involucrados en el establecimiento y/o mantenimiento de la persistencia viral podrían actuar bajo las siguientes circunstancias:

a) El agente permanecería secuestrado en un "sitio protegido". Los más obvios son los sitios intracelulares, en los cuales virus o antígenos virales no son interceptados por el sistema inmune celular o humoral. Otro "sitio protegido" característico de muchas infecciones virales persistentes es el cerebro, que se encuentra separado de los compartimentos vasculares por la

barrera hematoencefálica. Por otra parte, los virus también pueden acantonarse dentro de células pertenecientes al sistema inmune.

b) En el caso de inducir tolerancia del huésped, los virus pueden establecer una infección persistente; si son relativamente no citocídicos, los mismos podrían ser capaces de multiplicar sin provocar la muerte del hospedador.

c) Los virus pueden persistir si despiertan una respuesta de anticuerpos no neutralizantes capaces de bloquear a los anticuerpos neutralizantes. Alternativamente, los complejos virus-anticuerpos no neutralizantes podrían ser fagocitados por el sistema reticuloendotelial permitiendo que el virus reinfecte otras células de dicho sistema.

d) La persistencia viral podría ser el resultado de la replicación del agente en células de permisividad intermedia (143).

En principio, no habría un único mecanismo responsable del éxito de este tipo de infecciones, sino que, por el contrario, sería necesaria la conjunción de múltiples mecanismos y cada uno de ellos contribuiría, en última instancia, a la enfermedad del huésped.

¿Cuáles serían los factores inherentes al virus indispensables para garantizar su perpetuación en el animal infectado?. Nuevamente, las propiedades relevantes para el

establecimiento de la persistencia incluyen, alternativamente, el surgimiento de partículas virales interferentes, la producción de interferón, la selección de mutantes termosensibles, la virulencia y la aparición de variantes antigénicas (65, 161). Este último ejemplo ha sido particularmente estudiado en el caso de los RNA virus, que demostraron ser altamente mutables (66, 140). En diversos sistemas virus-huésped fue posible demostrar que, gracias a la extremadamente rápida velocidad de mutación de los genomas, se seleccionaban poblaciones virales antigénicamente diferentes a la parental, con alteraciones en la(s) glicoproteína(s) de superficie, capaces de multiplicar y, de este modo, eludir la respuesta inmune del huésped (27).

1.1.2. Acerca de la variabilidad de los RNA virus

Los virus RNA constituyen un grupo único y distinguible debido a que son entidades auto-replicativas capaces de utilizar un material genético distinto del DNA. En términos evolutivos, esto significa que los problemas de sobrevivencia enfrentados por dichos microorganismos no tienen paralelo alguno con ningún otro microorganismo y/u organismo viviente.

En particular, los virus RNA se caracterizan por

presentar altas frecuencias de mutación debido, en parte, precisamente, a la falta de enzimas reparadoras que sí garantizan la fidelidad de la replicación del DNA (136).

Aún más saliente es el hecho que la denominada velocidad de mutación (velocidad a la cual las mutaciones viables se acumulan en el genoma) es mucho más alta en el caso de los genomas RNA respecto de los genomas DNA (10^{-3} vs. 10^{-9} sustituciones nucleotídicas por sitio por año) y de allí que el concepto de "tipo salvaje" presente a menudo un significado más relativo para los virus con genomas RNA.

Además de la evolución debida a la acumulación de mutaciones puntuales, los genomas de algunos virus RNA están expuestos a mecanismos de rearreglos y recombinación que les permiten saltos evolutivos de importancia (142).

Por otra parte, el éxito evolutivo de los virus RNA también es atribuible a su habilidad para utilizar diferentes estrategias de replicación y adaptarse a su vez a una amplia gama de nichos biológicos durante su diseminación en un único huésped o en una red de varios huéspedes.

La variabilidad de los RNA virus es un fenómeno extensamente estudiado, si bien poco se conoce acerca de los factores responsables de los diferentes patrones de variación correspondientes a distintos virus.

Dado que la fuente de variación es la mutación, su expresión puede no manifestarse (tal es el caso de una mutación inviable) o bien puede traducirse en un cambio de

un único aminoácido en una determinada proteína viral. La demostración de la mutabilidad de los virus RNA se evidenció por medio de diversos métodos. En particular, la frecuencia de aparición de variantes que habían perdido el sitio de reconocimiento para un anticuerpo monoclonal neutralizante, ha sido empleada como una medida de la frecuencia de mutación en el caso de los virus Influenza (89), Polio (48) y VSV (122). Posteriormente, la secuenciación de genes de clones virales seleccionados al azar permitió calcular directamente la velocidad de mutación. De este modo fue posible determinar que la velocidad de mutación del virus Influenza A resultó considerablemente más alta que la correspondiente al virus Polio, y aún más, esta diferencia podría estar relacionada con la velocidad de la evolución y la falta de éxito en la vacunación contra el virus Influenza A (115). Recientemente, Leider et al., empleando idéntica metodología, encontraron un retrovirus (RSV) con una velocidad de mutación superior a la correspondiente a los virus Polio e Influenza, lo cual indica que el RSV es altamente mutable (87).

En consecuencia, un gran número de virus RNA pertenecientes a distintas familias son ejemplos de variabilidad genética y, en particular, cuando implica cambios graduales en la antigenicidad de las glicoproteínas de superficie, el fenómeno se denomina "drift antigénico". El resultado es la selección de una determinada población

viral capaz de escapar de la vigilancia inmunológica y continuar con el ciclo replicativo en un huésped inmunológicamente competente (27).

1.1.2.1. "Drift" antigénico en virus RNA

1.1.2.1.1. Influenza

Uno de los ejemplos de "drift" antigénico mejor estudiados corresponde al virus Influenza (112, 154). Diversos trabajos demostraron que, al cabo de sucesivas epidemias, se seleccionaron variantes virales con mínimos cambios antigénicos, detectados, fundamentalmente, en la glicoproteína de superficie, la hemaglutinina (HA) (12, 76). A diferencia de la mayor parte de las infecciones virales, la inmunidad adquirida por la infección con virus Influenza, perteneciente a un único subtipo, rápidamente resulta inefectiva debido, principalmente, a las alteraciones en la estructura y/o conformación de la HA antes mencionada. El advenimiento de la tecnología de los hibridomas ha permitido el análisis de los distintos determinantes antigénicos en la HA viral y, a su vez, contribuyó al estudio de las variantes antigénicas encontradas en la naturaleza (110). Lubeck et al. encontraron que la aplicación de una fuerte presión selectiva de distintos anticuerpos monoclonales sobre

poblaciones virales clonadas daba lugar a la aparición de un importante número de variantes antigénicas (89). El empleo de los anticuerpos monoclonales también permitió localizar y caracterizar los sitios antigénicos en la HA viral, encontrando, entre otros, que la sustitución de un ácido aspártico por asparragina daba lugar a la aparición de un nuevo sitio de glicosilación provocando una modificación en la antigenicidad de la molécula de HA (135). No obstante, la gran mayoría de las variantes antigénicas seleccionadas in-vitro con anticuerpos monoclonales se comportó análogamente al virus parental en un ensayo de neutralización frente a un antisuero policlonal, sugiriendo que dichas poblaciones virales no tendrían oportunidad de surgir como variantes dominantes en la naturaleza (153).

En un intento por interpretar la extensiva variabilidad antigénica del virus Influenza A in-vivo, Murakami et al. estudiaron el papel de los leucocitos polimorfonucleares, cuya aparición es característica durante la infección de humanos y hurones. Demostraron que el sólo agregado de polimorfonucleares humanos a un cultivo de células MDCK infectado con el virus Influenza A NWS producía un aumento significativo de la variación antigénica, sugiriendo una actividad mutagénica de los polimorfonucleares sobre el virus que replica intracelularmente (99). Por último, además de la variabilidad antigénica y la compleja epidemiología

características de los virus Influenza A y B, se ha descripto un mecanismo adicional de selección de variantes antigénicas que depende de los diferentes tropismos celulares de las subpoblaciones virales en cuestión (75, 132).

1.1.2.1.2. Lentivirus

Las infecciones provocadas por lentivirus constituyen el modelo óptimo para el estudio del "drift" antigénico en un único animal (26). Estos agentes se agrupan como una subfamilia dentro de los retrovirus, cuyo nombre deriva de la propiedad de establecer infecciones de tipo lento. Los lentivirus causan enfermedades crónicas que afectan los pulmones y los sistemas hematopoyético, inmune y nervioso de humanos y animales (63).

1.1.2.1.2.1. Virus Visna

En infecciones naturales y experimentales en ovejas, el agente etiológico Visna-Maedi (lentivirus prototipo) replica en el sitio de entrada (macrófagos alveolares en las infecciones naturales) y luego se disemina a través de la vía sanguínea u otras rutas (fluido

cerebroespinal) (63). El virus persiste fundamentalmente en el cerebro y continúa circulando en sangre en forma concomitante a la producción de anticuerpos neutralizantes especificos al cabo de 3 o 4 semanas post-infección (102, 103). La naturaleza inmunológicamente silente de la infección se podría explicar teniendo en cuenta que la mayoría de las células infectadas contienen virus en un estado latente, en el cual los antígenos virales no son producidos en suficiente cantidad como para ser detectados por la vigilancia inmunológica que provocaría la destrucción celular. En el caso de Visna, la célula móvil por excelencia es el monocito que podría vehiculizar el genoma viral a través de fluidos (sanguíneo y cerebroespinal) que a la vez contienen células inmunes y anticuerpos neutralizantes (55).

Existe evidencia adicional que apoyaría este mecanismo del "caballo de Troya" obtenida a través del análisis de hibridización "in situ" realizado con células de fluido cerebroespinal concentradas. De esta manera se demostró: 1) la acumulación de RNA viral en monocitos, en niveles restringidos; 2) la circulación de monocitos infectados en forma latente en fluidos que contienen anticuerpos neutralizantes y 3) la transferencia de virus infeccioso entre monocitos y células del plexo coroideo bajo condiciones de íntimo contacto entre las mismas (63).

Por otra parte, los aislamientos virales obtenidos a partir de monocitos de sangre periférica a distintos

tiempos p.i. no fueron neutralizados por los anticuerpos séricos (101). Estos resultados sugieren que la presencia de anticuerpos neutralizantes no es suficiente para limitar y/o erradicar la infección viral. En consecuencia, se postuló que el virus Visna podría sufrir mutaciones a lo largo de la infección persistente y las variantes virales no neutralizables por los anticuerpos podrían presentar una ventaja selectiva de crecimiento (26). Respecto de este evento de variación antigénica, es necesario remarcar dos aspectos fundamentales: 1) las variantes virales no parecen reemplazar a la cepa infectante original y 2) la variación antigénica de Visna sólo puede ser detectada en un 25% de los animales infectados. La primera hipótesis no constituiría por sí misma una observación relevante si se considera que los retrovirus se integran en el genoma de la célula huésped, y aún más, se demostró que los precursores de los monocitos en médula ósea contienen ácido nucleico viral, convirtiéndose en reservorios de la cepa infectante (55). En relación al segundo caso, Lutley et al. (1983) y Thormar et al. (1983) consideran que la variación antigénica es un evento poco frecuente e intrascendente tanto para la persistencia viral como para la replicación viral sostenida en animales inmunizados (90, 144). Sin embargo, cabe destacar que la mencionada variabilidad antigénica detectada en la cuarta parte de todos los animales infectados utilizando un "pool" de anticuerpos policlonales resulta,

sin dudas, un fenómeno significativo desde el punto de vista biológico (26).

A través del estudio de aislamientos virales obtenidos a partir de sangre de dos ovejas infectadas con la cepa 1514 del virus Visna durante un período de tres años, se encontró que los anticuerpos producidos más tempranamente neutralizaban el virus parental pero no los virus obtenidos tardíamente de leucocitos de sangre periférica. La respuesta de anticuerpos se amplía con el tiempo y los sueros obtenidos tardíamente neutralizaron las variantes virales previamente seleccionadas. No obstante, la última muestra de suero era capaz de distinguir entre las variantes antigénicas y el virus que había originado la infección (101). Por lo tanto, dichas variantes virales deben haber surgido como consecuencia de una fuerte presión selectiva ejercida por los anticuerpos neutralizantes a lo largo de la infección persistente. Estos resultados fueron corroborados a través de experimentos realizados con sueros inmunes para seleccionar variantes virales in-vitro. Los virus obtenidos en cultivos de tejidos no fueron neutralizados por los anticuerpos utilizados para seleccionarlos y así se comportaron como variantes antigénicas análogas a aquéllas detectadas en el animal (100).

A través del mapeo de oligonucleótidos resistentes a RNasa T1 y del análisis de secuencia del RNA genómico de las variantes virales aisladas in-vivo e in-vitro, se

investigaron las bases moleculares de la antigenicidad alterada. Se encontró que dichas variantes estaban estrechamente relacionadas con el virus parental y sólo diferían de él en unos pocos cambios localizados en la región env del genoma viral que codifica, precisamente, para la glicoproteína de membrana gp135 (25). Llamativamente, el análisis de oligonucleótidos de variantes virales provenientes de otro animal infectado reveló idénticos cambios que a su vez reflejaban las mismas mutaciones puntuales, tal como se determinó a través de la secuenciación del RNA. De esta forma los cambios se acumularían en el genoma de las variantes y el "drift" antigénico ocurriría progresivamente.

En consecuencia, los anticuerpos neutralizantes del animal inmune parecen haber ejercido una fuerte presión de selección sobre cambios mutacionales del gen env y las mutaciones así seleccionadas presumiblemente alterarían específicamente el sitio de interacción de las moléculas de anticuerpos con la glicoproteína viral. Esto podría involucrar 3 o 4 epitopes sobre la proteína, cada uno conteniendo una pequeña cantidad de aminoácidos, que no estarían asociados con potenciales sitios de glicosilación (26). El empleo de anticuerpos monoclonales preparados contra la gp135 de la cepa 1514 del virus Visna permitió demostrar que el reducido número de cambios de bases detectados en las variantes provocaba efectos profundos en

el arreglo topológico de los epitopes en dicha proteina (139).

De este modo las mutaciones puntuales en el gen env podrian inducir la exposición de epitopes previamente presentes en la glicoproteina en lugar de la creación de nuevos sitios antigénicos.

La correlación del análisis genético de las variantes antigénicas de Visna con los estudios de anticuerpos monoclonales sugieren el compromiso de unos pocos aminoácidos de la gp135 que originarian la modificación de la estructura de la proteina viral y, a la vez, el mecanismo de dicha alteración consistiria en un cambio de los epitopes expuestos en la superficie y no en la desaparición o creación de otros determinantes antigénicos (26).

1.1.2.1.2.2. Virus de la anemia infecciosa equina

El virus de la anemia infecciosa equina (AIE) es otro miembro de la Subfamilia Lentivirinae extensamente estudiado. La evolución de la enfermedad en caballos natural o experimentalmente infectados con AIE consiste en el desarrollo de un periodo agudo incial caracterizado por fiebre y hemorragias, correlacionado con una replicación masiva del virus en macrófagos y su posterior destrucción.

La respuesta más temprana y predominante de anticuerpos está dirigida contra las glicoproteínas de envoltura, gp90 y gp45. Los síntomas más clásicos se manifiestan durante el estadío crónico de la enfermedad y se observan ciclos recurrentes de viremia y signos clínicos que aparecen en intervalos irregulares distanciados en semanas o meses (26). Esta naturaleza periódica de la cronicidad causada por AIE puede ser atribuida a la evolución secuencial de variantes antigénicas que temporariamente escapan de la respuesta humoral establecida (78). Esto se evidenció a través del análisis de aislamientos virales obtenidos durante episodios febriles a partir de caballos experimentalmente infectados en ensayos de neutralización, usando muestras de suero colectadas durante períodos secuenciales afebriles. Llamativamente, se encontró que cada aislamiento viral podía ser inactivado únicamente por muestras de suero extraídas después del episodio clínico de origen; ningún aislamiento viral pudo ser neutralizado por muestras de suero obtenidas en forma previa al ciclo de enfermedad que había originado la variante viral. Esta unicidad antigénica de la mayor parte de los aislamientos fue confirmada por ensayos de reactividad en "Western blot". En consecuencia, es posible aislar una variante antigénica viral diferente asociada a cada episodio febril y, por otra parte, la evolución de una nueva cepa de virus puede demandar desde dos semanas hasta varios meses.

El grado de variación proteica y genómica detectado en AIE a través del análisis peptídico y mapeo de oligonucleótidos sugiere que la variación antigénica observada es el resultado de mutaciones puntuales al azar en el RNA viral. Si bien este hecho es análogo al virus Visna, la naturaleza de la variación de AIE es, aparentemente, no acumulativa y completamente azarosa, lo cual a su vez se correlaciona con una alta frecuencia de mutación (116, 117, 129).

A diferencia del virus Visna, se encontraron al menos dos patrones de glicosilación diferentes para gp90 y gp45 y además, la expresión de dichos patrones en las glicoproteínas de un único aislamiento viral es completamente independiente (129).

En consecuencia, la variación observada en la glicosilación de las proteínas de superficie del AIE podría jugar un papel muy significativo en la antigenicidad viral durante al transcurso de la infección persistente.

1.1.3. CONSIDERACIONES FINALES DE LA PRIMERA PARTE

Debido a velocidades de mutación extremadamente altas, gran parte de las poblaciones de virus RNA constituyen colecciones de cuasiespecies con genomas relacionados. Estas poblaciones virales que mutan rápidamente pueden permanecer relativamente estables bajo determinadas condiciones de replicación. Sin embargo, si dichas condiciones se modifican, el equilibrio se altera y una población viral minoritaria puede competir favorablemente con el virus predominante y dirigir el curso de la evolución. No obstante, esta rápida evolución de los genomas RNA resulta, en algunas ocasiones, en cambios profundos en la especificidad de especie del virus o en su tropismo celular lo cual podría significar un fracaso desde el punto de vista evolutivo.

En consecuencia, se trata de lograr un equilibrio óptimo entre la replicación viral y la respuesta del huésped. Precisamente, esta solución de compromiso resulta indispensable para el mantenimiento de la persistencia viral.

1.2. SEGUNDA PARTE: ASPECTOS BIOLOGICOS DE LOS ARENAVIRUS

1.2.1. Introducción

De acuerdo a criterios morfológicos, físico-químicos y serológicos considerados para la diferenciación de los arenavirus respecto de otros taxones virales (119), el Comité Internacional de Taxonomía de virus estableció su clasificación como familia Arenaviridae (50). A su vez, por inmunofluorescencia indirecta, la familia Arenaviridae puede dividirse en dos grandes grupos (159): a) los virus del Viejo Mundo, donde se incluyen el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM) y el Complejo Lassa, definido por los virus Lassa, Mobala y Mopeia y los recientemente aislados Ippy y Skukusa (77) y b) los virus del Nuevo Mundo o Complejo Tacaribe, que comprende los virus Junín, Machupo, Tacaribe, Amapari, Flexal, Pichindé, Latino, Paraná y Tamiami (71). Los integrantes de esta familia son partículas pleomórficas de 50-300 nm de diámetro, con una envoltura lipoproteica dentro de la cual se observa un número variable de partículas libres semejantes a granos de arena (del latín, arenosus: arenoso, lo cual da origen al nombre de la familia). Dichos gránulos, de 20-25 nm de diámetro son ribosomas de origen celular.

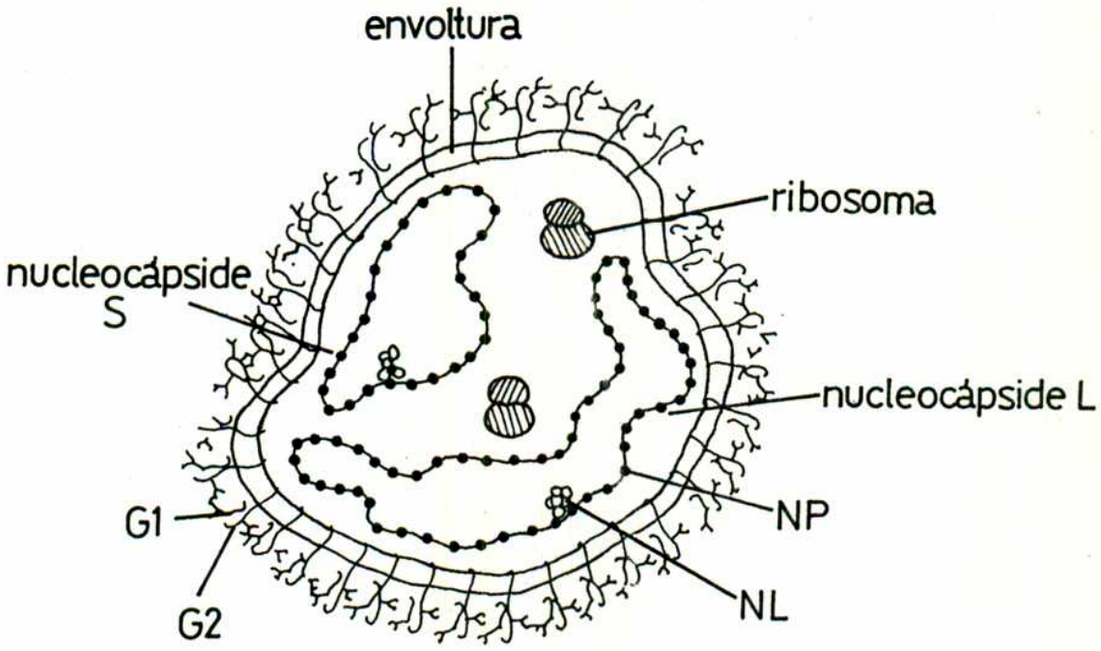
Las proyecciones superficiales de la envoltura

(llamadas espículas) estarían involucradas en la neutralización de la infectividad, siendo estos antígenos altamente específicos de especie. El antígeno fijador de complemento, que en este caso se encuentra en la ribonucleoproteína, se emplea para definir al denominado Complejo Tacaribe.

El genoma de los arenavirus consiste en dos segmentos de RNA de simple cadena denominados L (large) (PM 2-3 x 10^6) y S (small) (PM 1,3 x 10^6) que codifican esencialmente para información genética no superpuesta. Así, el S RNA contiene información para la síntesis de la proteína de nucleocápside (NP 60-63 Kd) y para el precursor de las glicoproteínas de la membrana viral, GPC (GP1 44-64 Kd; GP2 35-41 Kd) en tanto que el L RNA condificaría para una proteína más pequeña (L 180-200 Kd) que correspondería a la replicasa-transcriptasa viral (Esquema pág. 20) (19).

Una de las particularidades de los integrantes de la familia Arenaviridae es su estrategia de replicación. Recientemente se determinó la secuencia nucleotídica de cuatro arenavirus (8, 9, 52, 138) y así se corroboró que el extremo 3' del S RNA (que codifica para la NP) posee una secuencia complementaria al mRNA de dicho polipéptido (-RNA) y la mitad 5' (que codifica para el precursor GPC) tiene una secuencia idéntica al mRNA de GPC (+RNA). Por ende, se verifica una estrategia de codificación denominada "ambisense" (11).

ESQUEMA DE LA PARTICULA VIRAL DE UN ARENAVIRUS



1.2.2. Los arenavirus como agentes causales de infecciones in-vivo

Los arenavirus se caracterizan por su habilidad para establecer infecciones persistentes en roedores (con excepción del virus Tacaribe) y, a su vez, por presentar un rango de huésped altamente restringido. Dicha propiedad no es debida a la falta de susceptibilidad de otros animales ya que, si bien no es un fenómeno comúnmente descripto, una amplia variedad de mamíferos ha sido infectada experimental o incidentalmente con arenavirus. Dado que estos virus parecen ser mantenidos en la naturaleza a través de animales persistentemente infectados, el alto grado de especificidad del huésped podría representar la evolución de una interacción virus-huésped apropiada que permitiría el establecimiento de la persistencia viral.

La infección incidental de humanos provocada por ciertos arenavirus puede ocasionar enfermedades fatales conocidas como fiebres hemorrágicas. Tal es el caso de los virus Lassa (fiebre de Lassa), Junín (fiebre hemorrágica argentina) y Machupo (fiebre hemorrágica boliviana). Los casos humanos ocurren en áreas habitadas por roedores infectados en los que el virus se perpetúa y se disemina a través de la orina y/o saliva.

El virus Lassa se encontró asociado únicamente con el múrido Mastomys natalensis, habitante de la región de la

sabana del continente africano, en tanto que Junín y Machupo pueden ser transmitidos a partir de roedores pertenecientes a la familia Cricetidae (71). Así, el virus Machupo, inicialmente aislado en el noreste boliviano, se encuentra restringido exclusivamente a Calomys callosus, mientras que el virus Junín ha sido repetidamente aislado a partir de los cricétidos Calomys musculinus, Calomys laucha y Akodon azarae (128). Por otra parte, el virus LCM está asociado, predominantemente, con el ratón doméstico Mus musculus, un roedor perteneciente a la familia Muridae que apareció en el Viejo Mundo y actualmente está relacionado con el hombre en todos los continentes.

Los mecanismos involucrados en la perpetuación de los arenavirus en la naturaleza han sido extensamente estudiados, principalmente en el caso de los virus LCM y Junín, a través del empleo de modelos experimentales apropiados. A continuación se describen los hechos más salientes de la infección in-vivo originada por ambos arenavirus.

1.2.2.1. Virus de la coriomeningitis linfocítica

Fue aislado en 1934 por Armstrong y Lillie por pasajes en monos de "materiales infecciosos" provenientes de humanos.

Traub (1936) observó la presencia de virus infeccioso en tejidos y en circulación de animales infectados naturalmente con el virus LCM (145).

Los principios esenciales a través de los cuales el sistema inmune elimina el virus infeccioso del huésped durante una infección aguda, pero falla en hacerlo cuando se trata de una infección persistente, han sido establecidos, en parte, a partir de los estudios realizados con el virus LCM.

El virus puede inducir una infección aguda o persistente en su huésped natural, el ratón. El primer caso ha sido particularmente observado en animales adultos. Así, la inoculación de ratones adultos inmunocompetentes por vía intracerebral usualmente causa una enfermedad aguda caracterizada por leptomeningitis y coroiditis, que conduce a la muerte en un lapso de seis a diez días. Un pequeño porcentaje de los animales puede sobrevivir y el virus puede ser eliminado luego de semanas o meses con la intervención del sistema inmune.

El mecanismo antiviral primario que desencadena la infección con el virus LCM, involucrado tanto en la eliminación del virus como en la inmunopatología inducida por el virus, es la actividad LT citotóxica específica (CTL) restringida por el H-2 (5, 21). Este hecho se explica a través de dos observaciones: 1) la falla para generar linfocitos T citotóxicos o la disminución en número de estas

células permite la progresión de una infección aguda a una infección persistente (20) y 2) la transferencia adoptiva de CTL clonados elimina rápida y efectivamente el virus LCM de ratones agudos (21).

El caso de la infección persistente plantea un cuadro diferente al descripto para la infección aguda. Los primeros trabajos datan del año 1958, cuando Hotchin y Cintis describieron un modelo experimental que demostró que ratones neonatos inoculados con el virus LCM dentro de las primeras 24 hs. de vida sobrevivían a una dosis letal de virus para el ratón adulto y presentaban una infección productiva durante toda la vida del huésped (69). El virus se perpetúa en diferentes órganos alcanzando títulos virales máximos durante los días iniciales p.i. (10^7-10^8 UFP/ml de suero o gr de tejido) y luego cae 4-5 logs en los días subsiguientes, manteniéndose en 10^3-10^5 UFP/ml. Por el contrario, durante la fase inicial de replicación viral aumentada, las secuencias de ácido nucleico viral son difícilmente detectadas pero se acumulan posteriormente a lo largo del transcurso de la infección, lo cual sugiere la formación de partículas virales incompletas (137).

Durante la persistencia, los ratones montan una respuesta de anticuerpos contra todas las proteínas del virus LCM, pero la respuesta CTL virus específica está disminuída lo cual sugiere, al menos, un defecto determinado que colabora en el desarrollo de este tipo de infección

(21). La evidencia que sostiene esta hipótesis surge a partir de experimentos que demostraron que ratones persistentemente infectados reconstituidos con linfocitos específicos para el virus LCM Thy 1,2+, Lyt 2,2+, L3T4- son capaces de limpiar el virus infeccioso de la sangre y otros tejidos (107). La eliminación del virus LCM de los animales persistentemente infectados es sorprendente: 10^4-10^5 UFP de virus desaparecen de sangre, hígado y bazo alrededor del día 15, en tanto que la eliminación ocurre más lentamente en riñón y cerebro. El 99,9% del virus es removido por completo al cabo de 60-120 días después de la transferencia adoptiva, así como también se elimina el ácido nucleico viral. Cabe destacar que esta limpieza del virus no trae aparejada la lisis celular, que tampoco se observa in-vivo en fagocitos mononucleares y linfocitos infectados, en los cuales el virus LCM multiplica (96).

Si bien el hallazgo de un principio de inmunoterapia capaz de eliminar el virus LCM de los ratones persistentemente infectados sin destruir las células involucradas fue relevante, aún quedaba por interpretar la incapacidad de dichos animales para generar una respuesta CTL específica para el virus LCM. Inicialmente se demostró que en el ratón "carrier" no se puede evidenciar el fenómeno de hipersensibilidad retardada ni observar actividad CTL, razón por la cual se aceptaba que estos animales eran inmunológicamente tolerantes a nivel del compartimento de

células T (86). Recientemente fue posible dilucidar el mecanismo biológico por el cual los LT citotóxicos se encuentran suprimidos durante la infección persistente. Ahmed et al. (1984) demostraron, mediante experimentos de transferencia adoptiva, que las células de bazo de ratones "carrier" suprimían activamente las respuestas CTL específicas para el virus LCM de las células del bazo de ratones adultos normales. Por otra parte, dicha supresión específica no afectaba la respuesta de anticuerpos. En consecuencia, si la supresión de la respuesta CTL era debida al virus alojado en el ratón "carrier", el virus LCM presente en el bazo de los mismos podía resultar una variante genética viral. Con el objeto de analizar esta posibilidad, los autores mencionados clonaron el virus LCM proveniente de bazo de ratones "carrier" de dos meses de edad infectados perinatalmente y estudiaron su capacidad para inducir una respuesta CTL específica en ratones adultos, en comparación con la cepa infectante original. En el caso de la inoculación con la cepa Armstrong, los animales generaron una buena respuesta CTL y de anticuerpos y eliminaron el virus del bazo en un lapso de 8 días (3). Por el contrario, los clones virales aislados del bazo de ratones persistentemente infectados originaron una respuesta CTL considerablemente inferior a la registrada con la cepa parental. Tampoco fue posible lograr la eliminación del virus del organismo, si bien los animales montaron una

respuesta inmune humoral.

De acuerdo a estos resultados, Ahmed et al. concluyeron que la supresión de la respuesta CTL especifica era debida a la selección de variantes genéticas del virus LCM en el bazo de ratones persistentemente infectados (3).

¿Cuál sería el mecanismo de supresión de la respuesta CTL por parte de las variantes virales? Los autores plantean varias posibilidades. Las variantes genéticas serían linfotrópicas, infectarían los CTL específicos para el virus e inhibirían su diferenciación en células efectoras citolíticas capaces de eliminar la infección viral. Otro mecanismo posible consistiría en una presentación inapropiada del antígeno en las células T. La infección de dichas células por parte de las variantes virales y la subsecuente expresión de las proteínas respectivas en la membrana celular podría resultar una señal negativa y suprimir la inducción de la respuesta CTL especifica. Una tercera opción podría involucrar algún efecto de las variantes del virus LCM sobre las células T "helper" o los macrófagos, eventualmente necesarios para generar respuestas CTL especificas (3).

En consecuencia, las variantes genéticas del virus LCM aisladas in-vivo jugarían un papel preponderante en el establecimiento de la infección persistente. Dichas variantes genéticas fueron denominadas CTL- en contraste con el fenotipo CTL+ correspondiente al virus tipo salvaje

(108).

Estudios posteriores evidenciaron una importante influencia de los tejidos del huésped en la selección de las variantes genéticas. Ya existían antecedentes acerca de la presencia de variantes del virus LCM con distintas propiedades biológicas y diferentes fenotipos de placa aislados de hígado y bazo de ratones "carrier", si bien no se conocía el tipo de célula involucrada en dicha selección (70, 121).

Ahmed et al. demostraron que los aislamientos del virus LCM, obtenidos a partir del SNC y tejidos linfáticos (bazo y nódulos), presentaban un fenotipo diferente (2). La mayoría de los aislamientos virales provenientes del SNC causaban infecciones agudas en ratones adultos en tanto que los obtenidos a partir de bazo y nódulos linfáticos provocaban una infección crónica en el mismo hospedador. Cabe destacar que la infección de los tejidos linfáticos está limitada a las células T "helper" y macrófagos, con una mínima participación de las células T citotóxicas y células B (1). Paralelamente, también se demostró la selección inversa observada, precisamente, en ratones inoculados con variantes virales provenientes de bazo; el virus aislado del cerebro de dichos animales presentaba el fenotipo salvaje (2).

Con el objeto de comparar las secuencias del segmento S del RNA, Salvato et al. (1988) llevaron a cabo el

análisis molecular del virus LCM CTL+ y CTL- (130). Encontraron sólo dos cambios en la secuencia nucleotídica, uno de los cuales se traduce en un único cambio aminoacídico en el fenotipo CTL-. Dado que dicho cambio también había sido observado en otras cepas del virus LCM capaces de generar, pero no de suprimir, respuestas CTL específicas, es altamente probable que las alteraciones en la secuencia del S RNA no estuvieran relacionadas con el fenotipo CTL-, y, a su vez, los autores postulan que la función responsable de la supresión inmune CTL mapea en el segmento L del RNA (130).

Experimentos realizados con tres reasortantes virales que contenían el mismo segmento S, pero tenían el segmento L proveniente alternativamente de la cepa salvaje original (Armstrong), de una variante CTL- derivada de bazo, o de una revertante aislada del SNC (derivada de una variante CTL-), demostraron inequívocamente que las mutaciones relevantes desde el punto de vista biológico ocurrirían en el segmento L del RNA viral. Este hecho no sólo se comprobó en el surgimiento de la variante viral aislada de bazo de animales inoculados con la cepa Armstrong, sino también en el caso de la variante de bazo que había revertido al fenotipo salvaje (4).

En consecuencia, la(s) mutación(es) en el segmento L del RNA del virus LCM tiene(n) un efecto profundo en la habilidad del virus para originar una infección crónica en

el ratón adulto, y, por otra parte, dichas alteraciones genéticas estarían relacionadas con la selección de las variantes virales en órganos específicos. Los estudios genéticos mencionados sugieren que la(s) mutación(es) en el gen que codifica para la polimerasa viral podría(n) estar involucrada(s) en facilitar una replicación más eficiente de dichas variantes genéticas en linfocitos, macrófagos o en ambos. Esta replicación aumentada en células del sistema linfoideo podría ser la causa subyacente de la inmunosupresión y la infección crónica.

1.2.2.2. Virus Junín

Gracias a los trabajos pioneros de Parodi (1958) (114) seguidos un año más tarde por los de Pirosky (120), fue establecida la etiología viral de la fiebre hemorrágica argentina (FHA) cuando un virus desconocido fue aislado de sangre y muestras de tejidos de un paciente residente en la ciudad de Junín, Pcia. de Buenos Aires.

La FHA es una enfermedad endemo-epidémica, también conocida como "mal de los rastrojos", geográficamente circunscripta al área central de la pampa húmeda. El cuadro clínico que causa en humanos se caracteriza por alteraciones hematológicas y neurológicas, incluyendo un síndrome febril, junto con patologías cardiovasculares, renales y digestivas

de grado variable, descriptas en detalle por primera vez en 1955 (7). La sintomatología clínica provocada por el virus Junín en humanos se asemeja a la conocida para el virus Machupo, ya que puede abarcar desde una infección inaparente hasta una enfermedad letal.

Si bien la mayoría de los pacientes se recupera de la infección, existen casos donde puede ocurrir un desenlace fatal con severas manifestaciones hemorrágicas o neurológicas (125). A su vez, los casos de infección inaparente en pobladores del área endémica han sido detectados mediante estudios serológicos específicos (156).

Si bien la extensión de la zona endémica es pequeña (120.000 Km^2) en relación a la superficie total de la Argentina (2.800.000 Km^2), su densidad poblacional y, al mismo tiempo, su importancia económica basada fundamentalmente en la agricultura, influyeron para que la FHA fuese considerada un serio problema sanitario (91).

Hasta el año 1986, el número total de casos ascendía a 21.000 correspondiente a un período de 30 años. La mayor parte de los pacientes son trabajadores ocupados en la cosecha de maíz, girasol o sorgo. Es interesante mencionar que se ha detectado actividad de virus Junín en la localidad de Pila (Pcia. de Bs. As.) ubicada a 280 Km del foco endémico de FHA, ya que fue posible aislar virus del cerebro de un A. azarae y demostrar la presencia de anticuerpos por inmunofluorescencia en dos habitantes del

lugar (155).

Al igual que otros arenavirus, el virus Junín se mantiene en la naturaleza infectando roedores, si bien este virus parece tener un rango de huésped más amplio que los otros integrantes de la familia. Es así como fue aislado de C. musculinus, C. laucha, A. azarae y M. musculus siendo el primero el más importante desde el punto de vista epidemiológico, tanto por el elevado número de aislamientos virales positivos obtenidos como por su dominancia numérica sobre las especies C. laucha y A. azarae (113, 128).

La mayor incidencia de la FHA se registra en otoño (con un valor máximo en el mes de Mayo) hecho que se correlaciona con un aumento de la densidad de los roedores en el campo, particularmente los del género Calomys.

En relación a los huéspedes naturales, se han realizado diversos estudios con el fin de comprender los aspectos tanto ecológicos como biológicos de la interacción virus-roedor. A través de capturas realizadas en el área endémica se detectó viruria únicamente en la especie C. musculinus, mientras que en los hisopados bucales fue posible detectar virus en las especies C. musculinus, C. laucha, A. azarae y M. musculus (128).

Estudios realizados con C. musculinus infectados a través del contacto con otros cricétidos infectados experimentalmente demostraron que algunos animales desarrollan viremias crónicas, con altos títulos de virus en

glándulas salivales y bajos títulos de anticuerpos fijadores de complemento, mientras que otros presentan viremias leves y anticuerpos fijadores de complemento en títulos mayores que los primeros. Por microscopía electrónica se evidenció la presencia de partículas virales en glándulas salivales, cerebro y hepatocitos aislados, pero nunca acompañada de lesiones en dichos órganos (93, 94).

En principio, la transmisión horizontal por contacto directo es la forma de contagio entre roedores, siendo la saliva la secreción infectiva más importante para la diseminación viral en forma natural. No se observó infección congénita ni transmisión vertical, si bien sí se detectó transmisión post parto (128).

Estudios recientes demostraron que la inoculación por vía i.n. de C. musculinus neonatos con una cepa de campo produce un mayor índice de mortalidad respecto de los controles sin infectar, sin la observación previa de signos neurológicos típicos de enfermedad. Los animales sobrevivientes presentan un retraso en el crecimiento así como también una marcada reducción de la eficiencia reproductiva. Este hecho señala que la transmisión vertical por sí sola resultaría insuficiente para mantener el virus en la naturaleza (150).

Por otra parte, se encontró que no sólo las cuatro especies antes mencionadas son capaces de sobrellevar una infección crónica con virus Junín. Es así como Calomys

callidus (no reconocido como huésped natural) también es sensible a la infección con una cepa atenuada de virus Junín ($XJCl_{3}$) pudiéndose rescatar virus de cerebro, fauces y glándulas salivales hasta los dos meses p.i. (148, 149). Por otra parte, la inoculación intracerebral de Bolomys obscurus, residente en la zona endémica pero no reconocido como huésped natural del virus, provoca una respuesta de anticuerpos fijadores de complemento en tanto que se puede detectar virus en fauces y en sangre (127). Si bien el tamaño muestral es reducido, los resultados indican que esta especie también es sensible a la infección. Estos datos, conjuntamente con la detección de casos de FHA fuera del área endémica, deben ser evaluados en relación al posible papel que jugarían los distintos roedores tanto en la consolidación como en la extensión de la zona endémica.

1.2.2.2.1. Infección experimental de C. musculinus con la cepa $XJCl_{3}$ de virus Junín

Como fuera mencionado anteriormente, el cricétido C. musculinus es el principal reservorio natural del virus Junín. La infección experimental de esta especie con la cepa atenuada $XJCl_{3}$ del virus Junín ha sido extensamente estudiada, siendo importante destacar los aportes realizados, al repecto, por el Dr. J. S. Lampuri.

C. musculinus neonatos (1-10 días de edad) inoculados por vía i.p. desarrollan una enfermedad caracterizada, en su fase inicial, por disminución en los reflejos, erizamiento del pelo, y progresivamente evoluciona con una acentuada lateralización de la marcha acompañada de temblores espontáneos y/o inducidos, pudiendo llegar a la parálisis completa del tren posterior. Como consecuencia de la enfermedad muere más de un 60% de los animales entre los 14 y 28 días p.i..

La respuesta de los sobrevivientes a la infección no es uniforme ya que algunos se recuperan por completo en tanto que otros presentan un tamaño corporal reducido y signos de hiperexcitabilidad. En ambos casos se detecta la presencia de virus infeccioso en altos títulos, el cual no es eliminado aún luego de varios meses de infección.

Por último, otro grupo está constituído por animales que nunca enferman, entre los cuales, en algunos casos, se rescata virus a partir de cerebro (83). Cabe destacar que todos los cricétidos sobrevivientes a la infección montan una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra el virus (83).

La etapa aguda del C. musculinus perinatalmente infectado se caracteriza fundamentalmente por la presencia de virus infeccioso en el cerebro registrada a partir del día 6 p.i., que alcanza un título viral máximo (10^5-10^6 DL_{50}/ml) el día 11 p.i..

En forma concomitante, también se detectan anticuerpos neutralizantes en circulación a partir del día 11 p.i., los cuales se mantienen por el resto de la vida de los animales (83). En algunos casos es factible detectar viremias que se clarifican a partir del 30 p.i..

Si bien el número total de leucocitos se mantiene dentro de los valores normales, se detecta una importante neutrofilia y aumento de monocitos acompañado de linfopenia, entre los días 13 y 18 p.i.; los cricétidos que logran superar la etapa aguda de la enfermedad tienden a normalizar sus valores hematológicos (141).

También fue posible aislar virus infeccioso a partir de glándulas salivales de algunos animales; otros órganos estudiados (riñón, corazón, pulmón, adrenales, timo, bazo, hígado y páncreas) fueron rutinariamente negativos (83).

En relación a la vía de entrada del virus al organismo, se demostró que el virus Junín replica eficazmente en macrófagos peritoneales de cricétidos adultos y neonatos, hecho que indica que estas células son permisivas y pueden actuar como blanco en el comienzo de la infección viral (33). Sin embargo, esta interacción virus-macrófagos peritoneales no explicaba satisfactoriamente las causas de la resistencia edad-dependiente observada en C. musculinus, el cual, a partir de los 15 días de edad, resultaba completamente

resistente a la inoculación por vía i.p. (33). Experimentos realizados in-vivo empleando sílica demostraron la existencia de una barrera edad-dependiente integrada por células macrofágicas que probablemente se deba a una actividad antiviral extrínseca del macrófago, es decir, estas células o sus productos serían los encargados de evitar la replicación viral en otro tipo celular susceptible (33).

Los animales sobrevivientes a la etapa aguda de la enfermedad que manifiestan signos neurológicos persistentes presentan una severa meningoencefalitis asociada a una alta concentración de virus en el cerebro y antígeno viral en neuronas corticales y células de Purkinje (81). La patogenia del daño tisular es probablemente de naturaleza inmunológica timo-dependiente ya que se observa una disminución significativa de la incidencia de la enfermedad y muerte como consecuencia de la administración de suero antitimocito a los cricétidos neonatos infectados (36).

Según los diversos trabajos realizados, la infección crónica establecida en C. musculinus con el virus Junín se correlaciona fundamentalmente con la presencia de virus infeccioso en el encéfalo y con un alto título de anticuerpos seroneutralizantes anti virus. Experimentos realizados empleando la droga ciclofosfamida demostraron que el papel que juegan los anticuerpos como mecanismo activo de defensa sería relativo, a la vez que sugieren que los mismos

tampoco intervendrían como mediadores de citotoxicidad ni de los daños hísticos observados (34). Paralelamente, los aislamientos virales provenientes del cerebro de animales crónicamente infectados difieren en sus propiedades fenotípicas del virus parental que había iniciado la infección, observándose un enriquecimiento en mutantes termosensibles (31).

1.2.3. CONSIDERACIONES FINALES DE LA SEGUNDA PARTE

Los arenavirus se mantienen en la naturaleza infectando un restringido rango de huéspedes, siendo la mayoría de ellos roedores.

Dentro de la familia Arenaviridae, los modelos experimentales de infección crónica más estudiados corresponden a los virus LCM y Junín. En el primer caso, el análisis de la respuesta del ratón infectado con el virus LCM ha contribuido con conceptos fundamentales en la biología e inmunología modernas. Recientemente, el virus LCM se ha incorporado como otro virus RNA ejemplo de variabilidad genética, la cual sería responsable de la persistencia viral in-vivo.

En el caso de *C. musculinus* infectado con virus Junín, el estudio de este aspecto permitirá una comprensión más adecuada de la interacción virus-huésped respecto del establecimiento y/o mantenimiento de la persistencia viral.

2. OBJETIVOS

La fiebre hemorrágica argentina constituye un importante problema de salud si se considera que el área endémica aún continúa extendiéndose.

El roedor C. musculinus es el principal reservorio del virus Junín en la naturaleza, hecho que lo convierte en el responsable de la transmisión y diseminación viral. Poco se conoce acerca de los mecanismos involucrados en la perpetuación de este arenavirus en la naturaleza, la cual depende, precisamente, de su habilidad para establecer una infección persistente.

Con el propósito de investigar las características más salientes de la interacción virus-huésped, se han realizado en nuestro laboratorio numerosos estudios sobre la infección experimental de dicho cricétido con la cepa XJCl$_3$ de virus Junín, empleándose esta última, fundamentalmente, por razones de bioseguridad, ya que es atenuada para el humano.

Los objetivos principales del presente estudio fueron la búsqueda, el aislamiento y la caracterización de variantes virales antigénicas obtenidas a partir de C. musculinus inoculados experimentalmente con la cepa XJCl$_3$ de virus Junín y su eventual participación en el establecimiento y/o mantenimiento de la persistencia viral. Este trabajo de investigación se realizó en el marco de un

proyecto sobre "Evaluación de Modelos Animales para el estudio de la Fiebre Hemorrágica Argentina", que forma parte del Programa Nacional de Enfermedades Endémicas de la Secretaría de Ciencia y Técnica.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Virus

Se trabajó con la cepa atenuada del virus Junín (VJ) denominada XJCl$_3$ (62) mantenida en el laboratorio a través de pasajes en cerebro de ratón blanco. La cepa fue utilizada en el pasaje 13 posterior a su clonado con un título de 6 x 10^7 UFP/ml en células Vero. Asimismo, se utilizaron las cepas IV$_{4454}$ y XJ (prototipo) de VJ provenientes de crecimientos en células BHK-21, con títulos de 8 x 10^6 UFP/ml y 4 x 10^6 UFP/ml, respectivamente, cedidas por la Dra. N. A. Candurra.

3.2. Cultivo de tejidos

Se utilizó la línea continua proveniente de riñón de mono verde africano Cercopithecus aethiops, denominada Vero. La línea fue mantenida por repiques semanales en medio MEM (Medio Esencial Mínimo, Gibco) suplementado con 5% de suero de ternera (ST) inactivado y 50 ug/ml de gentamicina. El medio de mantenimiento utilizado fue MBE (Medio Basal de Eagle, Gibco) con 3% de ST inactivado y antibiótico.

Esta línea se utilizó para clonar y preparar stocks de virus en cultivo de tejidos y para la amplificación y

titulación de los materiales en estudio.

3.3. Animales

3.3.1. Calomys musculinus

Los Calomys musculinus utilizados provinieron de la colonia establecida en nuestro bioterio en el año 1980. La colonia fue originada a partir de cuatro parejas de animales del bioterio del Instituto de Virología de la Universidad de Córdoba, cedidas por la Dra. M. Sabattini.

La caracterización citogenética, bioquímica y de parámetros morfométricos de la colonia fue realizada por D'Aiutolo et al. (41).

Los apareos se realizan en forma exogámica, de forma de imitar las condiciones naturales de reproducción de este roedor.

Los cricétidos son alimentados con alimento balanceado para roedores (Labina, Purina S.A.) y agua ad-libitum.

Cabe destacar que los intentos de iniciar una cepa endocriada nunca superaron la 4ta. generación, pasada la cual resultó imposible obtener apareamientos exitosos.

3.3.2. Ratones

Se utilizaron ratones albinos cepa OF-1 (IFFA Credo, Lyon, Francia) de 24 hs. de vida para los aislamientos de virus. Estos animales se crían en el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

3.4. Determinación de la infectividad

3.4.1. Titulación por formación de placas bajo agar

Se utilizó el método de Damonte y Coto (43). Monocapas de células Vero cultivadas en botellas de 15 cc de capacidad se infectaron con 0,2 ml de diluciones seriadas decimales de virus a las 24-48 hs. de haber sido sembradas, por duplicado. Se dejó adsorber el virus durante una hora a 37°C, agitando suavemente las botellas cada 20 min. aproximadamente. Luego se retiró el inóculo y se cubrió la monocapa con 3 ml de medio semisólido nutritivo compuesto por partes iguales de una solución de agar al 1,4% en agua bidestilada y MEM doble concentrado suplementado con 4% de suero fetal bovino inactivado. Se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente; posteriormente las botellas se incubaron en forma invertida por el término de 7 días a 37°C, al cabo de los cuales se revelaron las placas de lisis fijando las células con formol al 10% durante 30 min. y, una vez extraído el agar, las células se tiñieron con una

solución de cristal violeta 1/1000 durante 15 min.

Se utlizaron dos botellas por dilución y los títulos virales se calcularon en base al número de placas, volumen del inóculo y dilución considerada.

3.4.2. Titulación por dosis letal 50 (DL_{50})

Se inoculó un volumen de 0,02 ml de diluciones seriadas decimales de virus en cerebro de ratón lactante. Se registró la mortalidad alrededor del día 20 p.i. y se calculó la DL_{50} que se obtiene por interpolación por el método de Reed y Muench (124) el cual se basa en las frecuencias acumulativas de respuestas positivas y negativas, las primeras de mayor a menor y las últimas a la inversa.

3.5. Preparación de los stocks de VJ

3.5.1. Clonado en células Vero

Monocapas de células Vero cultivadas en botellas de 60 cc de capacidad fueron infectadas con 0,4 ml de diluciones seriadas decimales (10^{-3} a 10^{-7}) de la cepa $XJCl_3$ de VJ. Al cabo de 7 días de incubación a 37°C,

se agregó a cada botella 3 ml de una mezcla compuesta, en partes iguales, por una solución de agar 1,4% en agua bidestilada y MEM doble concentrado, con el agregado de rojo neutro en una relación 1:41. Las botellas se mantuvieron durante 24 hs. a 37°C en oscuridad, para permitir la difusión del colorante. Al octavo día p.i. se observaron y marcaron placas de lisis en aquellas botellas infectadas con las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} de VJ. Dichas placas de lisis fueron levantadas con pipeta Pasteur y resuspendidas en medio de mantenimiento.

Monocapas celulares crecidas en botellas de 15 cc fueron infectadas con los clones así obtenidos. Luego de la adsorción, se eliminó el inóculo y se agregó un volumen de 3 ml de medio de mantenimiento. El sobrenadante colectado a los 4 y 5 días p.i. fue centrifugado a 1500 rpm durante 15 min. para eliminar restos celulares y finalmente fue fraccionado y almacenado a -70°C hasta su uso.

3.5.2. En cerebro de C. musculinus neonatos

Se inocularon cricétidos de 24 hs. de vida con 0,02 ml de VJ puro (obtenido por clonado) por vía i.c.. A los 7 días p.i. se sacrificaron los animales y se cosecharon los cerebros. Se preparó un homogenato al 10% (P/V) de cerebro de C. musculinus en PBS isotónico Ph=7,4, conteniendo 10% de

suero de ternera inactivado. El homogenato se centrifugó a 10000 x g durante una hora a 4°C. El sobrenadante se fraccionó y tituló por formación de placas bajo agar presentando un título de 10^8 UFP/ml. Se conservó a -70°C hasta su uso.

3.5.3. En cultivos de macrófagos peritoneales de C. musculinus

Tres C. musculinus de 20 días de edad fueron sometidos a un lavado de la cavidad peritoneal con 1,5 ml de MEM sin suero. Con los exudados obtenidos se establecieron cultivos en microplacas de 24 pocillos que fueron mantenidos a 37°C durante 2 hs.. Al cabo de dicho lapso, se eliminó el medio de cultivo y se agregó MEM adicionado con 5% de ST inactivado. A las 24 hs. dichos cultivos fueron infectados con la cepa $XJCl_5$ de VJ (clonada) con una multiplicidad de infección de 0,1. El medio de matenimiento se renovó cada 48 hs. y los sobrenadantes fueron cosechados en el día 7 p.i.. Los mismos fueron titulados por formación de placas bajo agar presentando un título de 10^4 UFP/ml.

3.6. Aislamiento de virus

3.6.1. A partir de sangre

Los animales fueron sangrados por punción retroocular con capilares de 50 ul de capacidad. Las muestras de sangre entera así obtenidas se diluyeron al décimo en medio de Eagle suplementado con 3% de ST inactivado y se conservaron a -70°C hasta su uso.

3.6.2. A partir de cerebro

Luego de la disección, el cerebro de los animales se extrajo en condiciones de esterilidad. Las distintas muestras se procesaron de la siguiente manera: se maceraron los cerebros en morteros estériles sobre hielo y se suspendieron al 10% (P/V) en PBS adicionado con 3% de ST inactivado. Las suspensiones se centrifugaron a 10000 x g durante 45 min.. Los sobrenadantes se conservaron a -70°C hasta su uso.

3.6.3. Determinación de la infectividad en los aislamientos virales

La detección de virus en cerebro y sangre se realizó a través de la inoculación de dichos aislamientos en ratones de 24 hs. de edad por vía i.c. (vol=0,02 ml) (9 ratones por muestra). Se empleó este método ya que es

conocido que el ratón inoculado por esa vía es altamente susceptible al VJ (14). Las muestras fueron consideradas positivas cuando produjeron signos neurológicos típicos con muerte posterior de, por lo menos, un 20% de los animales.

3.7. Ensayo de citotoxicidad de sangre

Muestras de sangre entera de C. musculinus sanos fueron diluídas en medio Eagle adicionado con 3% de ST inactivado y posteriormente se agregó una dilución de virus tal que contuviera 150 UFP/0,2 ml. Dichos materiales se titularon por formación de placas bajo agar a 37°C en monocapas de células Vero. Los resultados obtenidos fueron:

Diluciones finales de sangre entera	1/2	1/5	1/10	1/20	Control de virus
UFP/0,2 ml (x de 2 valores)	138	120	155	160	150

Dado que las placas de lisis observadas eran de un tamaño y aspecto comparables a las correspondientes al control de virus y el título viral no varió para las

diluciones de sangre ensayadas, se concluyó que las mismas no produjeron efecto tóxico alguno sobre la monocapa celular y tampoco interfirieron con la replicación viral.

3.8. Estudios serológicos

3.8.1. Ensayo de cinética de neutralización

Se utilizó la técnica de Waner y Weller (151) con algunas modificaciones. Se trabajó con concentraciones constantes de virus e inmunosuero (IS); la función variable fue el tiempo durante el cual la mezcla virus-anticuerpos se mantuvo a 37°C.

La reacción se llevó a cabo mezclando volúmenes iguales de IS (previamente inactivado a 56°C durante 30 min.) y la suspensión viral en estudio conteniendo 200 UFP/0,2 ml aproximadamente. Los controles se realizaron empleando suero normal en la misma dilución del IS a ensayar.

Las mezclas de reacción virus-IS (por duplicado) fueron incubadas durante 5, 10, 15 y hasta 20 min. a 37°C, en tanto que el control se mantuvo a dicha temperatura hasta el último tiempo ensayado. A posteriori se determinó en cada caso la infectividad remanente por formación de placas bajo agar en células Vero.

Con los datos obtenidos se calculó el valor de la constante de afinidad K=(D/t) 2,3 log (I/Io) donde Io y I son los títulos virales en la mezcla control y de reacción al tiempo t respectivamente, y D es la inversa de la dilución del IS empleado. K es una medida de la capacidad neutralizante del suero, válida solamente cuando se obtiene de la porción lineal del gráfico de la reacción de neutralización (151), que en este caso corresponde al tiempo 5 min.

3.8.2. Ensayo de neutralización

Se utilizó la técnica de suero variable-virus constante.

En primer lugar, el IS fue inactivado durante 30 min. a 56°C, junto con el suero normal empleado como control de la reacción. Luego se prepararon diluciones seriadas en base dos del IS en cuestión, las cuales se enfrentaron con 200 UFP/0,2 ml de virus, en volúmenes iguales.

Estas mezclas se incubaron a 37°C durante una hora. Se procedió entonces a la infección de monocapas de células Vero crecidas en botellas de 15 cc con 0,2 ml de cada mezcla de reacción. Las botellas se incubaron durante una hora a 37°C eliminándose posteriormente el inóculo y

cubriendo las monocapas con medio semisólido de cultivo tal como se detalló en el item 3.4.1..

A los 7 días p.i. se revelaron los materiales y el título del IS en cuestión se calculó como la inversa de la mayor dilución de suero capaz de producir un 80% de reducción del número de placas respecto del ensayo control realizado empleando suero normal.

3.9. Obtención de un suero hiperinmune anti VJ en cobayo

Se inocularon cinco lotes de cinco cobayos cada uno con 1000 DL_{50} de VJ/6 y los virus 192(19), 192(35), 215(31) y 215(61) por vía intramuscular. A los 30 días p.i. se los reinoculó con 1000 DL_{50} por la misma vía. Luego de 10 días de la última inoculación se los sangró a blanco por punción intracardíaca. El suero fue separado y absorbido en células Vero. Dichas células crecidas en monocapa fueron tripsinadas y centrifugadas a 1000 rpm. El precipitado fue resuspendido en el suero y homogeneizado enérgicamente. La suspensión se mantuvo a 37°C durante 15 min., luego fue centrifugada y colectado el sobrenadante que se conservó a -20°C hasta su uso.

3.10. Obtención de la fracción de inmunoglobulinas séricas por precipitación con sulfato de amonio

Se dispuso de un volumen inicial de IS anti VJ/6 de 8,2 ml al cual se le agregó una solución saturada de $SO_4(NH_4)_2$ hasta alcanzar una concentración final del 45%. Esta preparación se mantuvo a 4°C en agitación durante toda la noche y luego se centrifugó durante 15 min. a 3000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en PBS (vol.=8,2 ml).

Se procedió a realizar otra precipitación con $SO_4(NH_4)_2$ al 45% y el precipitado obtenido se resuspendió en un volumen mínimo de PBS (1 ml).

La fracción de globulinas obtenida fue dializada contra agua destilada a 4°C durante toda la noche, con agitación. Se conservó a -20°C hasta su uso.

3.11. Amplificación de suspensiones virales

Monocapas celulares crecidas en botellas de 1000 ml de capacidad fueron infectadas con una multiplicidad de infección de 0,1 de VJ (vol.=1 ml). Luego de una hora de adsorción a 37°C, se eliminó el inóculo y se agregó un volumen de 35 ml de medio de mantenimiento a cada botella.

Dicho sobrenadante fue cosechado los días 4, 5 y 6 p.i. (vol. total= 420 ml) y sometido a una centrifugación a 10000 x g durante 45 min. para precipitar restos celulares. Se colectaron nuevamente los sobrenadantes y se centrifugaron a 100000 x g durante 2 hs.. El precipitado se resuspendió en 0,4 ml de PBS y se sonicó durante 30 seg. a 50 Kc. Se conservó a -70°C hasta su uso.

3.12. Purificación de VJ

El VJ obtenido por ultracentrifugación fue purificado a través de un gradiente discontinuo de sacarosa de concentración 15 al 60% P/V en buffer TES Ph 7,2. Los gradientes sembrados con los stocks virales se centrifugaron a 100000 x g durante 90 min. Posteriormente se colectó la banda ubicada en la interfase, se diluyó 1:2 en buffer TES y se centrifugó nuevamente a 100000 x g durante 2 hs. El precipitado se resuspendió en 100 ul de buffer fosfato Ph 7,2, se sonicó durante 30 seg a 50Kc y se conservó a -70°C. La determinación de proteínas virales se realizó por el método de Bradford (15), usando como patrón una solución de albúmina bovina en una concentración de 0,5 mg/ml.

3.13. Inmunodifusión doble bidimensional

Se colocó una capa de agar base al 1,5% en PBS (vol.= 5 ml) en placas de Petri. Una vez que solidificó, se colocaron anillos metálicos siguiendo un esquema fijo y se agregaron 15 ml de agar fundido al 1,5% en PBS, por fuera de los mismos. Retirados los anillos, el IS se sembró en la cavidad central y los stocks virales ensayados, purificados y previamente tratados con NP 40 al 0,2% y dializados contra PBS, en las cavidades laterales.

La difusión transcurrió a temperatura ambiente en cámara húmeda y se observaron bandas de precipitación 48-72 hs. después de la siembra. Las placas fueron sometidas a sucesivos lavados (48 hs. con solución fisiológica y 48 hs. con agua bidestilada) y posteriormente se secaron cubiertas con papel de filtro a 37°C durante toda la noche. Una vez retirado el papel, se tiñieron con colorante amido Schwartz durante 15 min. y luego fueron lavadas con solución decolorante (metanol/ácido acético/agua 45:10:45) repetidas veces.

3.14. Inmunoelectroforesis cruzada bidimensional

La técnica de inmunoelectroforesis cruzada bidimensional (IEC) se llevó a cabo en un soporte de acetato de celulosa de 60 x 76 mm (TITAN III) en presencia de buffer Tris-glicina Ph= 8,3. En el ángulo inferior derecho de la

placa se sembró virus purificado en una concentración aproximada de 30-40 ug/ul, el cual fue sometido a una corrida electroforética durante 90 min. a 180 voltios. Una vez finalizada la separación en la primera dimensión, se embebió la superficie libre del soporte con IS (vol.= 60-70 ul) y se realizó la corrida en la segunda dimensión durante 90 min. a 180 voltios. La placa fue teñida con una solución de Coomasie al 0,2% durante 15 min., y posteriormente fue lavada con solución decolorante. Luego se sumergió en formol concentrado 3 min. y se fijó con una solución de glicerina al 7%. Tanto el secado de la placa como la corrida electroforética se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

3.15. Electroforesis en gel

Se utilizaron geles planos de poliacrilamida según el sistema de Laemmli (1970) (79) y con la modificación en el sistema buffer de Marsden (1972) (92). Para la resolución de las proteínas y de los péptidos obtenidos por digestión proteolítica, se prepararon geles con una solución de acrilamida al 12 y 14% respectivamente en buffer Tris-HCl 0,375M y agentes polimerizantes, TEMED y persulfato de amonio. Sobre el gel de resolución se agregó un pequeño volumen de gel separador consistente en una solución de acrilamida 3,8% en Tris-HCl 0,125M y los mismos agentes

polimerizantes.

En el gel así preparado se sembraron 25 ul de cada muestra y se sometieron a una corrida electroforética a 150 voltios a 4°C hasta que el frente de corrida entró en el gel de resolución. A partir de entonces se subió el voltaje a 180 voltios prosiguiendo la corrida hasta que el colorante alcanzó la parte inferior de la placa (aproximadamente 6 hs.). Junto con las muestras, se sembró en una línea 15 ul de un marcador de PM de proteínas.

Una vez finalizada la corrida, el gel se tiñó con una solución de Coomasie al 0,2% y se decoloró con una solución metanol/ácido acético/agua (5:7:88).

3.15.1. Detección de proteínas iodinadas

Una vez desteñido, el gel se sumergió en una solución metanol/glicerol/agua (20:3:77) durante una hora y luego se secó por aplicación de vacío y calor. Una vez seco, se puso en contacto con una película Agfa Gevaert Curix RP1 100 NIF a -70°C. Después de un período de 7-10 días, la placa fue revelada con una solución de revelador Kodak GEX durante 1 min. y luego de lavarla en una solución de ácido acético al 0,2%, se fijó en fijador Kodak. Todo el proceso de revelado se llevó a cabo a temperatura ambiente.

3.16. Mapeo peptídico a través de proteólisis controlada

Se utilizó la técnica de Cleveland et al. (1977) (28).

Las bandas proteicas obtenidas en geles de poliacrilamida-SDS procesados como se indica en el item 3.15.1., fueron cortadas a partir del gel seco teniendo como referencia la ubicación de las mismas en la autorradiografía. Luego fueron sumergidas en un buffer de hidratación Tris-HCl 0,5M, SDS 10% y EDTA 0,2M Ph= 6,8. Una vez rehidratados, los trozos de gel fueron colocados en los lugares de siembra respectivos de un segundo gel de poliacrilamida-SDS y se agregaron, sucesivamente: 1) 15 ul de buffer de hidratación conteniendo 20% de glicerol; 2) 20 ul de una concentración determinada de la enzima proteolítica a ensayar; 3) buffer de corrida.

La digestión se llevó a cabo directamente en el gel espaciador durante la electroforesis, que se interrumpió durante 30 min. cuando el azul de bromofenol se ubicó en el límite inferior del gel espaciador. Posteriormente, la corrida electroforética procedió en forma análoga a la mencionada en el item 3.15. y luego el gel se procesó según se indica en el item 3.15.1..

4. RESULTADOS

Parte I: DETECCION DE VARIANTES ANTIGENICAS DEL VJ

4.1. Aislamiento de VJ a partir de Calomys musculinus infectados

4.1.1. Selección de un clon de VJ

Con el propósito de establecer una infección experimental en C. musculinus neonatos con una población viral genéticamente homogénea, se procedió a clonar el stock de VJ cepa XJCl$_3$ utilizado en nuestro laboratorio (62).

A partir de monocapas de células Vero infectadas con dicho stock se obtuvieron por clonado doce subpoblaciones, seis de las cuales, previamente amplificadas en células Vero, fueron tituladas por formación de placas bajo agar a 37°C y 40°C y por dosis letal 50 para ratón neonato (cuadro 1). De los seis clones analizados, se calculó la eficiencia de plaqueo 40/37 (EDP 40/37) para cuatro de ellos; el clon 8 resultó termosensible (EDP 40/37=0,04) en tanto que los restantes presentaron una EDP cercana a la obtenida para el stock parental. Sólo los clones 2 y 6 resultaron apropiados para el establecimiento de la infección, dado que ambos fueron los más virulentos para el ratón neonato (índice de virulencia= 0,19 y 0,24,

CUADRO 1

Selección de un clon de la cepa XJCl$_3$ de VJ

Virus	Título (UFP/ml)	Título (DL_{50}/ml)	EDP* 40/37	Indice de virul. (UFP/DL_{50})	Mort.# (%)	Día de muerte**
Clon 1	$4,2 \times 10^5$	$6,9 \times 10^4$	0,13	6,09	72	21
Clon 2	$1,2 \times 10^5$	$6,3 \times 10^5$	0,42	0,19	100	20
Clon 3	$1,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	N.H.##	1,27	77	14
Clon 4	$4,7 \times 10^2$	$6,4 \times 10^2$	N.H.	0,73	54	17
Clon 6	$3,1 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	0,61	0,24	100	13
Clon 8	$8,9 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	0,04	0,55	94	22
Stock 1/82	$3,2 \times 10^7$	N.H.	0,28	--	N.H.	N.H.

\# Se indica el % de mortalidad en ratón lactante.

No Hecho.

* EDP 40/37: Cociente entre el título del virus crecido a 40°C y el título del virus crecido a 37°C.

** Día de registro del % de mortalidad.

respectivamente) y presentaron la eficiencia de plaqueo más cercana a 1 (EDP 40/37 = 0,42 y 0,61).

Se seleccionó el clon 6 debido a que produjo el 100% de mortalidad siete días antes de la obtenida con la inoculación del clon 2 (cuadro 1).

Por otra parte, la morfología y el tamaño de las placas de lisis resultaron similares a los obtenidos con el stock original. El clon 6 elegido se utilizó en los estudios realizados bajo la denominación de VJ/6.

4.1.2. Establecimiento de una infección experimental en C. musculinus neonatos

La infección experimental de C. musculinus neonatos inoculados con 4000 DL_{50} de la cepa XJCl$_3$ de VJ por vía i.p. causa la muerte de alrededor del 60% de los animales en tanto que un 30% de los sobrevivientes permanecen crónicamente infectados. En este caso, es posible detectar la presencia de virus en cerebro y anticuerpos neutralizantes en circulación en altos títulos (81).

Con el objeto de estudiar el comportamiento del clon previamente seleccionado, 122 C. musculinus neonatos fueron inoculados con VJ/6 por vía i.p. en la dosis anteriormente mencionada. Los animales fueron observados periódicamente y los primeros signos de enfermedad se

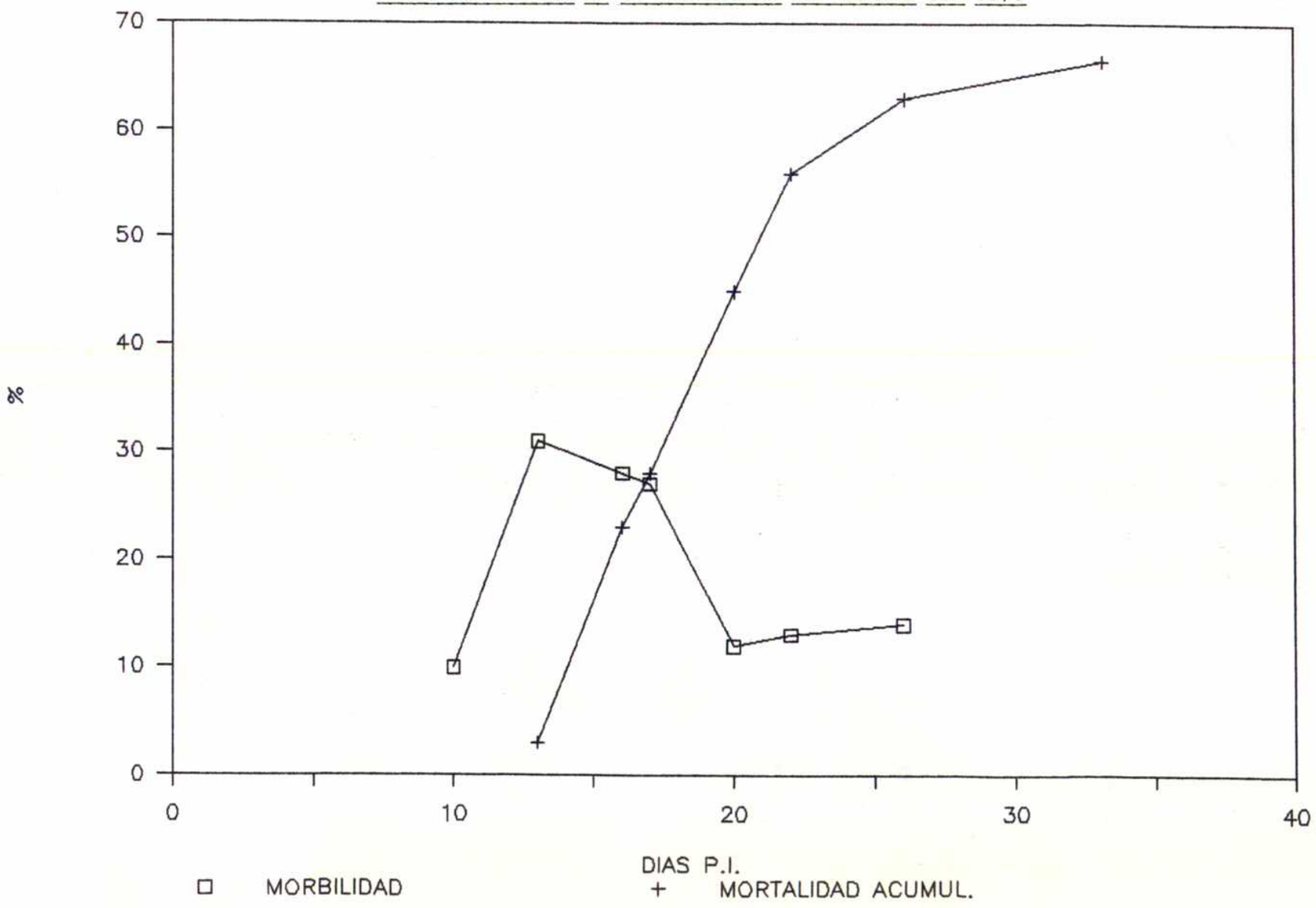
evidenciaron a partir del día 10 p.i. en un 10% de los casos (figura 1).

Los cricétidos presentaron progresivamente disminución en los reflejos, erizamiento del pelo, lateralización de la marcha acompañada por temblores espontáneos o inducidos, pudiendo llegar a la parálisis completa del tren posterior. El máximo porcentaje de animales enfermos se registró a los 13 días p.i. (31%), disminuyendo posteriormente como consecuencia de la aparición de las primeras muertes (figura 1). De este modo, la morbilidad decreció desde un valor del 27% (día 17 p.i.) hasta el 12% (día 20 p.i.). Dicha disminución correspondió a un incremento de la mortalidad acumulada en un 16% observado entre los días 17 y 20 p.i. El porcentaje de mortalidad aumentó progresivamente hasta el día 33 p.i. alcanzando un valor del 66,5% análogo al registrado en el caso de la infección con la cepa XJCl$_3$ de VJ proveniente de cerebro de ratón lactante (85).

La respuesta de los sobrevivientes (41 animales) a la infección no fue uniforme: 20 cricétidos no evidenciaron signos clínicos característicos durante el transcurso del período de observación (60 días), en tanto que la evolución de los signos clínicos en los 21 restantes fue cíclica. Dichos animales manifestaron los signos de enfermedad en forma periódica y finalmente, se recuperaron presentando una reducción del tamaño corporal respecto de aquéllos que nunca

FIGURA 1

MORBI-MORTALIDAD DE C. musculinus INFECTADOS CON VJ/6



habían enfermado.

De acuerdo a estos resultados, se puede concluir que la población viral seleccionada por clonado se comportó en forma análoga a la cepa parental proveniente de cerebro de ratón lactante (85). Cabe mencionar que, salvo aclaración específica, la dosis de virus empleada en la inoculación de los animales neonatos se fijó en 4000 DL_{50} la cual demostró ser exitosa para reproducir el modelo de infección experimental de C. musculinus con VJ (85).

Por lo tanto, el VJ/6 fue seleccionado como el virus parental apropiado para el establecimiento de una infección experimental in-vivo con el objetivo de realizar un análisis posterior de las poblaciones virales aisladas a lo largo de las etapas aguda y crónica de la enfermedad.

4.1.3. Búsqueda de vías de eliminación de virus

4.1.3.1. A partir de saliva y orina

Estudios de transmisión viral realizados con C. musculinus experimentalmente infectados con la cepa An 9446 (Cba) de VJ demostraron que la transmisión de virus entre cricétidos ocurre principalmente en forma horizontal, fundamentalmente a través de la saliva que se encuentra infectada, así como también existen evidencias de

contaminación de la orina (128).

Con el propósito de investigar eventuales vías de eliminación de virus infeccioso en nuestro modelo, se inocularon 31 C. musculinus neonatos con el VJ/6 y se realizaron repetidos intentos de aislamiento viral a partir de orina y saliva. Para ello, los animales fueron sometidos a lavados bucofaríngeos con medio de Eagle suplementado con 3% de ST, a distintos tiempos p.i.; paralelamente, se colectaron muestras de orina directamente a partir del animal, que también fueron diluídas en medio de Eagle.

Los materiales fueron inoculados en cerebro de ratón lactante y resultaron en su mayoría negativos. Ante la sospecha de la presencia de virus en bajo título, se efectuaron hasta tres pasajes ciegos en cerebro de ratón, recuperando infectividad sólo en dos casos (una muestra de saliva y otra de orina).

Si bien fue posible recuperar virus infeccioso, se descartaron ambos métodos de obtención de muestras debido, principalmente, a los reducidos volúmenes logrados y, por otra parte, a la inconveniencia de trabajar con aislamientos virales sucesivamente amplificados en cerebro de ratón lactante, ya que se trató de evitar la posibilidad de ejercer una presión de selección al someter el material a reiterados pasajes por cerebro.

4.1.3.2. A partir de sangre

El estudio de roedores infectados con VJ capturados reiteradamente en áreas endémicas de FHA permitió detectar la presencia de virus en la sangre de dichos animales (128). En base a estos antecedentes, se decidió recurrir a una metodología traumática para intentar el aislamiento de virus a partir de sangre de C. musculinus inoculados con VJ/6.

De este modo, se realizó un estudio secuencial de la aparición de virus en sangre de C. musculinus infectados, durante el transcurso de la etapa aguda de la enfermedad, período que comprende los primeros 25-30 días p.i. a lo largo del cual se manifiestan los signos neurológicos característicos de la infección con VJ.

Para tal fin, 161 crías fueron inoculadas con VJ/6, 102 de las cuales fueron sangradas a blanco por punción retroocular entre los días 2 y 26 p.i. Cabe destacar que los cricétidos sacrificados hasta el día 11 p.i. fueron elegidos al azar ya que no mostraron evidencias de enfermedad; a partir de entonces, se sacrificaron animales con signos clínicos de enfermedad (76 cricétidos).

Las muestras de sangre así obtenidas fueron inoculadas en cerebro de ratón lactante. La sintomatología típica y muerte del ratón blanco entre los 14 y 20 días p.i. se consideró como evidencia de la presencia de VJ en la sangre de los cricétidos estudiados.

La frecuencia de detección de viremias aparece en la figura 2; se consideró muestra virus positiva a aquélla que causó la muerte de, al menos, el 20% de los ratones inoculados. Se observa que la aparición de virus en sangre ocurrió tempranamente en el curso de la infección (día 4 p.i.), aumentando progresivamente su incidencia hasta alcanzar un máximo entre los días 13 y 14 p.i. (figura 2). A partir del día 15 p.i., la detección fue errática encontrando viremias en forma esporádica hasta el día 23 p.i..

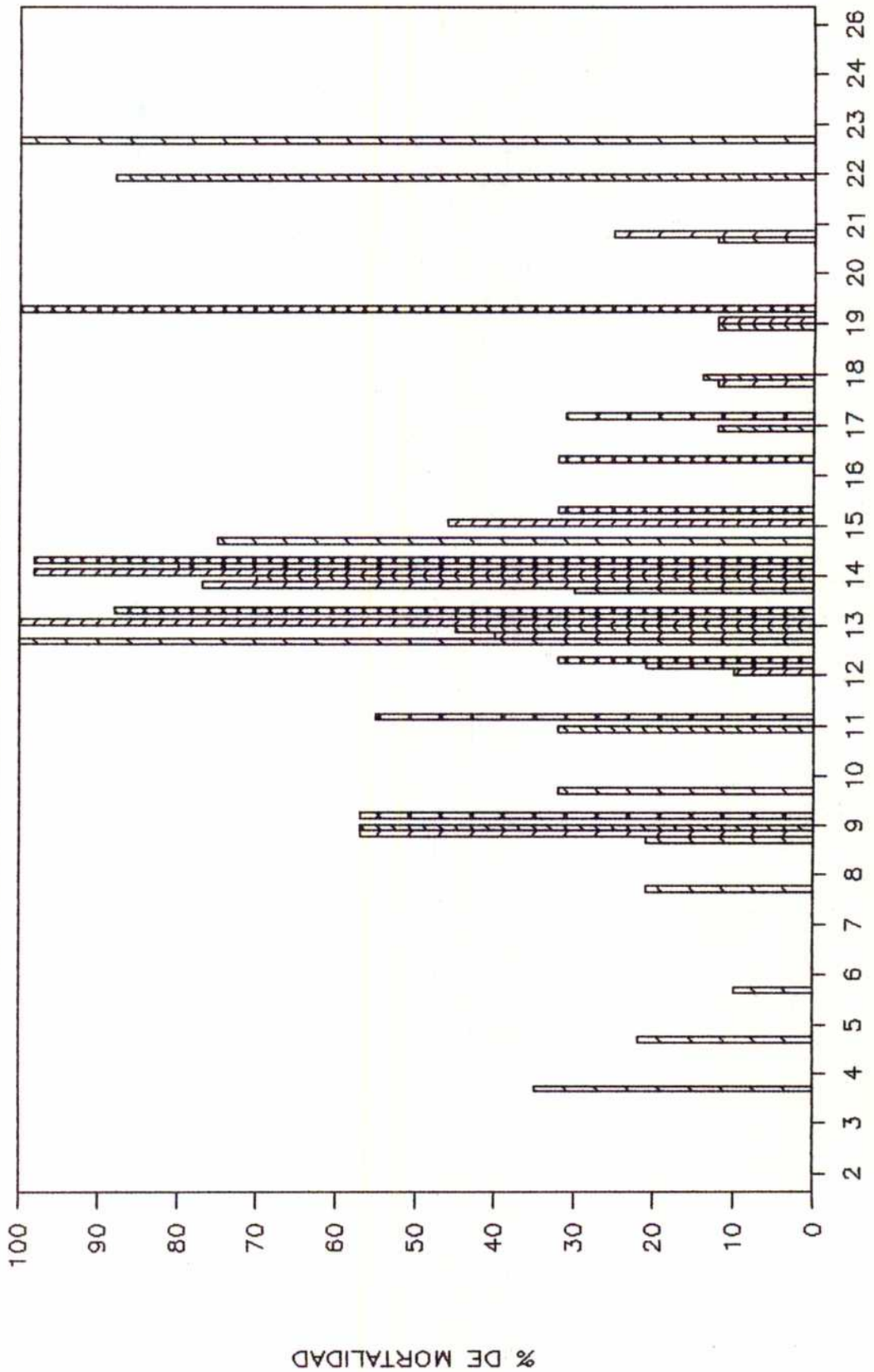
4.1.3.2.1. Aislamiento de virus de sangre de C. musculinus agudos y persistentemente infectados

La incidencia de viremias durante la etapa aguda de la enfermedad alcanzó un valor del 33% sobre un total de 102 animales estudiados, razón por la cual se consideró la sangre periférica de los animales infectados como fuente de virus.

Asimismo, la detección de viremias aisladas a posteriori de los registros de morbilidad máxima y de cricétidos sobrevivientes a la infección con síntomas neurológicos persistentes, nos llevó a analizar la evolución de la viremia en un mismo animal durante las etapas aguda y

FIGURA 2

REGISTRO DE VIREMIAS EN C. musculinus INOCULADOS CON VJ/6



crónica de la enfermedad.

Para ello, 69 C. musculinus fueron inoculados perinatalmente con VJ/6 y sometidos a sangrados periódicos de 50 ul cada uno, de manera tal de mantener con vida el mayor número posible de animales para sucesivas extracciones.

Cabe mencionar que, en términos generales, los volúmenes de muestra obtenidos fueron reducidos debido al pequeño tamaño de los cricétidos, fundamentalmente, a lo largo de la etapa aguda de la enfermedad.

Se registró un porcentaje de mortalidad relativamente alto entre los cricétidos infectados, dado que el 49% de los mismos murió durante el curso de las dos primeras semanas post-infección. De los 35 sobrevivientes 13 no enfermaron a lo largo del período de observación y, por ende, no fueron considerados para este estudio, en tanto que 12 animales murieron inmediatamente después del primer sangrado.

En consecuencia, y debido al manipuleo, sólo 10 C. musculinus fueron analizados, los cuales resistieron sucesivos sangrados hasta alrededor del día 60 p.i..

Los aislamientos virales resultaron reiteradamente negativos para cuatro cricétidos; la cinética de detección de virus correspondiente a los seis restantes aparece en la figura 3.

Se observaron dos tipos de respuestas: todas las

muestras provenientes de los C. musculinus 192 y 215 resultaron virus positivas hasta los 51 y 61 días p.i. respectivamente (figuras 3A y F), mientras que los cricétidos 193, 203, 213 y 214 presentaron viremias cíclicas (figuras 3B, C, D y E).

El hallazgo de viremias tardías constituye un hecho de singular importancia pues implica la presencia simultánea de virus y anticuerpos neutralizantes en circulación, los cuales comienzan a ser detectados a partir del día 11 p.i. en los animales infectados experimentalmente (83).

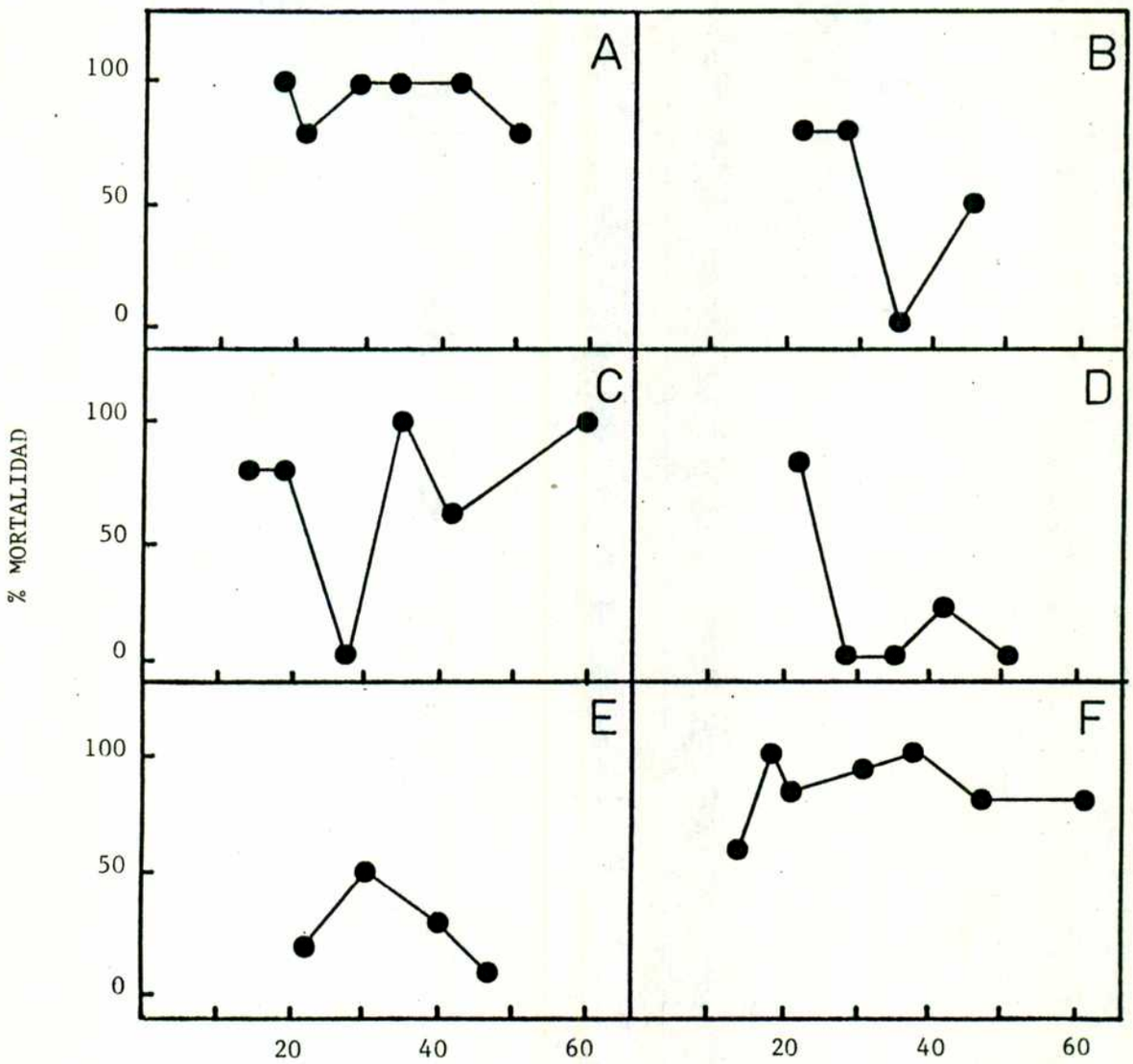
4.1.3.3. Detección de anticuerpos neutralizantes y VJ en sangre y cerebro de C. musculinus infectados

La propiedad más saliente de la persistencia del VJ in-vivo consiste en el acantonamiento de virus en el cerebro de los cricétidos infectados en forma concomitante a la aparición de anticuerpos neutralizantes en altos títulos, aún cuando la primo-infección se haya realizado por vía periférica (81). Dichos anticuerpos resultan incapaces de erradicar el virus alojado en el cerebro y, en principio, el virus circulante escaparía a la acción neutralizante de los mismos.

Por lo tanto se decidió investigar la presencia

FIGURA 3

DETECCION DE VIRUS EN SANGRE DE C. musculinus INOCULADOS CON VJ/6



A: C. musculinus # 192
B: C. musculinus # 193
C: C. musculinus # 203
D: C. musculinus # 213
E: C. musculinus # 214
F: C. musculinus # 215

simultánea de virus en sangre y anticuerpos neutralizantes en circulación en C. musculinus infectados que cursaban las etapas aguda y/o crónica de la enfermedad. Paralelamente se intentó rescatar virus infeccioso a partir del cerebro de dichos animales, considerado el órgano blanco de la infección (83).

De este modo, un lote de 13 C. musculinus neonatos fue inoculado intraperitonealmente con VJ/6 y los animales fueron sacrificados entre los 13 y 116 días p.i.. El cuadro 2 resume los resultados obtenidos, donde se confirmó la aparición temprana de anticuerpos neutralizantes (día 13 p.i.) y, por otra parte, la ocurrencia simultánea de virus y anticuerpos circulantes en cuatro casos, uno de los cuales corresponde a la etapa crónica de la enfermedad (día 60 p.i.). A su vez, este evento se vió acompañado por la presencia de virus en el cerebro de los cricétidos sacrificados a los 20, 23 y 60 días p.i. En consecuencia, la prácticamente nula eficiencia de los anticuerpos circulantes para erradicar por completo no sólo el virus alojado en el cerebro sino también el presente en sangre periférica, nos llevó a postular un cambio antigénico en la población viral aislada a partir de cricétidos infectados.

4.2. Detección de variantes antigénicas del VJ in-vivo

CUADRO 2

Aislamiento de VJ de cerebros de C. musculinus
y detección de anticuerpos neutralizantes

C.musculinus #	Viremia	Dia de sacrificio	Titulo viral (UFP/ml)	Titulo de anticuerpos
101 A	-	13	N.H.**	20*
107	+	14	$3,12 \times 10^5$	<10
101 B	-	15	<5	<10
102	-	16	3×10^3	N.H.
108	+	18	N.H.	120
109	+	20	$2,8 \times 10^4$	1600
117	+	23	$3,5 \times 10^3$	120
118	-	24	<5	N.H.
110 A	-	26	$1,95 \times 10^4$	N.H.
110 B	N.H.	27	<5	1600
203	+	60	3×10^3	800
99	-	64	$7,25 \times 10^4$	N.H.
305	-	116	<5	800

* Los números representan la inversa de la máxima dilución del suero que neutraliza el 80% de la infectividad.

** No Hecho.

La variabilidad antigénica viral es conocida como uno de los mecanismos que desempeñan un papel importante en el establecimiento y/o mantenimiento de la persistencia en diversos sistemas virus RNA-huésped in-vivo (66).

Respecto de los arenavirus, existen antecedentes acerca de la aparición de variantes genéticas del virus LCM en ratones "carrier" (3), así como también la presencia de variantes serológicas en cerebro de C. musculinus adultos inoculados por vía i.n. (84).

Considerando los resultados anteriormente expuestos, se decidió analizar el comportamiento antigénico de las poblaciones virales aisladas a partir de cerebro y sangre de cricétidos infectados. Al no disponer de una batería de anticuerpos monoclonales, se intentó establecer si mediante el empleo de un suero policlonal se podrían encontrar diferencias entre los distintos aislamientos virales a través de ensayos de cinética de neutralización.

4.2.1. Ensayo de cinética de neutralización

Trabajos realizados con distintos virus demostraron que es factible detectar cepas virales con un comportamiento antigénico diferencial a través de cinéticas de neutralización. Mediante este ensayo es posible cuantificar la velocidad de reacción entre el virus y los anticuerpos

neutralizantes, y a la vez reflejar la capacidad de dichos anticuerpos de neutralizar dos o más poblaciones virales con un grado de avidez igual o variable.

Inicialmente se establecieron las condiciones óptimas para llevar a cabo la reacción usando la cepa $XJC1_{\leq}$ de VJ. Tal como se determinó para el virus aftoso (126), se realizó un ensayo empleando distintas cantidades de UFP de virus enfrentadas a una concentración constante de IS anti VJ-$XJC1_{\leq}$. Dicho IS se utilizó en una dilución final de 1:160 en las mezclas de reacción que contenían respectivamente: A: 20000 UFP/ml, B: 2000 UFP/ml y C: 1000 UFP/ml.

De acuerdo a los fundamentos de este ensayo, los tiempos de incubación que usualmente se prueban son 5, 10 y 15 min. a 37°C, debido a que la cuantificación a través de la constante de afinidad K se realiza eligiendo un valor de la pendiente, que en general es el valor de la infectividad correspondiente a t=5 min.. No obstante, se ensayaron los tiempos 5, 10, 20 y 60 min., a fin de corroborar que, en el presente sistema, el nivel de infectividad residual al t=60 min. resultaría mínimo.

Al cabo de la incubación, las mezclas de reacción correspondientes a A, B y C fueron diluídas apropiadamente de manera tal de tener alrededor de 150 UFP/0,2 ml en el inóculo infectante. Cabe destacar que la estabilidad de los complejos virus-anticuerpo no se ve afectada por la dilución

posterior a la incubación.

La concentración inicial de virus (A, B y C) no afectó el perfil de las curvas obtenidas (figura 4). En los tres casos, la infectividad viral se redujo considerablemente al cabo de 5 min., para luego disminuir progresivamente hasta el t=60 min., tiempo en el cual la fracción viral remanente no neutralizable es mínima. De este modo no se observan diferencias significativas entre las pendientes de las curvas obtenidas correspondientes a cada mezcla de reacción, lo cual se reflejó en los respectivos valores de K (K_A= 26,01; K_B= 33,22 y K_C= 28,81).

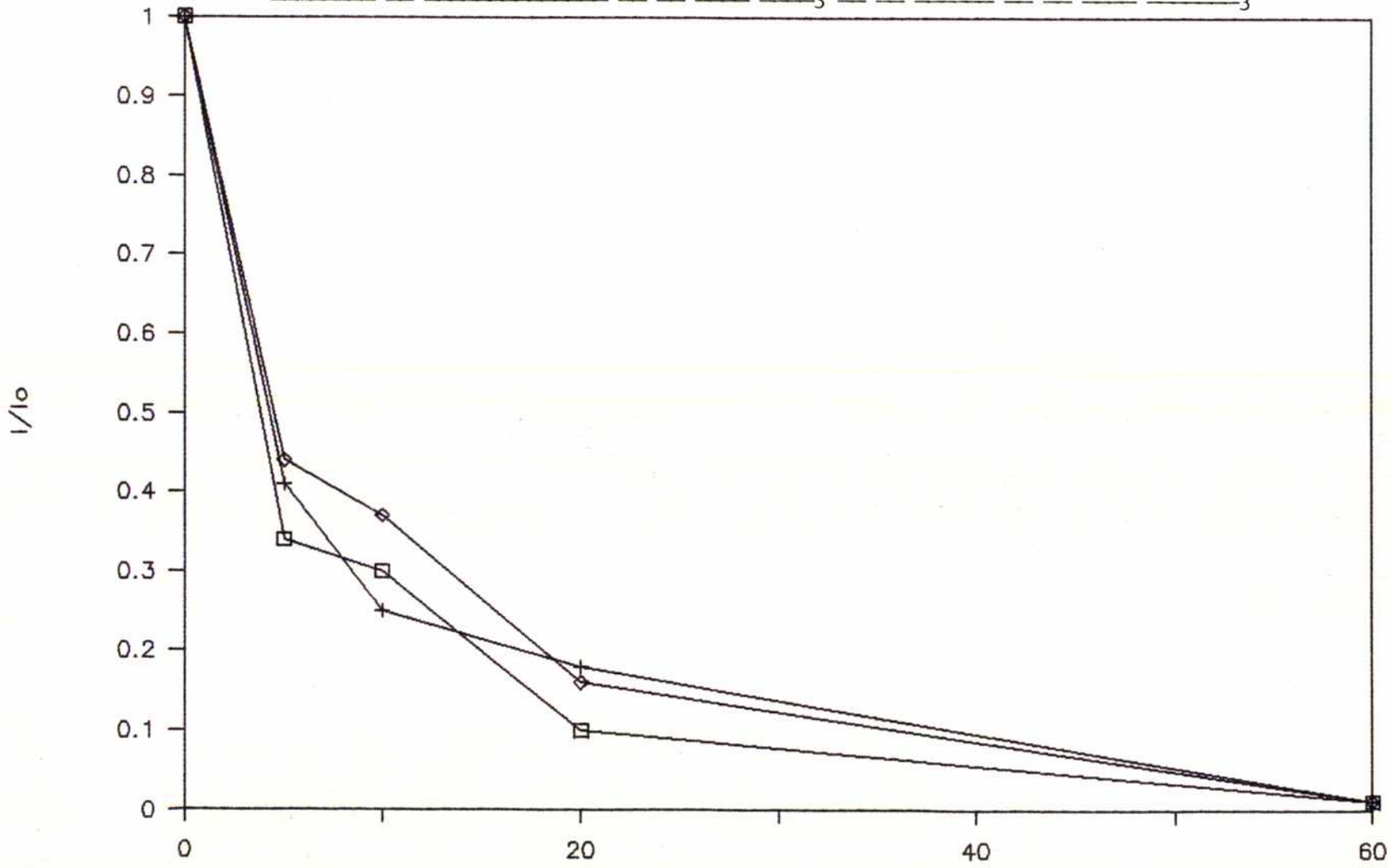
En consecuencia, se decidió trabajar, en todos los casos, con una dilución final de virus tal que contuviera 100-150 UFP/0,2 ml en el inóculo infectante, lo cual se corresponde con una concentración de virus inicial de 1000 UFP/ml (mezcla de reacción C).

A fin de establecer la cantidad óptima de IS necesaria para disponer de un exceso de anticuerpos en la mezcla de reacción, se enfrentaron distintas diluciones de IS anti VJ/6 a la concentración constante de virus previamente determinada. Las diluciones finales de IS ensayadas fueron 1:200, 1:300 y 1:400 (figura 5).

Los resultados obtenidos muestran que la reactividad de los anticuerpos difirió según la dilución de IS empleada. Así, los niveles de infectividad remanente al cabo de 15 min. de reacción alcanzaron el 41%, 71% y 77%

FIGURA 4

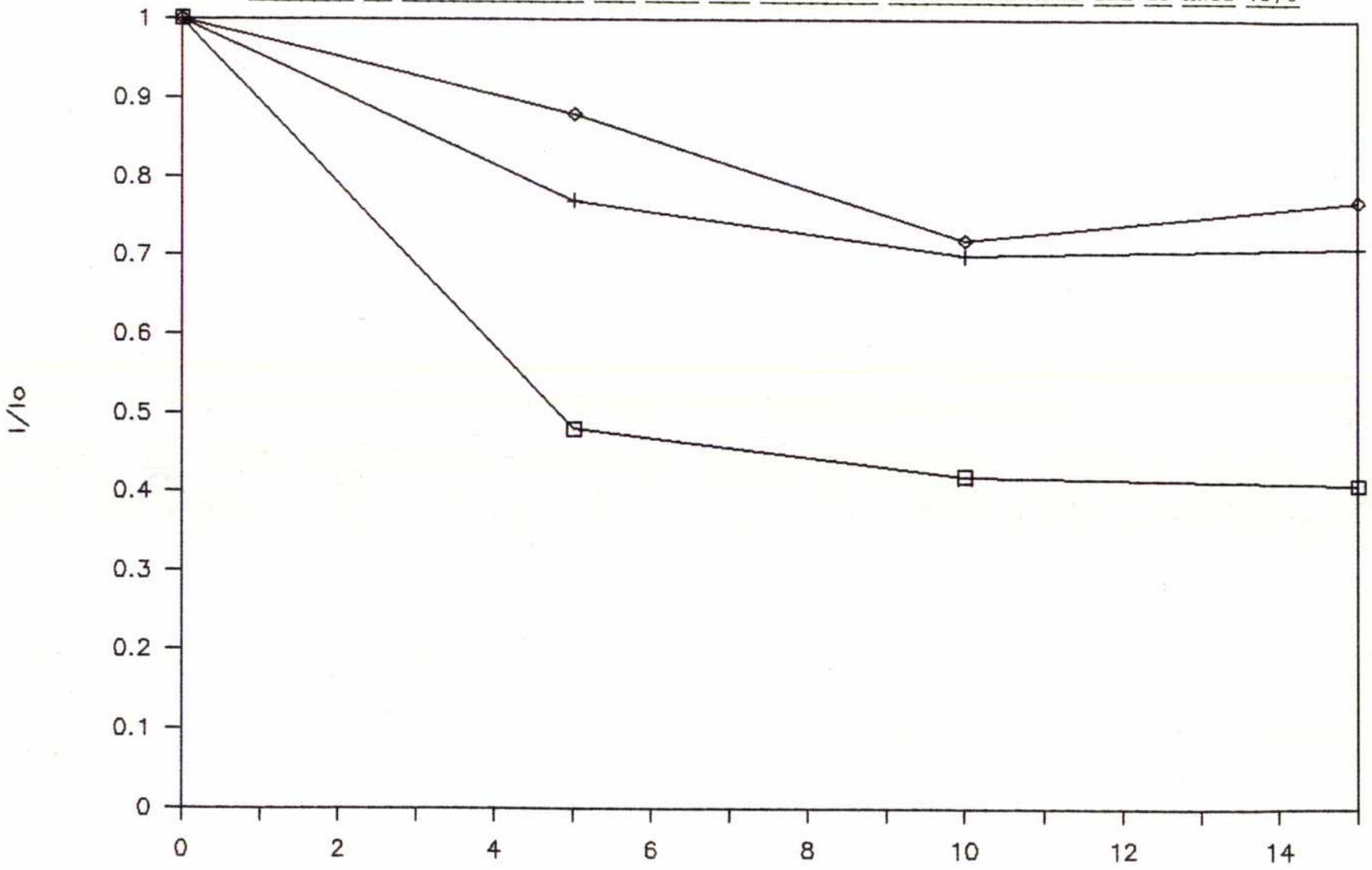
CINETICA DE NEUTRALIZACION DE LA CEPA $XJC1_3$ DE VJ FRENTE AL IS ANTI VJ-$XJC1_3$



I/Io: Infectividad residual al tiempo t/Infectividad del control

FIGURA 5

CINETICA DE NEUTRALIZACION DEL VJ/6 CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DEL IS ANTI VJ/6



Dilución de IS □ 1:200 + 1:300 ◇ 1:400

I/Io: Infectividad residual al tiempo t/Infectividad del control

para las diluciones de IS 1:200, 1:300 y 1:400, respectivamente.

Análogamente a lo aplicado con otros sistemas virus-anticuerpos (151), se decidió utilizar una dilución de IS tal que produjera una reducción de la infectividad en un valor del 50% o mayor al cabo de los primeros 5 min. de reacción. En este caso, dicho valor correspondió a la dilución 1:200 del IS ensayado, la cual aproximadamente coincidió con la dilución inmediatamente inferior a la inversa del título del IS ensayado.

4.2.2. Cinética de neutralización de un aislamiento viral del cerebro de un cricétido infectado

Establecidas las condiciones de reacción, se decidió investigar si el virus alojado en el cerebro de un cricétido infectado presentaba un comportamiento antigénico diferencial respecto del virus parental crecido en cerebro de C. musculinus neonato (cVJ/6) usado como control.

Con este propósito se seleccionó el C. musculinus 109 (cuadro 2) sacrificado a los 20 días p.i., que presentó un alto título de virus en cerebro y a la vez, un alto título de anticuerpos neutralizantes en circulación.

Inicialmente se ensayó el virus proveniente de cerebro (virus 109) y el cVJ/6 frente al IS anti VJ/6

(dil.1:160) en una cinética de neutralización.

Los resultados presentados en la figura 6 muestran que dicho IS secuestró rápidamente la infectividad correspondiente al virus parental (86% en 5 min.), aún cuando dicho stock había sufrido previamente un pasaje por cerebro de Calomys neonato. A posteriori de la respuesta lineal inicial, se obtuvo una fracción residual no neutralizable.

Por el contrario, el virus 109 fue pobremente neutralizado, registrándose sólo una disminución de la infectividad del 8% al cabo de 15 min. de reacción. Por lo tanto, el patrón de neutralización del virus 109 difirió significativamente del correspondiente al cVJ/6, lo cual se evidenció a través del cálculo de K cuyos valores resultaron, respectivamente, 2,4 y 58,66.

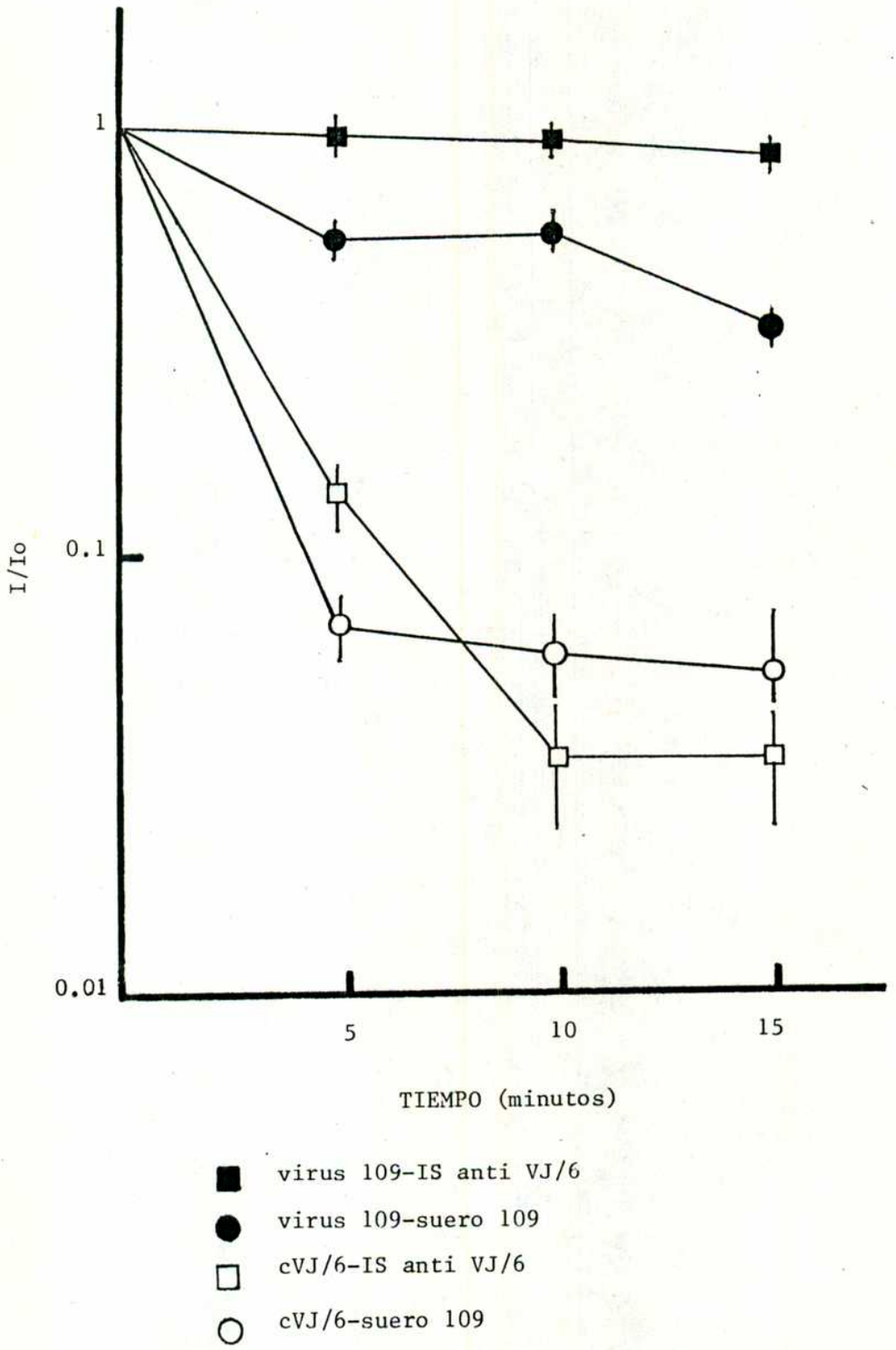
En consecuencia, la reactividad diferencial del IS ensayado observada demuestra que el virus 109 es una variante antigénica del virus parental.

Esta conclusión fue corroborada cuando se examinó la capacidad neutralizante del suero del C. musculinus 109 frente al virus 109 y al cVJ/6, utilizado en una dilución final de 1:800 (figura 6).

En este caso, el suero del animal reconoció con baja avidez al virus alojado en su propio cerebro, ya que el valor de K correspondiente al virus 109 fue considerablemente menor en comparación con el obtenido para

FIGURA 6

CINETICA DE NEUTRALIZACION DE UN AISLAMIENTO VIRAL DE CEREBRO DE C. musculinus



el virus que originó la infección (K=99,12 y K=420,82, respectivamente).

En consecuencia, se confirma la presencia de variantes antigénicas del VJ/6 en el cerebro del C. musculinus 109 y, a su vez, se demuestra que las mismas también escaparon a la acción neutralizante de los anticuerpos circulantes del huésped en cuestión (figura 6).

4.2.3. Amplificación de los aislamientos de sangre virus positivos en células Vero

Dado que el ensayo de citotoxicidad de sangre de C. musculinus resultó negativo, se procedió a titular seis aislamientos virales positivos obtenidos entre los 14 y 22 días p.i., por formación de placas bajo agar a 37°C.

En todos los casos los títulos virales resultaron muy bajos (aproximadamente 10^2 UFP/ml) y, teniendo en cuenta los reducidos volúmenes de muestra obtenidos, se decidió realizar una amplificación de dichos aislamientos en células Vero. Las monocapas celulares fueron infectadas con las muestras de sangre virus positivas sin diluir y los sobrenadantes correspondientes al 4to. día p.i. fueron cosechados y titulados (cuadro 3).

A pesar del número de aislamientos virales positivos presentados en la figura 2, cabe aclarar que no

CUADRO 3

Amplificación de aislamientos virales de sangre de C. musculinus en células Vero

Muestra #	Día de sangrado	Título (UFP/ml)
385 A-1	8	2×10^3
385 A-2	8	$1,5 \times 10^4$
385 A-3	8	$0,85 \times 10^2$
146	14	2×10^6
117	23	$2,1 \times 10^6$
215	14	$1,1 \times 10^4$
	21	$1,2 \times 10^4$
	31	$6,5 \times 10^3$
	38	$2,3 \times 10^3$
	47	6×10^3
	61	$1,66 \times 10^5$
192	19	9×10^3
	35	5×10^3
VJ/6	--	$1,13 \times 10^5$

todos pudieron ser efectivamente amplificados debido a un alto grado de contaminación detectado in-vitro, ya que el sangrado no puede llevarse a cabo en condiciones de esterilidad. No obstante, los títulos virales alcanzados (cuadro 3) permitieron el posterior análisis de dichas poblaciones virales.

4.2.4. Cinética de neutralización de aislamientos virales de sangre de C. musculinus infectados

Dado que el cerebro de los C. musculinus es considerado como el órgano blanco de la infección con VJ y, a la vez, el sitio a partir del cual se detectaron variantes antigénicas del virus parental, se investigó si dichas variantes virales también se encontraban en circulación.

Para ello, los aislamientos virales obtenidos de sangre de los C. musculinus 117, 192 y 215 a los 23, 35 y 61 días p.i. respectivamente, junto con el VJ/6 fueron enfrentados al IS anti VJ/6 en un ensayo de cinética de neutralización.

En la figura 7 se observa una rápida disminución de la infectividad del virus parental al cabo de los primeros 5 min. de reacción (82%), análogamente a lo ocurrido con el cVJ/6 (figura 6).

Por el contrario, el patrón observado para los aislamientos virales 192(35), 117(23) y 215(61) resultó completamente diferente: a los 5 min. de reacción, se obtuvieron valores de inhibición de la infectividad del 1, 8 y 39% en tanto que al tiempo 15 min. fueron del 7, 35 y 40% respectivamente, los cuales resultaron considerablemente inferiores respecto del obtenido con el virus que originó la infección.

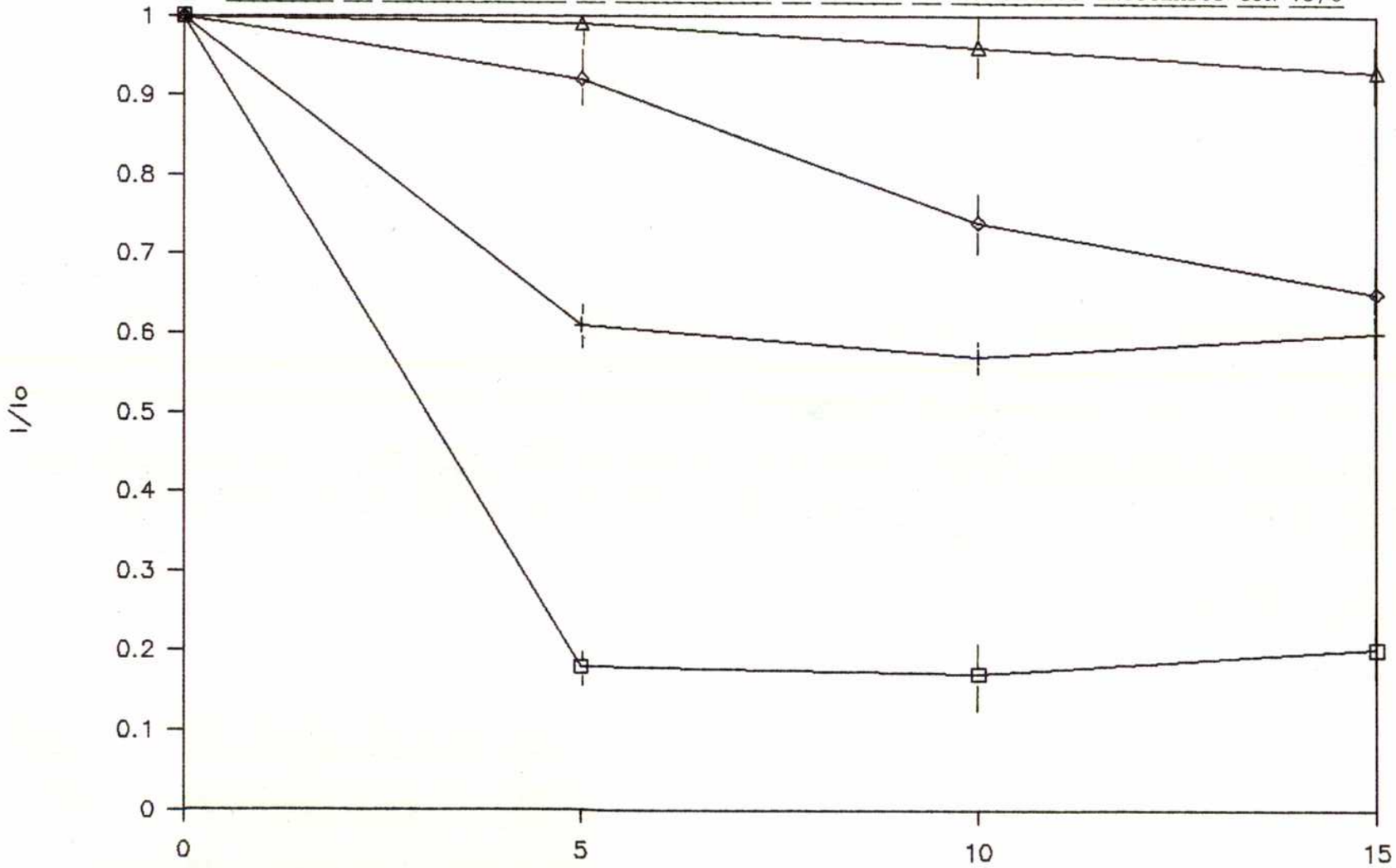
En consecuencia, los anticuerpos anti VJ/6 no fueron capaces de secuestrar la infectividad de los aislamientos virales en estudio con la misma reactividad demostrada para el virus parental, lo que se corroboró con los respectivos valores de K. Estos resultaron muy inferiores para dichos aislamientos (K=0,049, K=1,34 y K=7,97 para los virus 192(35), 117(23) y 215(61), respectivamente) en comparación con el calculado para el VJ/6 (K=27,33).

De acuerdo a los resultados hasta aquí presentados, se concluye que los aislamientos virales de sangre de los cricétidos 117, 192, y 215 se comportaron como variantes antigénicas del virus parental. Por otra parte, cabe destacar que la variación antigénica viral demostrada no es atribuible al sustrato de crecimiento, ya que el comportamiento de los stocks provenientes de células Vero y cerebro resultó similar.

Por lo tanto, la selección de dichas variantes

FIGURA 7

CINETICA DE NEUTRALIZACION DE AISLAMIENTOS DE SANGRE DE CRICETIDOS INOCULADOS CON VJ/6



IS empleado: IS anti VJ/6

virales podría ocurrir tempranamente en la infección, las que luego se alojarían definitivamente en el cerebro de los animales crónicamente infectados.

4.2.5. Búsqueda de complejos inmunes circulantes

La aparición de complejos inmunes es un fenómeno frecuente en el desarrollo de numerosas infecciones virales crónicas. Este hecho se debe fundamentalmente, a una continua producción de antígeno viral durante un lapso prolongado (22).

En el caso de la infección de C. musculinus con VJ se decidió investigar si el virus infeccioso que persiste en circulación aún después de la aparición de anticuerpos anti VJ (cuadro 2) existe en la forma de complejos virus infeccioso-anticuerpos. Si bien los anticuerpos neutralizantes no parecieron ser efectivos en secuestrar la infectividad correspondiente a las variantes antigénicas aisladas a partir de cerebro (figura 6), dichos anticuerpos bien podrían unirse al virus circulante y dar lugar a la formación de complejos inmunes, tal como lo indican los resultados obtenidos por Coulombié (32). De este modo, se sugirió la presencia de complejos inmunes circulantes en sueros de C. musculinus infectados con VJ, los que fueron detectados entre los 15 y 95 días p.i., a través del ensayo

de inhibición de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) (32). Este ensayo no indica si se trata de complejos constituídos por anticuerpos y virus infeccioso.

En consecuencia, se procedió a inocular 46 C. musculinus neonatos con VJ/6 y, a los 21 días p.i., los 20 animales sobrevivientes a la infección fueron sangrados a blanco a través del plexo venoso retroorbitario. Las muestras fueron colectadas en un único tubo conteniendo heparina y el plasma obtenido fue titulado por formación de placas bajo agar, presentando un título de 10^{3} UFP/ml.

En el caso que los anticuerpos anti VJ circulantes estuviesen unidos a la partícula viral infecciosa, el agregado de un IS anti cricétido neutralizaría la infectividad de dicho complejo, tal como se demostrara para el virus de la láctico deshidrogenasa (104).

Por lo tanto, se dispuso de un suero de conejo anti suero total de cricétido con un alto contenido de anticuerpos anti IgG, que fue inactivado a 56°C durante 30 min. junto con un suero normal de conejo.

La muestra de plasma virus positiva se incubó con el IS anti cricétido o con el suero normal de conejo como control, en volúmenes iguales, a 37°C durante una hora; luego se determinó la infectividad remanente.

Plasma virus + incubado con:	Título viral (UFP/ml)
Suero normal	10^{5}
IS anti cricétido	$1,08 \times 10^{5}$

Se observa que el agregado del suero de conejo anti suero total de cricétido no redujo la infectividad del plasma virus positivo, indicando que los anticuerpos anti VJ no estarían unidos a los virus en circulación, dando lugar a la formación de complejos inmunes. Sin embargo, y tal como se demostrara en el item 4.2.4., se planteó la hipótesis de que una gran parte de la población viral responsable de la viremia podría comportarse como variante antigénica del VJ y escapar de la acción neutralizante de los anticuerpos. Dicha hipótesis no pudo ser demostrada debido a los reducidos volúmenes de plasma obtenidos.

4.2.6. Los macrófagos peritoneales como fuente de variantes antigénicas in-vivo

Diversos trabajos han demostrado la participación

de los macrófagos para determinar el éxito de una infección viral. En este sentido, se observó que los macrófagos de animales neonatos constituyen un punto de partida óptimo para la diseminación viral in-vivo (98).

Respecto de los arenavirus, el estudio del tejido linfático de humanos y animales infectados con VJ por inmunofluorescencia mostró que la mayor parte de los antígenos están ubicados en células morfológicamente semejantes a los macrófagos (57, 109). Dichas células aisladas de sangre periférica humana o de peritoneo o bazo de ratones y/o cobayos son sustratos eficientes para la replicación del VJ. En estos casos, se observó que la producción viral es alta y, a la vez, cíclica, indicando una infección de tipo persistente (58, 59).

Por otra parte, el VJ replica activamente in-vitro en macrófagos peritoneales de C. musculinus adultos y neonatos (33). Sin embargo, y en relación a la infección in-vivo por vía i.p., se encontró que el virus está asociado, principalmente, a los macrófagos peritoneales de animales neonatos. Experimentos realizados con macrófagos obtenidos a partir de C. musculinus infectados mostraron que dichas células son capaces de producir virus en condiciones in-vitro (33).

Por lo tanto, se decidió investigar si los macrófagos peritoneales provenientes de cricétidos inoculados con VJ permanecían infectados a distintos tiempos

p.i..

Dos lotes de 15 C. musculinus neonatos cada uno fueron inoculados con VJ/6. A los 15 días p.i. (lote A) y a los 26 días p.i. (lote B), se practicó un lavado de la cavidad peritoneal con MEM sin suero y, con el exudado obtenido, se establecieron diez cultivos (10^6 céls/cavidad), los cuales fueron mantenidos con MEM adicionado con 5% de ST.

Los sobrenadantes cosechados a distintos días p.i. fueron titulados por formación de placas bajo agar (cuadro 4). Se observa que siete cultivos fueron productores de virus, lo cual indica que los macrófagos peritoneales permanecieron infectados hasta, al menos, el día 26 p.i.. Con excepción del cultivo 8, los títulos virales alcanzados se aproximaron a 10^3 UFP/ml. Si bien la diferencia no fue altamente significativa, resulta conveniente destacar que los macrófagos provenientes del lote A fueron productores de virus en títulos más bajos que los correspondientes al lote B.

Por lo tanto, ha sido posible establecer que los macrófagos peritoneales de cricétidos inoculados con VJ/6 estaban infectados hasta, prácticamente, el fin de la etapa aguda de la enfermedad. Si bien dichas células fueron capaces de liberar virus al extracelular en condiciones in-vitro, se desconocen los mecanismos inmunológicos involucrados en el establecimiento de la infección como para

CUADRO 4

Titulación de sobrenadantes de cultivos de macrófagos peritoneales de C. musculinus infectados con VJ

Día de obtención de macrófagos	Cultivo #	Título (UFP/ml) Sobrenadantes 5º día	Sobrenadantes 7º día
15	1	<5	$1,5 \times 10^2$
	2	<5	$5,5 \times 10^2$
	3	<5	<5
	4	2×10^2	$0,95 \times 10^2$
	5	3×10^2	3×10^2
		Sobrenadantes 2º día	Sobrenadantes 5º día
26	6	<5	<5
	7	<5	<5
	8	$1,43 \times 10^6$	$3,65 \times 10^6$
	9	$5,9 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$
	10	$1,9 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$

predecir su comportamiento in-vivo.

4.2.7. Neutralización de aislamientos virales provenientes de macrófagos de C. musculinus infectados

Dado que los macrófagos peritoneales de los cricétidos inoculados perinatalmente con VJ parecen constituir el sitio inicial de la replicación viral in-vivo (33), se decidió investigar si las variantes antigénicas detectadas en sangre y cerebro provenían de la multiplicación del VJ en dichas células.

Por lo tanto se llevó a cabo un ensayo de neutralización frente al IS anti VJ/6 utilizando los sobrenadantes virus positivos correspondientes a los cultivos de macrófagos Nº 5, 8, 9 y 10 (cuadro 4).

Los títulos neutralizantes del I8 anti VJ/6 frente a los distintos aislamientos virales resultaron 8 y 16 veces más bajos que los obtenidos frente al virus parental (cuadro 5). Estos resultados indican claramente que los virus provenientes de los macrófagos peritoneales de animales infectados se comportan como variantes antigénicas.

En consecuencia, los macrófagos peritoneales obtenidos a los 15 y 26 días p.i. a partir de cricétidos infectados fueron productores de variantes antigénicas y por

CUADRO 5

Ensayo de neutralización de aislamientos virales provenientes de macrófagos peritoneales de C. musculinus infectados

Aislamientos virales	Día de cosecha del sobrenadante #	Título del IS anti VJ/6
VJ/6 *	4	320##
VJ/6 (Mfs) **	7	320
5 (a)	22	<80,>40
8 (b)	31	40
9 (b)	28	40
10 (b)	31	<40

\# Día de cosecha de sobrenadantes virus positivos luego de la infección de cricétidos neonatos con VJ/6.

El título neutralizante corresponde a la inversa de la máxima dilución de suero que neutraliza el 80% de la infectividad.

* Virus parental crecido en células Vero.

** Virus parental crecido en cultivos de macrófagos peritoneales, provenientes de cricétidos de 20 días de edad.

(a) Virus proveniente de macrófagos obtenidos a los 15 días p.i. a partir de cricétidos infectados.

(b) Virus proveniente de macrófagos obtenidos a los 26 días p.i. a partir de cricétidos infectados.

ende, dichas células podrían ser eventualmente responsables no sólo de la aparición de variantes virales sino también de las viremias previamente descriptas.

4.2.8. Ensayo de neutralización cruzada con variantes antigénicas aisladas de sangre de cricétidos infectados

Con el fin de cuantificar la reactividad serológica diferencial de las variantes antigénicas detectadas por cinéticas de neutralización frente al IS anti VJ/6, se llevaron a cabo ensayos de neutralización cruzada. Para ello se utilizaron tres sueros policlonales preparados en cobayo contra el virus parental y las variantes antigénicas 192(35) y 215(61), que fueron enfrentados a siete aislamientos virales obtenidos de sangre de C. musculinus que cursaban tanto la etapa aguda como crónica de la enfermedad (cuadro 6).

Se observa que el título neutralizante del IS anti VJ fue hasta 8 y 16 veces mayor frente al virus homólogo en comparación con los obtenidos frente a los virus 192(35), 215(61), 192(19), 117(23) y 385 A-1(8), corroborando de esta forma, que dichos aislamientos son variantes antigénicas del virus parental.

Es importante mencionar que el aislamiento viral

146(14) se comportó análogamente al virus parental en el ensayo de neutralización, indicando que la aparición de variantes antigénicas no ocurrió en todos los casos de infección en estudio. En el caso del C. musculinus 146, la selección pudo haber ocurrido más tardíamente, hecho que no pudo comprobarse dado que el animal murió 72 horas después del sangrado.

De acuerdo a los resultados presentados, es conveniente señalar que una vez que una población de variantes antigénicas fue seleccionada, su comportamiento antigénico diferencial frente al mismo IS no se modificó, tal como ocurrió con los aislamientos virales provenientes del C. musculinus 192 obtenidos a los 19 y 35 días p.i.

Llamativamente se observa que los títulos de los IS anti 192(35) y 215(61) fueron prácticamente similares en todos los casos. La neutralización recíproca no mostró diferencias entre los títulos respectivos cuando dichos ISs fueron enfrentados a los virus homólogos, al virus parental o a los restantes aislamientos virales, indicando que la reacción procedió en un "único sentido" (cuadro 6).

4.2.8.1. Comportamiento antigénico de distintos aislamientos virales provenientes de un mismo animal

CUADRO 6

Ensayo de neutralización cruzada entre distintos aislamientos virales de C. musculinus y tres sueros hiperinmunes

Aislamiento viral	IS anti VJ/6	IS anti virus 192(35)	IS anti virus 215(61)
VJ/6	320 *	320	80
192(35) **	40	320	80
215(61)	20	160	160
192(19)	20	160	80
215(31)	N.H.#	N.H.	80
117(23)	40	160	N.H.
385 A-1(8)	20	N.H.	N.H.
146(14)	320	160	N.H.

* El título neutralizante corresponde a la inversa de la máxima dilución de suero que neutraliza el 80% de la infectividad.

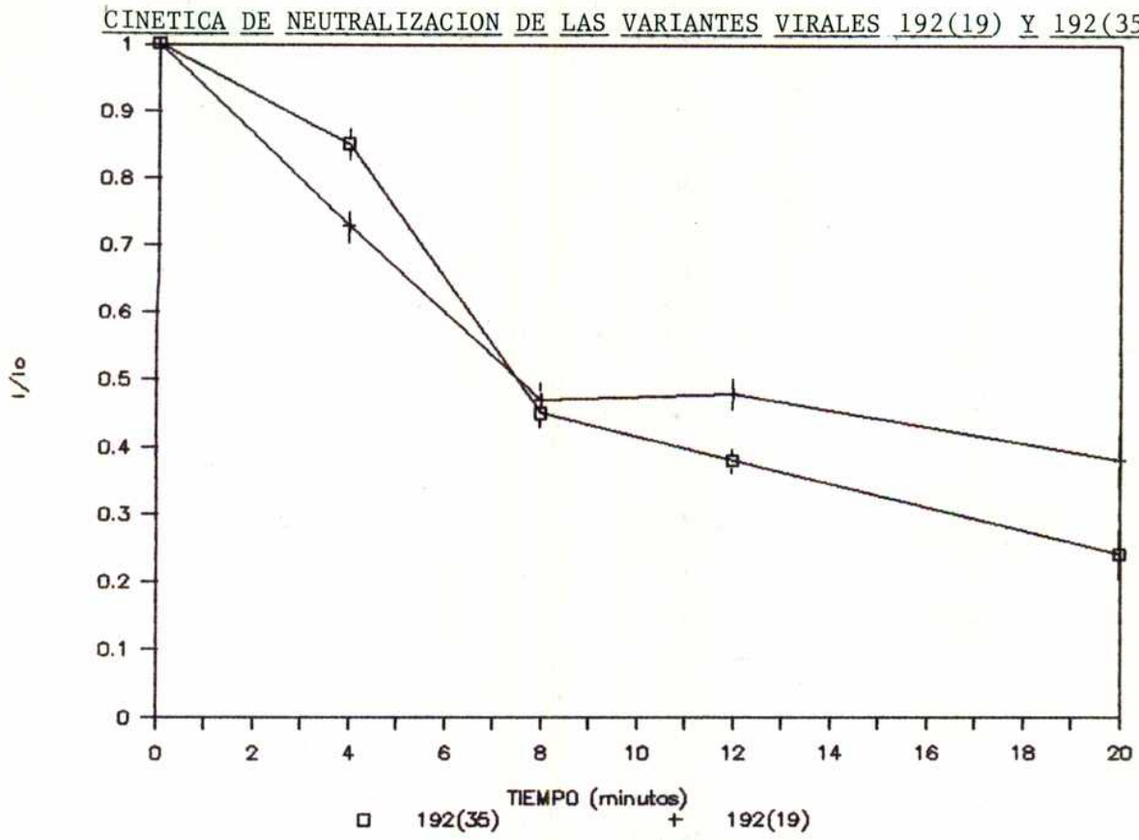
** El número entre paréntesis indica el día post-infección en que se sangró el animal en cuestión.

No Hecho.

Los resultados del cuadro 6 muestran que los IS anti 192(35) y 215(61) neutralizaron a los virus homólogos respectivos y a los aislamientos virales más tempranos (192(19) y 215(31)) con títulos similares. Con el fin de determinar si las variantes 192 y 215 aisladas a los 19 y 35 días p.i., y a los 31 y 61 días p.i., respectivamente, pertenecen a la misma población viral, se realizaron ensayos de cinética de neutralización. Las variantes virales 192(19) y 192(35) fueron enfrentadas al IS anti 192(35) ensayado en una dilución final de 1:80 (figura 8A). Se observa que no existen diferencias significativas entre las cinéticas correspondientes a ambos virus, indicado por los respectivos valores de K (K=6,2; K=3,2). Análogamente, la figura 8B muestra perfiles coincidentes para las variantes virales 215(31) y 215(61) enfrentadas al IS anti 215(61) (dilución final 1:40). En principio, estos resultados sugieren que la composición antigénica de las poblaciones virales no se modificó a través del tiempo una vez que la(s) alteración (es) fueron(ron) seleccionada(s). Sin embargo, los inóculos virales con los cuales se prepararon los IS anti 192(35) y 215(61) bien podrían haber incluído una población minoritaria de los virus 192(19) y 215(31) y, por ende, los patrones observados serían los mismos. Para descartar la hipótesis planteada, se realizaron cinéticas de neutralización con las variantes virales antes mencionadas frente a ISs preparados contra los virus 192(19) y 215(31)

FIGURA 8A

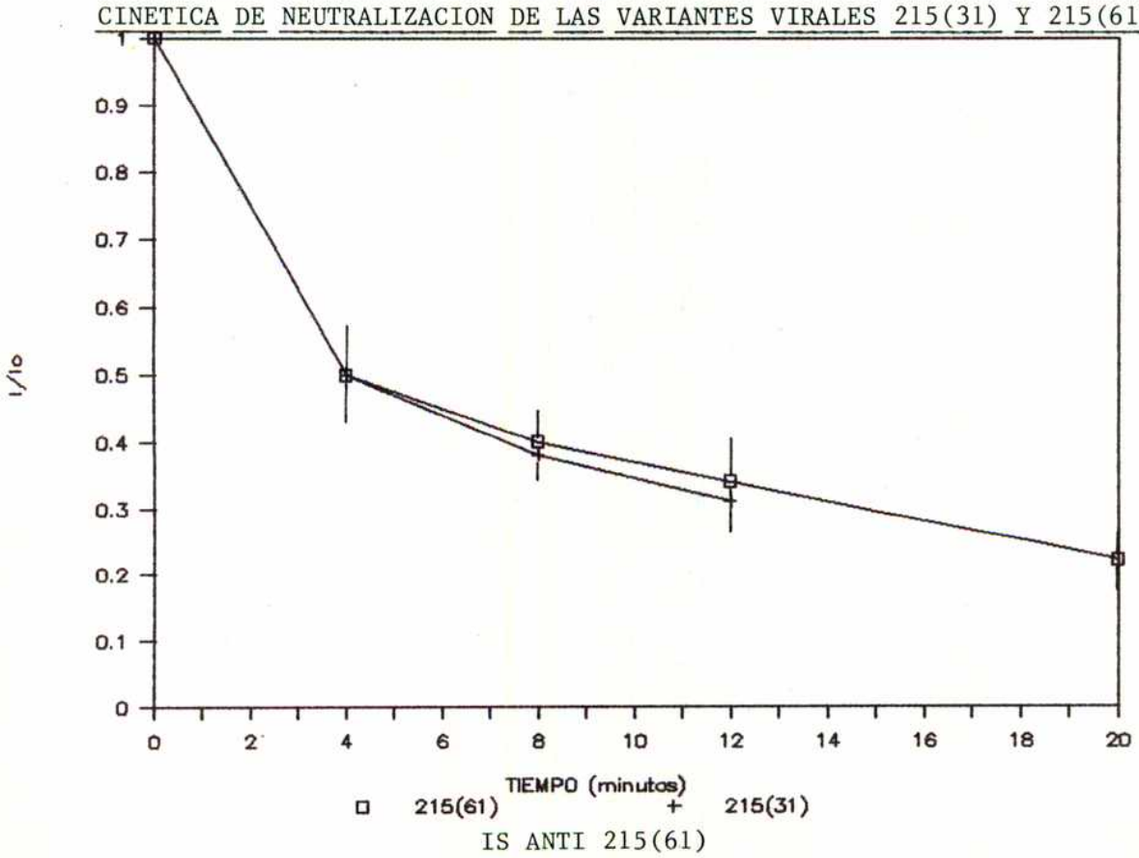
CINETICA DE NEUTRALIZACION DE LAS VARIANTES VIRALES 192(19) Y 192(35)



IS ANTI 192(35)

FIGURA 8B

CINETICA DE NEUTRALIZACION DE LAS VARIANTES VIRALES 215(31) Y 215(61)



IS ANTI 215(61)

(dilución 1:20 y 1:80 respectivamente). Las figuras 9A y B muestran que, en ambos casos, no existe una afinidad diferencial de los anticuerpos por los virus aislados en forma temprana y tardía. En efecto, los valores de K obtenidos para el IS anti 192(19) fueron de 3,66 y 3,58 para el virus homólogo y el 192(35) respectivamente (figura 9A), en tanto que los correspondientes al IS anti 215(31) resultaron 2,79 y 4,6 para las variantes 215(31) y 215(61) (figura 9B). Por lo tanto, estos resultados sugieren que durante lapsos relativamente cortos, no se observan cambios antigénicos en las poblaciones virales seleccionadas, detectados por esta metodología.

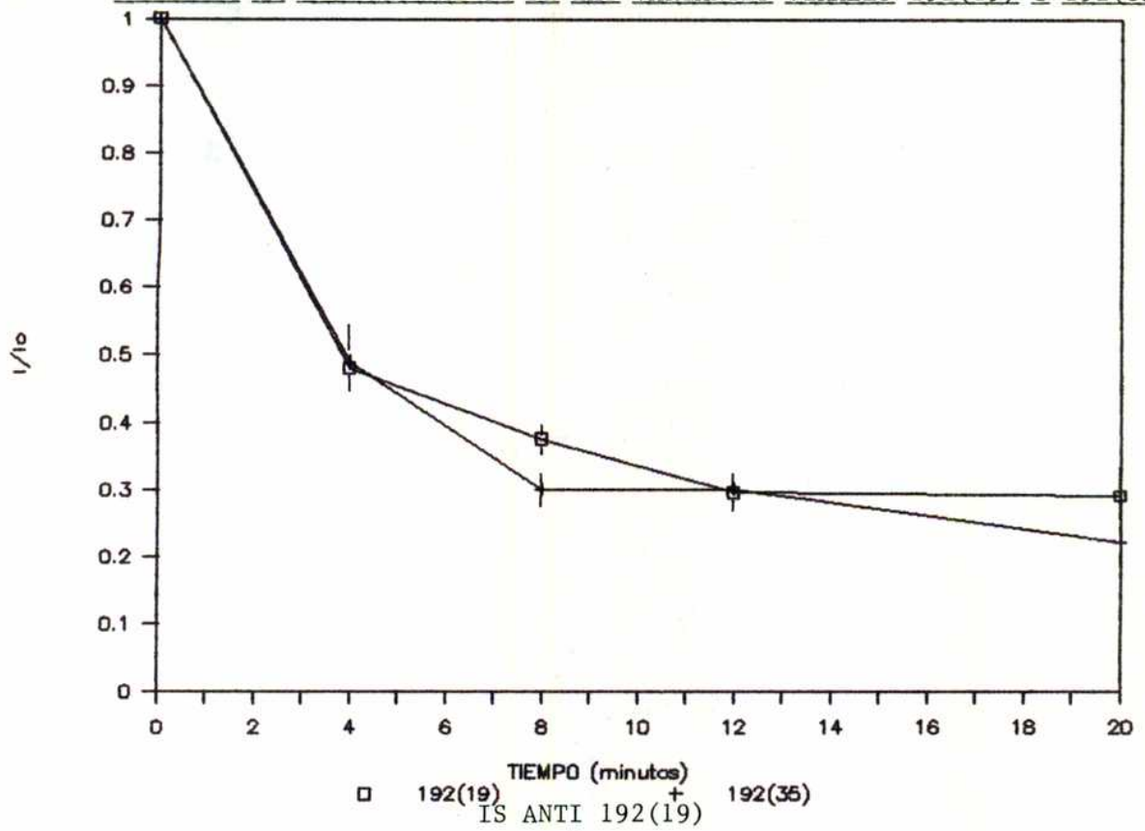
4.3. ¿Es posible seleccionar variantes antigénicas in-vitro?

4.3.1. A través de la presión selectiva de anticuerpos

Para comprender más precisamente el mecanismo del "drift" antigénico, varios investigadores han utilizado anticuerpos monoclonales para analizar la(s) modificación (es) en los determinantes antigénicos de distintos virus RNA en sistemas in-vitro (10, 73, 80, 100). De esta manera ha sido posible estudiar mutantes virales obtenidas bajo la

FIGURA 9A

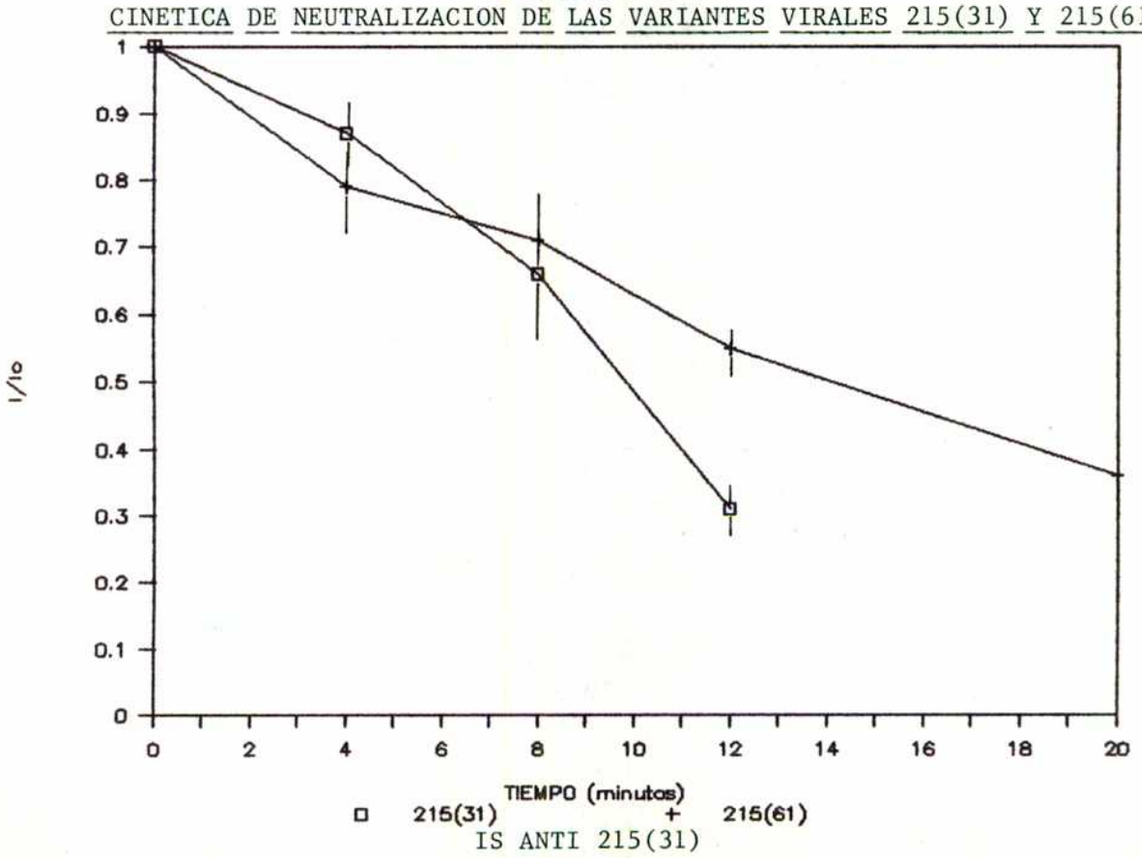
CINETICA DE NEUTRALIZACION DE LAS VARIANTES VIRALES 192(19) Y 192(35)



IS ANTI 192(19)

FIGURA 9B

CINETICA DE NEUTRALIZACION DE LAS VARIANTES VIRALES 215(31) Y 215(61)



IS ANTI 215(31)

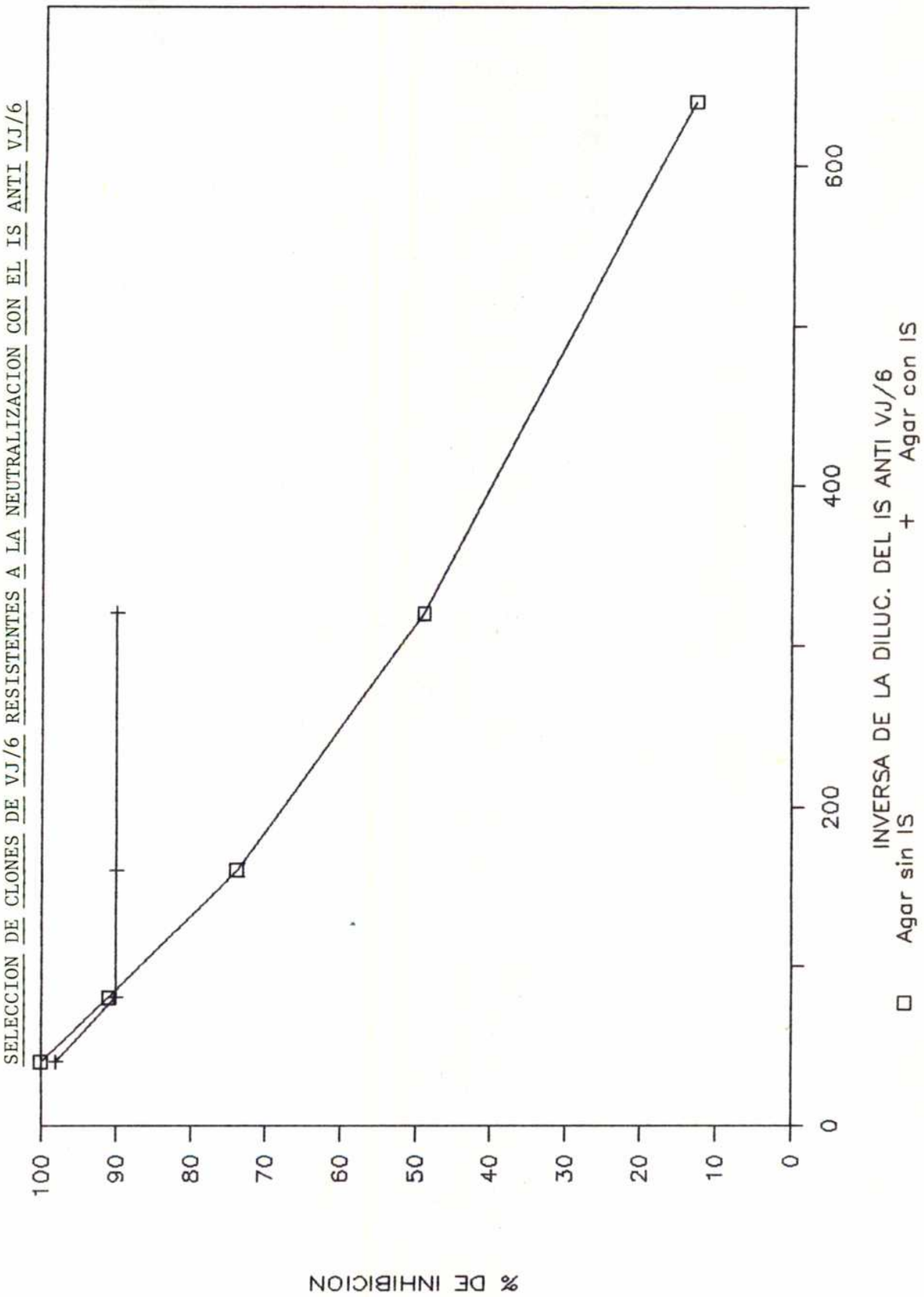
presión selectiva de dichos anticuerpos, y correlacionarlas, eventualmente, con cepas virales circulantes asignándoles importancia epidemiológica (153). En particular, también se han obtenido anticuerpos monoclonales contra el arenavirus Tacaribe, que han sido utilizados como agentes de selección de variantes virales in-vitro (72).

Dado que las variantes antigénicas del VJ/6 fueron efectivamente aisladas in-vivo, se trató de obtener mutantes virales in-vitro a través de la acción de anticuerpos policlonales. Para ello se procedió en forma análoga a una neutralización: se mezclaron 200 UFP/0,2 ml de VJ/6 ensayado con distintas diluciones del IS anti VJ/6 (1:40 hasta 1:320) en volúmenes iguales. Paralelamente, se practicó un control de virus y suero normal de cobayo. Luego de la incubación a 37°C, monocapas de células Vero se infectaron con las mezclas de reacción. La capa de agar nutritivo correspondiente a las monocapas infectadas con la mezcla VJ+IS fue adicionada con una dilución 1:80 (final) del IS anti VJ/6, de manera tal de obtener las condiciones más estrictas para la eventual aparición de variantes virales. A modo de control se trabajó paralelamente con monocapas de células Vero infectadas, sin el agregado de IS en el agar nutritivo.

Los resultados presentados en la figura 10 muestran, tal como se esperaba, que el porcentaje de inhibición de la infectividad disminuyó con la dilución de

FIGURA 10

SELECCION DE CLONES DE VJ/6 RESISTENTES A LA NEUTRALIZACION CON EL IS ANTI VJ/6



IS en el caso del control del ensayo de neutralización. Sin embargo, fue posible aislar ocho clones virales resistentes a la neutralización correspondientes a las distintas diluciones de IS ensayadas en aquellas monocapas celulares que fueron tratadas con IS en el agar nutritivo. Dichos clones fueron amplificados en células Vero; los sobrenadantes de 3er. y 4to. día fueron cosechados y titulados. En la mayoría de los casos resultó prácticamente imposible cuantificar la infectividad debido a que los clones obtenidos presentaron un muy reducido tamaño de placa de lisis, con excepción de dos clones correspondientes a la dilución 1:80 del IS (VJ/6 R y VJ/6 R_1) que fueron enfrentados al IS anti VJ/6 en una reacción de neutralización. Se ensayaron, además, el virus parental y la cepa prototipo del VJ, XJ (cuadro 7).

Se observa que los virus VJ/6 R y VJ/6 R_1 fueron neutralizados por el IS anti VJ/6 con títulos similares a los obtenidos con los aislamientos virales provenientes de sangre de C. musculinus (cuadro 6) comportándose, por ende, como variantes antigénicas del virus parental. Paralelamente, la cepa XJ fue reconocida por el IS anti VJ/6 con un título similar a los encontrados con las variantes antigénicas aisladas tanto in-vivo (cuadro 6) como in-vitro (cuadro 7). Asimismo, el IS anti XJ reconoció a la variante viral VJ/6 R_1 como si se tratara del virus parental. En consecuencia, se demuestra que fue factible aislar variantes

CUADRO 7

Ensayo de neutralización de clones virales aislados in-vitro bajo la presión selectiva de anticuerpos

Virus	IS anti VJ/6	IS anti cepa XJ
VJ/6	320 *	320
XJ	40	1280
Clon 6 R	40	N.H. #
Clon 6 R_1	<40	320

* El título neutralizante corresponde a la inversa de la máxima dilución de suero que neutraliza el 80% de la infectividad.

No Hecho.

antigénicas del VJ/6 in-vitro, a través de una intensa presión selectiva de anticuerpos policlonales.

4.3.2. A partir de cultivos primarios de embrión de Calomys infectados

El arenavirus Junín establece una infección persistente característica in-vitro a posteriori de un período de alta producción viral no necesariamente seguido de efecto citopático (23). Los cultivos de células Vero persistentemente infectados son indistinguibles morfológicamente de células sin infectar y presentan características similares de crecimiento (29, 44). Dichos cultivos "carrier" son productores de distintos tipos de mutantes virales (termosensibles, patogenicidad alterada) así como también de partículas virales interferentes (13, 30). La aparición de mutantes termosensibles también fue detectada en cultivos de células MRC_5 persistentemente infectados con VJ (152).

Con el fin de considerar el eventual surgimiento de variantes antigénicas a partir de cultivos celulares infectados, se establecieron dos cultivos primarios de embrión de Calomys, EC-1 y EC-2, que fueron sometidos a seis y cuatro subcultivos, respectivamente, para luego ser infectados con una multiplicidad de infección de 0,01 de la

cepa XJCl$_{3}$ de VJ. A distintos días p.i. se realizaron subcultivos y se cosecharon los sobrenadantes, los que fueron titulados y ensayados en una neutralización.

Si bien no fue posible realizar más de un pasaje, tanto el cultivo EC-1 como el EC-2 fueron productores de virus, alcanzando títulos de 10^4 UFP/ml. En el caso del sobrenadante correspondiente a EC-2, el título viral alcanzado fue menor (2×10^2 UFP/ml) hecho que posiblemente se deba a que dicho sobrenadante fuese cosechado más tardíamente (día 53 p.i.), tal como ocurre con los sobrenadantes de los cultivos de células Vero persistentemente infectados con VJ (42).

En el cuadro 8 se observa que los anticuerpos de los IS anti VJ/6 y anti XJCl$_{3}$ ensayados neutralizaron con igual título los dos sobrenadantes virus positivos correspondientes al cultivo EC-1 y la cepa XJCl$_{3}$ de VJ con la cual se originó la infección. Llamativamente, el virus proveniente del cultivo EC-2 fue pobremente neutralizado por ambos ISs, ya que los mismos presentaron títulos 4 y 8 veces más bajos que los obtenidos frente al virus parental. Por lo tanto, el cultivo EC-2, que se mantuvo infectado por un lapso más prolongado que el cultivo EC-1, sería productor de variantes serológicas, cuya aparición no estaría mediada por la presión selectiva de los anticuerpos neutralizantes. Por el contrario, dicha población parecería haber surgido como consecuencia de la evolución de la infección establecida in-vitro.

CUADRO 8

Neutralización de sobrenadantes de cultivos primarios de embrión de C. musculinus infectados con la cepa $XJCl_3$ de VJ

Cultivo	Día de cosecha # del sobrenadante	Título neutralizante IS anti VJ/6	Título neutralizante IS anti $XJCl_3$
EC-1 *	23	640 (a)	640
EC-1	27	640	640
EC-2 **	53	160	<80
$XJCl_3$ ##	--	640	640

\# Día de cosecha del sobrenadante luego de la infección con la cepa $XJCl_3$ de VJ.

Control de la reacción de neutralización.

* Cultivo de embrión de Calomys 1, subcultivado una única vez a los 21 días p.i..

** Cultivo de embrión de Calomys 2, subcultivado una única vez a los 15 días p.i..

(a) El título neutralizante corresponde a la inversa de la máxima dilución de suero que neutraliza el 80% de la infectividad.

Parte II: PROPIEDADES BIOLOGICAS, INMUNOLOGICAS Y BIOQUIMICAS DE LAS VARIANTES ANTIGENICAS DEL VJ

4.4. Propiedades biológicas

4.4.1. Acción citopática sobre cultivo de tejidos

Monocapas de células Vero crecidas en tubos de ensayo fueron infectadas por triplicado con el VJ/6 y los virus 146(14), 192(35) y 215(61) con una multiplicidad de infección de 0,1. Los cultivos se incubaron a 37°C y se observaron al microscopio óptico durante 13 días, con periódicos cambios de medio de mantenimiento. La figura 11 muestra el grado de acción citopática (ACP) alcanzado producido por los virus en estudio. La misma se tabuló arbitrariamente de +1 a +4, de acuerdo al siguiente criterio:

Grado +1: <30% de la monocapa alterada

Grado +2: de 30 a 60% de la monocapa alterada

Grado +3: de 60 a 90% de la monocapa alterada

Grado +4: >90% de la monocapa alterada

Se observa que la aparición de ACP ocurrió prácticamente en forma simultánea para el virus parental y los restantes virus ensayados entre el 2do. y 3er. día p.i.. La evolución del ACP fue similar en todos los casos, aunque se detectaron algunas diferencias. Si bien el grado máximo de ACP se

registró entre los 9 y 10 días p.i. en todos los casos, el punto final de observación no fue el mismo. Las células infectadas con el VJ/6 y el virus 146(14) (que se comportó análogamente al virus parental en el ensayo de neutralización (cuadro 6)) desarrollaron una ACP muy destructiva, dado que la monocapa celular no pudo recuperarse hasta el día 13 p.i., último día de observación. Sin embargo, los cultivos infectados con las variantes antigénicas 192(35) y 215(61) comenzaron la etapa de recuperación a partir del día 10 p.i., ya que se observa la involución de la ACP alrededor del día 13 p.i..

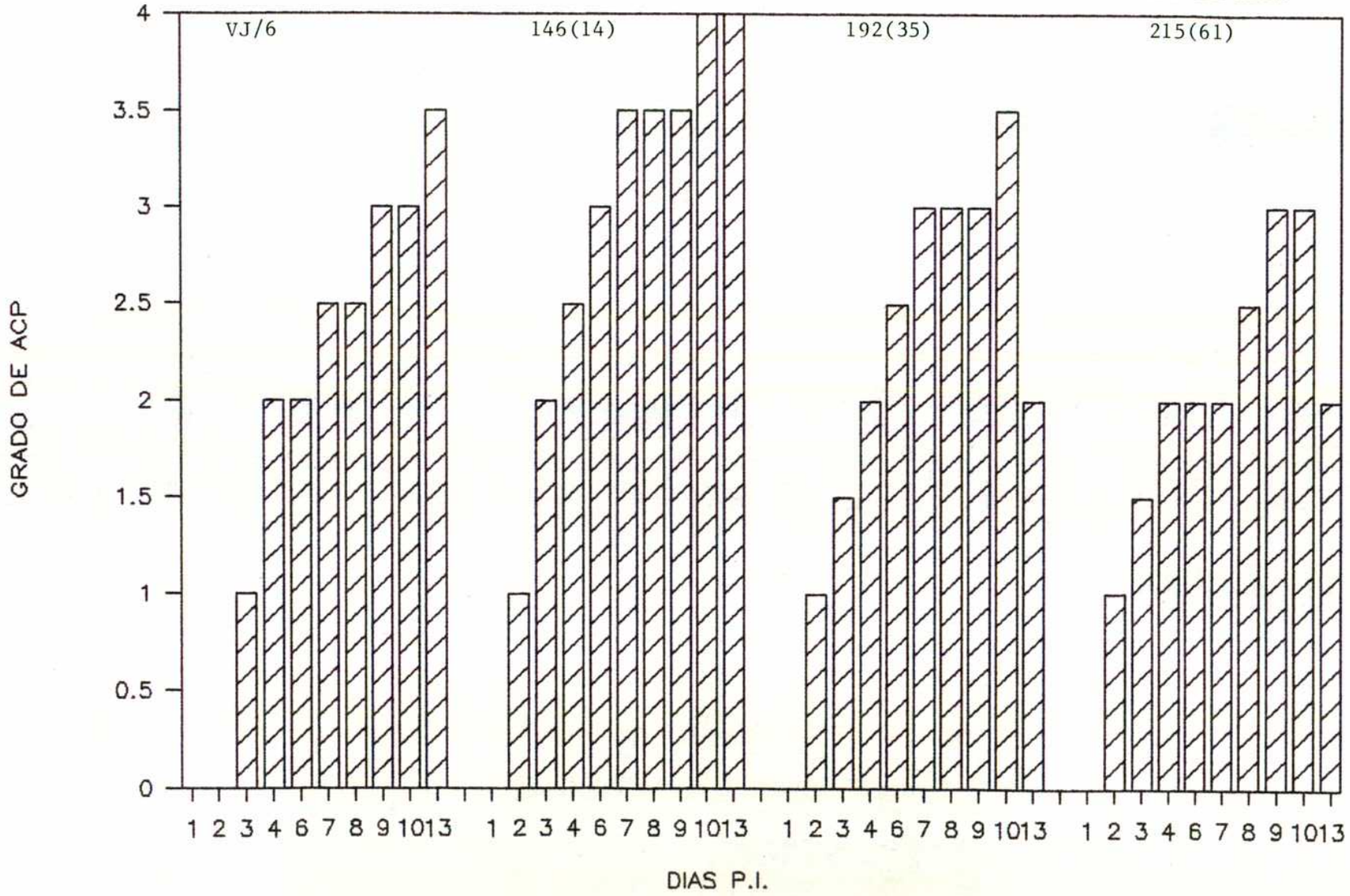
4.4.2. Ensayo de interferencia viral

Teniendo en cuenta que el efecto citopático observado no fue tan destructivo para el caso de la infección con las variantes serológicas, se consideró la posibilidad de una eventual presencia de partículas virales interferentes en dichos stocks, razón por la cual se realizó un ensayo de interferencia con el virus parental y las variantes virales 192(35) y 215(61).

Para tal fin, monocapas de células Vero crecidas en botellas de 15 cc de capacidad fueron infectadas por duplicado con diluciones decimales de los materiales interferentes a estudiar. Al cabo de una hora de adsorción a

FIGURA 11

EVOLUCION DE LA ACP DE AISLAMIENTOS VIRALES DE CRICETIDOS INFECTADOS EN CELULAS VERO



37°C se eliminaron los inóculos , y las monocapas fueron exhaustivamente lavadas con PBS y sobreinfectadas con VJ/6. Paralelamente, se realizaron controles infectados únicamente con igual dilución del VJ/6 desafiante y también de las variantes virales ensayadas. Se incubaron nuevamente durante una hora a 37°C y se eliminó el inóculo para cubrirlas posteriormente con una mezcla de agar y MEM 2x. A los siete días de incubación fueron reveladas y los resultados obtenidos figuran en el cuadro 9.

Se observa que los títulos virales obtenidos en el caso de los controles y los materiales ensayados resultaron prácticamente similares. Por lo tanto, no fue posible detectar un enriquecimiento del stock de VJ/6 y/o las variantes antigénicas en partículas virales interferentes, detectado por este tipo de ensayo.

4.4.3. Curvas de crecimiento viral

Los sobrenadantes correspondientes a dos de los tres tubos de ensayo utilizados para la observación del efecto citopático fueron cosechados alternativamente a distintos días p.i. y titulados por formación de placas bajo agar. Los materiales ensayados fueron el VJ/6 y los aislamientos 146(14), 192(35) y 215(61) (figura 12). Los títulos virales máximos se alcanzaron entre el 3er. y 4to.

CUADRO 9

Ensayo de interferencia viral

Material inoculado	Material desafiante	Título (UFP/ml)
--	VJ/6	$2,03 \times 10^5$
--	192(35)	$7,45 \times 10^5$
--	215(61)	$1,3 \times 10^5$
VJ/6	VJ/6	$9,3 \times 10^5$
192(35)	VJ/6	$1,35 \times 10^6$
215(61)	VJ/6	$9,5 \times 10^5$

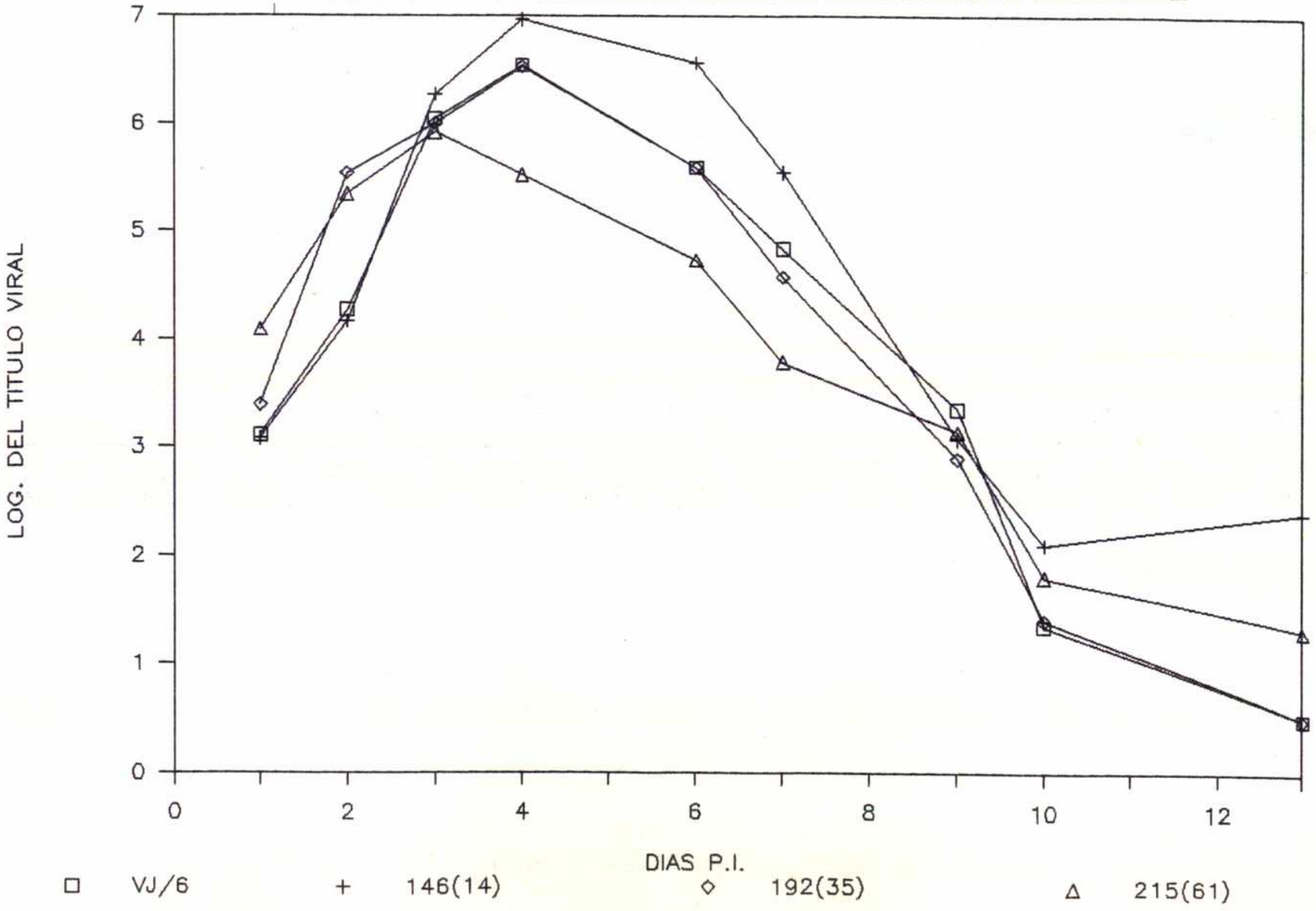
día p.i., tanto para los virus parental y 146(14) como para las variantes serológicas. A su vez, las curvas de producción viral obtenidas siguieron un patrón similar en todos los casos. Se detectaron títulos virales de 10^3-10^4 UFP/ml en los sobrenadantes correspondientes al 1er. día de cosecha cuando aún la acción citopatogénica no había sido observada (figura 11). Por lo tanto, la liberación de virus al extracelular precedió a la acción citopática provocada por el virus, hecho que también se verificó al 3er. y 4to. día p.i., dado que los títulos virales máximos fueron registrados previamente a la observación del máximo grado de ACP. Por último, los títulos virales disminuyeron considerablemente en todos los casos en el día 13 p.i..

4.4.4. Termosensibilidad

Con el propósito de determinar si la(s) variación (es) antigénica(s) estaba(n) relacionada(s) con la expresión fenotípica de una mutación génica (termosensible), monocapas de células Vero fueron infectadas con el VJ/6 y los virus 146(14), 192(35) y 215(61). Dichos cultivos fueron mantenidos a 37°C y 40°C; los sobrenadantes correspondientes al 3er. día p.i. fueron cosechados y titulados a 37°C (cuadro 10).

FIGURA 12

REPLICACION DE LOS AISLAMIENTOS VIRALES DE C. musculinus EN CELULAS VERO



CUADRO 10

Ensayo de termosensibilidad

Virus	Título viral (UFP/ml) Temperatura de crecimiento 37°C	40°C	EDP 40/37 *
VJ/6	1,16 x 10^6	8 x 10^5	0,69
146(14)	2,2 x 10^6	7,2 x 10^5	0,33
192(35)	3,7 x 10^5	1,85 x 10^5	0,5
215(61)	3,5 x 10^5	8,1 x 10^4	0,23

* EDP 40/37: cociente entre el título del virus crecido a 40°C y el título del virus crecido a 37°C.

Se observa que los virus 146(14), 192(35) y 215(61) no presentaron diferencias respecto del virus parental en cuanto a su multiplicación a 40°C dado que la EDP 40/37 fue aproximadamente la misma en todos los casos.

Por lo tanto, los stocks de virus y variantes antigénicas aquí estudiados no están enriquecidos en mutantes termosensibles (ts).

4.4.5. Virulencia de las variantes antigénicas para C. musculinus neonatos

Con el objeto de analizar la virulencia de las variantes antigénicas para los cricétidos recién nacidos, se constituyeron varios grupos muestrales de C. musculinus neonatos, los cuales fueron inoculados por vía i.p. tanto con las variantes serológicas como con los virus 146(14) y parental.

Las dosis y los tamaños muestrales empleados fueron:

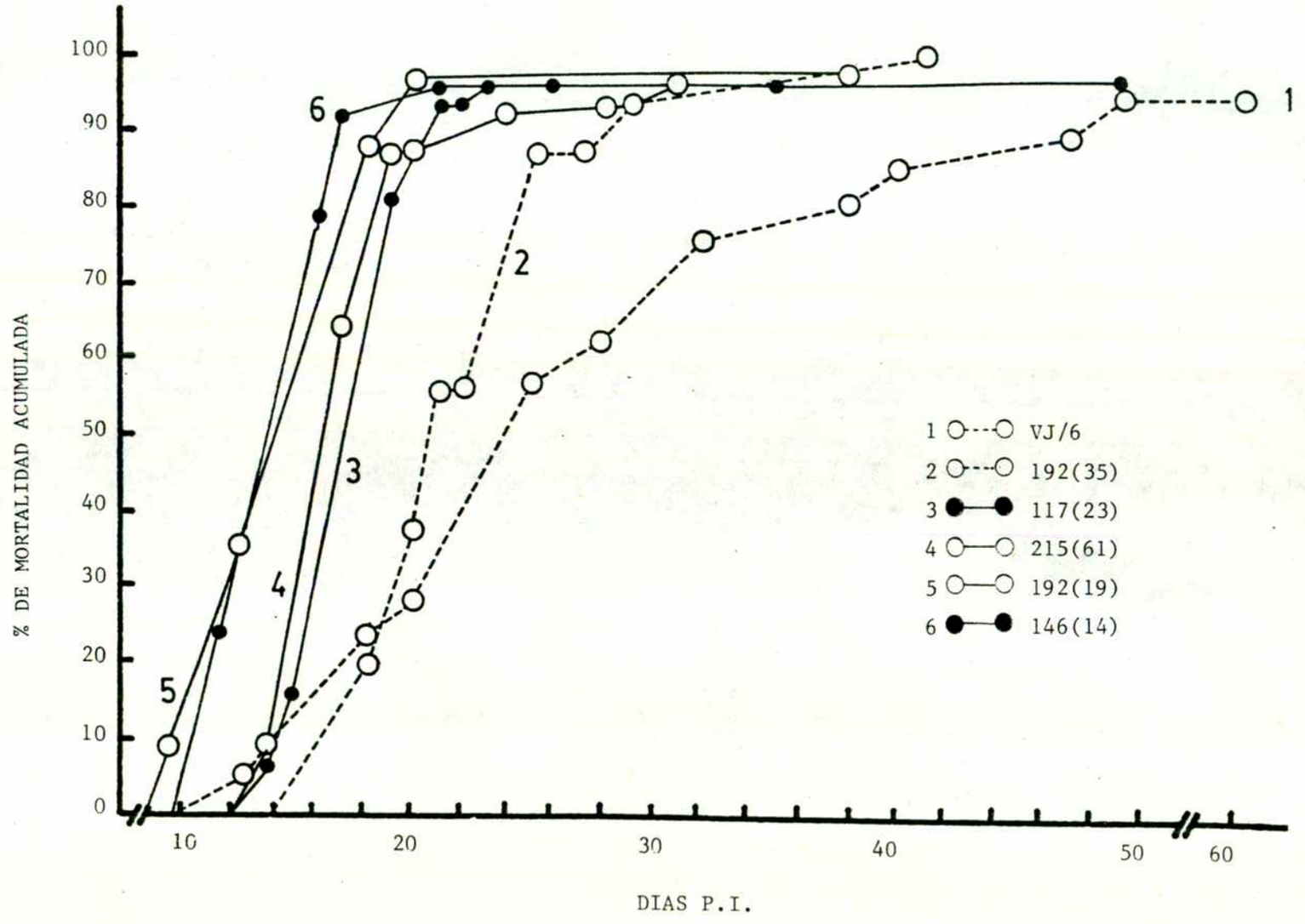
Virus	Dosis (UFP/0,02 ml)	Nº de crías
VJ/6	350	21
146(14)	250	27
117(23)	300	27
192(19)	230	26
192(35)	200	16
215(61)	330	31

Los animales inoculados fueron observados periódicamente; se registraron signos de enfermedad y mortalidad en todos los cricétidos, independientemente del stock viral utilizado. La detección de las primeras muertes ocurrió entre los días 10 y 14 p.i. para todos los virus ensayados, a excepción de la variante viral 192(35) (figura 13). Sin embargo, la cinética posterior varió según el virus inoculado. En efecto, los máximos porcentajes de mortalidad acumulada alcanzaron un valor del 90% entre los 17 y 21 días p.i. en el caso de la inoculación con los virus 146(14), 192(19), 215(61) y 117(23), en tanto que se registró un 86% a los 40 días p.i. para los animales inoculados con el virus parental (figura 13). Estos resultados indican una virulencia más acentuada de los virus ensayados respecto del VJ/6 para los C. musculinus neonatos, lo cual se corroboró mediante una prueba estadística para muestras pequeñas. La aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov (46) mostró diferencias significativas entre la curva de mortalidad acumulada del VJ/6 y las correspondientes a las variantes antigénicas y al virus 146(14) con p=0,995, con excepción de la obtenida con la variante viral 192(35), que no presentó diferencias respecto del virus parental en el máximo de exigencia de la prueba estadística.

4.5. Propiedades inmunológicas y bioquímicas

FIGURA 13

CURVAS DE MORTALIDAD ACUMULADA DE CRICETIDOS NEONATOS



4.5.1. Inmunodifusión doble bidimensional

Los antecedentes de la técnica de inmunodifusión doble bidimensional (ID) (Ouchterlony) realizada con distintos arenavirus se remontan a trabajos publicados en la década del 70. Chastel estudió, en forma comparativa, las bandas de precipitación obtenidas con los virus Tacaribe, Junín, Amaparí y Tamiami enfrentados a inmunosueros homólogos y heterólogos (38). Así, la ID permitió separar netamente los virus Junín y Tacaribe, hecho que no había sido posible evidenciar a través de la fijación de complemento (39).

Por lo tanto, el virus parental y las variantes antigénicas aisladas in-vivo (192(35)) e in-vitro (VJ/6 R) fueron ensayadas frente al IS anti VJ/6 (puro) en una ID. Cabe destacar que se trabajó con los correspondientes stocks virales previamente clonados, purificados y tratados según se detalla en Materiales y Métodos. La concentración de proteína viral determinada por el método de Bradford fue la siguiente: 1,2 ug/ml (VJ/6), 0,4 ug/ml (VJ/6 R) y 0,9 ug/ml (192(35)).

En la figura 14A se observan bandas de precipitación detectadas simultáneamente para todos los materiales estudiados, encontrando reacción de identidad total entre los virus VJ/6, VJ/6 R y 192(35), lo cual indica que las diferencias de reactividad observadas a través del

ensayo de neutralización no se evidenciaron en reacciones de identidad parcial o no identidad entre los antígenos ensayados.

Paralelamente, se realizó un control para descartar precipitación inespecífica. Para ello, células Vero crecidas en monocapa en una botella de 1000 ml de capacidad, fueron tripsinadas y resuspendidas, y sometidas a congelamientos y descongelamientos sucesivos (tres veces). Dichas células se centrifugaron durante 40 min. a 10000 x g y se colectó el sobrenadante. El sobrenadante sin diluir y el VJ/6 fueron enfrentados al IS anti VJ/6 (dilución 1:80) (figura 14B).

Se observa que no existe reacción de precipitación entre el sobrenadante sembrado y el IS anti virus parental, en tanto que sí se obtuvo banda de precipitación en el caso del virus homólogo.

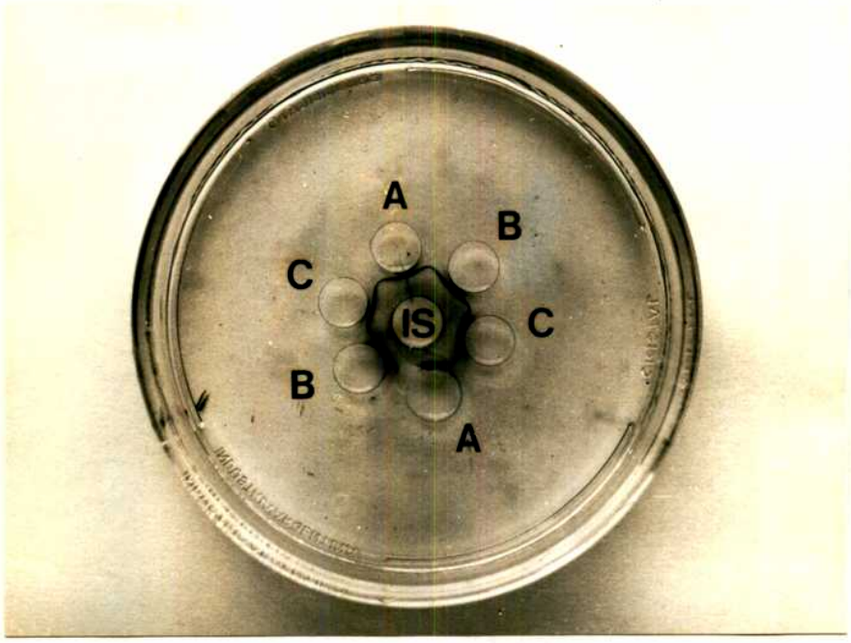
4.5.2. Inmunoelectroforesis bidimensional cruzada

La inmunoelectroforesis bidimensional cruzada (IEC) ha sido utilizada como técnica para realizar la caracterización inmunológica de glicoproteínas parcialmente purificadas de los virus herpes simplex (147) y Parainfluenza humano tipo 3 (67), así como también el estudio de distintas cepas de rotavirus humano (61).

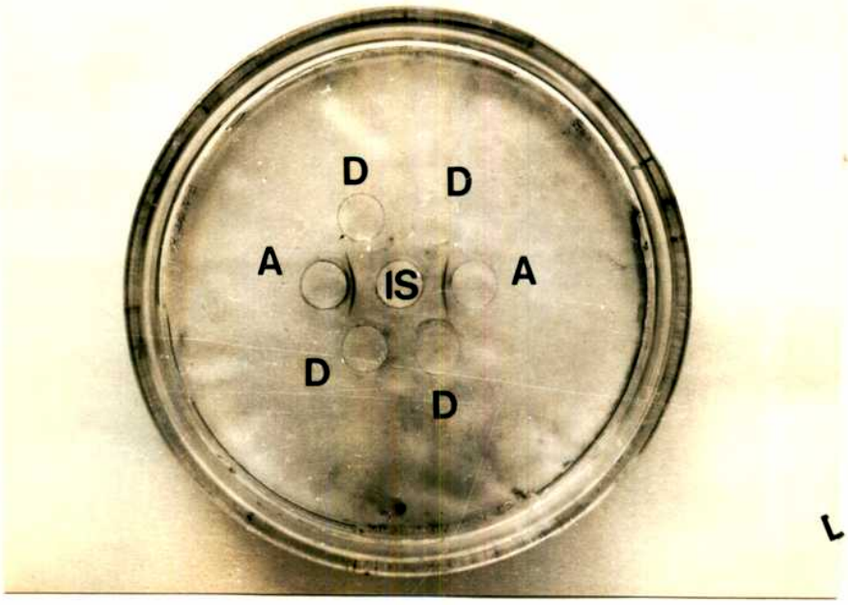
A través de la IEC se evidencian, fundamentalmente,

FIGURA 14

A) ID del VJ/6 y las variantes antigénicas 192(35) y VJ/6 R frente al IS anti VJ/6



B) ID del VJ/6 y el sobrenadante de células Vero frente al IS anti VJ/6



alteraciones cualitativas reflejadas en los distintos tipos de perfiles electroforéticos.

Con el fin de realizar un análisis comparativo se llevó a cabo una IEC con el VJ/6 y el virus 192(35) frente a la fracción de IgG correspondiente al IS anti VJ/6 obtenida por precipitación con $SO_4(NH4)_2$ (concentración proteica: 3,7 ug/ul).

En la figura 15A se observa el patrón obtenido en el sistema homólogo, encontrando una única banda de precipitación. Sin embargo, la variante viral 192(35) enfrentada en las mismas condiciones a la fracción de IgG, presentó un perfil diferente, detectando, al menos, tres bandas de precipitación (figura 15B). Cabe destacar que en este último caso, probablemente no se hayan definido en forma adecuada otros sistemas antígeno-anticuerpo reaccionantes.

Paralelamente se realizó una IEC con los mismos stocks virales enfrentados al IS anti 192(35) (vol= 80 ul). Nuevamente, el sistema 192(35)-IS anti 192(35) mostró una configuración análoga a la observada en la figura 15 A, que consiste en una única banda de precipitación (figura 16A). Sin embargo, cuando el VJ/6 es inmunoprecipitado por el IS anti 192(35), se distinguen dos bandas de precipitación netas y una zona no definida similar a la obtenida a través de la reacción entre la variante viral 192(35) y la fracción de IgG del IS anti VJ/6 (figura 16B).

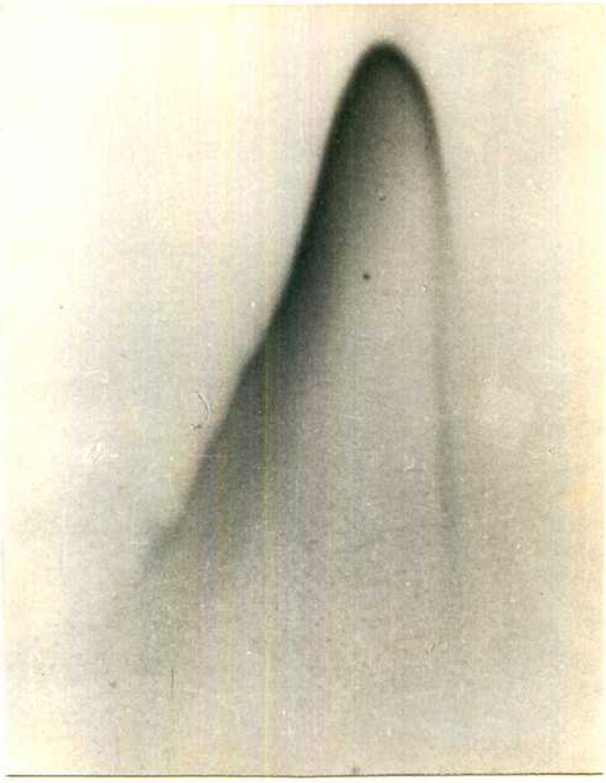
FIGURA 15

A) IEC del VJ/6 frente a la fracción IgG del IS anti VJ/6

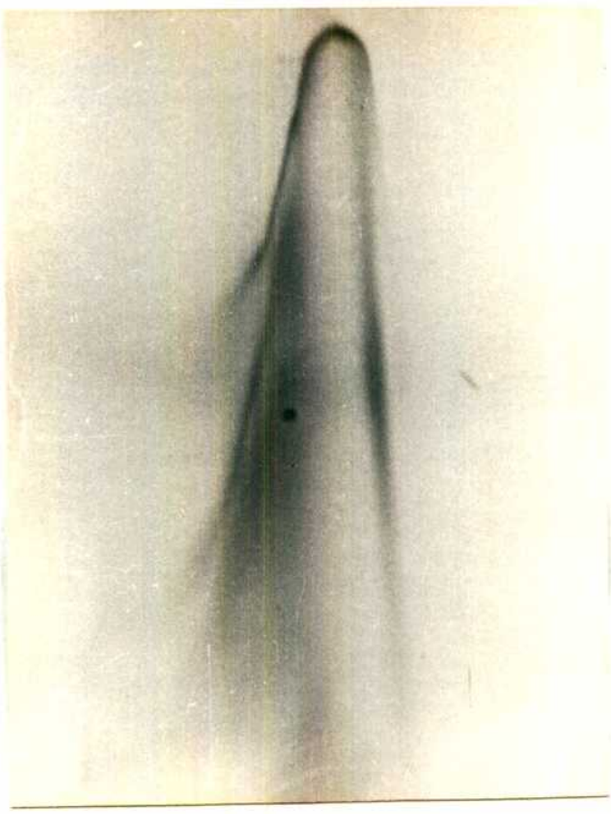
B) IEC de la variante antigénica 192(35) frente a la fracción IgG del IS anti VJ/6

FIGURA 16

A) IEC de la variante antigénica 192(35) frente al IS anti 192(35)



B) IEC del VJ/6 frente al IS anti 192(35)



En consecuencia, los virus parental y 192(35) evidenciaron patrones de precipitación diferentes a través de ensayos de IEC, al ser enfrentados tanto a la fracción de IgG del IS anti VJ/6 como al IS anti 192 (35). Cabe mencionar que, en ambos casos, las bandas de precipitación obtenidas resultaron más nítidas en los sistemas virus-IS homólogos (figuras 15A y 16A).

4.5.3. Mapeo de proteínas virales en geles de poliacrilamida

Respecto de los arenavirus, la electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas virales de células Vero infectadas, marcadas con metionina ^{35}S e inmunoprecipitadas con anticuerpos poli o monoclonales, posibilitó el estudio de las proteínas del virus LCM (18) así como también la reactividad cruzada entre los virus Junín y Tacaribe (45).

Considerando que las principales diferencias entre el VJ/6 y las variantes antigénicas se detectaron a través de ensayos de neutralización cruzada, cinéticas de neutralización e inmunoprecipitación en acetato de celulosa, se intentó investigar si dicha diferenciación también se evidenciaba en cambios en la movilidad electroforética de la glicoproteína G2.

En consecuencia se trabajó con preparaciones

virales purificadas y marcadas con ^{125}INA por el método de la lacto-peroxidasa usando Enzymobeads (Bio-Rad Lab.) (97). Mediante esta metodología se iodinan las glicoproteínas de superficie y, en este caso, específicamente la G2. De esta manera es posible analizar la estructura nativa de la glicoproteína G2 que, por otra parte, es la única que efectivamente se iodina, dado que G1 estaría ubicada en una capa más profunda de la envoltura, tal como se ha sugerido para el virus LCM (16, 17).

En particular, el interés de estudiar la glicoproteína G2 del VJ radica en que se trata de una proteína de envoltura expuesta y, como tal, capaz de inducir la síntesis de anticuerpos neutralizantes (111).

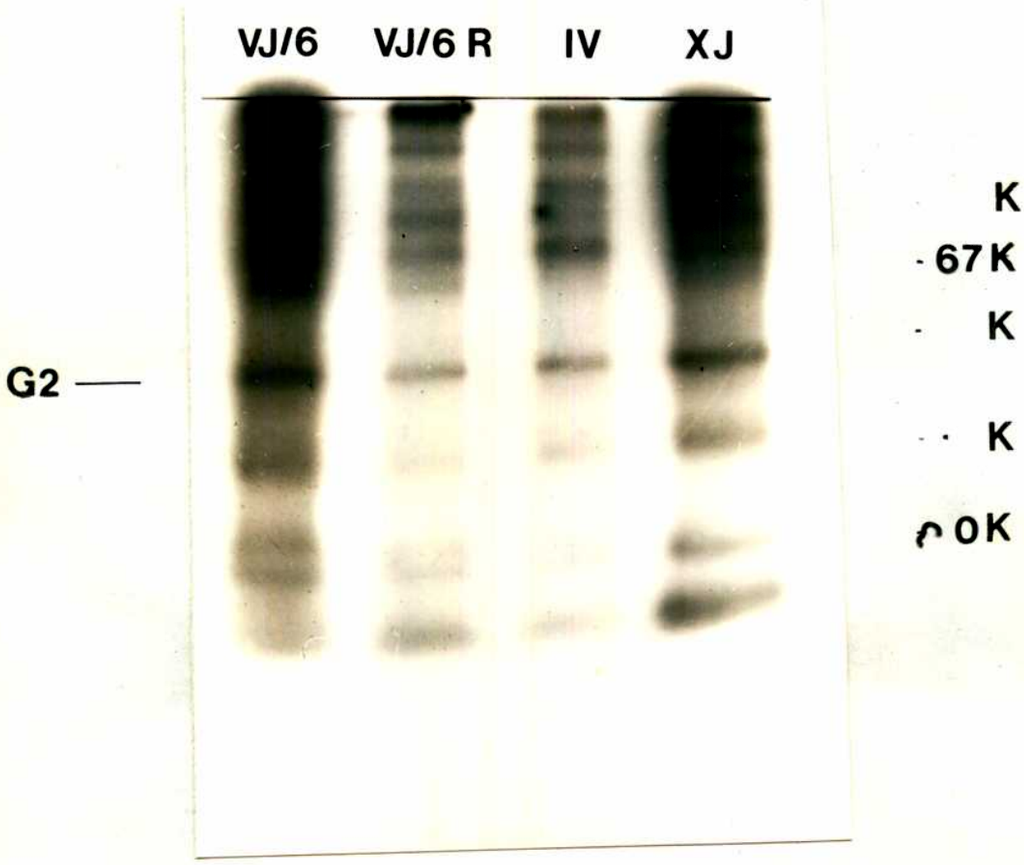
Las muestras radiactivas sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida fueron el VJ/6, la variante antigénica aislada in-vitro, VJ/6 R y las cepas XJ (prototipo) e IV_{4454}. Al cabo de 6 hs. de corrida, el gel se procesó según se detalla en Materiales y Métodos para luego observar la autorradiografía obtenida al cabo de 48 hs. de exposición.

La figura 17 muestra la aparición de varias bandas para los cuatro materiales ensayados, las cuales posiblemente correspondan a la marcación inespecífica debido a la metodología empleada y, a la vez, a la presencia de contaminantes. No obstante, una de ellas se ubicó a la altura de una proteína de 38000 Kd de acuerdo a los

FIGURA 17

Electroforesis en gel de poliacrilamida

de las proteínas del VJ



marcadores de PM indicados. Dicha banda correspondió a la glicoproteína G2 que, tal como se observa, presentó el mismo PM para todos los virus ensayados. Por otra parte, dicha proteína mapea en idéntica posición cuando previamente se inmunoprecipita (45).

4.5.3.1. Digestión de la glicoproteína G2 por acción de proteasas

Dado que la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida de los virus anteriormente ensayados no evidenció diferencias en la movilidad electroforética de la glicoproteína G2, se llevó a cabo una digestión con proteasas de las proteínas cuyo PM correspondiera a 38000 Kd.

Se realizó una corrida electroforética en gel de la cepa IV_{4454} del VJ y la variante antigénica viral 215(61), ambas previamente radioiodinadas.

Nuevamente se observa que no existen diferencias en la movilidad electroforética correspondiente a las glicoproteínas de ambos virus (figura 18), las cuales fueron removidas del gel seco, rehidratadas e insertas en el sitio de siembra de otro gel.

Las enzimas proteolíticas a ensayar eran ficina (100 ug/ml) y las proteasas tipo XXIII (50 ug/ml) y V8 de S.

aureus (50 ug/ml). Sin embargo sólo se utilizaron las dos últimas dado que una de las bandas correspondiente a la G2 del virus 215(61) resultó muy poco iodinada y no se pudo utilizar para realizar el clivaje proteolítico (figura 18).

Luego del agregado de ambas proteasas en el buffer adecuado, las muestras entraron en el gel concentrador y, al cabo de 30 min. de digestión, los péptidos resultantes fueron mapeados en una electroforesis monodimensional.

Se observa que la glicoproteína G2 correspondiente tanto a la cepa IV_{4454} como a la variante serológica 215(61) generó péptidos de similar tamaño luego del tratamiento con ambas enzimas proteolíticas (figura 19). Así, las glicoproteínas clivadas por acción de la proteasa V8 dieron lugar a dos péptidos de idéntico PM (figura 19A), en tanto que se observan claramente seis péptidos (dos bandas más tenues de mayor PM y cuatro más nítidas de menor PM) en el caso de la digestión con la proteasa tipo XXIII, que también resultaron semejantes entre la cepa IV_{4454} y el virus 215(61) (figura 19B).

Estos resultados indican que todos los péptidos originados por ambas proteasas a partir de la glicoproteína G2 correspondiente a la cepa IV_{4454} y a la variante viral 215(61) presentaron igual movilidad electroforética, lo cual sugiere que las diferencias existentes entre las glicoproteínas de los virus estudiados probablemente sean muy sutiles y no detectables mediante esta metodología.

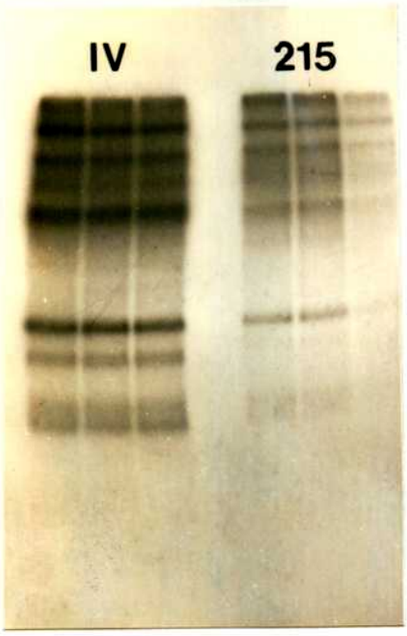


FIGURA 18: Electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas de la cepa IV_{4454} del VJ y la variante antigénica 215(61)

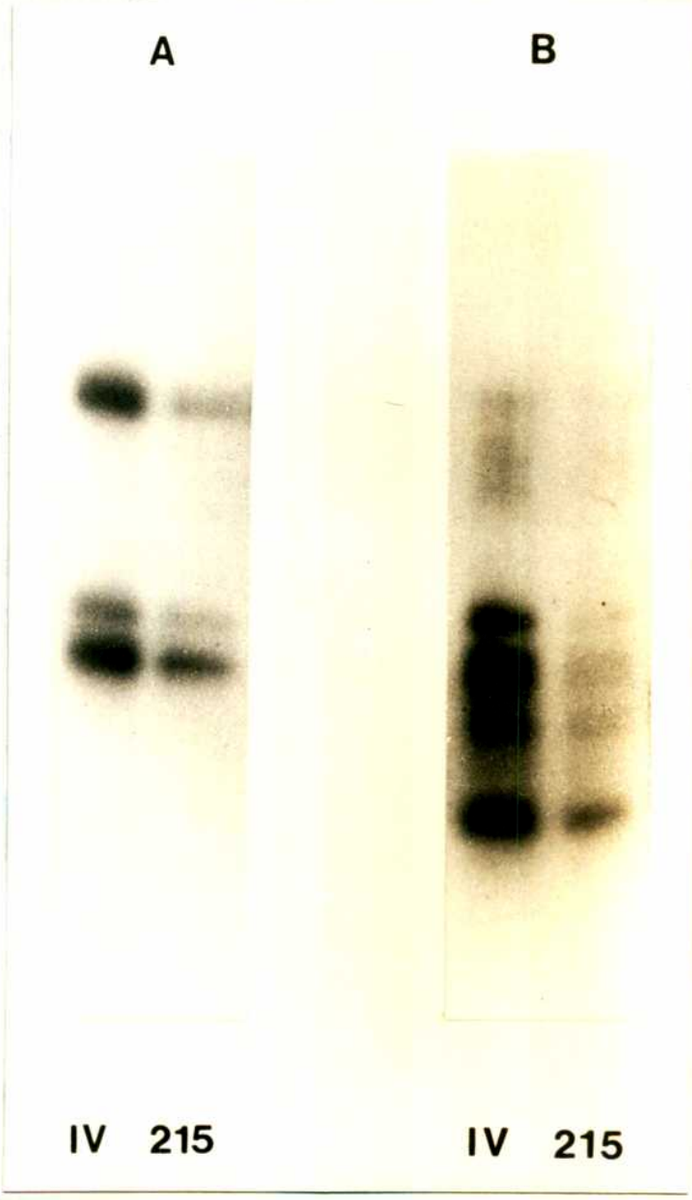


FIGURA 19: Clivaje de la glicoproteína G2 de la cepa IV_{4454} del VJ y la variante antigénica 215(61)

A: Digestión con la proteasa V8 de S. aureus (50 ug/ml).

B: Digestión con la proteasa tipo XXIII (50 ug/ml).

5. DISCUSION Y CONCLUSIONES

En la actualidad, con un gran número de infecciones virales agudas bajo control, las infecciones persistentes han ocupado un lugar preponderante en el marco de la virología moderna. Existen diversos motivos para ello. En primer lugar, esta clase de infecciones pueden ser reactivadas y causar episodios agudos de enfermedad. Algunas veces están asociadas con enfermedades inmunopatológicas o con otras enfermedades crónicas, especialmente del SNC, pero, fundamentalmente, se caracterizan porque el virus persiste en una determinada comunidad o huésped específico. Este hecho es de singular importancia ya que, de alguna manera, explica el por qué de este tipo de infecciones. Si no hubiese ventaja selectiva para aquellos virus que persisten, la persistencia, que no se establece fácilmente, se transformaría en un evento muy poco frecuente.

En el caso de los virus RNA, el fenómeno es particularmente significativo, ya que sus genomas son de una gran plasticidad y divergen muy rápidamente.

Por lo tanto, el individuo persistentemente infectado se convierte en un reservorio de la información genética viral en gran escala dentro de una determinada población.

En el caso del modelo experimental de C. musculinus infectado con VJ, las investigaciones realizadas acerca de

la búsqueda, el aislamiento y la caracterización de variantes antigénicas obtenidas tanto in-vivo como in-vitro aportan nuevos datos a una comprensión integral más adecuada del fenómeno de la persistencia viral, los cuales serán analizados a continuación.

El stock viral denominado VJ/6 obtenido por clonado a partir de la cepa XJCl$_3$ de VJ demostró ser el adecuado para el establecimiento de una infección en C. musculinus neonatos, dado que presentó un elevado índice de virulencia (0,24 UFP/DL$_{50}$) así como también causó un 100% de mortalidad de ratones lactantes a los 13 días p.i.. Por otra parte, la EDP calculada resultó cercana a 1 (0,61) indicando que el inóculo infectante no estaba enriquecido en mutantes ts (cuadro 1).

Los patrones de morbi-mortalidad obtenidos resultaron análogos a los descriptos para la cepa original (83) y se observa que el máximo porcentaje de morbilidad registrado precedió al valor máximo de mortalidad acumulada (figura 1).

Los antecedentes existentes acerca de la presencia de virus en circulación se refieren a la infección de C. musculinus con cepas patógenas de VJ, en cuyo caso se encontró que el número de animales virémicos no resultó muy significativo (128). Durante la etapa aguda de la enfermedad, el análisis de la aparición de viremias en C. musculinus infectados demostró que el VJ/6 es capaz de

multiplicar y diseminarse a través de la vía sanguínea, si bien se trata de una cepa atenuada para el humano. Asimismo, la máxima incidencia de viremia que se observa entre los 13 y 14 días p.i. coincide con el máximo porcentaje de morbilidad detectado (figuras 1 y 2). A partir de entonces, aumenta considerablemente la tasa de mortalidad así como también es interesante destacar que se observa una marcada linfopenia que comienza a ser detectada el día 8 p.i. y alcanza un máximo el día 19 p.i. (N. Steyerthal, comunicación personal).

La correlación de ambos eventos (viremia e inmediatamente después linfopenia) podría suponer una asociación entre el VJ y los linfocitos circulantes. En este sentido se ha observado que los linfo-monocitos provenientes de sangre periférica de C. musculinus infectados que cursaban la etapa aguda de la enfermedad, participan como sustrato para la replicación viral in-vitro (32). En consecuencia, los linfo-monocitos circulantes actuarían, al menos, como sitio de acantonamiento viral, pudiendo tener eventualmente, alguna significación como sitio de multiplicación. En tal caso, se explicaría claramente el origen de las viremias observadas durante esta etapa, dado que, por otra parte, es posible detectar en circulación virus infeccioso no asociado a células (item 4.2.5.). A su vez, la eventual interacción entre el virus y los linfocitos podría consistir en la destrucción de los mismos,

responsabilizando a la partícula viral de dicha acción citotóxica (157). Este fenómeno no ocurre en el caso del virus LCM ya que el mismo es capaz de multiplicar in-vivo durante las etapas aguda y crónica de la infección, pero no mata los linfocitos que emplea como sustrato de replicación (96).

Complementando estos resultados, trabajos más recientes no sólo permitieron detectar la replicación del VJ en linfocitos de sangre periférica humana (6) sino también una disminución en el número de dichas células (82), particularmente significativa en el caso de los linfocitos OKT_4+ (146). Cabe destacar que dicha alteración es aparentemente transitoria y se revierte tanto para los pacientes convalescientes de FHA, para los cuales el número de linfocitos circulantes alcanza los valores normales (146), así como también para los cricétidos que cursan la etapa crónica de la infección, ya que no fue posible aislar virus de los cultivos de células mononucleares provenientes de dichos animales (32).

Probablemente, este hecho se encuentre asociado con la aparición de anticuerpos neutralizantes, registrada a partir del día 13 p.i. (cuadro 2), así como también a la desaparición de inmunofluorescencias positivas en tejido linfático (83). Tal como ocurre con las células HeLa infectadas con el virus de sarampión y cultivadas en presencia de anticuerpos anti-virus (74), dichos

anticuerpos podrían estar involucrados en el fenómeno de modulación o desaparición de antígenos virales expresados en la superficie de los linfocitos. De esta manera, la replicación viral podría verse afectada y no ser detectada a mayores tiempos p.i..

Sin embargo, en el caso de C. musculinus infectados con VJ/6, dichos anticuerpos no fueron capaces de eliminar el virus circulante, ya que fue posible detectar viremias hasta el día 23 p.i. (figura 2). Esta circunstancia nos llevó a investigar la presencia de virus en sangre durante la etapa crónica de la enfermedad. Si bien el tamaño muestral fue reducido debido a la dificultad encontrada para obtener sucesivas muestras de sangre en un único animal, seis de diez animales presentaron viremias cíclicas y/o crónicas detectables a lo largo de las etapas aguda y persistente de la enfermedad (figura 3). Sólo fue posible estimar el título de anticuerpos neutralizantes en el suero de un animal de los seis estudiados (cuadro 2). En efecto, el C. musculinus 203 que resultó virémico el día 60 p.i., simultáneamente exhibió un alto título de anticuerpos (800) así como también fue detectada la presencia de virus en el cerebro (cuadro 2).

De esta manera quedó confirmada la presencia de virus en sangre a tiempos tardíos p.i. conjuntamente con la detección de anticuerpos neutralizantes en circulación. De acuerdo a lo observado con distintos huéspedes, los

anticuerpos parecen ofrecer una protección efectiva contra el VJ (49, 54, 56, 131).

Por otra parte, estudios realizados con caballos que presentaban una inmunodeficiencia combinada (ausencia de linfocitos T y B) infectados con el virus AIE, demostraron inequívocamente el papel preponderante de la respuesta inmune específica en el control de la viremia causada por dicho lentivirus (118).

Sin embargo, en el caso de los cricétidos infectados, los anticuerpos neutralizantes resultaron ineficientes en secuestrar el virus infeccioso circulante. Este hecho está avalado por experimentos realizados empleando la droga ciclofosfamida en C. musculinus infectados los cuales demostraron que, si bien los anticuerpos se producen normalmente durante la infección, carecerían de importancia como mecanismo humoral de defensa (32).

En consecuencia, la inhabilidad de los anticuerpos para eliminar el virus circulante y aquél acantonado en cerebro puede ser explicada a través de la aparición de nuevas poblaciones virales antigénicamente diferentes al VJ/6 que dio origen a la infección en C. musculinus neonatos.

Con el fin de detectar dichas variantes antigénicas in-vivo se ensayaron cinéticas de neutralización, que a su vez han sido empleadas en la diferenciación de cepas de

Cytomegalovirus (40), así como también de mutantes del virus Visna (134). Una vez obtenidas las condiciones óptimas de reacción para el VJ (figuras 4 y 5), las cinéticas de neutralización llevadas a cabo con un aislamiento viral de cerebro proveniente de un cricétido que transitaba la etapa aguda de la enfermedad evidenciaron la presencia de variantes antigénicas del VJ/6 (figura 6).

Considerando los antecedentes ya existentes acerca del comportamiento diferencial de los virus Junín y Tacaribe provenientes de diferentes sustratos de replicación, en reacciones de neutralización (35), se utilizó un control de virus crecido en cerebro de C. musculinus neonato de forma tal de homogeneizar eventuales diferencias comúnmente atribuídas al origen de cada stock viral.

Dicha preparación viral fue rápidamente neutralizada tanto por el IS anti VJ/6 como por el suero proveniente del mismo animal, mientras que el virus alojado en el cerebro de dicho cricétido fue pobremente reconocido por los anticuerpos de ambos sueros (figura 6). Es importante destacar que los anticuerpos del suero del C. musculinus continuaron reconociendo al virus parental, en forma análoga a lo observado para el virus Visna (101).

Idénticos resultados se observaron con los aislamientos virales de sangre de C. musculinus obtenidos durante las etapas aguda y crónica de la enfermedad, ensayados en cinéticas de neutralización frente al IS anti

VJ/6. La reducida avidez de los anticuerpos por los tres aislamientos estudiados (192(35), 117(23), 215(61)) fue notable en comparación con el patrón de disminución de la infectividad encontrada para el virus homólogo (figura 7).

Es importante destacar que la(s) alteración(es) presente(s) en dichas variantes antigénicas es(son) estable(s) ya que, pese a haber sufrido un pasaje previo a través de células Vero para incrementar el título viral (cuadro 3), no modificaron su comportamiento antigénico diferencial respecto del virus parental. Al intentar cuantificar esta reactividad diferencial mediante ensayos de neutralización, los resultados fueron aún más llamativos. En efecto, las variantes antigénicas fueron neutralizadas por el IS anti VJ/6 en títulos considerablemente inferiores al obtenido para el virus homólogo (cuadro 6). Aún más, esta diferencia es del mismo orden de magnitud que la observada entre el VJ/6 y la cepa XJ del VJ frente al IS anti VJ/6 (cuadro 7). Por lo tanto, las variantes antigénicas del VJ/6 aisladas in-vivo parecieron comportarse como una cepa distinta a la de origen en un ensayo de neutralización empleando un IS anti virus parental. Esta hipótesis resultaría cuestionable en vista de los resultados obtenidos a partir de la titulación de ISs preparados contra las variantes antigénicas con idéntico esquema de inmunización correspondiente al IS anti VJ/6. Los ISs anti 192(35) y anti 215(61) no sólo reconocieron a las restantes variantes

virales sino también al VJ/6, alcanzando prácticamente el mismo título neutralizante (cuadro 6). Este hecho podría sugerir la expresión de uno o más epitopes en la glicoproteína G2 de las variantes antigénicas involucrados directa o indirectamente en la reacción de neutralización, sumados a los ya existentes en la G2 correspondiente al VJ/6.

En consecuencia, el disminuído título del IS anti VJ/6 frente a las variantes serológicas podría deberse, precisamente, al reconocimiento de aquel(los) epitope(s) compartido(s) con las mismas y el virus parental. Esta hipótesis se confirmaría con el empleo de anticuerpos monoclonales anti G2 del VJ, así como también con un conocimiento más profundo de los mecanismos intrínsecos que operan en la reacción de neutralización de los arenavirus, tal como ocurre en el caso del virus Influenza (123).

Por lo tanto, el fenotipo de dichas variantes antigénicas se asimila al correspondiente a la cepa XJCl$_3$ de origen y no a otra cepa distinta de VJ, dado que los ISs anti 192(35) y 215(61) reaccionaron con títulos semejantes frente al VJ/6 y a sus virus homólogos respectivos (cuadro 6).

Las mencionadas reacciones de neutralización cruzada de "único sentido" demostradas con el VJ/6 y las variantes antigénicas se asemejan a las observadas para el virus Visna (101). En este ejemplo también se encontró que

las mutantes virales LV-1 y LV-4 inducían la producción de anticuerpos con altos títulos neutralizantes frente a la cepa parental 1514. Este hecho sugiere que los virus parental y mutante tendrían, fundamentalmente, la misma composición antigénica y la(s) mutación(es) podría(n) alterar la avidez con la cual la proteína viral necesaria para la neutralización se uniría a los anticuerpos en cuestión (101).

En consecuencia, el patrón de reacción cruzada en un "único sentido" podría reflejar un "drift" antigénico progresivo a partir de la cepa parental.

En el caso de los virus AIE y Visna dichos cambios progresivos se han traducido en la aparición secuencial de mutantes virales in-vivo con la consecuente síntesis de anticuerpos específicos para cada nueva población viral emergente (24, 101). Esta constante evolución de mutantes antigénicas estables parece ser una adaptación especial de estos virus en sus respectivos huéspedes. Con respecto al VJ, el análisis de los aislamientos de las variantes virales 192 y 215 obtenidos a los 19 y 35 días p.i. y 31 y 61 días p.i. respectivamente, empleando tanto ISs preparados contra los virus aislados durante la etapa crónica (IS anti 192(35) y anti 215(61)) como contra los obtenidos durante la etapa aguda de la enfermedad (IS anti 192(19) y anti 215(31)), mostraron patrones de cinéticas de neutralización similares, reflejados en los valores de la constante de afinidad

encontrados para las distintas variantes virales ensayadas (figuras 8 y 9). Por lo tanto, y a diferencia de los modelos de "drift" antigénico conocidos a través de los lentivirus, se trataría de poblaciones de variantes antigénicas relativamente homogéneas, las cuales, una vez seleccionadas, no modificarían su comportamiento antigénico durante el transcurso de la infección. Cabe destacar que la duración de la etapa crónica en C. musculinus infectados es mucho más reducida en comparación con los modelos de infección de ovejas y caballos con los virus Visna y AIE respectivamente, hecho que a su vez está directamente relacionado con la vida media de dichos cricétidos (41).

Por otra parte, la detección de variantes antigénicas de VJ en sangre de C. musculinus infectados sólo fue posible mediante el empleo de un suero hiperinmune preparado en cobayo, debido fundamentalmente a un muy reducido volumen de suero obtenido a partir de dichos cricétidos. En consecuencia, se planteó la hipótesis de una eventual presión de selección por parte de los anticuerpos circulantes favoreciendo la aparición de las variantes virales, si bien se desconocía algún tipo de interacción entre ambos. El antecedente existente en relación al modelo en estudio se refiere a la presencia de complejos inmunes circulantes en los C. musculinus infectados con VJ, detectados a través de la técnica de inhibición de la reacción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

(CCDA) (32).

Con el fin de dilucidar la naturaleza de dichos complejos virus-anticuerpos se utilizó un suero de conejo anti suero total de cricétido. El agregado del mismo a una muestra de sangre virus positiva proveniente de cricétidos infectados, sacrificados a los 21 días p.i., no modificó el título viral respecto de un control con suero normal de conejo (item 4.2.5.).

Este hallazgo abre un interrogante acerca de la constitución de los complejos inmunes. Existe abundante información acerca de la formación de inmunocomplejos y el daño por ellos producido en el modelo LCM-ratón. La inoculación del ratón lactante con el virus LCM provoca el establecimiento de una infección persistente con virus unido a la IgG circulante. El depósito de tales complejos en los glomérulos causa, en algunos animales, luego de varios meses, casos de glomerulonefritis (106). Sin embargo, esta situación no es común a todos los arenavirus. Curiosamente, las evidencias acumuladas hasta el momento permiten descartar una posible patología debida a complejos inmunes en la infección de C. musculinus, debido, entre otros, a la ausencia de daño renal característico de enfermedades asociadas con complejos virus-anticuerpos (32). Asimismo, a través de estudios realizados en pacientes con FHA no fue posible detectar la presencia del componente $C1_q$ unido a complejos inmunes (47).

Teniendo en cuenta la ausencia de patología típica causada por el depósito de complejos virus-anticuerpos en los tejidos de los cricétidos infectados, se podría postular la unión de los anticuerpos circulantes con proteínas virales inmunogénicas, dando lugar a la formación de complejos inmunes de menor tamaño. Por otra parte, en caso de que los mismos estuviesen constituídos por viriones infecciosos, debería haberse observado una marcada reducción de la infectividad ante el agregado del suero de conejo anti suero total de cricétido, tal como ocurre con el virus láctico deshidrogenasa en el ratón. En este caso, si bien el virus en sangre se encuentra en forma de complejos inmunes en ratones persistentemente infectados, los animales no presentan generalmente daños vasculares o renales (22).

En consecuencia, no es factible concluir en forma definitiva acerca de la naturaleza de los complejos VJ-anticuerpos circulantes. No obstante, el experimento brindó información valiosa en relación a que el virus aislado de sangre de C. musculinus infectados no sólo puede estar asociado a células sino que también se encuentra libre en circulación, ya que fue posible detectar título de virus en la fracción plasmática. Asimismo, este hecho formaría parte del conjunto de evidencias que apoyan la hipótesis de la variabilidad del VJ in-vivo, dado que la población de virus libre podría comportarse como variante antigénica.

¿Cuál sería el sitio de origen de las variantes

antigénicas del VJ?

Considerando que la vía de entrada del virus fue intraperitoneal y, a su vez, el hecho que los macrófagos y otros elementos del sistema polimorfonuclear están intimamente involucrados en el control de numerosas infecciones virales (98), se investigó el papel de los macrófagos peritoneales como eventual fuente de variantes antigénicas in-vivo.

El sistema fagocítico mononuclear es considerado uno de los mecanismos primarios de defensa no específico contra distintos agentes, incluídos los virus (105). La interacción entre macrófagos y virus puede resultar en la destrucción o replicación del virus. En consecuencia, dichas células pueden desempeñar un papel muy importante en la eliminación del virus del organismo o bien tener un rol preponderante en el establecimiento de la persistencia viral (98). La interacción virus-macrófago fue demostrada para los arenavirus Pichindé (53), LCM (133) y Junín (59), en todos los casos en células provenientes de exudados peritoneales de ratón.

En el caso particular del cricétido C. musculinus, trabajos previos demostraron que el VJ replica eficazmente en macrófagos peritoneales provenientes de animales que habían sido sometidos a lavados de la cavidad peritoneal 48 hs. después de infectados. Por lo tanto, quedaba demostrado que los macrófagos peritoneales de los C. musculinus

neonatos efectivamente habían sido infectados por el VJ. Asimismo, si la multiplicación del VJ en cultivos de macrófagos refleja eventos que ocurren in-vivo, dichas células se comportarían como blanco permitiendo la replicación del virus y su posterior diseminación.

Inicialmente fue posible determinar que los macrófagos peritoneales provenientes de cricétidos inoculados perinatalmente con VJ/6 permanecían infectados hasta los días 15 y 26 p.i.. Las células mencionadas fueron productoras de virus en siete de diez cultivos establecidos, alcanzando títulos relativamente bajos (con excepción del cultivo #8) en comparación con los observados para C. musculinus neonatos (33) (cuadro 4). Los ensayos de neutralización llevados a cabo con sobrenadantes correspondientes a cuatro de los siete cultivos en estudio demostraron que los títulos neutralizantes del IS anti VJ/6 resultaron similares a los que había presentado el mismo IS frente a la variantes antigénicas aisladas de sangre (cuadro 5, cuadro 6).

En consecuencia, las variantes antigénicas del VJ se seleccionarían luego de la multiplicación del virus parental en los macrófagos peritoneales, a partir, al menos, del día 15 p.i.. La selección de dichas variantes sólo ocurre in-vivo ya que los macrófagos obtenidos de C. musculinus sanos, de 20 días de edad, y luego infectados in-vitro con el VJ/6, liberaron al extracelular una

población indistinguible del virus parental a través de ensayos de neutralización (cuadro 5).

Por lo tanto, la asociación entre las variantes antigénicas y los macrófagos peritoneales de los cricétidos infectados podría constituir el punto de partida para la diseminación de dichas poblaciones virales in-vivo, que luego serán responsables de la aparición de viremias y de la infección de los linfo-monocitos circulantes, al menos, durante la etapa aguda de la enfermedad. El destino último sería el cerebro, sitio de acantonamiento por excelencia para los arenavirus.

Si bien los mecanismos que operan en la selección de las variantes virales no están aún completamente dilucidados, dichas mutantes parecen diferir del virus parental únicamente en la antigenicidad. En efecto, el estudio de distintos parámetros biológicos mostraron que, en términos generales, no existen diferencias significativas entre el VJ/6 y las variantes antigénicas. Con respecto al desarrollo de efecto citopático en células Vero, tanto el VJ/6 como el virus 146(14) y las variantes virales 192(35) y 215(61) presentaron un patrón relativamente similar en relación a la intensidad del daño producido (figura 11). Las monocapas celulares infectadas con el virus parental presentaban un grado de ACP en aumento alrededor de los días 10-13 p.i., en tanto que las correspondientes a la infección con el virus 146(14) se encontraban seriamente afectadas

como consecuencia de la replicación viral. Por el contrario, en el caso de las variantes virales 192(35) y 215(61), las monocapas celulares habían comenzado la etapa de recuperación hacia el final del período de observación (figura 11).

La interacción virus-célula huésped ha sido extensamente estudiada para el binomio células Vero-cepa XJCl$_{3}$ de VJ. Usualmente se generan dos tipos de partículas virales como consecuencia de la infección: las unidades formadoras de placas responsables de producir efecto citopático y las partículas interferentes (PIs), cuya habilidad consiste en inhibir la actividad citolítica del virus homólogo con el cual coinfecta (64). Por esta razón, se investigó la eventual presencia de PIs en los stocks virales 192(35) y 215(61), debido, precisamente, a la observación de un efecto citopático no tan destructivo provocado por los virus mencionados.

El ensayo de interferencia viral realizado demostró que tanto el virus parental como las variantes virales 192(35) y 215(61) no evidenciaron actividad interferente ya que los títulos virales alcanzados fueron semejantes a los obtenidos para los controles respectivos (cuadro 9).

La generación de PIs parece constituir un evento regular en la replicación del VJ, que a su vez depende de la relación PIs/virus standard en el inóculo. En este caso, si bien el efecto citopático provocado por los stocks virales

192(35) y 215(61) en células Vero sugiere la participación de PIs, podría ocurrir que las mismas estuvieran presentes en una proporción tal que no fueran detectadas a través de este tipo de ensayo. Si bien la ACP descripta en los últimos días de observación no fue homogénea para todos los virus ensayados, las curvas de crecimiento obtenidas a través de la titulación de los sobrenadantes provenientes de los mismos cultivos siguieron un patrón similar (figura 12).

Otro parámetro biológico analizado fue el eventual enriquecimiento de las variantes virales en mutantes ts. Es ampliamente conocido el surgimiento del mencionado fenotipo en cultivos de células Vero persistentemente infectados con VJ (30, 44). Paralelamente, también ha sido posible aislar mutantes ts a partir del cerebro de cricétidos persistentemente infectados (83). Una de las propiedades del VJ/6 elegido para el establecimiento de la infección experimental consistía, precisamente, en la inexistencia del fenotipo ts, hecho que fue nuevamente corroborado dado que el valor de la EDP 40/37 alcanzado resultó prácticamente similar al original (cuadros 1 y 10). Al mismo tiempo, el aislamiento viral 146(14) y las variantes antigénicas 192(35) y 215(61) presentaron una EDP 40/37 muy cercana a la obtenida para el virus parental. Esto indica que las variantes virales aisladas en el transcurso de la etapa persistente no se encuentran enriquecidas y/o comparten el fenotipo ts (cuadro 10).

Finalmente, se intentó determinar la capacidad de las variantes antigénicas para establecer una infección en C. musculinus neonatos. La eficiencia de replicación y la virulencia para cultivos celulares hasta aquí demostradas resultaron similares a lo observado con el virus parental, en tanto que la inoculación de dichas variantes in-vivo evidenció algunas diferencias. Los cricétidos fueron inoculados intraperitonealmente con el VJ/6 como control, el aislamiento viral 146(14) y cuatro variantes virales. En todos los casos se observaron los signos clínicos característicos de enfermedad, si bien los máximos porcentajes de mortalidad acumulada correspondientes a las variantes antigénicas y al virus 146(14) fueron alcanzados 20 días antes respecto del valor registrado para el VJ/6 (figura 13).

En consecuencia, las curvas de mortalidad acumulada presentaron diferencias significativas en comparación con la correspondiente al virus parental, con excepción de la obtenida para la variante viral 192(35) (figura 13). Por lo tanto es importante destacar que las variantes serológicas no sólo son estables antigénicamente sino que además presentan una marcada virulencia para los cricétidos neonatos. Sin embargo, esta propiedad también es compartida por el virus 146(14), el cual se comportó en forma análoga al VJ/6 en un ensayo de neutralización. Por ende, estos cambios en los patrones de mortalidad acumulada observados

podrían ser atribuídos a una adaptación previa al huésped en cuestión.

En consecuencia, la única propiedad biológica distintiva de las variantes serológicas es, precisamente, su antigenicidad alterada respecto del clon viral que había originado la infección.

Estudios realizados con el virus Influenza demostraron que aún los stocks de virus clonados presentan variantes en una frecuencia de 10^{-5} aproximadamente, cuando la misma era estimada empleando un único tipo de anticuerpo monoclonal dirigido contra la molécula de HA (160). De este modo se llevó a cabo un ensayo de neutralización del VJ/6 frente al IS homólogo, el cual fue titulado en presencia de un exceso de anticuerpos policlonales específicos agregado a la capa de agar nutritivo (figura 10). El propósito de este experimento consistía en determinar si las variantes virales existían como una población minoritaria en el stock de VJ/6 utilizado para la inoculación de los animales.

En efecto, fue posible aislar dos clones de VJ/6 (VJ/6 R y VJ/6 R_1) resistentes a la neutralización con el IS homólogo, indicando que, si bien en baja proporción, el stock de virus parental clonado contenía una (o más) subpoblación(es) de variantes antigénicas (cuadro 7). En este caso, los títulos neutralizantes obtenidos resultaron análogos a los registrados frente a las variantes

antigénicas aisladas in-vivo (cuadro 6). Asimismo, se comprueba que las variantes virales aisladas in-vitro se comportan como la cepa $XJCl_3$, ya que el IS preparado contra la cepa XJ de VJ reconoció con el mismo titulo neutralizante a las mencionadas variantes y al virus parental (cuadro 7). Por otra parte, los ISs anti 192(35) y 215(61) ensayados frente al VJ/6 R_1 presentaron titulos similares a los obtenidos con sus respectivos virus homólogos y las restantes variantes virales aisladas in-vivo (resultados no presentados).

En términos generales, en gran parte de los estudios acerca de la selección de variantes virales in-vitro se utilizan antucuerpos monoclonales y, a la vez, las mutaciones seleccionadas son irrelevantes en cuanto al surgimiento de nuevas variantes en la naturaleza (153). Por el contrario, el empleo de anticuerpos policlonales como agentes de selección permite no sólo la valoración de mutantes virales de importancia epidemiológica sino también el análisis del curso evolutivo de poblaciones de variantes serológicas in-vivo, tal como ocurre con el virus Visna (26). En principio, el surgimiento de variantes del VJ/6 in-vitro a través de una intensa presión selectiva de anticuerpos sugeriría un papel preponderante de los mismos en la selección de las variantes antigénicas in-vivo. No obstante, la presencia de dichas mutantes virales en sangre de cricétidos infectados fue detectada muy tempranamente

(día 8 p.i.) (cuadro 6) previamente a la aparición de anticuerpos neutralizantes (cuadro 2). En consecuencia, se decidió investigar si las variantes antigénicas podían surgir espontáneamente in-vitro a partir de cultivos primarios de embrión de Calomys infectados.

Si bien no es posible asegurar que se había establecido una infección persistente en dichas células, dado que sólo se practicó un único subcultivo a posteriori de la infección, dichos subcultivos fueron productores de virus (cuadro 8). Aún más, el virus del sobrenadante proveniente del cultivo EC-2 se comportó como variante serológica, ya que fue pobremente neutralizado tanto por el IS anti VJ/6 como por el IS anti cepa $XJCl_3$ de VJ (cuadro 8). Es importante mencionar que: 1) dichas variantes fueron detectadas en el sobrenadante cosechado más tardíamente (día 53 p.i.) y 2) la infección in-vitro fue establecida con la cepa $XJCl_3$ que constituye una población más heterogénea respecto del clon de virus parental empleado en todos los experimentos, no obstante lo cual también fue posible el aislamiento de mutantes virales a partir de dicho stock.

Resulta interesante destacar que ambos cultivos de embrión de Calomys infectados con el VJ no evidenciaron daño celular, a diferencia de lo observado con las células Vero que presentan un marcado efecto citopático durante los primeros días p.i.. Por lo tanto, el surgimiento de variantes antigénicas del VJ/6 también ocurriría en

condiciones in-vitro, hecho que, en principio, no parecería estar necesariamente mediado por la acción de anticuerpos neutralizantes.

De acuerdo a los resultados obtenidos in-vitro hasta aquí discutidos, resulta difícil precisar el papel de los anticuerpos neutralizantes in-vivo. Si bien ha quedado demostrada su incapacidad para erradicar la infección de los cricétidos, los experimentos de presión de selección mediada por anticuerpos evidenciaron la presencia de subpoblaciones virales contaminantes en el stock de virus parental, con un comportamiento antigénico diferencial respecto del mismo. Por lo tanto, se podría especular que el modelo de infección C. musculinus-VJ podría constituir un sistema de selección de variantes virales a través de la acción directa de los anticuerpos circulantes, aunque no es posible descartar su producción como consecuencia de una o más mutaciones puntuales en el gen que codifica para la glicoproteína de superficie, directamente involucrada en la reacción de neutralización (37, 95).

Por ende, y teniendo en cuenta la magnitud y diversidad de los mecanismos y respuestas que resultan gatillados como producto de la infección de los cricétidos con el VJ/6, no es posible concluir en forma definitiva si los anticuerpos neutralizantes están involucrados o no en la aparición de las variantes antigénicas in-vivo. Podría ocurrir que no fueran los responsables únicos en dicha

selección. Aún más, dichos anticuerpos podrían ejercer una acción indirecta a través de la destrucción de células inmunes que expresen en superficie los antígenos del virus parental, tal como ha sido recientemente demostrado para el virus AIE (24).

En una siguiente etapa se decidió llevar a cabo distintas clases de ensayos inmunológicos y bioquímicos que permitieran poner en evidencia la reactividad serológica diferencial observada.

Inicialmente se empleó la inmunoprecipitación en gel que ya había sido utilizada en el estudio antigénico de los arenavirus. En este caso, dicha técnica demostró ser más específica y más analítica que la fijación de complemento para la diferenciación de los virus Amapari, Junin, Tacaribe y Tamiami (38). Por otra parte, la inmunodifusión también ha sido utilizada para determinar las relaciones antigénicas entre una variante del virus Influenza y distintas cepas virales, frente a un suero hiperinmune (153).

En el caso de las variantes antigénicas del VJ/6 aisladas tanto in-vivo como in-vitro, no fue posible establecer diferencia alguna a través de esta metodología, ya que la inmunodifusión de las proteínas virales estudiadas presentó un patrón de identidad total entre las mismas y las correspondientes al virus parental (figura 14A)

Se procedió entonces a ensayar el sistema de IEC en acetato de celulosa, el cual provee una alta resolución

necesaria para estudiar cantidades muy pequeñas de proteínas virales y detectar variaciones muy sutiles dentro de distintas poblaciones virales (61, 67, 147). Las IEC llevadas a cabo con el virus parental y la variante viral 192(35) frente a los respectivos ISs permitieron evidenciar en forma cualitativa las diferencias previamente detectadas a través del ensayo de neutralización cruzada (cuadro 6). En efecto, los patrones de precipitación obtenidos en los sistemas virus-IS heterólogo resultaron diferentes de los respectivos sistemas homólogos (figuras 15 y 16). Estos resultados constituyen una evidencia adicional que ayudaría a corroborar la naturaleza antigénica diferencial de las mutantes virales aisladas y el VJ/6.

Por último, se intentó determinar si la glicoproteína viral expuesta en la superficie de la partícula viral estaba involucrada en dichas diferencias antigénicas, ya que la misma es la responsable de la inducción de la síntesis de anticuerpos neutralizantes (37, 95).

El estudio bioquímico de las glicoproteínas de superficie de distintas cepas virales, a través de corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida, permitió relacionar el número y PM de dichas proteínas con diferencias en antigenicidad, virulencia, morfología de placas de lisis y características epidemiológicas de las cepas en cuestión. Tal es el caso del virus de la

encefalomielitis equina de Venezuela (EEV), para el cual se llegó a proponer un nuevo esquema de clasificación taxonómica que no se correlaciona uniformemente con las características serológicas de las cepas de EEV analizadas (51).

Diferencias de movilidad electroforética de proteínas detectadas mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida también han sido observadas con otros virus tales como NDV (88) e Influenza. Para este último ejemplo, se demostró que un único cambio en un determinado sitio de glicosilación de la hemaglutinina viral que se traducía en una variación de PM, podía implicar el surgimiento de una nueva variante antigénica (68). No se observaron diferencias entre el VJ/6, la variante VJ/6 R_1 y las cepas XJ e IV_{4454} de VJ en cuanto al patrón de movilidad electroforética de las respectivas proteínas G2 iodinadas (figura 17). La identificación de las mismas no resultó dificultosa ya que su PM coincidió con el valor de 38000 Kd (figura 17). Frente a estos resultados, se recurrió al análisis de péptidos obtenidos por digestión parcial de proteínas con enzimas proteolíticas que ha resultado de suma utilidad para la diferenciación de cepas virales, como en el caso del virus polio (158), Influenza (60) y NDV (88). La técnica descripta originalmente por Cleveland (1977) involucra la digestión parcial de polipéptidos previamente separados por electroforesis en gel, a través de la acción

de proteasas (28).

El mapeo peptídico de la proteína G2 correspondiente a la variante antigénica 215(61) y a la cepa IV_{4454} realizado no mostró diferencias entre los patrones electroforéticos obtenidos en cada caso, aún cuando se trata de distintas cepas virales (figura 19). Probablemente, las eventuales diferencias existentes bien podrían ser evidenciadas a través del empleo de otras enzimas proteolíticas, o bien, a través del análisis de los péptidos resultantes en columnas de cromatografía, tal como se realizó con el virus EEV (51).

Basándonos en los resultados obtenidos en el presente trabajo, es posible concluir que el arenavirus Junín integra la extensa lista de virus RNA caracterizados por su variabilidad genética y/o antigénica. El virus LCM también se encuentra incluído, si bien el estudio sobre las variantes genéticas se realizó en base a tratar de explicar el mecanismo de supresión de la respuesta CTL en ratones crónicamente infectados.

En el caso del VJ, el hallazgo de variantes antigénicas aisladas a partir de su huésped natural C. musculinus, aporta valiosa información para tratar de comprender el por qué de su mantenimiento en la naturaleza.

Cuando los cricétidos neonatos son inoculados por

vía i.p., se selecciona o simplemente surge a través de mutaciones espontáneas una población viral relativamente homogénea, que presenta un comportamiento antigénico diferencial respecto del virus parental. Su sitio de origen estaría constituído por los macrófagos, células blanco para la replicación del VJ in-vivo. A partir de allí, libres en circulación o asociadas a linfo-monocitos periféricos, dichas variantes alcanzan el órgano blanco más importante de esta infección, el cerebro, donde finalmente se acantonan.

A través de otros ensayos biológicos y bioquímicos, se observó que las variantes antigénicas del VJ tienen características compartidas con el virus que originó la infección, lo cual indica que sus diferencias deberían ser, ciertamente, mínimas. Sólo cabe recordar que los estudios de secuenciación realizados con las variantes genéticas del virus LCM demostraron, hasta el presente, muy pocas alteraciones a nivel de su estructura génica.

Por último, la detección de variantes antigénicas en el modelo experimental C. musculinus-VJ con anticuerpos policlonales podría implicar una eventual importancia epidemiológica de las mismas, y, por otra parte, su selección podría contribuir como un mecanismo importante en el establecimiento y/o mantenimiento de la persistencia viral in-vivo.

CECOTO

6. BIBLIOGRAFIA

1.- Ahmed R., Chwan-Chuen King, Oldstone M.B.A. Virus-lymphocyte interaction: T cells of the helper subset are infected with lymphocytic choriomeningitis virus during persistent infection in-vivo. J. Virol. 61: 1571, (1987).

2.- Ahmed R., Oldstone M.B.A. Organ-specific selection of viral variants during chronic infection. J. Exp. Med. 167: 1719, (1988).

3.- Ahmed R., Salmo A., Butler L.D., Chiller J.M., Oldstone M.B.A. Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice. J. Exp. Med. 60: 521, (1984).

4.- Ahmed R., Simon R.S., Matloubian M., Kolhekar S.R., Southern P.J., Freedman D.M. Genetic analysis of in-vivo selected viral variants causing chronic infection: importance of mutation in the L RNA segment of lymphocytic choriomeningitis virus. J. Virol. 62: 3301, (1988).

5.- Allan J.E., Dixon J.E., Doherty P.C. Nature of the inflammatory process in the central nervous system of

mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 134: 131, (1987).

6.- Ambrosio A.M., Enria D.E., Maiztegui J.I. Aislamiento de virus Junin por cocultivo de leucocitos periféricos de enfermos de fiebre hemorrágica argentina. Medicina (Buenos Aires) 42: 745, (1982).

7.- Arribalzaga R.A. Una nueva enfermedad epidémica a germen desconocido: hipertermia nefrotóxica, leucopénica y enantémica. Día médico 27: 1204, (1955).

8.- Auperin D.D., Romanowski V., Galinski M., Bishop D.H.L. Sequencing studies of Pichinde arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA. J. Virol. 52: 897, (1984).

9.- Auperin D.D., Sasso D.R., McCormick J.B. Nucleotide sequence of the glycoprotein gene and intergenic region of the Lassa virus S genomic RNA. Virology 154: 155, (1986).

10.- Birrer M.J., Udem S., Nathenson S., Bloom B.R. Antigenic variants of measles virus. Nature (London) 293: 67, (1981).

11.- Bishop D.H.L., Auperin D.D. Arenavirus gene structure and organization. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 133: 5, (1987).

12.- Both G.W., Hua Shi Cheng, Kilbourne E.D. Hemagglutinin of swine influenza virus: A single amino acid change pleiotropically affects viral antigenicity and replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6996, (1983).

13.- Boxaca M.C., Giovanniello O.A. Células Vero persistentemente infectadas con virus Junin. II. Recuperación de virus. Medicina (Buenos Aires) 37: 112, (1977).

14.- Boxaca M.C., Giovanniello O.A., Nota N.R., Nejamkis M.R., Guerrero L.B. de, Frigerio M.J. Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junin I. Cuadro clínico y susceptibilidad. Rev. Asoc. Arg. Microbiol. 5: 18, (1973).

15.- Bradford M.A. A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72: 248, (1976).

16.- Bruns M., Lehmann-Grube F. Lymphocytic

choriomeningitis virus. V. Proposed structural arrangement of proteins in the virion. J. Gen. Virol. 64: 2157, (1983).

17.- Bruns M., Martínez Peralta L., Lehmann-Grube F. Lymphocytic choriomeningitis virus. III Structural proteins of the virion. J. Gen. Virol. 64: 599, (1983).

18.- Buchmeier M.J., Lewicki H.A., Tomori O., Oldstone M.B.A. Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis and Pichinde viruses: generation, characterization, and cross-reactivity with other arenaviruses. Virology 113: 73, (1981).

19.- Buchmeier M.J., Parekh B.S. Protein structure and expression among arenaviruses. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 133: 41, (1987).

20.- Buchmeier M.J., Welsh R.M., Dutko F.J., Oldstone M. B.A. The virology and immunobiology of lymphocytic choriomeningitis virus infection. Adv. Immunol. 30: 275, (1980).

21.- Byrne J.A., Ahmed R., Oldstone M.B.A. Biology of cloned cytotoxic T lymphocytes specific for lymphocytic choriomeningitis virus. I. Generation and recognition

of virus strains and H-2b mutants. J. Immunol. 133: 433, (1984).

22.- Cafruny W.A., Plagemann P.G.W. Immune response to Lactate-Dehidrogenase elevating virus: isolation of infectious virus-immunoglobulin G complexes and quantitation of specific antiviral immunoglobulin G response in wild-type and nude mice. Infect. Immun. 37: 1001, (1982).

23.- Carballal G., Cossio P.M., Rabinovich A., Oubiña J., Arana R.M. Description of a BHK/21 cell line persistently infected with Junin virus: its use in diagnostic procedures. Intervirology 3-4: 173, (1980).

24.- Carpenter S., Evans L.H., Sevoian M., Chesebro B. Role of the host immune response in selection of equine infectious anemia virus variants. J. Virol. 61: 3783, (1987).

25.- Clements J.E., D'Antonio N., Narayan O. Genomic changes associated with antigenic variation of visna virus. II. Common nucleotide sequence changes detected in variants from independent isolations. J. Mol. Biol. 158: 415, (1982).

26.- Clements J.E., Gdovin S.L., Montelaro R.C., Narayan O. Antigenic variation in lentiviral diseases. Ann. Rev. Immunol. 6: 139, (1988).

27.- Clements J.E., Narayan O. Immune selection of virus variants. En: "Concepts in Viral Pathogenesis", pp. 152, ed. A.L. Notkins and M.B.A. Oldstone. Springer-Verlag, New York, (1984).

28.- Cleveland D.W., Fischer S.G., Kirschner M.W., Laemmli U.K. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 252: 1102, (1977).

29.- Coto C.E., León M.E., Martínez Peralta L, Help G.I., Laguens R.P. Induction of infectious virus and viral surface antigen in Vero cells persistently infected with Junín virus. En: "Humoral immunity in neurological diseases", pp. 405, ed. D. Karcher, A. Lowenthal and A.D. Strosberg. Plenum Press, New York, (1979).

30.- Coto C.E., Vidal M.del C., D'Aiutolo A.C., Damonte E.B. Selection of spontaneous ts mutants of Junín and Tacaribe viruses in persistent infections. En: "The replication of negative strand viruses", pp. 11, ed. D.H.L. Bishop and R.W. Compans. Elsevier, New York,

(1981).

31.- Coto C.E., Vidal M.del C., Lampuri J.S. Experimental infection of Calomys musculinus with an attenuated strain of Junín virus. Resum. V Congreso Internacional de Virología, Estrasburgo, Francia, 2-7 agosto 1981.

32.- Coulombié F.C. Inmunobiología de Calomys musculinus infectado experimentalmente con virus Junín (agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina). Tesis Doctoral - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires, (1986).

33.- Coulombié F.C., Alché L.E., Lampuri J.S., Coto C.E. Role of Calomys musculinus peritoneal macrophages in age-related resistance to Junín virus infection. J. Med. Virol. 18: 289, (1986).

34.- Coulombié F.C., Coto C.E. Efecto de la ciclofosfamida en el desarrollo de la infección de Calomys musculinus con virus Junín. Medicina (Buenos Aires) 45: 487, 1985).

35.- Coulombié F.C., Damonte E.B., Coto C.E. Influencia de la célula huésped en las reacciones de neutralización cruzada entre virus Junín y Tacaribe. Rev. Asoc. Arg.

Microbiol. 16: 159, (1984).

36.- Coulombié F.C., Laguens R.M., Coto C.E. Administration of antithymocyte serum modified the response of Calomys musculinus to Junin virus infection. Intervirology 25: 56, (1986).

37.- Cresta B., Padula P., Martinez Segovia M. de Biological properties of Junin virus proteins. I. Identification of the immunogenic glycoprotein. Intervirology 13: 284, (1980).

38.- Chastel C. Parentés antigéniques dans le groupe des arénavirus. II. Résultats obtenus par immunoprécipitation en gel. Ann. Inst. Pasteur 122: 1205, (1972).

39.- Chastel C. Intéret des techniques d'immunoprécipitation en gel (immunodiffusion double, immunoélectrophorese) pour l'étude des arbovirus et des arénavirus. Rev. Epidém., Méd. Soc. et Santé Publ. 22: 231, (1974).

40.- Chong K.T., Gould J.J., Mims C.A. Neutralization of different strains of murine Cytomegalovirus (MCMV) - Effect of in vitro passage. Archives of Virology 69:

95, (1981).

41.- D'Aiutolo A.C., Cutrera R.A., Coto C.E. Estudios morfométricos y citogenéticos de una colonia de Calomys musculinus. Reunión de la Soc. Arg. de Virología. La Plata, (1981).

42.- Damonte E.B. Arenavirus: persistencia de los virus Junín y Tacaribe en células cultivadas in-vitro. Tesis Doctoral - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires, (1978).

43.- Damonte E.B., Coto C.E. Análisis de los factores que condicionan la formación de placas en células Vero infectadas con los virus Junín y Tacaribe. Rev. Asoc. Arg. Microbiol. 6: 15, (1974).

44.- Damonte E.B., Coto C.E. Temperature sensitivity of the arenavirus Junín isolated from persistently infected Vero cells. Intervirology 11: 282, (1979).

45.- Damonte E.B., Mersich S.E., Candurra N.A., Coto C.E. Cross reactivity between Junín and Tacaribe viruses as determined by neutralization test and immunoprecipitation. Microbiol. and Immunol. 175: 85, (1986).

46.- Daniel W.W. Applied nonparametric statistics. Houghton Mifflin Company, USA, (1978).

47.- De Bracco M.M.E., Rimoldi M.T., Cossio P.M., Rabinovich A., Maiztegui J., Carballal G., Arana R. Argentine hemorrhagic fever: alterations of the complement system and anti-Junín virus humoral response. N. Engl. J. Med. 299: 216, (1978).

48.- Emini E.A., Kao S., Lewis A.J., Crainic R., Wimmer E. Functional basis of poliovirus neutralization determined with monospecific neutralizing antibodies. J. Virol. 46: 466, (1983).

49.- Enria D.A., Damilano A.J. de, Briggiler A.M., Ambrosio A.M., Fernández N.J., Feuillade M.R., Maiztegui J.I. Síndrome neurológico tardío en enfermos de fiebre hemorrágica argentina tratados con plasma inmune. Medicina (Buenos Aires) 45: 615, (1985).

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

51.- France J.K., Wyrick B.C., Trent D.W. Biochemical and antigenic comparisons of the envelope glycoproteins of

Venezuelan equine encephalomyelitis virus strains. J. Gen. Virol. 44: 725, (1979).

52.- Franze-Fernández M.T., Zetina C., Iapalucci S., Lucero M.A., Bonisson C., López R., Rey O., Daheli M., Cohen G.N., Zakin M.M. Molecular structure and early events in the replication of Tacaribe arenavirus S RNA. Virus Research 7: 309, (1987).

53.- Friedlander A.M., Jahrling P.B., Merrill P., Tobery S. Inhibition of mouse peritoneal macrophage DNA synthesis by infection with the arenavirus Pichinde. Infect. Immun. 43: 283, (1984).

54.- Galassi N.V., Blejer J.L., Barrios H.A., Nejamkis M.R. Acción de la ciclofosfamida en la infección experimental de la rata con dos cepas de virus Junín. Rev. Asoc. Arg. Microbiol. 13: 69, (1981).

55.- Gendelman H.E., Narayan O., Kennedy-Stoskopf S., Kennedy P.G.E., Ghotbi Z., Clements J.E., Stanley J., Pezeshkpour G. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. J. Virol. 58: 67, (1986).

56.- Giovanniello O.A., Nejamkis M.R., Galassi N.V., Nota N. R. Immunosuppression in experimental Junín virus infection of mice. Intervirology 13: 122, (1980).

57.- González P.H., Cossio P.M., Arana R., Maiztegui J. I., Laguens R.P. Lymphatic tissue in Argentine hemorrhagic fever. Pathologic features. Arch. Pathol. Lab. Med. 104: 250, (1980).

58.- González P.H., Laguens R.P. Replicación in-vitro de dos cepas de virus Junín en monocitos y macrófagos humanos. Medicina (Buenos Aires) 41: 682, (1981).

59.- González P.H., Lampuri J.S., Coto C.E., Laguens R. P. In vitro infection of murine macrophages with Junín virus. Infect. Immun. 35: 356, (1982).

60.- Goto H., Tanaka T., Tobita K. Comparison of nine strains of Influenza C virus growth characteristics and viral polypeptides. Archives of Virology 82: 110, (1984).

61.- Grauballe P.C., Meyling A., Genner J. Immunoelectrophoretic studies of rotaviruses: preparation of rabbit antibodies to immunoprecipitates of human rotavirus and their use for identification of

specific and common antigens of human and bovine rotavirus. INSERM 90: 413, (1979).

62.- Guerrero L.B. de, Weissenbacher M.C., Parodi A.S. Inmunización contra la fiebre hemorrágica argentina con una cepa atenuada del virus Junín. I. Estudio de una cepa modificada del virus Junín. Inmunización de cobayos. Medicina (Buenos Aires) 29: 1, (1969).

63.- Haase A.T. Pathogenesis of lentivirus infections. Nature (London) 322: 130, (1986).

64.- Help G. Biogénesis de particulas interferentes y su posible rol en las infecciones por virus Junín. Tesis Doctoral - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires, (1980).

65.- Holland J.J., Kennedy I.T., Semler B.L., Jones C.L., Roux L., Grabau E.A. Defective interfering RNA viruses and the host-cell response. En:"Comprehensive Virology" Vol. 16, pp. 137, ed. H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner. Plenum Press, New York, (1980).

66.- Holland J.J., Spindler K., Horodyski F., Grabau E., Nichol S., Vandepol S. Rapid evolution of RNA genomes. Science 215: 1577, (1982).

67.- Holling R.A., Guskey L.E. Resolution of two surface glycoproteins from human Parainfluenza-3 virus by crossed immunoelectrophoresis. J. Virol. Methods 8: 309, (1984).

68.- Hongo S., Sugawara K., Homma M., Nakamura K. The functions of oligosaccharide chains associated with Influenza C viral glycoproteins. II. The role of carbohydrates in the antigenic properties of Influenza C viral glycoproteins. Archives of Virology 89: 189, (1986).

69.- Hotchin J.E., Cintis M. Lymphocytic choriomeningitis infection of mice as a model for the study of latent virus infection. Can. J. Microbiol. 4: 149, (1958).

70.- Hotchin J., Kinch W., Benson L. Lytic and turbid plaque-type mutants of lymphocytic choriomeningitis virus as a cause of neurological disease or persistent infection. Infect. Immun. 4: 281, (1971).

71.- Howard C. Natural history in arenaviruses. En: "Perspective in Medical Virology" Vol. 1, pp. 9, ed. A.J. Zuckerman. Elsevier, New York, (1986).

72.- Howard C.R., Lewicki H., Allison L., Salter M.,

Buchmeier M.J. Properties and characterization of monoclonal antibodies to Tacaribe virus. J. Gen. Virol. 66: 1383, (1985).

73.- Iorio R.M., Bratt M.A. Selection of unique antigenic variants of Newcastle disease virus with neutralizing monoclonal antibodies and anti-immunoglobulin. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 7106, (1985).

74.- Joseph B.S., Oldstone M.B.A. Immunologic injury in measles virus infection. II. Suppression of immune injury through antigenic modulation. J. Exp. Med. 142: 864, (1975).

75.- Katz J.M., Naeve C.W., Webster R.G. Host cell-mediated variation in H3N2 Influenza viruses. Virology 156: 386, (1987).

76.- Kendal A.P., Cox N.J. Forecasting the epidemic potential of influenza virus variants based on their molecular properties. Vaccine 3: 263, (1985).

77.- Kiley M.P., Swanepoel R., Mitchell S.W., Lange J.V., Gonzalez J.P., McCormick J.B. Serological and biological evidence that Lassa-complex arenaviruses are widely distributed in Africa. Med. Microbiol. Immunol.

175: 161, (1986).

78.- Kono Y., Kobayashi K., Fukunaga Y. Antigenic drift of Equine Infectious Anemia virus in chronically infected horses. Arch. Virusforschung 41: 1, (1973).

79.- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature (London) 227: 680, (1970).

80.- Lafon M., Wiktor T.J., Macfarlan R.I. Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies. J. Gen. Virol. 64: 843, (1983).

81.- Laguens R.M., Lampuri J.S., Coto C.E., Laguens R.P. Patología de la infección persistente del Calomys musculinus con una cepa atenuada de virus Junín. Medicina (Buenos Aires) 42: 273, (1982).

82.- Laguens R.P., González P.H., Ponzinibbio C., Chambó J. Damage of human polymorphonuclear leucocytes by Junín virus. Med. Microbiol. Immunol. 175: 177, (1986).

83.- Lampuri J.S. Infección experimental del Calomys musculinus con virus Junín: modelo de infección crónica. Tesis Doctoral - Facultad de Ciencias Exactas

y Naturales - Universidad de Buenos Aires, (1984).

84.- Lampuri J.S., Coto C.E. Responsabilidad de las variantes serológicas en la infección crónica con virus Junín. Medicina (Buenos Aires) 43: 733, (1983).

85.- Lampuri J.S., Vidal M. del C., Coto C.E. Respuesta del Calomys musculinus a la infección experimental con virus Junín. Medicina (Buenos Aires) 42: 61, (1982).

86.- Lehmann-Grube F., Martínez Peralta L., Bruns M., Lohler J. Persistent infection of mice with the lymphocytic choriomeningitis virus. En:"Comprehensive Virology" Vol. 18, pp. 43, ed. H. Fraenkel-Conrat and R. Wagner. Plenum Publishing Corp., New York, (1983).

87.- Leider J.M., Palese P., Smith F.I. Determination of the mutation rate of a retrovirus. J. Virol. 62: 3084, (1988).

88.- Lomniczi B., Nagy E. Differentiation of Newcastle disease virus strains by one-dimensional peptide mapping. J. Virol. Methods 9: 227, (1984).

89.- Lubeck M.D., Schulman J.L., Palese P. Antigenic variants of Influenza viruses: marked differences in

the frequencies of variants selected with different monoclonal antibodies. Virology 102: 458, (1980).

90.- Lutley R., Pétursson G., Pálsson P.A., Georgsson G., Klein J., Nathanson N. Antigenic drift in Visna: virus variation during long-term infection of Icelandic sheep. J. Gen. Virol. 64: 1433, (1983).

91.- Maiztegui J.I., Sabattini M.S. Extensión progresiva del área endémica de fiebre hemorrágica argentina. Medicina (Buenos Aires) 37: 162, (1977).

92.- Marsden H.S., Crombie J.K., Snabak Sharpe J.H. Control of protein synthesis in Herpes virus-infected cells. Analysis of the polypeptides induced by wild type and sixteen ts mutants of HSV strain 17. J. Gen. Virol. 31: 347, (1972).

93.- Martínez Peralta L., Cossio P.M., Sabattini M.S., Maiztegui J.I., Arana R.M., Laguens R.P. Ultraestructural, immunohistochemical and virological studies in organs of Calomys musculinus infected with Junín virus by natural routes. Medicina (Buenos Aires) 39: 213, (1979).

94.- Martínez Peralta L., Laguens R.P., Cossio P.M.,

Sabattini M.S., Maiztegui J.I., Arana R.M. Presence of viral particles in the salivary gland of Calomys musculinus infected with Junin virus by a natural route. Intervirology 11: 111, (1979).

95.- Martinez Segovia Z.M. de, De Mitri M.I. Junin virus structural proteins. J. Virol. 21: 579, (1977).

96.- McChesney M.B., Oldstone M.B.A. Viruses perturb lymphocyte functions: selected principles characterizing virus-induced immunosuppression. Ann. Rev. Immunol. 5: 279, (1987).

97.- Mersich S.E., Castilla V., Damonte E.B. Lectin affinity of Junin virus glycoproteins. Ann. Inst. Pasteur/Virol. 139: 277, (1988).

98.- Mogensen S.C. Role of macrophages in natural resistance to virus infections. Microbiol. Rev. 43: 1, (1979).

99.- Murakami T., Matsuyama T. Appearance of Influenza A virus antigenic variants after treatment of infected MDCK cells with human leukocytes. J. Gen. Virol. 69: 1841, (1988).

100.- Narayan O., Clements J., Griffin D.E., Wolinsky J.S. Neutralizing antibody spectrum determines the antigenic profiles of emerging mutants of Visna virus. Infect. Immun. 32: 1045, (1981).

101.- Narayan O., Griffin D.E., Clements J.E. Virus mutation during "slow infection": temporal development and characterization of mutants of Visna virus recovered from sheep. J. Gen. Virol. 41: 343, (1978).

102.- Narayan O., Griffin D.E., Chase J. Antigenic shift of visna virus in persistently infected sheep. Science 197: 376, (1977).

103.- Narayan O., Wolinsky J.S., Clements J.E., Strandberg J. D., Griffin D.E., Cork L.C. Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna virus of sheep and goats. J. Gen. Virol. 59: 345, (1982).

104.- Notkins A.L., Mahar S., Scheele C., Goffman J. Infectious virus-antibody complex in the blood of chronically infected mice. J. Exp. Med. 124: 81, (1966).

105.- Ohmann H.B., Babiuk L.A. Viral infections in domestic

animals as models for studies of viral immunology and pathogenesis. J. Gen. Virol. 66: 1, (1986).

106.- Oldstone M.B.A. Virus neutralization and virus-induced immune complex disease. Prog. Med. Virol. 19: 84, (1975).

107.- Oldstone M.B.A., Blount P., Southern P.J., Lampert P. W. Cytoimmunotherapy for persistent virus infection reveals a unique clearance pattern from the central nervous system. Nature (London) 321: 239, (1986).

108.- Oldstone M.B.A., Salvato M., Tishon A., Lewicki H. Virus-lymphocyte interactions. III. Biologic parameters of a virus variant that fails to generate CTL and establishes persistent infection in immunocompetent hosts. Virology 164: 507, (1988).

109.- OubiÑa J.R., Videla C.M., Carballal G. Falta de persistencia del virus Junín en dos Cebus sp. Rev. Asoc. Arg. Microbiol. 16: 107, (1984).

110.- Oxford J.S., Salum S., Corcoran T., Smith A.J., Grilli E.A., Schild G.C. An antigenic analysis using monoclonal antibodies of Influenza A (H3N2) viruses isolated from an epidemic in a semi-closed community.

J. Gen Virol. 67: 265, (1986).

111.- Padula P.J., Segovia Z.M. de M. Replication of Junín virus in the presence of tunicamycin. Intervirology 22: 227, (1984).

112.- Palese P., Young J.F. Variation of Influenza A, B and C viruses. Science 215: 1468, (1982).

113.- Parodi A.S., De La Barrera J.M., Rugiero H.R., Greenway D.J., Yerga M., Mettler N.E., Boxaca M., Frigerio M.J. Los reservorios del virus de la Fiebre Hemorrágica Epidémica de la Provincia de Buenos Aires. Prensa Méd. Arg. 46: 554, (1959).

114.- Parodi A.S., Greenway D.J., Rugiero H.R., Rivero E., Frigerio M.J., Mettler N.E., Garzón F., Boxaca M., Guerrero L.B. de, Nota N.R. Sobre la etiología del brote epidémico de Junín. Día médico 30: 2300, (1958).

115.- Parvin J.D., Moscona A., Pan W.T., Leider J.M., Palese P. Measurement of the mutation rates of animal viruses: Influenza A virus and Poliovirus type 1. J. Virol. 59: 377, (1986).

116.- Payne S., Parekh B., Montelaro R.C., Issel C.J.

Genomic alterations associated with persistent infections by equine infectious anaemia virus, a retrovirus. J. Gen. Virol. 65: 1395, (1984).

117.- Payne S.L., Salinovich O., Nauman S.M., Issel C.J., Montelaro R.C. Course and extent of variation of equine infectious anemia virus during parallel persistent infections. J. Virol. 61: 1266, (1987).

118.- Perryman L.E., O'Rourke K.I., McGuire T.C. Immune responses are required to terminate viremia in equine infectious anemia lentivirus infection. J. Virol. 62: 3073, (1988).

119.- 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., Weissenbacher M.C. Arenaviruses. Intervirology 4: 207, (1974).

120.- Pirosky I., Zuccarini J., Molinelli E.A., di Pietro A., Barrera Oro J.G., Martini P., Copello A.R. Virosis hemorrágica del noroeste bonaerense; endemo-epidémica, febril, enantemática y leucopénica. Inst. Nac. Microb. Ministerio de Asistencia Social y Salud Pública, pp. 1, (1959).

121.- Popescu M., Lehmann-Grube F. Diversity of lymphocyte choriomeningitis virus: variation due to replication of the virus in the mouse. J. Gen. Virol. 30: 113, (1976).

122.- Portner A., Webster R.G., Bean W.J. Similar frequencies of antigenic variants in Sendai, Vesicular Stomatitis and Influenza A viruses. Virology 104: 235, (1980).

123.- Possee R.D., Schild G.C., Dimmock N.J. Studies on the mechanism of neutralization of Influenza virus by antibody: evidence that neutralizing antibody (anti-haemagglutinin) inactivates Influenza virus in vivo by inhibiting virion transcriptase activity. J. Gen. Virol. 58: 373, (1982).

124.- Reed L.J., Muench H.A. A simple method of estimating 50% end point. Am. J. Hyg. 27: 493, (1938).

125.- Rugiero H.R., Greenway D.J., Parodi A.S., Rivero E., Frigerio M.J., Mettler N.E., Boxaca M., Nota N.R., Guerrero L.B. de, Garzón F. Fiebre hemorrágica epidémica; síntesis clínico-evolutiva. Día médico 31: 236, (1959).

126.- Rweyemamu M.M., Booth J.C., Pay T.W.F. Neutralization

kinetics studies with type SAT 2 foot-and-mouth disease virus strains. 1. Factors that influence the rate and pattern of neutralization. J. Hyg. Camb. 78: 99, (1977).

127.- Sabattini M.S., Contigiani M.S. Ecological and biological factors influencing the maintenance of arenaviruses in nature, with special reference to the agent of Argentinean Hemorrhagic Fever (AHF). Simposio Internacional sobre Arbovirus dos Trópicos e Febres Hemorrágicas. Academia Brasileira de Ciencias, Rio de Janeiro, Brasil. pp. 251, (1982).

128.- Sabattini M.S., González de Rios L., Díaz G., Vega V.R. Infección natural y experimental de roedores con virus Junin. Medicina (Buenos Aires) 37: 149, (1977).

129.- Salinovich O., Payne S.L., Montelaro R.C., Hussain K.A., Issel C.J., Schnorr K.L. Rapid emergence of novel antigenic and genetic variants of equine anemia virus during persistent infection. J. Virol. 57: 71, (1986)

130.- Salvato M., Shimomaye E., Southern P., Oldstone M.B.A. Virus-Lymphocyte interactions. IV. Molecular characterization of LCMV Armstrong (CTL^+) small

genomic segment and that of its variant, clone 13 (CTL⁻). Virology 164: 517, (1988).

131.- Samoilovich S.R., Avila M.M., Weissenbacher M.C. Efecto de la ciclofosfamida en la infección del cobayo con los virus Junín y Tacaribe. Resum. III Congreso Argentino de Microbiología - Buenos Aires, 1-5 de agosto de 1982.

132.- Schild G.C., Oxford J.S., de Jong J.C., Webster R.G. Evidence for host-cell selection of Influenza virus antigenic variants. Nature (London) 303: 706, (1983).

133.- Schwartz R., Lohler J., Lehmann-Grube F. Infection of cultivated mouse peritoneal macrophages with lymphocytic choriomeningitis virus. J. Gen. Virol. 39: 565, (1978).

134.- Scott J.V., Stowring L., Haase A.T., Narayan O., Vigne R. Antigenic variation in visna virus. Cell 18: 321, (1979).

135.- Skehel J.J., Stevens D.J., Daniels R.S., Douglas A.R., Knossow M., Wilson I.A., Wiley D.C. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong Influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody.

Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 1779, (1984).

136.- Smith D.B., Inglis S.C. The mutation rate and variability of eukaryotic viruses: an analytical review. J. Gen. Virol. 68: 2729, (1987).

137.- Southern P.J., Blount P., Oldstone M.B.A. Analysis of persistent virus infections by in situ hybridization to whole-mouse sections. Nature (London) 312: 555, (1984).

138.- Southern P.J., Singh M.K., Riviere Y., Jacoby D.R., Buchmeier M.J., Oldstone M.B.A. Molecular characterization of the genomic S RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. Virology 157: 145, (1987).

139.- Stanley J., Bhaduri L.M., Narayan O., Clements J.E. Topographical rearrangements of visna virus envelope glycoprotein during antigenic drift. J. Virol. 61: 1019, (1987).

140.- Steinhauer D.A., Holland J.J. Rapid evolution of RNA viruses. Ann. Rev. Microbiol. 41: 409, (1987).

141.- Steyerthal N., Alché L.E., Lampuri J.S., Coto C.E. Caracterización de la infección aguda en Calomys

musculinus neonato inoculado con virus Junin. Resum. I Congreso Argentino de Virologia. Buenos Aires, 1-5 de agosto de 1983.

142.- Strauss J.H., Strauss E.G. Evolution of RNA viruses. Ann. Rev. Microbiol. 42: 657, (1988).

143.- Stroop W.G., Baringer J.R. Persistent slow and latent viral infections. Prog. Med. Virol. 28, pp. 1, ed. J. L. Melnick. Karger Basel, Houston, USA, (1982).

144.- Thormar H., Barshatzky M.R., Arnesen K., Kozlowski P.B. The emergence of antigenic variants is a rare event in long-term visna virus infection in-vivo. J. Gen. Virol. 64: 1427, (1983).

145.- Traub E. Persistence of lymphocytic choriomeningitis virus in immune animals and its relation to immunity. J. Exp. Med. 63: 847, (1936).

146.- Vallejos D.A., Ambrosio A.M., Gamboa G., Briggiler A.N. Maiztegui J.I. Alteraciones de las subpoblaciones linfocitarias en la fiebre hemorrágica argentina. Medicina (Buenos Aires) 45: 407, (1985).

147.- Vestergaard B.F., Grauballe P.C. Crossed

immunoelectrophoretic identification of partially purified type common and type specific Herpes simplex virus glycoprotein antigens (39934). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 156: 349, (1977).

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

149.- Videla C., Kajon A., Carballal G., Merani M.S., Weissenbacher M.C. Sensibilidad del Calomys callidus lactante a la infección con la cepa XJCl3 de virus Junín. Resum. IX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología, (1985).

150.- Vitullo A.D., Hodara V.L., Merani M.S. Effect of persistent infection with Junin virus on growth and reproduction of its natural reservoir Calomys musculinus. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37: 663, (1987).

151.- Waner J.L., Weller T.H. Analysis of antigenic diversity among human cytomegaloviruses by kinetic neutralization tests with high-titered rabbit antisera. Infect. Immun. 21: 151, (1978).

152.- Weber E.L., Guerrero L.B. de, Boxaca M. MRC$_5$ cells: a model for Junin virus persistent infection. J. Gen. Virol. 66: 1179, (1985).

153.- Webster R.G., Laver W.G. Determination of the number of nonoverlapping antigenic areas on Hong Kong (H3N2) Influenza virus hemagglutinin with monoclonal antibodies and the selection of variants with potential epidemiological significance. Virology 104: 139, (1980).

154.- Webster R.G., Laver W.G., Air G.M., Schild G.C. Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. Nature (London) 296: 115, (1982).

155.- Weissenbacher M.C., Calello M.A., Carballal G., Planes N., De La Vega M.T., Kravetz F. Actividad del virus Junin en humanos y roedores de áreas no endémicas de la Provincia de Buenos Aires. Medicina (Buenos Aires) 45: 263, (1985).

156.- Weissenbacher M.C., Sabattini M.S., Avila M.M., Sangiorgio P.M., de Sensi M.R.F., Contigiani M.S., Levis S.C., Maiztegui J.I. Junin virus activity in two rural populations of the Argentine Hemorrhagic Fever endemic area. J. Med. Virol. 12: 273, (1983).

157.- Wheelock E.F., Toy S.T. Participation of lymphocytes in viral infections. En:"Advances in Immunology" Vol. 16, pp. 123, Academic Press, New York, (1973).

158.- Wiegers K.J., Dernick R. Peptide maps of labeled poliovirus proteins after two-dimensional analysis by limited proteolysis and electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. Electrophoresis 2: 98, (1981).

159.- Wulff H., Lange G., Webb P.A. Interrelationship among arenaviruses measured by indirect immunofluorescence. Intervirology 9: 344, (1978).

160.- Yewdell J.W., Webster R.G., Gerhard W. Antigenic variation in three distinct determinants of an influenza type A hemagglutinin molecule. Nature (London) 279: 246, (1979).

161.- Youngner J.S., Preble O.T. Viral persistence: Evolution of viral populations. En:"Comprehensive Virology" Vol. 16, pp. 73, ed. H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner. Plenum Press, New York, (1980).

7. APENDICE

EDTA: ácido etilendiamintetraacético

i.c.: intracerebral

i.n.: intranasal

i.p.: intraperitoneal

Kd: Kilo dalton

NP 40: Nonidet P-40

PBS: buffer fosfato salino

p.i.: post-infección

PM: Peso Molecular

rpm: revoluciones por minuto

SDS: dodecil sulfato de sodio

SNC: sistema nervioso central

TEMED: tetra metil etilendiamina

UFP: unidades formadoras de placas