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

Participación de sistemas supresores en la infección viral

Campetella, Oscar Eduardo

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:
Campetella, Oscar Eduardo. (1989). Participación de sistemas supresores en la infección viral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2267_Campetella.pdf

Cita tipo Chicago:
Campetella, Oscar Eduardo. "Participación de sistemas supresores en la infección viral". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2267_Campetella.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

PARTICIPACION DE SISTEMAS SUPRESORES EN LA INFECCION VIRAL

Autor: Lic. Oscar Eduardo Campetella

Directores: Dr. Martín A Isturiz - Dra. Mercedes C. Weissenbacher

Lugar de Trabajo: Departamento de Microbiología - Facultad de Medicina - UBA

Tesis presentada para optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

* * * * *

A Susana

1. OBJETIVOS 1

2 INTRODUCCION 3

2.1 Generalidades del sistema inmune 3

2.2 Efecto de la ciclofosfamida (Cy) sobre la respuesta inmune 6

2.3 Respuesta inmune en las infecciones virales 7

2.4 Fiebre hemorrágica argentina (FHA) 10

2.4.1 Características del agente etiológico 11

2.4.2 Huéspedes experimentales 11

2.4.2.1 Cobayo 11

2.4.2.2 Rata 13

2.4.2.3 Primates 13

2.4.2.4 Infección experimental del ratón 14

2.5 Breve descripción de los sistemas indicadores de hipersensibilidad retardada (HR) utilizados 17

3. MATERIALES Y METODOS 19

3.1 Animales 19

3.1.1 Ratones 19

3.1.2 Conejos 19

3.1.3 Cobayos 19

3.1.4 Carnero 20

3.1.5 Pollo 20

3.2 Cultivo de tejidos 20

3.2.1 Células Vero 20

3.2.2 Células BHK21 21

3.3 Virus 21

3.4 Detección de Anticuerpos anti-VJ 21

3.4.1 Neutralización 22

3.4.2 Inmunofluorescencia 22

3.5 Detección de virus por co-cultivo 22

3.6 Preparación de antisueros 23

3.6.1 Suero anti-timocito (anti-Φ) 23

3.6.2 Suero anti-gammaglobulinas de ratón 24

3.7 Determinación del porcentaje de linfocitos T y B en las poblaciones celulares esplénicas 24

3.8 Origen de reactivos inmunológicos comerciales .. 25

3.8.1 Anticuerpos monoclonales (AcMn) 25

3.8.2 Aloantisuero. 25

3.8.3 Complemento de conejo. 26

3.8.4 Medio para ensayos de citotoxicidad 26

3.9 Obtención y tratamiento de células esplénicas ... 26

3.9.1 Depleción de diferentes poblaciones celulares 26

3.9.1.1 Por técnicas de adherencia 26

3.9.1.2 Por depleción con antisueros convencionales 27

3.9.1.3 Por depleción con aloantisuero 27

3.9.1.4 Por depleción con AcMn 27

3.10 Transferencia pasiva de células sensibilizadas . 27

3.11 Determinación de Células Formadoras de Ac (CFA) hacia GRC 28

3.12 Cuantificación de la respuesta de HR por el método del Swelling Test 28

3.12.1 Hacia glóbulos rojos xenogeneicos 28

3.12.2 Hacia DNFB 30

3.13 Estudios histológicos 30

3.14 Análisis estadístico 30

4. RESULTADOS 31

4.1 Efecto de la infección viral sobre la reacción de HR inducida con 106 GRC 31

4.2 Dependencia de la dosis viral y requerimiento de virus infeccioso 33

4.3 Acción del virus en la respuesta inmune de tipo humoral 35

4.4 Acción del virus sobre el sistema inmunocompetente del ratón adulto 36

4.5 Relación de la actividad supresora con poblaciones celulares 39

4.5.1 Determinación del número mínimo de células requeridas 40

4.6 Tipificación de las poblaciones celulares responsables de la supresión 42

4.7 Actividad de las células supresoras inducidas por VJ sobre la rama aferente de la respuesta de HR 45

4.8 Actividad sobre la rama eferente de la repuesta de HR 48

4.9 Actividad supresora en el esquema de administración de Cy: -1, +1,+4 49

4.9.1 Análisis de la actividad supresora viral en el esquema Cy -1, +1, +4 52

4.9.2 Identificación fenotípica de las células Tsu* 55

4.9.3 Identificación de los blancos presentes en los receptores 106 GRC y 108 GRC-Cy -1, +1, +4 56

4.9.4 Análisis crítico del efecto de la administración de Cy según el esquema -1, +1, +4..... 61

4.10 Regulación de la actividad Tsu..... 65

4.11 Modo de acción de las células Tsu. 68

4.11.1 Restricción H2..... 69

4.11.2 Especificidad..... 71

4.12 Búsqueda de los marcadores IJ y L3T4 en las células Tsu 81

4.13 Descripción de un modelo murino adulto naturalmente sensible a la inoculación con VJ..... 83

4.13.1 Susceptibilidad de los ratones de 3 meses de vida a VJ..... 83

4.13.2 Dependencia de la edad en la susceptibilidad 84

4.13.3 Correlación entre la atenuación viral, la dosis y la vía de inoculación con la susceptibilidad..... 85

4.13.4 Rescate de virus a partir de órganos y sangre 87

4.13.5 Respuesta humoral..... 87

4.13.6 Hallazgos histopatológicos 89

4.14 Relación entre la actividad supresora inducida por VJ y la capacidad de sobrevida de los ratones a la inoculación viral..... 90

4.14.1 Modelo C3H/HeJ adulto 90

4.14.2 Modelo ratón lactante 94

4.14.3 Utilización de células contrasupresoras 96

4.14.4 Actividad supresora en los ratones híbridos (BALB/cJ X C3H/HeJ)F1 y (C3H/HeJ X BALB/cJ)F1 96

5. DISCUSION 98

6. CONCLUSIONES 115

7. BIBLIOGRAFIA 118

AGRADECIMIENTOS

* Al INTA (CICV-Castelar), y a su personal por facilitar sus instalaciones para mantener allí un carnero y sangrarlo.

* A la Fuerza Aérea Argentina y al Brigadier E. Crespo, por realizar gratuitamente el transporte de las cepas murinas importadas de The Jackson Lab, USA.

* Al CONICET, por financiar estos trabajos.

* Al Dr. Martín A Isturiz, por su constante apoyo y comprensión.

* Al Dr. ACC Frasch por facilitarme su procesador de palabras y financiar la impresión de esta Tesis.

* Al Dr N. Sanjuan por la realización de los estudios histopatológicos.

* A mis amigas las Dras. Hebe A Barrios y Nora V. Galassi, sin cuyo apoyo y estímulo estos trabajos jamás se hubieran realizado.

* Al Dr. JM Azcurra, Consejero de Estudios de la Carrera del Doctorado.

* A la Dra. MC Weissenbacher y al Dr. MA Isturiz por permitirme la prosecusión de estos trabajos en momentos muy críticos.

Abreviaturas:

Ac: anticuerpo
ACP: acción citopatogénica
Ag: antígeno
Ags: antígenos
CFA: células formadoras de anticuerpos
CMH: complejo mayor de histocompatibilidad
Cy: ciclofosfamida
DNFB: 2,4 dinitro, 1 flúor benceno
FHA: fiebre hemorrágica argentina
Fig: Figura
GRC: glóbulos rojos de carnero
GRP: glóbulos rojos de pollo
H2: CMH murino
HEPES: ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HR: hipersensibilidad retardada
ic: intracerebral
kg: kilogramo
LB: linfocitos B
LCM: virus de la coriomeningitis linfocitaria
LT: linfocitos T
LT_H: LT con actividad "helper" (colaboradores)
LT_{HR}: LT efectores de HR
LTs: linfocitos T supresores
MEM: Minimum essential medium
min: minutos
MOI: multiplicidad de infección
NK: células "natural killer"
P/V: peso/volumen
PBS: solución salina buffereada con fosfatos
pi: post-inoculación
ps: post-sensibilización
RPM: revoluciones por minuto
seg: segundos
SNC: sistema nervioso central
UFP: unidades formadoras de placas
v/v: volumen/volumen
VJ: virus Junin

1. OBJETIVOS

La respuesta inmune frente a las infecciones virales pone en evidencia la amplia variedad de recursos inmunológicos que posee el huesped. Dentro de ellos las respuestas celulares reguladoras han sido puestas de manifiesto y estudiadas recientemente.

Entre las respuestas inmunes más interesantes se encuentran aquellas capaces de llevar al huésped a desarrollar la capacidad de atacar los tejidos propios. Se genera entonces un daño que en algunos casos puede ser mayor que el que, potencialmente, produciría el patógeno *per se*. En numerosos modelos experimentales, este tipo de respuesta ha sido relacionado con la mortalidad producida por diferentes agentes virales. Surge entonces que la capacidad de regular este tipo de daño potencial, cuando por alguna causa se generan respuestas potencialmente peligrosas, puede jugar un papel central en la capacidad de sobrevida a la infección.

En el caso particular del virus Junin (VJ), la mortalidad en el ratón lactante (altamente susceptible a la infección) está estrechamente asociada a la inducción de una respuesta timo-dependiente. Esta respuesta se manifiesta por la producción de un cuadro neurológico que, histológicamente, se caracteriza como una meningoencefalitis con la presencia de infiltrados perivasculares de células mononucleares. Estos hallazgos están unidos concomitantemente con la mortalidad, y concuerdan con una reacción de tipo IV de Gell y Coombs, es decir de hipersensibilidad retardada (HR).

En el modelo ratón adulto (resistente a la infección), no se detecta virus en ningún órgano por métodos convencionales, no registrándose lesiones compatibles con una respuesta de HR, aunque sí se inducen altos títulos de anticuerpos neutralizantes y se detecta actividad citotóxica específica. Por otra parte, utilizando técnicas de alta sensibilidad como el cocultivo de tejidos disgregados con células permisivas a la replicación viral, se consiguió establecer la presencia de virus infeccioso hasta el día +7 post-infección (pi). Además de ello la administración de ciclofosfamida (Cy), en dosis y esquemas adecuados, induce en los animales infectados alta mortalidad. Los ratones muertos presentan un cuadro histológico similar al descripto en los recién nacidos. El conjunto de estos resultados demuestra que el ratón adulto no es refractario a la infección y que, de alguna manera, es capaz de regular la respuesta celular ligada a la mortalidad en el ratón lactante.

En los trabajos aquí desarrollados se estudió la presencia de mecanismos celulares operantes en el ratón adulto capaces de regular la respuesta de HR, analizándose sus principales características operativas e identificándose *fenotípicamente* a las células involucradas. Paralelamente, se describe el primer modelo ratón adulto naturalmente susceptible a la infección con virus Junin. Se intentará establecer una correlación entre la actividad reguladora de la respuesta de HR y la capacidad de sobrevida en diferentes modelos murinos sensibles o resistentes a la infección.

2 INTRODUCCION

2.1 Generalidades del sistema inmune

A lo largo de la evolución, los vertebrados han desarrollado una serie de mecanismos que les permite sobrevivir en un medio altamente contaminado sin sufrir, normalmente, las agresiones de una gran variedad de microorganismos. Aún más, han conseguido convivir con un conjunto de ellos en forma simbiótica y detener a una serie de potenciales patógenos. El conjunto de mecanismos de defensa que son capaces de producir moléculas y células que, específicamente desarrollan sistemas efectores destructivos hacia los patógenos invasores, es el que comúnmente se conoce como sistema inmune.

En los últimos tiempos, el conocimiento del sistema inmune se ha visto enriquecido por el aporte de grandes avances provenientes de diferentes campos de la Ciencia. Así la genética, la bioquímica, la biología celular y molecular, han permitido interpretar y analizar los fenómenos de la respuesta inmune, de tal modo que hoy tenemos una idea global del funcionamiento de un sistema de alta complejidad y fina regulación, cuya comprensión total aún escapa a la Ciencia moderna.

En la elaboración y puesta en marcha de una dada respuesta inmune, participan un conjunto de células especializadas las que, a través de una compleja interrelación, generan mecanismos efectores moleculares y celulares capaces de eliminar y, más tarde, de prevenir la invasión de un patógeno. A su vez también desarrollan mecanismos de regulación capaces de acotar y prevenir el daño a los tejidos propios. Es decir que el lema básico de la inmunología sería: Máxima efectividad en la destrucción de los patógenos invasores con mínimo daño a los tejidos propios.

Los principales aportes a la inmunología no provienen del estudio de alguna enfermedad infecciosa sino de la respuesta hacia sustancias no patógenas y, aún más, no presentes en la naturaleza. El empleo de sustancias más simples y fáciles de manejar ha permitido la disección de las respuestas facilitando su comprensión. Los mecanismos puestos en marcha son sin embargo los mismos que se activan frente a una infección real, permitiendo así establecer el repertorio de respuestas y de las vías que eventualmente éstas podrían utilizar [1]. De todos modos, el cambio de escala que implica la aplicación de los conocimientos así adquiridos a la mejor comprensión de los

mecanismos actuantes en una infección real, no es algo que transcurra en forma directa. Dada su complejidad, cada agente infeccioso posee su propia estrategia y pone en juego distintos mecanismos para lograr su sobrevida. En este sentido debemos considerar que, si bien es cierto que la evolución capacitó al huésped vertebrado para la sobrevida, no es menos cierto que también ha capacitado a los patógenos para lograr su propósito de perdurar en la naturaleza. Es así como al no ser inertes y expresar un cúmulo de diferentes antígenos (Ags) y aún diferentes Ags en diferentes momentos de la infección, entre otras muchas estrategias, los conocimientos adquiridos con sustancias no patógenas nos dan sólo una idea superficial de lo que verdaderamente ocurre en el individuo frente a una infección real. Entonces, la aplicación de los conocimientos adquiridos en esos modelos a una dada infección real es un campo diferente que, si bien se nutre de la inmunología básica, debe considerar otros aspectos que hacen a la fisiopatogenia de la enfermedad en cuestión.

Las células responsables de la respuesta inmune, son en gran parte los linfocitos. Dentro de ellos, y a grandes rasgos, se pueden distinguir dos subpoblaciones: los linfocitos B (LB) principales responsables de la respuesta humoral en tanto son los productores de anticuerpos (Ac), y los linfocitos T (LT) que, entre otras funciones, favorecen y regulan su producción. Sin embargo, entre los LT se pueden distinguir gran número de funcionalidades diferentes, pudiéndoselos clasificar según su función como efectores y reguladores. Dentro de los reguladores podemos encontrar aquellos LT con función "helper" capaces de colaborar en la inducción de una dada respuesta. En contraposición a ellos, encontramos los LT con actividad supresora (LTs) que participan regulando en forma negativa (inhibiendo) la respuesta inmune [1-2].

Los LT "helper", reconocen Ags procesados por los macrófagos en asociación con determinantes codificados por la región IA del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en el ratón o por la región HLA-D del CMH humano. Ellos son estimulados a proliferar y a inducir directamente o vía la secreción de mediadores solubles otras células linfoides a diferenciarse en células efectoras. Por el contrario, los LTs parecerían ser capaces de reconocer al Ag en forma directa o en conjunto con el determinante IJ [3] luego de lo cual, son activados para suprimir la respuesta inmune. Los blancos de la regulación T incluyen, entre otras, a las células B y T.

Entre los LT efectores podemos distinguir al menos dos tipos diferentes de actividades realizadas por ellos, la actividad efectora de hipersensibilidad retardada y los mediadores de respuestas citotóxicas. Está generalmente aceptado que la respuesta inmune celular es de importancia primordial en los

fenómenos de rechazo de injertos, de resistencia a tumores y en infecciones virales.

El sistema inmune, tomado en su conjunto, es considerado por algunos autores como en una permanente y compleja homeostasis en donde su característica saliente es el reconocimiento de lo propio más que de lo no propio [4]. Desde este punto de vista, la respuesta inmune sería un proceso en donde un Ag extraño en el contexto de los Ags propios perturba el equilibrio produciendo una alteración en la regulación que lleva hacia respuesta positiva (inmunidad) o negativa (tolerancia) [4]. De este modo, la regulación inmune emerge como un área central de la inmunología.

La actividad de los linfocitos supresores es uno de los mecanismos claves de la tolerancia inmunológica. Aunque las células supresoras están generalmente asociadas con la falta de respuesta del sistema inmune, ellas probablemente conducen al control de muchas o quizá de todas las respuestas inmunológicas. Las células Ts fueron descriptas por primera vez por Gershon & Kondo en 1971 [5]. Desde su hallazgo ha sido examinada su presencia en numerosos modelos experimentales encontrándose que son capaces de ejecutar supresión a través de diferentes mecanismos.

Gran cantidad de información sobre el funcionamiento del sistema inmune, proviene de los estudios efectuados en modelos experimentales animales. De éstos el ratón, es el que más resalta debido a la gran cantidad de cepas endogámicas, facilidad de manejo y conocimiento de su sistema inmune. Es entonces, el modelo de elección para realizar estudios básicos de inmunología.

El estudio de las diferentes poblaciones celulares involucradas en la respuesta inmune permitió establecer un patrón *a priori* de marcadores de superficie de cada una. Así, los LB son fácilmente identificados por poseer en su superficie inmunoglobulinas mientras que los LT llevan, en el ratón, el Ag Thy 1 [6]. Dentro de las diferentes subpoblaciones de LT, se han conseguido establecer fenotipos útiles en su discriminación. Los Ags más aptos para diferenciar las subpoblaciones de LT son los de la serie Lyt. Dentro de ellas se pueden considerar básicamente tres subpoblaciones de LT: las que portan los Ags Lyt 1,2,3; las que portan sólo el Lyt 1 y las que poseen los Lyt 2,3

Aunque desconocida su función, estos Ags de superficie se expresan en forma selectiva y, de alguna manera, incluyen información que decide sobre la funcionalidad de la población linfocitaria portadora. Se ha conseguido correlacionar experimentalmente la presencia o no de estos marcadores con una dada función. Así, los LT Lyt 1^+, se comportan en un gran número de modelos experimentales como mediadores de actividad "helper" aunque

también ese Ag está presente en LT efectores de HR, en determinadas poblaciones efectoras de supresión sobre actividades celulares y en células involucradas en circuitos amplificadores de supresión. Por otra parte, el fenotipo Lyt $2^+,3^+$ se encuentra asociado con células supresoras de respuestas humorales y celulares como así también en efectoras de citotoxicidad.

Otros marcadores de interés en la tipificación de células inmunocompetentes en el ratón, son el determinante IJ perteneciente a la región I del CMH (H2) y el L3T4 codificado en el cromosoma 6 [3].

Los determinantes IJ se expresan en algunas subpoblaciones de células T inmunoreguladoras y también en factores solubles liberados por LT involucrados en la generación de actividades supresoras, contrasupresoras y amplificadoras de "helper" [3]. Sin embargo, no se detecta IJ en LT "helper" o en LT citotóxicos, pese a que los primeros reconocen los Ags extraños en asociación con determinantes clase II y los segundos en asociación con moléculas clase I. Esto determina que los marcadores IJ estarían demarcando un lineaje de células T funcionalmente distinto.

Por su parte, el Ag L3T4, considerado como el equivalente murino del CD4 humano [7], se expresa en la mayoría de los timocitos y en la subpoblación dominante de los LT periféricos [7]. La expresión de este Ag, está asociada con la de los Lyt 2, 3 sólo en timocitos (80% de estas células poseen ambos marcadores), pudiéndose entonces separar a los LT maduros en poblaciones mutuamente excluyentes, basándonos en la expresión del L3T4 o de Lyt 2, 3 [7]. Estos Ags son considerados marcadores de diferenciación debido a su expresión diferencial durante el desarrollo de timocitos a LT maduros.

2.2 Efecto de la ciclofosfamida (Cy) sobre la respuesta inmune

La Cy (N-N-bis [ß-cloretil]-N'-O-propilen-ácido fosfórico éster diamida), un agente alquilante, tiene en comparación con otras drogas citostáticas una mayor selectividad hacia las células tumorales. *In vivo* esta droga es transformada en el hígado [8-10] a su metabolito farmacológicamente activo la 4-hidroxiciclofosfamida. Este compuesto, de corta vida media, actúa introduciendo errores durante la síntesis de ADN y por lo tanto inhibe la multiplicación celular.

Las células más sensibles son aquellas que se dividen en forma activa afectando entonces principalmente a las células tumorales. Sin embargo, también resultan destruídas aquellas poblaciones normales con alto índice de recambio.

Cuando las células del sistema inmune son activadas por el contacto con un Ag, proliferan tornándose sensibles a la droga. Es así como la Cy posee un

marcado efecto inmunosupresor. Se pudo comprobar que la actividad de la droga puede notarse aunque haya sido suministrada con anterioridad a la estimulación antigénica ya que las células impactadas por la Cy morirán al proliferar luego del contacto con el Ag.

Paralelamente, no todos los linfocitos poseen la misma sensibilidad a la droga. En numerosos modelos experimentales, pudo comprobarse que los LTs son particularmente sensibles [11-12]. En algunos casos, dosis tan bajas como 20 mg/kg son capaces de eliminar una dada subpoblación [13-14].

Por otra parte, es sabido que la droga posee un marcado efecto sobre la respuesta inmune humoral debido a la sensibilidad de los LB y LT "helper" a grandes dosis de Cy (150-200 mg/kg en el ratón) [14-17].

La aplicación de altas dosis previo a la estimulación antigénica, produce en general la ausencia de respuesta humoral y exacerba la respuesta celular debido a la destrucción por una parte de los LB y por otra de los LTs de la respuesta de HR, como fuera observado, entre otros modelos, en glóbulos rojos de carnero (GRC), 2,4-dinitro, 1-flúor benceno (DNFB) [18].[19] y en infecciones virales como Influenza y Dengue [20] [21].

Es así como esta droga ha resultado particularmente útil en la disección de gran número de respuestas inmunes. En su manipulación cobran gran importancia la dosis, número de aplicaciones y la secuencia de administración de las mismas. Mediante un adecuado manejo de estas variables se puede modular o destruír un tipo de respuesta en particular.

2.3 Respuesta inmune en las infecciones virales

Cuando un agente viral establece contacto con un huésped susceptible, pone en juego sus propias estrategias de replicación y de perduración en la naturaleza. Una de las principales características de las infecciones virales es que no se puede establecer *a priori* un patrón común a todas ellas. Esto es debido fundamentalmente a la diferente composición estructural de los agentes y a las distintas estrategias de replicación que siguen.

Prácticamente todos los Ags virales son capaces de generar respuesta inmune de algún tipo, dependiendo ello, entre otras variables, de la cantidad, la presentación y la antigenicidad

La producción de Ac capaces de neutralizar al agente infectante es de gran importancia en impedir la diseminación de la infección. Además, la respuesta humoral puede generar Ac que reconocen Ags expuestos en la superficie celular permitiendo la acción de células o del complemento que lisan la célula infectada abortando la producción viral. En otros casos (Dengue) la producción de Ac no neutralizantes puede favorecer al virus ya que el inmunocomplejo virus-Ac es fagocitado por los macrófagos donde el virus replica rápidamente [22].

La respuesta celular se caracteriza por la producción de células T citotóxicas y T efectoras de HR. Las T citotóxicas, reconocen Ags en la superficie celular en asociación con Ags del CMH, siendo capaces entonces de destruir la célula infectada. De esta manera abortan la replicación y exponen al virus contenido en su interior a la acción de los Ac neutralizantes. Son de gran importancia en la eliminación viral y es uno de los mecanismos más activos y tempranos que se generan.

Por su parte la respuesta de HR en algunas infecciones es de gran importancia, aunque no ha sido aún clarificado como juega su papel en beneficio del huésped. Un ejemplo de esta actividad beneficiosa se observa en el sarampión, donde la ausencia de la erupción (respuesta HR) característico de esta enfermedad lleva a formas atípicas más complejas y peligrosas [23]. A su vez en infecciones con el virus Herpes, las T efectoras de HR protejen de una enfermedad letal [23-24].

Por otra parte, todas estas respuestas pueden llevar a la generación de daños por el sistema inmune que pueden, eventualmente, llegar a ser aún más graves que los que podría producir la infección *per se*. Se determina entonces un fenómeno conocido como inmunopatología viral [25]. Puede además sumarse la falla en la inducción de una respuesta protectora.

Es aquí cuando se observa como la regulación de la respuesta inmune cobra una importancia fundamental. La inducción de una respuesta potencialmente peligrosa, deberá ser cuidadosamente controlada a riesgo de poner en peligro al individuo como un todo.

La generación de una respuesta inmune estará establecida por las características típicas del agente infeccioso y del sistema inmune del individuo infectado.

Existen gran número de estrategias que emplean los virus de modo de asegurar su supervivencia en un dado huésped o en una población. Prácticamente todas ellas involucran la capacidad de evitar las defensas inmunes ya sea en forma directa o indirecta [23].

Debido a su complejidad funcional, el sistema inmune puede ser afectado por los virus en diferentes niveles. Pueden ocurrir numerosas alteraciones de las células inmunocompetentes en el curso de una dada infección viral. Estas alteraciones funcionales no necesariamente presuponen un daño extensivo al tejido linfoide. De hecho generalmente se observan pocas, si alguna, alteración histológica del tejido linfoide en el curso de una infección viral [23,25].

Existen representantes de prácticamente todas las familias virales capaces de infectar algún tipo de célula inmunocompetente [25-26]. A veces la infección puede ser determinada por la presencia de Ag viral asociado a ellas o por la acción citopática que ésta induce.

Sin embargo, no es la infección de células del sistema inmune el único mecanismo que poseen los virus para asegurar su supervivencia. Otras formas son la no exposición al sistema inmune, ya sea porque puede infectar células contiguas (Herpes) o por la integración al genoma (Retrovirus); o la sobrevida de células infectadas con baja producción viral (LCM) entre otras estrategias.

La ausencia de respuesta frente a una dada infección viral, clásicamente fue considerada como una falla en el sistema inmune. Desde este punto de vista, esta falencia es considerada como un fenómeno de tolerancia inmunológica. Este concepto incluye las distintas causas capaces de originar la aparición de un mismo fenómeno final (la falta de respuesta). Así, por ejemplo, quedan incluídas la ausencia de estimulación debida tanto a una pobre antigenicidad del patógeno como a la falta de respuesta dada por una incapacidad manifiesta del huésped (ejemplo clásico de este fenómeno son los animales infectados en forma intrauterina o brevemente luego de su nacimiento y por lo tanto inmunológicamente inmaduros) e, incluso, cuando la tolerancia se debe a la puesta en marcha por parte del huésped de un sistema supresor activo de una dada respuesta inmune.

Es necesario, entonces, analizar los distintos fenómenos por separado.

#Algunos agentes infecciosos emplean una estrategia de evasión basada en la baja antigenicidad de su estructura. (Scrapie y otras encefalopatías espongiformes) [23].

#Un caso absolutamente diferente es aquel en el cual el agente infecta un organismo inmunológicamente inmaduro. En este caso, la ausencia de respuesta es debida a un fenómeno de tolerancia inmunológica en el sentido más estricto del término.

#Otros virus son capaces de infectar células comprometidas en la respuesta inmune. Algunos de ellos alteran la presentación de antígenos infectando las células especializadas (macrófagos y células dendríticas) logrando así disminuír o desviar la respuesta [25] Por otra parte, determinados agentes patógenos son capaces de infectar linfocitos B ó T y aún determinados subsets dentro de estas poblaciones [25-26].

#Capítulo aparte merecen aquellos virus capaces de inducir sistemas supresores de una dada actividad inmune. En este caso en particular, la supresión de la respuesta puede ser conducente a favorecer el proceso infeccioso [23]. El mismo fenómeno puede ser tomado como una forma de protección o de restricción frente a respuestas potencialmente dañinas para el huésped como las reacciones de hipersensibilidad (celular o humoral) [23]. En el último caso esta sería una forma de defensa y por lo tanto una estrategia puesta en juego en forma activa por el huésped que debería ser claramente distinguida del fenómeno de tolerancia.

Existen ejemplos en los que la supresión de una respuesta inmune potencialmente dañina resulta beneficiosa para el huésped. Es el caso de Influenza donde la respuesta de HR podría producir daños extensivos en pulmón [23, 27]; Coxsackie donde las Ts reducen la miocarditis [28] y LCM que, a altas dosis, genera supresión de respuesta celular la que es responsable de la patología del SNC [29-30], entre otros virus.

2.4 Fiebre hemorrágica argentina (FHA)

La FHA ("mal de los rastrojos") es una enfermedad infecciosa, endemo-epidémica de etiología viral, cuyo agente etiológico es el virus Junin (VJ) [31].

En el humano, el cuadro clínico se caracteriza por un síndrome febril con signos hematológicos y neurológicos presentándose además, distintos grados de alteraciones renales, cardiovasculares y digestivas [32].

En la naturaleza, los principales reservorios del virus, serían los roedores silvestres (p. ej. *Calomys musculinus*, *Calomys laucha* y *Akodon azarae*) cuyas densidades de población acompañan el curso de la epidemia de FHA [33]. Estas especies se infectan de manera persistente, produciéndose transmisión horizontal de la virosis.

En forma experimental, se ha conseguido infectar exitosamente diferentes modelos animales, los que han sido de utilidad en el estudio de distintos aspectos de la fisiopatogenia de la infección.

2.4.1 Características del agente etiológico

El virus Junin fue aislado por primera vez en 1958 por Parodi y sus colaboradores a partir de material de necropsia de un paciente de la localidad de Junin (Prov. Bs. Aires) [31].

Es un virus perteneciente al grupo de los Arenavirus, cuyas dimensiones varían entre 50 y 300 nm. En cortes ultrafinos de células infectadas se lo pudo visualizar durante el proceso de brotación a partir de la membrana celular, de donde arrastra componentes celulares [34].

Su genoma está compuesto por ARN de simple cadena, dispuesto en cuatro constituyentes mayores y tres menores, correspondiendo algunos de ellos al ARN ribosomal de la célula huésped. Posee además seis polipéptidos estructurales (cuatro glicosilados) siendo el de 64 kD la nucleoproteína, como surge de su cosedimentación con el ácido nucleico viral. Una de las glicoproteínas (38 kD) está ubicada en la superficie de la partícula y sería responsable de la inducción de Ac con actividad neutralizante [35].

La partícula viral, fuertemente pleomórfica, posee dentro de su núcleo ("core") una zona menos electrodensa donde quedan incluídos los gránulos semejantes a ribosomas y en la periferia una zona densa y compacta que se confunde con la envoltura viral [36]. La presencia de espículas en la envoltura es aún materia de discusión.

Dentro de los Arenavirus, VJ se ubica dentro del grupo Tacaribe el que además componen, entre otros, los virus: Tacaribe, Tamiami, Amapari, Pichindé y Machupo. Todos ellos dan reacción cruzada en ensayos de fijación de complemento e inmunofluorescencia, pero pueden ser distinguidos porque no cruzan en reacciones de neutralización (con la excepción de Tacaribe y Junin) ni de inmunoprecipitación. Por otra parte, estos virus dan sólo una pobre reacción cruzada por inmunofluorescencia con los Arenavirus del viejo mundo (LCM, Lassa y Mozambique).

2.4.2 Huéspedes experimentales

2.4.2.1 Cobayo

La infección experimental del cobayo permite la reproducción de la forma hemorrágica de la enfermedad humana. La inoculación de la cepa XJ de VJ produce la muerte de prácticamente el 100% de los animales, dentro de los 10-18 días pi. La susceptibilidad a la infección no depende de la vía de entrada del virus ya que similares resultados se obtienen inoculándolo en forma intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intracerebral, subcutánea y por

escarificación de la piel, en todos los casos el curso de la infección y su desenlace fatal es similar [37].

Los signos prominentes de la enfermedad son: hipertermia seguida de hipotermia (al final del curso de la afección), pérdida de peso y petequias en: piel, tejido celular subcutáneo, intestino delgado y grueso, suprarrenales y mucosa bucal. Las alteraciones hematológicas incluyen: leucopenia, linfopenia y plaquetopenia [38-39], observándose además alteraciones de la coagulación [40] y en la activación del complemento. Por otra parte existe una destrucción importante de los tejidos y células comprometidos en la respuesta inmune, que se visualiza como: descenso de LT en bazo, ganglios y sangre periférica; hiperplasia reticular con depleción linfocitaria y necrosis de ganglios linfáticos, bazo y médula ósea [41]. Por otra parte, la presencia de Ag viral detectado por inmunofluorescencia y de virus infeccioso en el tejido linfohematopoyético se correlaciona estrechamente con las alteraciones histológicas descriptas, sugiriendo entonces un efecto citopático directo del virus sobre este tejido. Paralelamente, en el modelo cobayo se ha observado una fuerte inmunosupresión hacia Ags no relacionados e, incluso, hacia el mismo virus [42-43]. En efecto, no se detectan Acs específicos a lo largo de la infección y se encuentran deprimidas respuestas tanto celulares como humorales hacia Ags no relacionados como haptenes, Ags proteicos, PPD etc. Por otra parte, la inoculación de la cepa XJCL3 demostró que ésta es atenuada en este modelo no observándose destrucción del tejido linfoide que se acompaña de la presencia de respuestas inmune hacia el virus y hacia Ags no relacionados, ésto último ha sido propuesto como una herramienta para detectar atenuación en las diferentes cepas virales [44].

En los animales infectados con la cepa XJ de VJ, se observa viremia temprana (a partir del 2º día pi) que perdura hasta la muerte del animal. Del mismo modo el virus puede aislarse de órganos como ganglio (a partir del día +3 pi), bazo, pulmón y suprarrenales (a partir del día +7 pi) y de corazón, hígado y riñón a partir del día +11 pi [38, 43, 45]. Estos hallazgos muestran una amplia distribución del virus en diferentes tejidos aunque no se lo encuentra en muestras de cerebro.

Aparentemente, la respuesta inmune no intervendría en la fisiopatogenia de la infección ya que no se observa infiltrado de células mononucleares en las lesiones [43], el tratamiento con suero antilinfocítico no modifica el curso de la enfermedad [46] y no se detectan depósitos renales de inmunoglobulinas ó de componentes de complemento [47]. Se postula en este modelo un mecanismo de acción directa del virus como causa de la muerte.

2.4.2.2 Rata

En este modelo se observa una fuerte dependencia de la cepa viral, la vía de inoculación y de la edad del huésped en la sensibilidad a la infección. Así, la cepa viral XJ (prototipo) al ser inoculada por vía ic en lactantes de 6, 24 ó 48 hs de vida, induce mortalidades del orden del 18%, 3% y 5% respectivamente, mientras que los animales de 72hs de vida son resistentes (mortalidad 0%). Sin embargo, la mortalidad se incrementa luego con la edad de los animales (5 días: 31%, 10 días: 93%) para disminuír nuevamente más tarde, alcanzando a los 26 días la mortalidad 0% [48]. Por otra parte, los animales son resistentes a la inoculación por vía ip. La inoculación de la cepa viral XJCL3 por vía ic en animales lactantes induce una alta mortalidad en todos los casos, pero se muestran resistentes cuando se utiliza la vía ip.

Los animales presentan un cuadro neurológico sin hemorragias y la muerte sobreviene entre los 14-20 días pi. No se observan alteraciones hematológicas significativas entre los animales infectados a los 10 días de vida y sus controles sin infectar. La histopatología permitió establecer la presencia de lesiones cerebrales y cerebelares que se correlacionan con la mortalidad. En efecto, en los animales de dos días de vida, (5% de mortalidad) se observan sólo discretas alteraciones mientras que, en los de diez días de vida (93% de mortalidad) se encuentra en cerebro un intenso infiltrado mononuclear localizado en la membrana subaracnoidea y espacios perivasculares que posteriormente muestran áreas de neurolisis y desmielinización

Es de destacar que, en la rata, el virus no parecería poseer un efecto letal *per se*, dado que se puede observar alta concentración de Ag viral en neuronas de cerebro, protuberancia y bulbo en presencia de altos títulos de Ac neutralizantes en animales que sobreviven a la infección y que se tornan crónicamente infectados. En ellos se observó atrofia cerebelosa [49]. Por otra parte, los títulos obtenidos en cerebros de animales infectados tanto a los dos como a los diez días de vida, son similares a pesar que sólo mueren los pertenecientes al último grupo. Se postula entonces el desarrollo de una inmunopatología responsable de las lesiones que se presentan en estos animales y que conducen a su mortalidad.

2.4.2.3 Primates

Se han estudiado, hasta el presente, cinco especies de primates todas pertenecientes al Nuevo Mundo, ellas son: *Alouatta caraya*, *Saimiri sciureus*, *Aoutus trivirgatus*, *Cebus sp.* y *Callithrix jacchus*.

Si bien se detectaron Ac neutralizantes en las tres primeras, la infección con la cepa XJ no se traduce en manifestaciones clínicas apreciables ni en signos hematológicos significativos, no rescatándose virus de órganos o de sangre [50-52].

Cebus sp., desarrolla una afección no mortal presentando en especial poliadenopatías, pérdida de peso, leuco-plaquetopenia, presencia de virus en sangre y fauces, generándose producción de Acs. Ocasionalmente, se presenta un cuadro neurológico tardío con depósito de inmunoglobulinas y algunos componentes del sistema complemento (C3) en vasos del SNC [53].

La inoculación de *Callithrix jacchus*, induce una grave enfermedad con signos hemorrágicos y neurológicos que conducen a la muerte de los animales entre los días 17-24 pi presentándose altos títulos virales en órganos y en sangre, particularmente en tejido nervioso y hemopoyético. El estudio histopatológico demuestra la presencia de meningoencefalitis y vasculitis de intensidad variable en pulmón, hígado, tejido linfatico y medula ósea. Ademas se detecta la presencia de Ag viral por inmunofluorescencia en esos mismos órganos. El conjunto de estos hallazgos sugieren que en este modelo se presenta una enfermedad similar en varios aspectos a la FHA humana [54-55].

Un modelo experimental desarrolado en *Rhesus macaques* fue utilizado para valorar una cepa atenuada de VJ (Candid 1), no encontrándose lesiones en CNS ni tampoco virus o antígeno viral en sus órganos [35].

2.4.2.4 Infección experimental del ratón

Se ha conseguido infectar exitosamente una serie de animales de laboratorio. De esta forma se lograron establecer diferentes modelos experimentales, cada uno de ellos con características propias, que permitieron realizar estudios sobre la fisiopatogenia de la infección.

En el ratón infectado con VJ se pueden distinguir clásicamente, dos modelos. Por una parte el modelo ratón lactante (24-72 hs de vida) que es sensible a la inoculación por VJ ya sea por vía ic donde presenta una mortalidad cercana al 100%, o por vía ip donde la mortalidad alcanza al 75-90%. Este comportamiento se observa en forma independiente de la atenuación de la cepa viral empleada [56-57]. La inoculación induce fuertes signos neurológicos no presentándose manifestaciones hemorrágicas. La muerte sobreviene entre los 7-27 días pi presentando el pico de mortalidad entre los días 12-15 [56-57]. Por otra parte, el ratón adulto es resistente al virus ya que no se observan signos de enfermedad y sólo se obtiene baja mortalidad (8-10%) aún cuando se lo inocule directamente en el órgano blanco, es decir en el cerebro [58-59].

En el ratón lactante infectado por vía ic, no se detectan Ac neutralizantes en ningún momento aunque sí fijadores de complemento que aparecen alrededor de los días 10-15 pi. Sin embargo, en los animales que sobreviven a la infección se encuentran Ac neutralizantes alrededor de los 20 días pi los que perduran posteriormente durante períodos prolongados [57].

En los recién nacidos infectados por vía ic, el virus alcanza altos títulos en cerebro (10^8 DL_{50}/mg) a partir del día +7 que se mantienen hasta la muerte de los animales [56]. Es posible aislar virus a partir de otros órganos luego del día 7º pi. Se detecta viremia en bajo título desde el 3º día pi [56].

El análisis histopatológico del cerebro de los lactantes infectados muestra entre los días 12-15 pi, coroiditis, hiperplasia glial, vasculitis y perivasculitis con infiltrado de células mononucleares [60]. Es posible detectar Ag viral en citoplasma de neuronas corticales y en las paredes de los vasos a partir del 7º día pi.

Existe acuerdo generalizado entre los distintos autores en aceptar que las lesiones observadas en el encéfalo de estos animales y responsables de la mortalidad, serían el producto de una reacción de tipo inmunológico semejante a la descripta en la encefalitis alérgica experimental [60-66]. Para que estas lesiones se manifiesten y los animales no sobrevivan a la infección viral, es necesaria la integridad del sistema T dependiente [60-62].

Luego de los trabajos pioneros con animales timectomizados en los que se obtienen títulos virales semejantes a los controles infectados sin timectomía, pero con sobrevida del 100%, que llamaron la atención sobre el origen inmunopatológico de la enfermedad en este modelo [61], se diseñaron diferentes experiencias que en definitiva concluyeron en la misma afirmación sobre la necesidad de la integridad del sistema timo dependiente para la generación de daños en el SNC.

Los animales tratados con suero antitimocito en diferentes esquemas pueden sobrevivir a la infección o ver prolongada su expectativa de sobrevida, pese a que los títulos virales en cerebro son semejantes a los controles infectados sin tratar [60, 65-66].

La histopatología de los animales timectomizados o tratados con suero antitimocito demuestra la ausencia de las lesiones características que siguen a la inoculación con VJ [60-61]. Esto permite afirmar que no es el virus *per se* el responsable de los daños encontrados en los animales no tratados.

Mas recientemente, con el desarrollo de los ratones atímicos (nude: *nu/nu*) se confirmaron estos hallazgos. En efecto, estos animales no presentan

signos de enfermedad ni mortalidad pese a que los títulos virales son semejantes a los encontrados en sus hermanos eutímicos (*nu/+*; *+/+*), los que siguen los patrones clásicos de la enfermedad [62].

Por otra parte, la inmunosupresión de los ratones infectados con Cy aplicada en determinados esquemas, permite la reducción del daño histológico con la consiguiente sobrevida [63, 67].

Esta serie de hallazgos tomados en su conjunto, permitieron establecer firmemente la naturaleza inmunopatológica del daño en el SNC, el cual se presenta de manera concomitante con la mortalidad. Paralelamente, existe también concordancia en que la respuesta inmune responsable de la mortalidad es del tipo IV de Gell & Combs es decir de hipersensibilidad retardada [63].

En contraste, el ratón adulto es resistente a la inoculación viral no presentando daños en el SNC ni signo clínico alguno, alcanzándose una mortalidad de sólo el 8-10% [58]. En él no es posible detectar virus utilizando métodos convencionales en ningún órgano, ni aún de aquellos pocos animales que mueren [58]. La utilización de técnicas más sensibles permitió detectar la presencia de virus infeccioso en cerebro hasta el día +7 pi, y una viremia fugaz en los días 2 y 4 pi [68]. También se consiguió la detección de virus en bazo en los días 3 y 4 pi, que probablemente sea a consecuencia de la viremia.

Si bien no se presentan daños en el SNC, la infección puede ponerse en evidencia debido a la generación de respuesta humoral. Ésta se desarrolla a partir del día +8 con la presencia de Ac fijadores de complemento [59]. La aparición de Ac neutralizantes (probablemente los más importantes en la resistencia) ocurre también al día +8 pero en títulos muy bajos (1/10) los que posteriormente aumentan hacia los días 20-24 pi llegando a valores de 1/160 [59].

La presencia de virus infeccioso en SNC, junto a la susceptibilidad de los macrófagos peritoneales a la infección viral [69-70], descartan la posibilidad de que estos animales no posean células blanco para la replicación viral. Paralelamente se pudo detectar la generación de células T citotóxicas que preceden a la inmunidad humoral, otro indicador de la presencia de infección viral [59].

Cuando se suministran drogas inmunoupresoras como Cy en esquemas y dosis adecuadas, se consigue fácilmente la obtención de altos índices de mortalidad (90%) [58]. En los animales que mueren se pudo comprobar la presencia de lesiones similares a las halladas en los ratones lactantes y altos títulos virales en cerebro. Paralelamente se observa retraso en la aparición de

Ac neutralizantes. La posterior administración de Ac obtenidos de animales infectados fue capaz de protejer estos ratones tratados pero no de eliminar al virus. Si en cambio se transfieren células esplénicas de animales infectados sin tratar, se obtiene limpieza viral pero sin proteccion. Estos resultados sugieren la activa participación de ambos tipos de respuesta inmune (humoral y celular) en la resistencia a la infección viral [58-59].

Hasta el presente, no existe una explicación adecuada de las causas conducentes a la sobrevida de los ratones adultos a la infección con VJ. Se puede postular que los ratones lactantes serían sensibles por una falla debido a su inmadurez inmunológica en la regulación de la actividad de HR, mientras que el ratón adulto podría poseer mecanismos de regulación más eficientes capaces de protegerlo del daño potencial de este tipo de respuesta inmune hasta la generación de Ac neutralizantes protectores.

De este modo se postula que la respuesta de HR, considerada como la causante de la inmunopatología que lleva a la muerte de los animales, probablemente estaría bajo la regulación de algún sistema capaz de suprimirla en los ratones adultos (resistentes a la infección viral). La búsqueda, caracterización y estudio de su cinética y modo de acción, son los puntos centrales del trabajo experimental aquí presentado. Paralelamente, se describirá un modelo murino adulto naturalmente sensible a la infección viral.

2.5 Breve descripción de los sistemas indicadores de hipersensibilidad retardada (HR) utilizados

Con el propósito de estudiar las posibles alteraciones en la HR inducidas por el virus Junin (VJ), se empleó la respuesta generada hacia Ags no relacionados la que fue utilizada como "sistema indicador" y gran parte del trabajo experimental aquí presentado se basa en su empleo. Se seleccionaron como Ags particulados los eritrocitos xenogeneicos. Los circuitos que éstos inducen en el ratón han sido previamente descriptos y estudiados por diferentes autores, así como el efecto de la administración de Cy [71-78]. Fundamentalmente el Ag que más se empleó fue glóbulos rojos de carnero (GRC).

En el ratón, la administración de altas dosis de GRC (10^8 ó superiores), induce la estimulación de respuesta humoral excluyéndose la respuesta de tipo HR (desviación inmune) [71, 74, 77]. Si se suministran bajas dosis de GRC (10^6 ó inferiores), no se observa respuesta humoral apreciable pero sí buena respuesta de HR 7 días después de la sensibilización [73]. En el modelo 10^8

GRC, se pudo comprobar que la ausencia de respuesta de tipo HR es debida a la activa puesta en marcha de un sistema supresor, que hace su aparición luego del día +3 post-sensibilización (ps), y que estaría compuesto por, al menos, dos células supresoras como pudo determinarse por su sensibilidad diferencial a la Cy [73-74. Por otra parte en el modelo 10^6 GRC se obtiene una cinética de HR, en función del tiempo ps, que indica que a partir de un determinado momento, hace su aparición una población supresora capaz de disminuír, aunque sólo parcialmente, la respuesta de HR [73].

La administración de Cy (200 mg/kg) dos días antes de sensibilizar con 10^8 GRC, produce la eliminación total de la actividad supresora de HR y de la respuesta humoral [78]. Así, en el modelo Cy 200-10^8 GRC, es posible obtener a los 5 días ps una respuesta de HR hacia GRC libre de sus supresoras específicas. Por otra parte, la administración de Cy (50 mg/kg cada dosis) en los días -1,+1,+4, tomando como cero el día de la sensibilización con GRC, produce la depleción parcial de las células supresoras de HR hacia GRC valorándola al día +7 ps (sistema Cy 50-10^8GRC) [74].

En resumen, se puede tener de esta manera, distintos sistemas indicadores de HR diferentes aunque dirigidos hacia el mismo antígeno:

10^6 GRC: Buena respuesta de HR aún en presencia de células supresoras específicas. Valoración: día +7.

10^8 GRC: Ausencia de respuesta HR debido a la activación de circuitos supresores específicos. Util como control negativo de HR. Valoración: día +7.

Cy 200-10^8 GRC: Destrucción de los sistemas supresores de HR específicos. Buena respuesta HR valorada al día +5.

Cy 50-10^8 GRC: Destrucción parcial de los circuitos supresores de HR específicos. Buena respuesta de HR. Valoración: día +7.

Otro sistema que se utilizó fue el disparado contra glóbulos rojos de pollo (GRP). Este Ag sigue vías semejantes a las descriptas para GRC. Sin embargo, cuando ambos Ags son utilizados en forma simultánea no dan reacción cruzada en respuesta de HR [77].

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Animales

3.1.1 Ratones

Cepas murinas empleadas:

BALB/c, BALB/cJ, C3H/HeJ, C57BL todas ellas endocriadas.

Origen de las mismas:

BALB/c: Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Ezeiza, Prov. Bs. Aires.

BALB/cJ y C3H/HeJ: The Jackson Laboratories Inc., Bar Harbour, ME, USA.

C57BL: Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología, Buenos Aires.

Todas estas cepas fueron mantenidas en el bioterio del Departamento de Microbiología, Fac. de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Los animales fueron utilizados a las edades que se especificarán en cada caso.

En los ensayos detallados en los puntos **4.1-4.4**, se utilizaron los ratones BALB/c de la CNEA. Toda otra mención de esta cepa, hace referencia a los BALB/cJ obtenidos de "The Jackson Laboratories".

3.1.2 Conejos

Se utilizaron animales adultos de 2.5 kg de peso de la raza Gigantes de Flandes, los que fueron obtenidos de distintos criaderos comerciales y del bioterio del Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología (Buenos Aires).

3.1.3 Cobayos

Fueron obtenidos de diferentes criaderos comerciales, de un peso entre 250-350g. Se emplearon como dadores de suero fresco el que se utilizó en algunos ensayos como fuente de complemento.

3.1.4 Carnero

Se utilizó un único animal previamente seleccionado por la capacidad de sus glóbulos rojos de inducir buena respuesta de HR en los sistemas utilizados. Este animal fue mantenido en las instalaciones del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA-Castelar).

Los eritrocitos fueron obtenidos por punción venosa (vena yugular) cada veinte días, los que fueron conservados en solución de Alsever con el agregado de antibióticos (penicilina-estreptomicina) a 4ºC. Previamente a su utilización, los glóbulos rojos de carnero (GRC) fueron lavados por centrifugación tres veces en solución salina tamponada (PBS). Luego del último lavado, las células fueron contadas en cámara de Neubauer y ajustada su concentración en PBS según los requerimientos experimentales.

3.1.5 Pollo

Se obtuvieron eritrocitos de un único animal seleccionado por la capacidad de sus células para inducir respuesta HR satisfactoria en el sistema empleado. Animal de origen comercial. La sangre fue mantenida en solución de Alsever libre de antibióticos y usada dentro de los veinte días de su extracción.

3.2 Cultivo de tejidos

3.2.1 Células Vero

Estas células son permisivas a la replicación de VJ, que produce en ellas un efecto citopático característico. Además, en ellas es posible la inducción de placas de lisis debidas a la acción del virus lo que permite su cuantificación por unidades formadoras de placas (UFP).

La línea celular fue mantenida por pasajes semanales en "Minimum Essential Medium" (GIBCO 410-1500) adicionado de 5% suero de ternera (GIBCO) y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 mg/ml).

3.2.2 Células BHK_{21}

Estas células fueron utilizadas en la preparación de microcultivos en tubos Leighton los que, una vez infectados, sirvieron como sustrato en ensayos de titulación de anticuerpos fluorescentes.

Las células fueron mantenidas por pasajes semanales en medio "Minimum Essential Medium-Glasgow BHK_{21}" (GIBCO 410-2100) suplementado con 10% suero fetal bovino (GIBCO) y antibióticos.

3.3 Virus

Se utilizaron las cepas XJ (patógena prototipo) y XJCL3 atenuada para hombre y cobayo, del virus Junin.

Los stocks fueron preparados en cerebro de ratones BALB/c lactantes de 72 hs de vida, los que fueron inoculados por vía ic con 10^3 DL50 de VJ contenidos en 0.02 ml de solución de Hanks' adicionada de 2% suero de ternera y antibióticos. A los 7 días post-infección, se sacrificaron los animales por decapitación dejándose con vida el 10% como control. Los cerebros fueron obtenidos en forma aséptica y conservados a -70 ºC. Una vez confirmado el éxito de la infección por la mortalidad de los controles, se realizó la preparación del stock viral. Para ello, se maceraron los cerebros (10% p/v) en solución de Hanks' con el agregado de suero fetal bovino (2%), y antibióticos. El homogenato fue centrifugado a 10000 rpm a 4ºC durante 1 h, conservándose el sobrenadante alicuotado a -70ºC hasta su utilización.

Los stocks fueron titulados por DL_{50} para ratón lactante, inoculándose 0.02 ml de diluciones de razón $1/10^n$ por vía ic. El título fue estimado por el método de Reed & Muench [79]. Paralelamente, los stocks fueron titulados por UFP, sobre monocapas de células Vero bajo metilcelulosa. Para ello, se inocularon monocapas de células Vero con 0.1 ml de diluciones seriadas del stock viral en PBS de razón $1/10^n$. El virus se dejó adsorber durante 60 min a 37ºC agitándose cada quince minutos y, luego de retirado el inóculo, se agregó medio de cultivo adicionado de 3% suero fetal bovino y 0.8% metilcelulosa. El revelado se efectuó a los 7 días con solución de cristal violeta (0.02%) en 10% formol [80].

3.4 Detección de Anticuerpos anti-VJ

3.4.1 Neutralización

Se siguió la técnica de dilución de suero variable-virus constante. Los sueros fueron diluídos 1/5 en PBS y centrifugados a 10000 rpm durante 1h a 4ºC y luego incubados a 56ºC durante 30 min. Seguidamente, se los diluyó a razón de $1/10^n$ en PBS y se les agregó igual volumen conteniendo 100 UFP de la cepa XJ de VJ [diluído en PBS] y se incubó la mezcla a 37ºC durante una hora. Luego se infectaron monocapas del mismo modo que el descripto en el punto anterior. Se consideró título neutralizante aquella dilución capaz de proteger el 100% de la monocapa.

3.4.2 Inmunofluorescencia

Como Ag se utilizaron preparados de células BHK_{21} infectadas. Para ello, se inocularon microcultivos crecidos en tubos de Leigthon con la cepa XJ de VJ a una multiplicidad de infección (MOI) igual a 1. A las 24 hs los preparados fueron lavados varias veces con PBS y luego fijados en acetona fría durante 10 min. Estos preparados fueron conservados a -20ºC hasta su utilización. Como controles, se prepararon cultivos paralelos que recibieron PBS en lugar de virus.

Los sueros a titular, fueron diluídos 1/5 en PBS y luego incubados a 56ºC durante 30 min. Posteriormente, se efectuaron diluciones de razón $1/2^n$, con las que se cubrieron los preparados durante 30 min a 37ºC en cámara húmeda, luego de sucesivos lavados en PBS, los preparados fueron cubiertos con gammaglobulinas de cabra anti-gammaglobulinas de ratón marcadas con fluoresceína (Dako, Dinamarca) diluído 1/80 durante 30 min a 37ºC. Los preparados fueron lavados exhaustivamente en PBS, luego en agua y posteriormente secados a temperatura ambiente. La observación se efectuó con un microscopio de epiiluminación Zeiss a 400X. Como control positivo se incluyó un suero hiperinmune de ratón anti-VJ obtenido de animales que recibieron 4 inoculaciones de la cepa XJ de VJ (10^5 DL_{50} cada una) a intervalos de 15 días por vía intraperitoneal.

3.5 Detección de virus por co-cultivo

Esta técnica de alta sensibilidad para la detección de virus, fue descripta en 1969 por Horta-Barbosa y col. [81] siendo modificada luego por Gilden y col. [82] y por Carrigan y col. [83]. En el presente estudio se siguió básicamente la técnica descripta para virus Junín por Berría y col. [68].

El principio de la técnica se basa en colocar en estrecho contacto células permisivas a la replicación viral, con el material en el que se desea detectar virus (órganos, tejidos o fluídos) en condiciones adecuadas a la multiplicación viral, de modo que el virus liberado sea amplificado por las células permisivas facilitándose su detección.

La presencia viral se puede detectar por la acción citopatogénica (ACP) sobre las células, por la presencia de Ag viral o por el ensayo del sobrenadante, entre otras alternativas.

En el presente trabajo, se utilizaron como células permisivas las células Vero, que además presentan ACP al ser infectadas con VJ.

Los órganos de los ratones infectados fueron obtenidos en condiciones asépticas, lavados repetidamente en PBS y luego con antibióticos (penicilina-estreptomicina). Posteriormente, se los cortó en pequeños trozos y se los disgregó preservando la integridad celular. La sangre fue obtenida del seno retroorbital sobre heparina, siendo luego diluída en PBS con el agregado de antibióticos. Por otra parte se preparó una suspensión de células Vero ($1x10^6$ células/ml) en MEM adicionado de 5% suero fetal bovino y antibióticos. Se mezclaron volúmenes iguales de células Vero y de cada uno de los tejidos disgregados, para luego sembrarlos en botellas de cultivo de vidrio e incubarlos a 37ºC durante 7 días. En las muestras correspondientes a sangre y cerebro, se procedió al cambio de medio a las 24hs. Los cultivos fueron observados diariamente en busca de ACP y a los 7 días se cosechó el sobrenadante, el que fue ensayado sobre monocapas de células Vero bajo metilcelulosa para la detección de virus por UFP.

3.6 Preparación de antisueros

3.6.1 Suero anti-timocito (anti-Φ)

Se siguió la técnica de Golub [6]. Se efectuaron en conejos adultos dos inoculaciones por vía subcutánea separadas quince días entre sí, de macerado al 10% (p/v) de cerebro proveniente de ratones BALB/c adultos normales emulsionado con un volúmen igual de adyuvante completo de Freund. Los animales fueron sangrados 7 días después de la última inoculación.

Los sueros fueron decomplementados a 56ºC durante 30 min y luego adsorbidos con glóbulos rojos y con polvo de hígado de ratón BALB/c adulto. Los glóbulos rojos fueron obtenidos a partir de sangre periférica y el polvo de hígado fue preparado a partir de 25 órganos macerados en solución fisiológica a los que luego se les agregó 400 ml de acetona, el residuo fue lavado con

acetona y secado por evaporación a 37ºC. La adsorción del suero se efectuó durante 1 h a temperatura ambiente con los glóbulos rojos y posteriormente con 100 mg de polvo de hígado durante una noche a 4ºC con agitación constante. Luego de este proceso, el suero fue centrifugado a 10000 rpm durante 1h a 4 ºC y el sobrenadante se conservó, en alícuotas, a -20ºC hasta su utilización.

El suero fue titulado por citotoxicidad sobre una suspensión de timocitos de ratón BALB/c lactante (10^6 cél/ml) agregándose partes iguales del suero a titular diluído a razón $1/2^n$ y 0.1 ml de suero fresco de cobayo como fuente de complemento. Las mezclas se incubaron una hora a 37ºC y la viabilidad se ensayó por el método de exclusión de azul tripán.

3.6.2 Suero anti-gammaglobulinas de ratón

Las gammaglobulinas de ratón fueron obtenidas a partir de suero de ratones BALB/c adultos normales, al que se le agregó lentamente un volumen igual de solución saturada y neutralizada de sulfato de amonio bajo agitación constante. El precipitado fue recuperado por centrifugación a 10000 rpm durante 30 min y resupendido en agua destilada para reprecipitarlo con sulfato de amonio. El precipitado fue dializado contra PBS durante 48 hs con varios cambios y luego fue valorado el contenido proteico mediante la técnica de Lowry [84].

Se inocularon conejos adultos con 500 µg de gammaglobulina de ratón emulsionada en 2 ml de adyuvante completo de Freund por vía intramuscular. A los quince días, se les aplicó una segunda dosis en las mismas condiciones, sangrándose a blanco a los animales 15 días después. El suero fue conservado a -20ºC hasta su utilización.

El suero fue titulado por citotoxicidad contra células B. Para ello, se obtuvieron esplenocitos de ratones BALB/c adultos normales, los que fueron liberados de glóbulos rojos por shock hipotónico (PBS diluído 1/5 durante 15 seg). Posteriormente, se realizó el ensayo de citotoxicidad en forma similar a la descripta para el suero anti-Ø.

3.7 Determinación del porcentaje de linfocitos T y B en las poblaciones celulares esplénicas.

Los esplenocitos fueron obtenidos mediante el disgregado de los bazos sobre malla de acero inoxidable en solución de Hanks'. Luego de efectuar 3 lavados en la misma solución, se resuspendieron en PBS diluído 1/5 para eliminar glóbulos rojos durante 15 seg y luego se restauró la tonicidad. La

suspensión así obtenida fue centrifugada a 1000 rpm durante 10 min y el pellet fue resuspendido en glucosa y sorbitol, pasándose las células por una columna de algodón flojo en pipetas Pasteur siliconadas para remover las células muertas.

Los esplenocitos (viabilidad no menor a 98%) fueron lavados sucesivas veces en PBS y ajustados a una concentración de 10^6 cél/ml con el agregado de azida sódica (0.1%). En tubos Eppendorf, se sembraron alícuotas de 0.1 ml, se los centrifugó y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 0.1 ml de la dilución adecuada de suero anti-Ø ó anti-gammaglobulinas de ratón, como control se trató una alícuota de cada suspensión a ensayar con igual dilución de suero normal de conejo. Luego de incubar 30 min a 4ºC se centrifugó y eliminó el suero, lavándose por centrifugación tres veces con 0.5 ml de PBS con azida sódica (0.1%). El pellet del último lavado, fue resuspendido en 0.1 ml de una dilución adecuada (1/80) de gammablobulinas de cabra anti-gammaglobulinas de conejo marcadas con fluoresceína (Dako, Dinamarca), incubándose la suspensión a 4ºC por 30 min. Transcurrido ese lapso, se lavaron las células tres veces con 0.5 ml de PBS con azida sódica, manteniéndose las suspensiones en hielo hasta su observación. El recuento de células fluorescentes fue efectuado en un microscopio Zeiss de epiiluminación a 400X. En cada preparado se contaron, al menos, 300 células.

3.8 Origen de reactivos inmunológicos comerciales

3.8.1 Anticuerpos monoclonales (AcMn)

Se obtuvieron AcMn de origen comercial según detalle:

anti-Thy 1.2: New England Nuclear (Boston, MA, USA), NEI-001. IgM de ratón en líquido ascítico.

anti- Lyt 1.2: del mismo origen, NEI-017. IgG2b de ratón en líquido ascítico.

anti-Lyt 2.2: del mismo origen, NEI-006. IgM de ratón en líquido ascítico.

anti-L3T4: Cedarlane Laboratories Ltd. (Ontario, Canadá), CL 012A Clon YTS 191.1. Monoclonal de rata en líquido ascítico.

3.8.2 Aloantisuero.

anti-IJ^k: Cedarlane, CL8703. Obtenido mediante inmunización de ratones B10.A(3R) con células de ratones B10.A(5R). Fluído ascítico.

3.8.3 Complemento de conejo.

Low-Tox M rabbit Complement: Cedarlane, CL3051. Suero total de conejos seleccionados por su alta actividad de complemento y baja toxicidad para células murinas.

3.8.4 Medio para ensayos de citotoxicidad

Cedarlane Cytotoxicity Medium: Cedarlane, CL95100. RPMI 1640 adicionado con 25 mM HEPES y 0.3% albúmina bovina seleccionada por su baja toxicidad para células murinas.

3.9 Obtención y tratamiento de células esplénicas

Las células esplénicas fueron obtenidas a partir de ratones sensibilizados de acuerdo al diseño experimental de cada ensayo, mediante la disgregación de los bazos sobre mallas de acero inoxidable en medio de cultivo (GIBCO 410-1500). Luego de eliminar restos de tejido por pasaje a través de una red de nailon, se realizaron tres lavados en el mismo medio. Luego se contaron las células nucleadas y se valoró la viabilidad por ensayo con azul tripan, ajustándose la concentración según las necesidades experimentales.

3.9.1 Depleción de diferentes poblaciones celulares

3.9.1.1 Por técnicas de adherencia

Con el propósito de eliminar células adherentes en determinados diseños experimentales, se siguió la técnica de Mizushima y col. [85]. Para ello, las células esplénicas fueron sembradas sobre placas de Petri plásticas (Falcon, USA) incubándose 1 h a 37ºC. Posteriormente se recuperaron, las células no adherentes por sucesivos lavados con medio de cultivo y luego las células adherentes por tratamiento con una solución de etilen diamino tetra acetato

disódico (EDTA). Posteriormente, las células fueron lavadas y manipuladas a 4ºC sobre material siliconado.

3.9.1.2 Por depleción con antisueros convencionales

Se utilizaron los antisueros hechos en conejo anti-Ø y anti-gammaglobulinas de ratón. La suspensión de células esplénicas ajustada a 10^8 células nucleadas/ml, fue tratada con igual volumen de suero anti-timocito diluído 1/10 o de suero anti-gammaglobulinas de ratón diluído 1/4. A la mezcla se le agregó un volumen igual de suero fresco de cobayo como fuente de complemento y se incubó 1 h a 37ºC. Luego de la incubación se controló la acción lítica de los sueros y se lavaron las células con medio de cultivo tres veces. La concentración de células viables fue ajustada según el requerimiento experimental.

3.9.1.3 Por depleción con aloantisuero

Los ensayos que involucran la utilización del suero anti-IJ^k fueron realizados sobre 10^7 células esplénicas obtenidas y lavadas en "Cytotoxicity Medium" en un volumen final de 1 ml. Las células fueron incubadas 30 minutos con el suero diluído 1/5 a 4ºC, y luego de lavar con el mismo medio se los trató con "Low-Tox M Rabbit Complement" a dilución final 1/4 durante 1h a 37ºC. La suspensión luego fue lavada en el mismo medio tres veces y se valoró la viabilidad, ajustándose la concetración según requerimiento.

3.9.1.4 Por depleción con AcMn

En estos ensayos, se utilizó "Cytotoxicity Medium" para la obtención y lavado de las células. Se incubaron 10^8 células esplénicas, con una dilución final 1/400-1/1000 del anticuerpo a utilizar a 4ºC durante 1h. Luego se lavaron tres veces las células y se resuspendieron en "Low -Tox M Rabbit Complement" diluído 1/10, incubándose a 37ºC durante 1h. Posteriormente se lavaron las células tres veces en medio y se valoró la viabilidad ajustándose la concentración según los requerimientos.

3.10 Transferencia pasiva de células sensibilizadas

Las células a ser transferidas fueron ajustadas en su concentración de tal modo que el volumen a inyectar fuera de 0.2 ml (0.5 ml en los casos de cotransferencia que involucraran más de tres tipos de dadores diferentes).

La transferencia de células fue realizada siempre por vía intravenosa, utilizándose la vena caudal en los ratones BALB/c y la vía retroorbital en los C3H/HeJ. La utilización de estas vías alternativas demostró no tener influencia en el comportamiento de las células transferidas.

3.11 Determinación de Células Formadoras de Ac (CFA) hacia GRC

Con el objeto de evaluar la acción del virus sobre la respuesta humoral, se estudiaron las posibles alteraciones inducidas en la generación de células productoras de Ac en bazo. Para ello, se sensibilizaron animales con 10^8 GRC (dosis óptima para la producción de Ac) los cuales fueron infectados con VJ en diferentes esquemas.

Se siguió la técnica de Cunningham para la evaluación de placas directas (células productoras de IgM). Los bazos extraídos asépticamente fueron disgregados sobre mallas de acero inoxidable en MEM adicionado de 25 mM HEPES, lavándose posteriormente las células y lisándose los glóbulos rojos mediante shock hipotónico según se describió en el punto **3.7**. Luego de tres lavados, se ajustó la concentración de células viables a 4.2×10^6/ml, resuspendiéndolas en medio conteniendo gelatina al 0.5%. Luego se realizó una mezcla de 150 µl de la suspensión celular, 20 µl de GRC (lavados) al 20% y 40 µl de suero fresco de cobayo como fuente de complemento, de la que se sembraron 50 µl en cámaras construídas con portaobjetos, de manera de formar una delgada monocapa celular. Estas cámaras fueron selladas con parafina y se las incubó a 37ºC hasta el desarrollo de placas de lisis (aproximadamente 15-30 min) provenientes de la reacción de IgM anti-GRC (liberada de las células sensibilizadas) en presencia de complemento. Luego las placas de lisis fueron contadas bajo lupa, y los valores obtenidos fueron expresados como CFA por 10^7 células esplénicas.

3.12 Cuantificación de la respuesta de HR por el método del *Swelling Test*

3.12.1 Hacia glóbulos rojos xenogeneicos

Se utilizaron tres sistemas diferentes de HR dirigida hacia eritrocitos xenogeneicos.

#I: Inducción de HR debido a la administración de bajas dosis de GRC (subóptimas para generación de respuesta humoral) [73]. Se administraron $1x10^6$ GRC lavados tres veces en PBS, por vía intraperitoneal en un volumen de 0.2 ml (día cero). A los 7 días, los animales fueron desafiados con $1x10^8$ GRC contenidos en un volumen de 0.05 ml por vía subcutánea en la almohadilla plantar de la pata trasera izquierda (día +7). Veinticuatro horas más tarde, se valoró la hinchazón de la pata descargada respecto de la medida previa a la descarga o respecto a la pata sin descargar mediante la utilización de un calibre manual de ingeniería (Oditest®, H.C. Köplin, Schlüchtern-Hessen, Alemania Federal), calibrado a 0.05 mm. El porcentaje de incremento fue estimado según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de incremento} = \frac{\text{Medida pata descargada X 100}}{\text{Medida previa}} - 100$$

II. Inducción de HR hacia altas dosis de GRC con depleción simultánea de células T supresoras específicas mediante pretratamiento con altas dosis de Cy [18]. Para ello, los animales recibieron, por vía intraperitoneal, 200 mg/kg de peso corporal de Cy preparada inmediatamente antes de su utilización. Dos días más tarde, se les inyectó $1x10^8$ GRC contenidos en 0.2 ml por la misma vía y, 5 días más tarde los animales fueron desafiados y valorada la hinchazón de la pata en la misma forma descripta en I.

III. Inducción de HR hacia altas dosis de GRC con la aplicación simultánea de esquemas fraccionados de Cy [73-74]. Los animales recibieron $1x10^8$ GRC por vía intraperitoneal en el día cero. Paralelamente, recibieron en forma parcial o completa un esquema fraccionado de administración de Cy (50 mg/kg cada dosis) aplicado en los días -1, +1, +4. Mediante este esquema de la droga inmunosupresora se obtiene la depleción de ciertas células supresoras de HR. La descarga se efectuó a los 7 días de la sensibilización con $1x10^8$ GRC y se valoró la HR del mismo modo que en los casos anteriores.

En todos los casos se utilizó como control negativo de HR animales que fueron sensibilizados con $1x10^8$ GRC al día cero y descargados en los mismos tiempos que en los distintos esquemas sin recibir otro tratamiento.

En el caso de los GRP, se siguieron los esquemas I y II.

3.12.2 Hacia DNFB

Este hapteno fue aplicado por vía epicutánea. Los animales recibieron sobre su abdomen previamente rasurado, 50 µl de una solución de DNFB 0.5% (p/v) en 4 : 1 acetona : aceite de oliva (v/v), dándose dos dosis, la primera al día cero y la segunda al día siguiente. La descarga se efectuó sobre la cara externa de la oreja derecha al día +4 aplicándose 5 µl de DNFB al 0.25% en el mismo solvente, midiéndose la hinchazón de la oreja 24 hs más tarde. Como control negativo se utilizaron animales que sólo recibieron la dosis desencadenante.

La hinchazón se expresó directamente como la diferencia (en µm) entre la hinchazón registrada en los grupos experimentales respecto de los controles sin sensibilizar.

3.13 Estudios histológicos.

Los encéfalos completos de los animales infectados fueron fijados por 12 h en metanol adicionado de 5% ácido acético glacial a -20ºC. Luego deshidratados con concentraciones crecientes de etanol, clarificados en xileno y embebidos en parafina. Posteriormente, se efectuaron secciones coronales las que fueron teñidas con hemalumbre de Mayer-eosina.

3.14 Análisis estadístico.

Se utilizó la prueba t de Student.

4. RESULTADOS

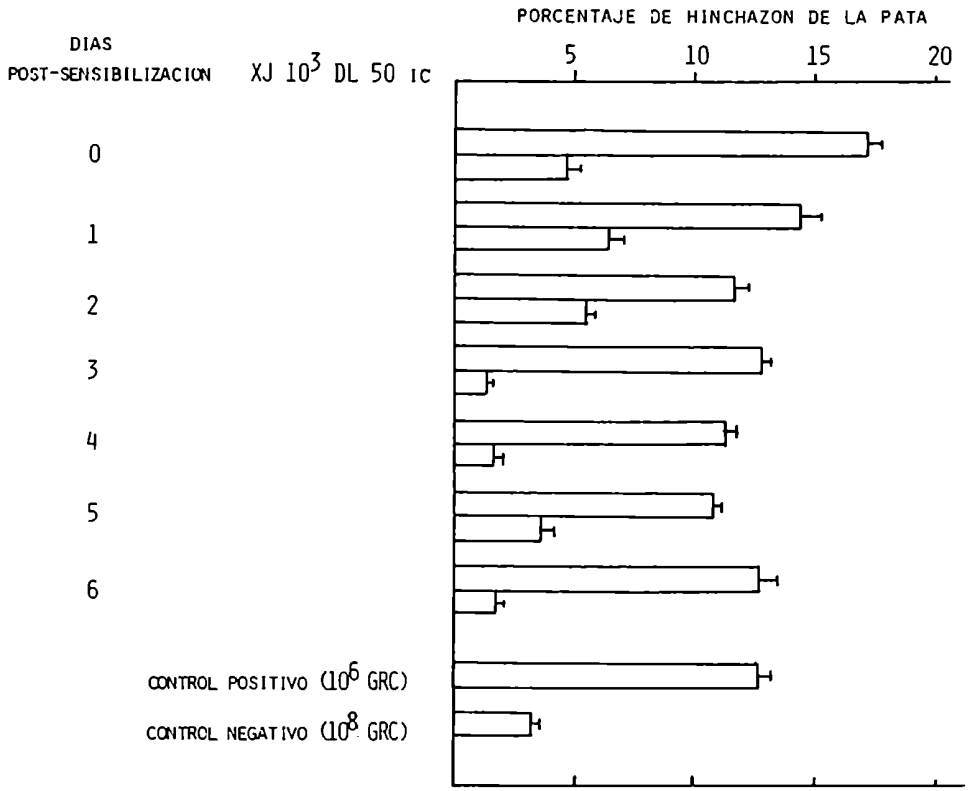
4.1 Efecto de la infección viral sobre la reacción de HR inducida con 10^6 GRC

Los animales fueron sensibilizados con 10^6 GRC e inoculados con VJ cepa XJ ó XJCL3 (10^3 DL_{50}) por vía ic en distintos momentos de la reacción inmune (desde el día -3 hasta +6 ps). En todos los casos, la respuesta de HR fue deprimida independientemente del momento de la infección con respecto al de la sensibilización con GRC (Figs 1 y 2). La administración, como control, de macerado de cerebro de ratones lactantes normales tratados y diluídos en la misma forma que el stock viral no modificó la respuesta de HR (Fig 1). La supresión fue altamente significativa (P <0.001) tanto respecto de los controles positivos (10^6 GRC) como respecto a los controles inoculados con macerados normales. La supresión obtenida luego de la inoculación viral es similar a la observada en los animales sensibilizados con 10^8 GRC,.dosis a la que se disparan células supresoras de HR específicas de GRC [73-74], siendo entonces la mínima expresión de HR de este sistema. Por lo tanto, VJ puede deprimir prácticamente en un 100% una respuesta de HR hacia GRC totalmente establecida.

Cuando los animales fueron inoculados previamente a la sensibilización antigénica, la supresión inducida alcanzó los mismos valores que cuando la infección fue efectuada al mismo tiempo que la sensibilización antigénica o con posterioridad a ella. En la Fig 2 se puede apreciar que los niveles de HR observados son similares o aún inferiores a los que se inducen mediante la aplicación de 10^8 GRC. En este experimento se incluyeron animales que fueron inoculados ic con la cepa XJCL3 de VJ (10^3 DL_{50}) y la supresión alcanzó valores semejantes a los observados con la cepa prototipo XJ. Resultados similares se observaron cuando la inoculación con la cepa XJCL3 tuvo lugar 5 días antes que la sensibilización con GRC.

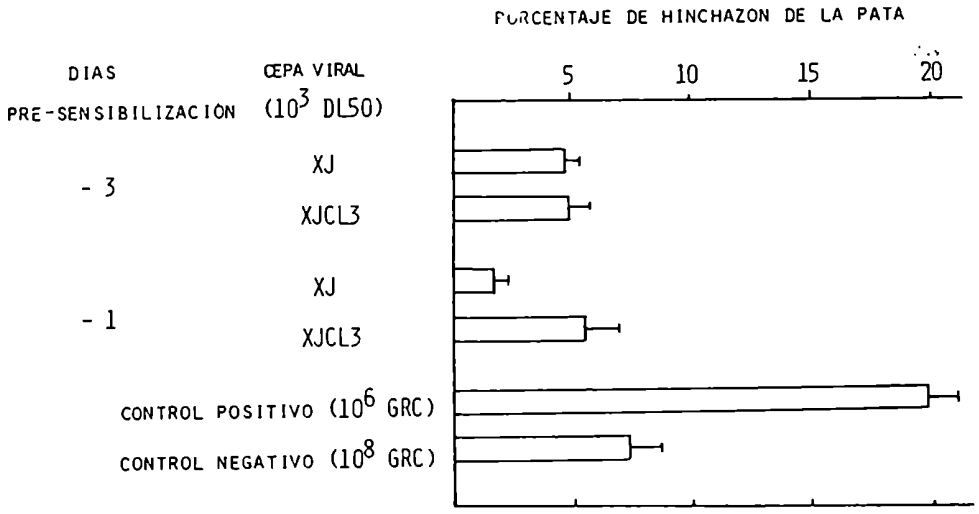
Por otra parte, se pudo comprobar que la inoculación subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal de la cepa XJ (10^3 DL_{50}) 24h antes o después de la sensibilización con 10^6 GRC induce similares resultados a los obtenidos mediante la utilización de la vía ic.

Figura 1



Se inocularon ratones BALB/c adultos (60-90 días de vida) con VJ (10^3 DL_{50} cepa XJ ic) en los días indicados. Los animales fueron sensibilizados con 10^6 GRC por vía ip en el día 0 (cero). La descarga fue efectuada con 10^8 GRC por vía intradermoplantar a los 7 días post-sensibilización (ps). La lectura fue efectuada 24 hs más tarde. Los resultados se expresan como el porcentaje de hinchazón registrado respecto a la lectura previa a la descarga. Como control negativo de HR se agregó un grupo de animales sensibilizados con 10^8 GRC en el día cero. Cada grupo está compuesto por, al menos 5 animales. En todos los casos se encontró $P<0.001$ entre los grupos infectados (+) y los controles inoculados con cerebro de ratón normal diluído en la misma forma que el stock viral (-), ó de los controles sin inocular (control positivo).

Figura 2



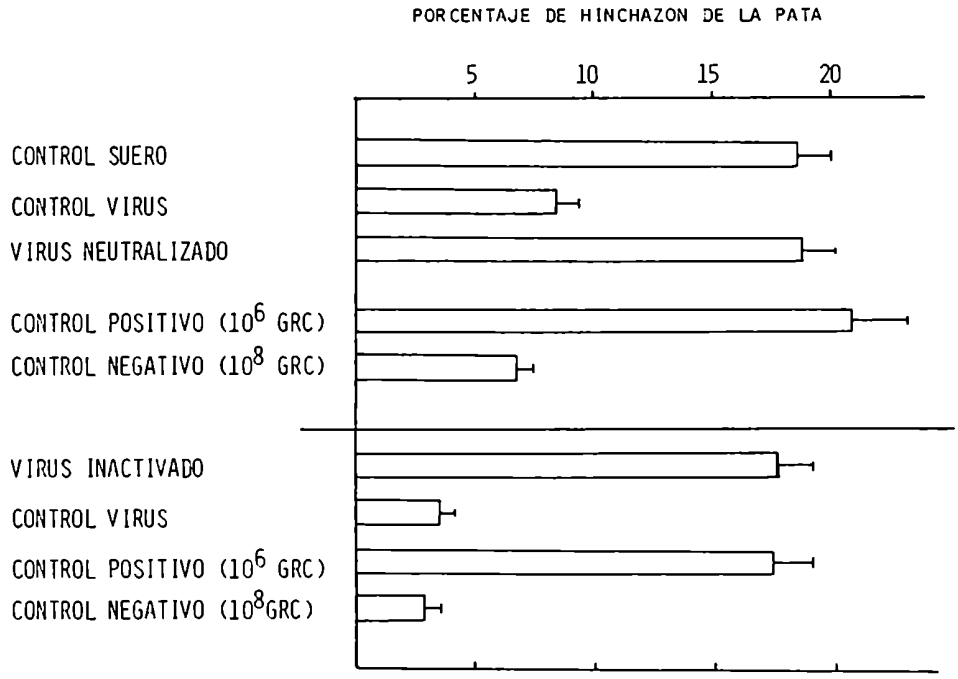
Similar a la figura anterior, pero los animales fueron inoculados ya sea con la cepa XJ ó XJCL3 en los días -3 ó -1 ps. En todos los casos, se encontró P<0.001 respecto del control positivo. Al menos 5 animales en cada grupo.

4.2 Dependencia de la dosis viral y requerimiento de virus infeccioso

Dado que la supresión inducida por la infección viral se manifiesta en forma independiente del momento de inoculación respecto al de sensibilización, se eligió el día +5 post-sensibilización para evitar en la mayor medida posible la multiplicación viral.

Se realizaron ensayos de neutralización con suero humano proveniente de un convalesciente de FHA. Como se puede observar en la Fig 3, no se detectó supresión en los animales inoculados con virus neutralizado, lo cual contrasta con una supresión cercana al 100% en el grupo control que recibió 50 DL_{50} de la cepa XJ de VJ. Por otra parte, la inactivación térmica del agente infeccioso mediante preincubación a 56ºC durante 30 min determina la desaparición del efecto supresor sobre la reacción de HR, sugiriendo el requerimiento por virus activo y no la acción de algún Ag en particular.

Figura 3

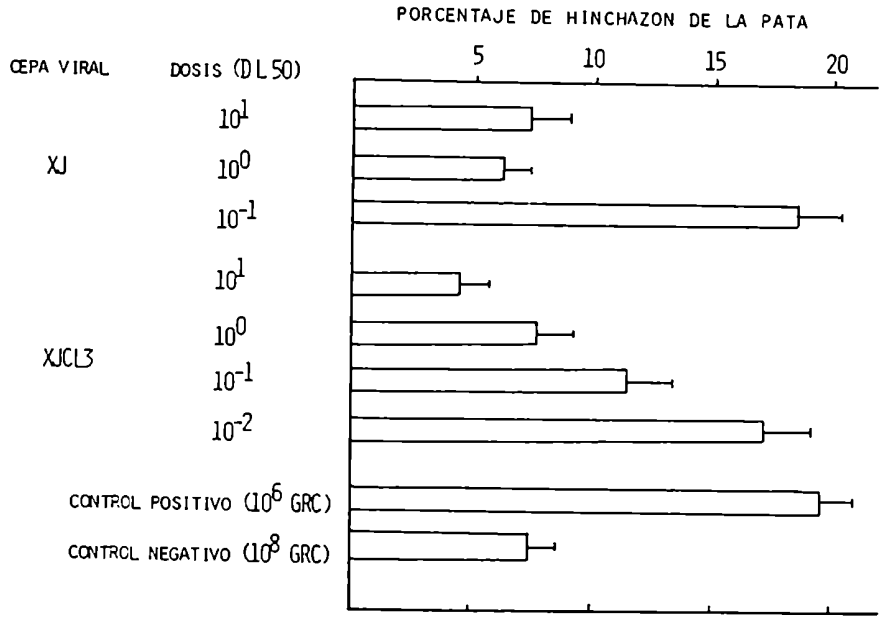


Requerimientos virales para inducir supresión. Se inocularon al día +5 ps ratones sensibilizados con 10^6 GRC con virus neutralizado (50 DL_{50} cepa XJ incubado 1 hora a 37ºC con una dilución 1/10 de suero humano inmune) ó con virus inactivado por tratamiento térmico (10^3 DL_{50} cepa XJ incubado a 56ºC durante 30 min). Cada grupo se compone de, al menos 5 animales. La significación estadística fue en ambos casos: control virus: $P<0.001$ respecto del control positivo y de los grupos experimentales. Los grupos "virus neutralizado" y "virus inactivado" no presentaron diferencias significativas respecto de los controles positivos.

Con el propósito de determinar los requerimientos cuantitativos de partículas virales para inducir el efecto supresor, se efectuaron diluciones seriadas de factor $1/10^n$ de cada cepa viral, las que fueron inoculadas ic en ratones sensibilizados con 10^6 GRC 5 días antes. De los resultados expuestos en la Fig. 4 surge que la supresión desaparece cuando se inyectan 10^{-1} DL_{50} de la cepa XJ. En el caso de la cepa XJCL3 el efecto decae en forma escalonada y desaparece con 10^{-2} DL_{50}. En estas dosis finales, se puede estimar que contienen menos de una UFP. A este respecto, se puede sugerir que la cuantificación de las partículas infecciosas por el método convencional de plaqueo en células Vero bajo metilcelulosa, podría subestimar el número total de partículas presentes. Esta explicación encuentra sustento en el

requerimiento por virus activo e infeccioso para obtener la supresión de la respuesta de HR.

Figura 4



Se ensayaron distintas dosis de VJ (ambas cepas), inoculadas por vía ic al 5º día ps. Los valores de P encontrados fueron XJ 10^0 DL_{50}: $P<0.001$; XJCL3 10^{-1} DL_{50} $P<0.01$. Al menos 5 animales en cada grupo.

4.3 Acción del virus en la respuesta inmune de tipo humoral

Con el propósito de establecer si la inoculación de VJ inducía también alteraciones en la respuesta inmune humoral, diferentes grupos de ratones fueron sensibilizados, en este caso con 10^8 GRC para desencadenar una buena respuesta humoral. Estos animales se infectaron por distintas vías y en diferentes momentos respecto de la administración de GRC. La respuesta humoral se valoró por el número de células formadoras de Ac (CFA) a los 4 días post-sensibilización.

De los resultados expuestos en la Tabla I surge que la inoculación de VJ, en las condiciones experimentales realizadas, induce un incremento significativo de CFA independientemente del momento y de la vía utilizada para la infección.

TABLA I: Efecto de la infección con XJ por distintas vías y diferentes momentos sobre la capacidad de respuesta inmune humoral

Día de infección*	vía	CFA/10^7 células esplénicas	significación estadística
—	—	8036,4±1420	—
+1	ip	15273,6±1492	P<0.01
	ic	15557,2±1890	P<0.01
-1	ip	18914,4±2078	P<0.001
	ic	13031,4±1425	P<0.05

* Los animales recibieron 10^3 DL_{50} de la cepa XJ por la vía indicada.
CFA = células formadoras de anticuerpos.
En todos los casos, los animales recibieron 10^8 GRC ip en el día cero y el ensayo se realizó el día +4. Los valores representan la media aritmética entre dos ensayos independientes realizados con tres ratones cada uno.

4.4 Acción del virus sobre el sistema inmunocompetente del ratón adulto

En el cobayo el virus es capaz de inducir inmunosupresión. Ésta ha sido asociada con la destrucción del sistema inmunocompetente, lo cual modifica marcadamente la fórmula sanguínea [86]. Con el propósito de analizar esta posibilidad en el modelo murino, se tomaron animales infectados por vía ic con 10^3 DL_{50} de la cepa XJ y, a distintos tiempos pi (desde +3 a +20 pi), se les efectuó recuento y fórmula sanguínea. De los resultados expuestos en la Tabla II, surge que el virus no parecería producir destrucción de células linfoides, dada la ausencia de linfopenia o leucopenia; no observándose, además, la presencia de células alteradas o debris celulares. Las alteraciones observadas en el día +3 podrían ser debidas al proceso inflamatorio.

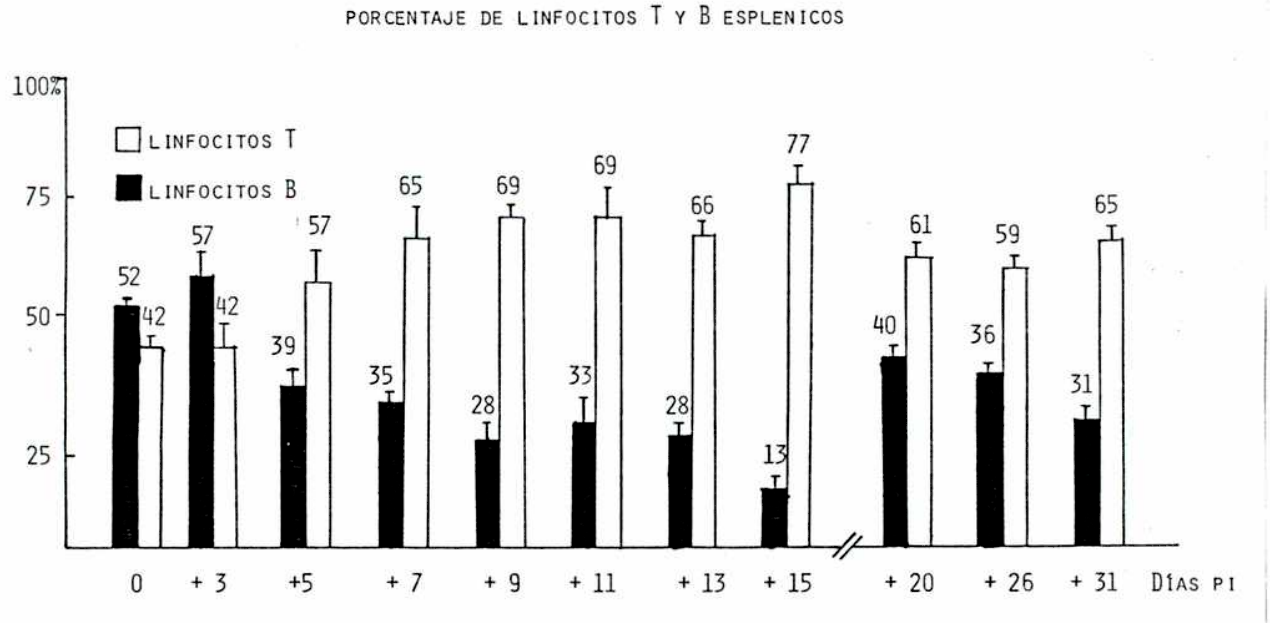
El estudio del porcentaje de linfocitos T y B esplénicos, de los ratones infectados, mostró un creciente desbalance en la relación T/B con marcado incremento de poblaciones T (Fig. 5), sugiriendo tal vez algún papel en el efecto supresor inducido por el virus.

TABLA II: Recuento y fórmula sanguínea a diferentes tiempos pi

Días pi	Leucocitos (x $10^3/mm^3$)	Neutrófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)
Normal	11.6±1.00	22.25±3.30	74.75±3.70	3.00±0.40	0
+3	9.8±0.98	44.00±3.24	50.00±3.51	3.75±0.47	0.25±0.25
+5	19.2±3.14	29.00±8.00	67.33±7.66	4.25±0.47	0
+7	11.1±0,41	30.00±3.00	68.00±8.99	1.33±0.33	0.33±0.33
+9	10.7±0.55	32.00±8.18	66.00±7.76	1.66±0.33	0
+15	10.1±2.59	13.25±0.75	85.00±0.70	1.75±0.47	0
+20	11.6±1.23	17.66±1.85	81.00±2.51	1.33±0.66	0

Por lo menos fueron utilizados tres animales para cada punto. La sangre fue obtenida del seno retro-orbital. Los animales recibieron 10^3 DL_{50} ic de VJ (cepa XJ). Los valores se expresan como X±1 desvío estandard.

Figura 5



Se inocularon distintos lotes de animales por vía ic con 10^3 DL_{50} de la cepa XJ y en los días indicados fueron sacrificados realizándose determinación de las poblaciones linfoides esplénicas mediante inmunofluorescencia indirecta. Cada punto contiene los resultados de, al menos, 3 animales.

Los resultados hasta aquí expuestos describen el modelo básico sobre el que se fundamenta el posterior trabajo experimental, motivo por el cual se realizarán algunas precisiones generales:

#Se demuestra una inmunosupresión significativa de la respuesta de HR inducida por VJ en la etapa aguda de la infección experimental del ratón adulto. El efecto resultó ser independiente del momento de inoculación respecto de la sensibilización con GRC. En todos los casos, la respuesta de HR fue totalmente deprimida independientemente de la atenuación de la cepa viral ensayada y de la vía de inoculación seguida.

#En contraste con el cobayo, donde la inoculación de las cepas atenuadas de VJ no induce inmunosupresión mientras que la cepa XJ produce la destrucción de las células inmunocompetentes y por lo tanto una inmunosupresión generalizada, en el ratón adulto no se observó esta variación respecto de la cepa viral empleada ni tampoco se pudo detectar destrucción de células linfoides. Es de destacar que, hasta el presente, no se ha podido demostrar que VJ sea capaz de infectar linfocitos de ratón adulto.

#El hecho que para la depresión de la respuesta de HR se requiera virus infeccioso, sugiere que éste juega un papel activo y que no se trataría sólo de algún determinante antigénico en particular.

#La inoculación de VJ 24 hs antes del desafío con GRC, indujo la supresión de la respuesta de HR, lo cual indica que es capaz de actuar sobre la rama eferente de una reacción de HR totalmente establecida. Cuando la inoculación se realiza previo a la sensibilización con GRC, la respuesta de HR también está deprimida pero en este caso queda por determinar cuál es la rama afectada.

#Es de destacar que el virus induce una supresión de la respuesta de HR que perdura más allá del momento en que la eliminación del agente se completa. En efecto, por la utilización de técnicas de alta sensibilidad como el cocultivo con células permisivas, se comprobó que VJ es eliminado completamente luego del día +7 pi cuando se lo inocula ic en ratones BALB/c adultos [68]; mientras que aquí se pudo comprobar la presencia de supresión 10 días después de la inoculación.

#La posibilidad de que el virus pueda actuar alterando de alguna manera el normal procesamiento del Ag por los macrófagos, puede ser descartada debido a que la inoculación previa a la sensibilización con GRC (ambas por vía intraperitoneal), no deprime la respuesta de CFA, contrastando así con lo

observado por otros autores en la infección con adenovirus [87], entre otros modelos [88].

#Los compartimentos B no han sido alterados, dado que se obtuvo respuesta CFA altamente satisfactoria contra GRC y, por otra parte, la presencia de respuesta humoral anti-VJ es un hecho ampliamente demostrado en los ratones infectados [58-59]

#El incremento del porcentaje de células T esplénicas, podría estar relacionado con el "clearance" viral, de hecho una de las poblaciones involucradas en este fenómeno, los linfocitos T con actividad citotóxica, han sido detectados en los ratones adultos infectados [59].

#Teniendo en cuenta que el procesamiento antigénico difícilmente pueda estar alterado y dado que la respuesta de HR está aún deprimida cuando se completó la limpieza viral, observándose fuerte incremento en el porcentaje de células T esplénicas, se podría sugerir que se inducen determinadas poblaciones T con capacidad supresora de la actividad HR. Además, los circuitos supresores para las respuestas celulares y humorales hacia GRC son diferentes, lo cual sugiere una diferente base celular para la acción de VJ.

#Los hallazgos hasta aquí descriptos utilizando GRC, son consistentes con la respuesta anti-VJ del ratón adulto tanto en los aspectos humorales como en la respuesta de HR. Sugiriendo entonces, que el modelo GRC podría ser de utilidad en el estudio de los eventos responsables de la sobrevida del ratón adulto a la infección.

4.5 Relación de la actividad supresora con poblaciones celulares

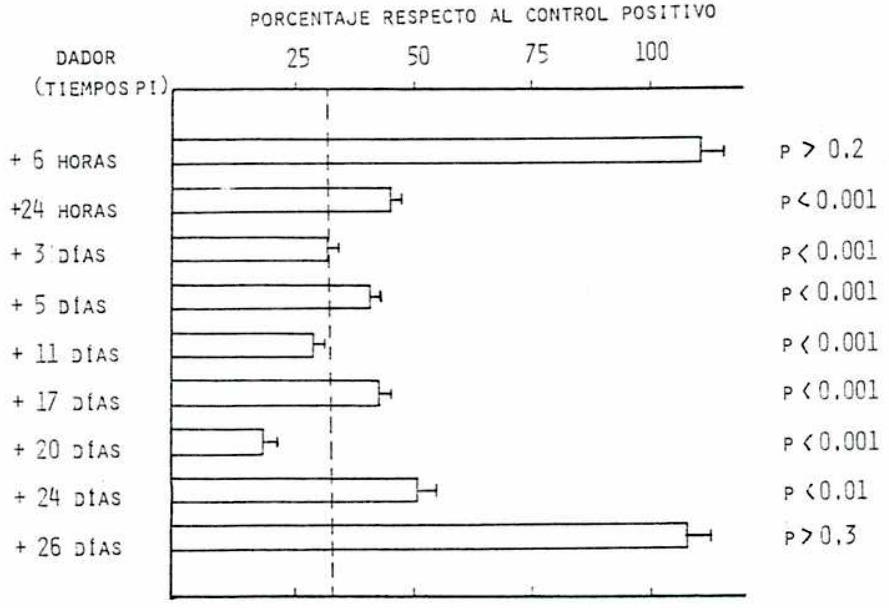
Una vez establecido el modelo experimental, se realizaron ensayos tendientes a analizar el mecanismo por el cual el virus empleado podría ejercer la supresión de la respuesta de HR.

Se decidió establecer si la actividad supresora estaba relacionada con alguna población celular y por lo tanto, si resultaba transferible.

Para ello un total de $80x10^6$ células esplénicas provenientes de ratones adultos obtenidas a diferentes tiempos pi (desde 6 h hasta 26 días) fueron transferidas a ratones isogénicos sensibilizados 7 días antes con 10^6 GRC ip. En todos los ensayos, se agregó como control negativo un lote de ratones sensibilizados por la misma vía con 10^8 GRC.

En la Fig 6 se detallan los resultados obtenidos, los que indican que la supresión fue transferible por células esplénicas obtenidas a partir del día posterior a la infección y hasta los 24 días pi. Es importante recordar que, aún por técnicas tan sensibles como el cocultivo, no es posible rescatar virus de bazo de los animales infectados por vía ic a partir del 5º día pi, y a partir del día +7 de ningún órgano [68]. Por lo tanto, difícilmente pueda atribuírse la supresión observada, a la presencia de virus en las células transferidas.

Figura 6



Se transfirieron $80x10^6$ células viables obtenidas a distintos tiempos pi de ratones infectados con 10^3 DL_{50} de la cepa XJ por vía ic, a ratones sensibilizados 7 días antes con 10^6 GRC. Estos ensayos se realizaron en diferentes oportunidades experimentándose distintos tiempos pi en cada caso. Por este motivo, los resultados se expresan como porcentaje respecto de sus correspondientes controles positivos los que se tomaron como 100%. Los valores de los controles positivos variaron entre 16.19% y 25.32% de hinchazón. La línea punteada indica el valor medio de los controles negativos. Los valores de P se indican en cada caso y se refieren respecto a cada control positivo. Al menos 5 ratones en cada grupo experimental.

4.5.1 Determinación del número mínimo de células requeridas

Habiendo demostrado la naturaleza celular de la supresión, se tomaron los días +5 y +11 pi, como temprano y tardío respectivamente para continuar los

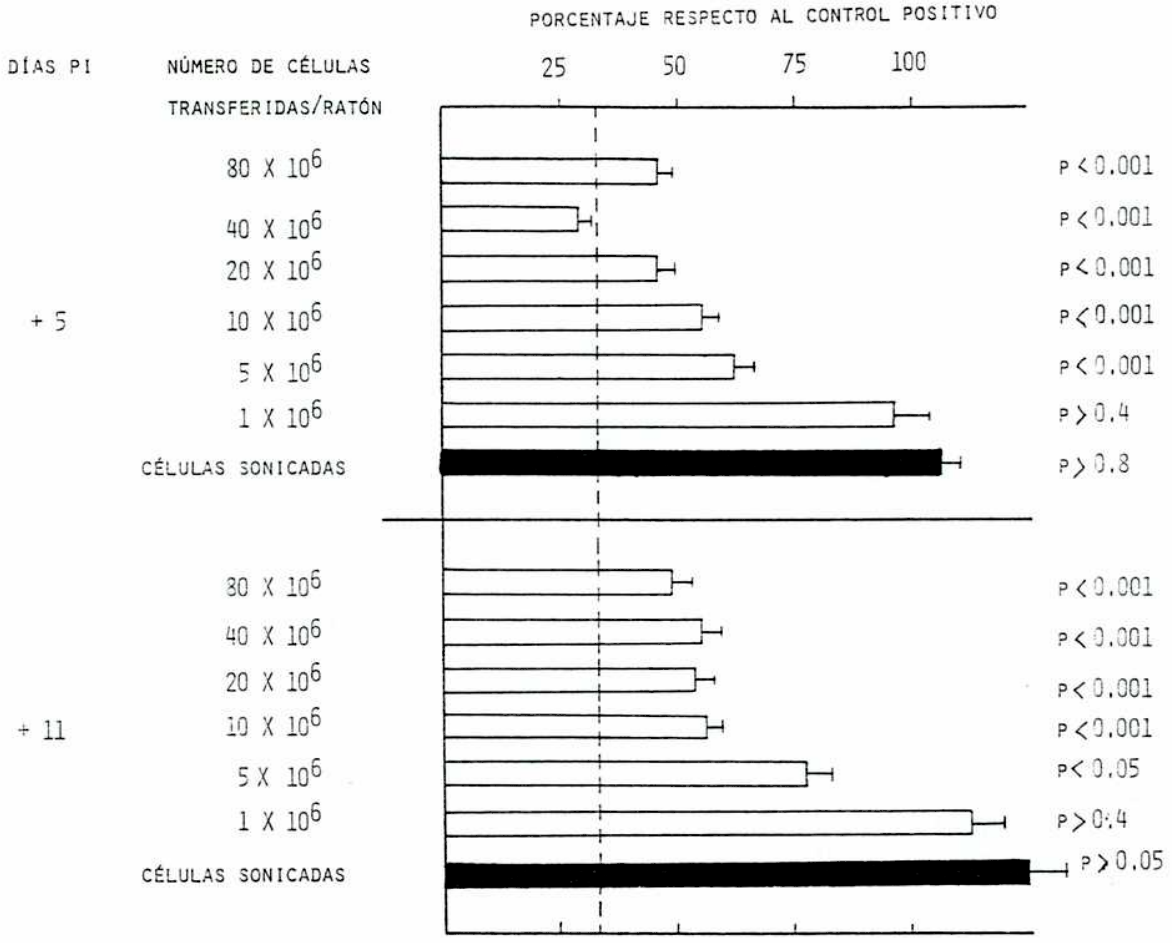
estudios. El día +5, es el primero en el que ya no se detecta virus en bazo de animales infectados [68] y el +11 es el día en el que se comienzan a registrar las muertes en los animales infectados e inmunosuprimidos con ciclofosfamida (Cy) aplicada según un esquema particular capaz de doblegar la resistencia del ratón adulto [58].

Para determinar cuál es el mínimo número requerido de células esplénicas nucleadas para obtener la supresión, 80; 40; 20; 10; 5 ó $1x10^6$ células viables fueron transferidas a cada uno de los receptores previamente sensibilizados con 10^6 GRC.

De los resultados expuestos en la Fig. 7, surge que la actividad supresora es transferida aún con $5x10^6$ células nucleadas esplénicas totales en ambos tiempos ensayados.

Paralelamente, se pudo determinar que el requerimiento por células viables es absoluto, dado que su destrucción por sonicación elimina completamente su capacidad para deprimir la respuesta de HR (Fig 7, barras llenas). Este resultado también elimina la posible presencia de virus infeccioso en las células transferidas. Por otra parte, el método de sonicación es uno de los más utilizados para detectar la posible presencia de factores supresores intervinientes en un dado modelo, lo que sugiere la ausencia de mediación por factores supresores en este caso. La supresión no fue transferida por la administración de 0.3 ml de suero obtenido a partir de ratones infectados 5 ú 11 días antes, resultado que también apoya la ausencia de mediación por factores solubles.

Figura 7



Se transfirió diferente número de células esplénicas obtenidas de animales infectados 5 ú 11 días antes con 10^3 DL_{50} de la cepa XJ por vía ic, a receptores sensibilizados 7 días antes con 10^6 GRC. En otros casos, los receptores fueron transferidos con células destruídas por sonicación (barras llenas). Los resultados se expresan en la misma forma que en la Fig. 6, con controles positivos entre 21.01% y 23.91% de hinchazón. Al menos 5 animales en cada grupo.

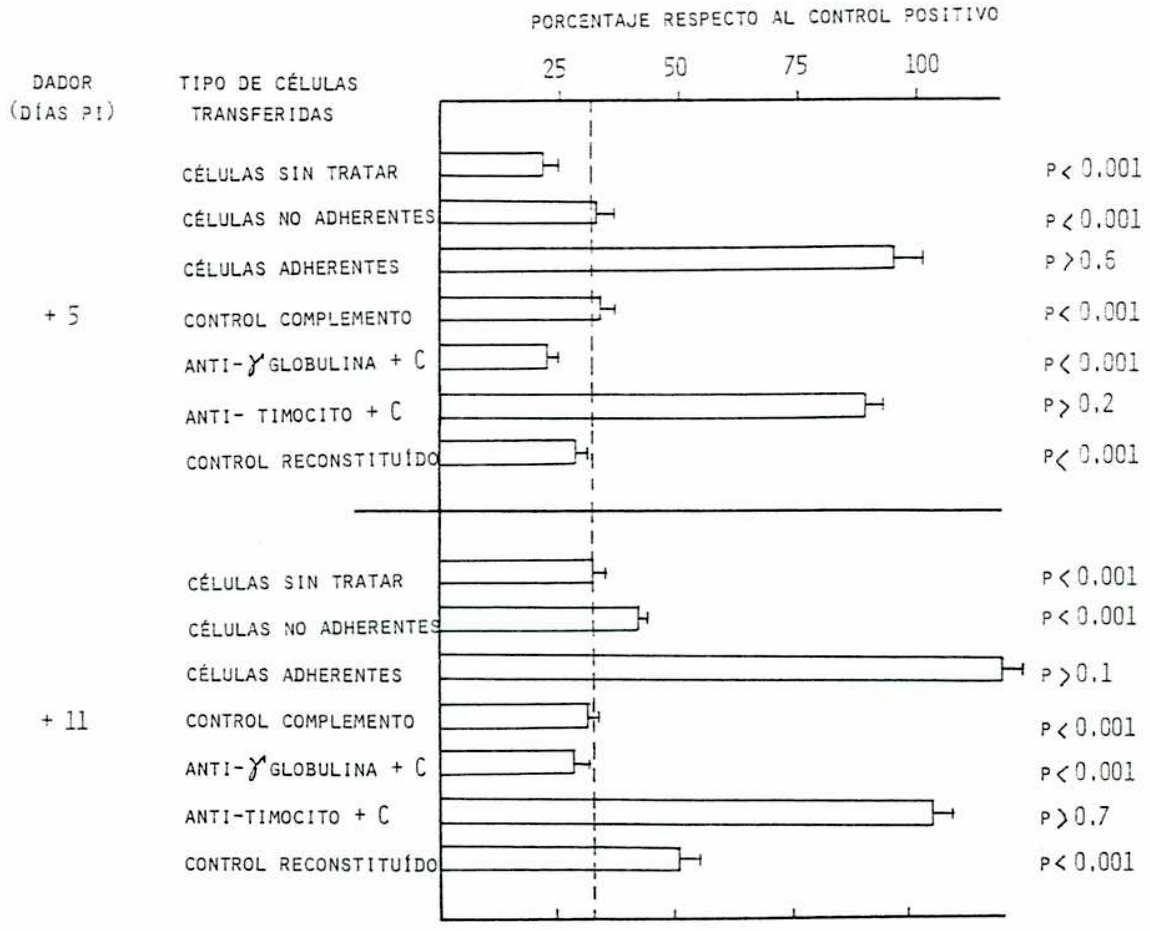
4.6 Tipificación de las poblaciones celulares responsables de la supresión

A partir de estos resultados, se inició la caracterización de la/s célula/s responsable/s de la supresión, utilizando un número menor de células que el empleado en el punto **4.5**, tal que permitiera el ahorro de materiales sin

afectar la validez de los resultados. Por este motivo, estos experimentos fueron realizados transfiriendo $20x10^6$ células viables/ratón, las que fueron previamente sometidas a diferentes tratamientos. Esto permitió ensayar células adherentes, no adherentes y poblaciones privadas de linfocitos B o T.

En la Fig 8, se puede apreciar que la actividad supresora está asociada en un 100% con una población de linfocitos T, ya que sólo el tratamiento con suero anti-timocito (anti-Ø) y complemento fue capaz de eliminar la actividad supresora sobre la HR de las células esplénicas provenientes de ratones infectados.

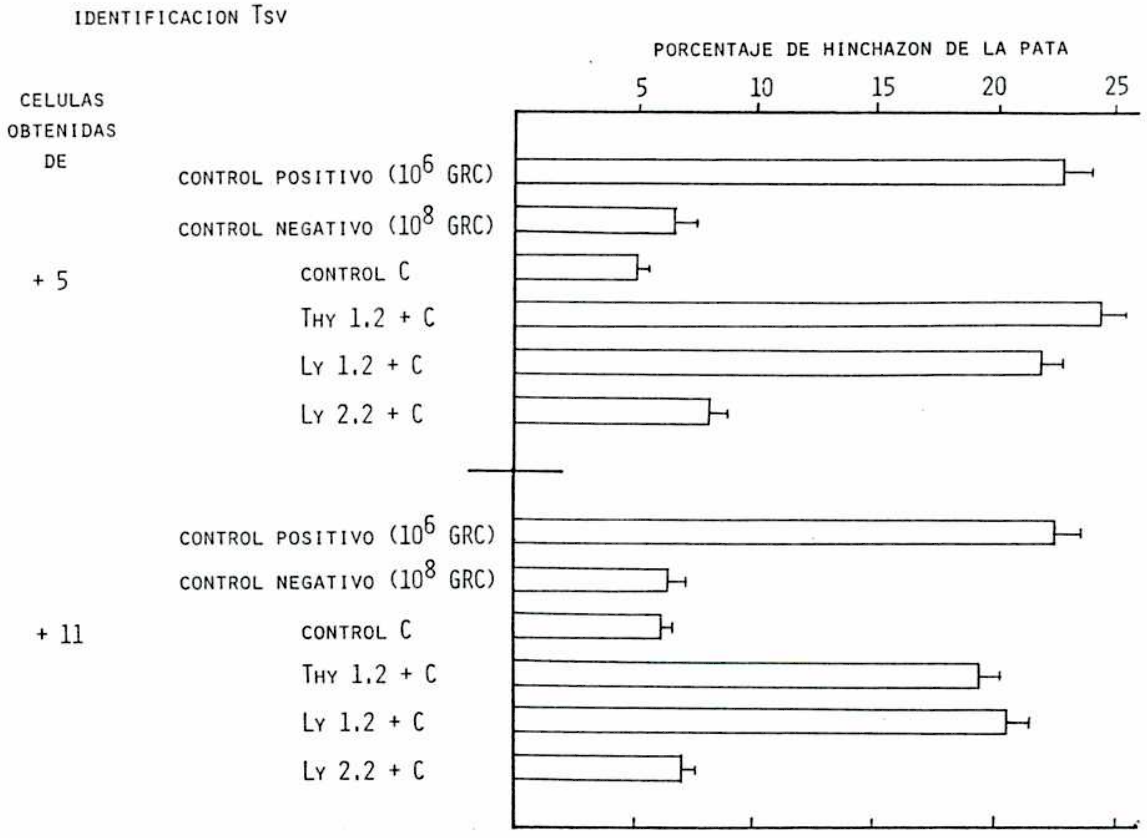
Figura 8



Se obtuvieron células esplénicas en los días +5 ó +11 de animales infectados con 10^3 DL_{50} de la cepa XJ por vía ic. Previo a su transferencia, las células fueron tratadas de modo de deplecionarlas de células adherentes, linfocitos B ó T. El "control reconstituído" está conformado por la mezcla de las células pretratadas con anti-γ-globulina o con suero anti-timocito. Los resultados se expresan en forma similar a la Fig 6, con controles positivos entre 17.22% y 20.86%. Al menos 5 animales en cada grupo.

De la posterior caracterización mediante ensayos de depleción por lisis mediada por anticuerpos monoclonales, efectuada debido a la gran variedad de subpoblaciones linfocíticas existentes dentro del compartimento T, y cuyos resultados se muestran en la Fig 9, claramente surgió que las células responsables se encuentran dentro de la subpoblación linfocitaria Thy 1^+, Ly 1^+ 2^-.

Figura 9



Se transfirieron células obtenidas a los 5 ú 11 días pi, las que fueron tratadas con AcMn seguido de complemento. En ambos casos los grupos "control complemento (C)" y "anti-Ly 2.2 + C": P<0.001 respecto de los controles positivos. Al menos 5 animales en cada grupo.

Alcanzado este punto en la investigación y habiendo establecido:

i) la presencia y duración de actividad supresora sobre la HR inducida por la infección viral,

ii) la presencia de células supresoras antígeno-no específicas inducidas por el virus,

iii) el requerimiento por células viables para que se exprese la supresión; y

iv) el fenotipo celular implicado en la supresión (Thy 1^+, Ly 1^+ 2^-),

se continuaron los estudios dirigiéndolos a establecer el mecanismo de acción de esta población celular y su posible relación con la capacidad de sobrevida del ratón BALB/c adulto infectado con VJ.

4.7 Actividad de las células supresoras inducidas por VJ sobre la rama aferente de la respuesta de HR

Los resultados expuestos anteriormente (Fig 6 y subsiguientes), demuestran claramente la existencia de células supresoras inducidas por VJ que son capaces de actuar sobre la expresión de la reacción, es decir sobre la rama eferente de la respuesta de HR, dado que su transferencia en el día de la descarga a receptores sensibilizados hacia GRC, induce depresión de una respuesta inmune celular ya establecida.

Sin embargo, los ensayos realizados no permitieron determinar el modo de acción de estas células, aunque de ellos parece deducirse que no intervendrían factores solubles comprometidos en la modificación de la reacción.

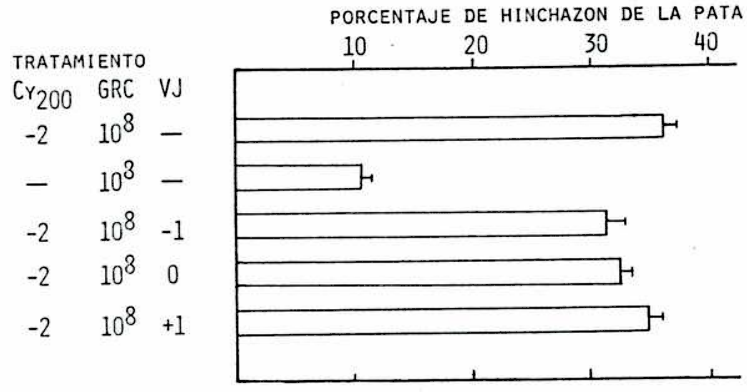
Ha sido anteriormente demostrado que 10^8 GRC induce en el ratón adulto una buena respuesta humoral sin poder evidenciarse por la técnica del *swelling test*, reacción de HR. Sin embargo, si a este modelo experimental se le administran 200 mg/kg de Cy 2 días antes de la sensibilización con GRC, se manifiesta la reacción de HR [18]. En ese mismo trabajo fue demostrado, que ello se debía a la acción de la Cy sobre el sistema T supresor de la respuesta. Es decir entonces que la falta de expresión de la HR, en los animales sin tratamiento con Cy, es debida a la existencia de un sistema supresor de la respuesta, el cual es eliminado con el tratamiento inmunosupresor.

Por lo tanto, el modelo ratón-GRC tratado con Cy de esta manera, permitiría contar con células T efectoras de HR (THR) libres, por acción de la droga, de sus supresoras específicas.

Para determinar la acción viral sobre la rama aferente de la reacción, distintos lotes de ratones adultos sensibilizados con GRC y tratados con Cy (200 mg/kg 2 días antes de los GRC), fueron infectados ic con 10^3 DL_{50} de VJ (cepa XJ) los días -5, -1, 0 ó +1 de la sensibilización.

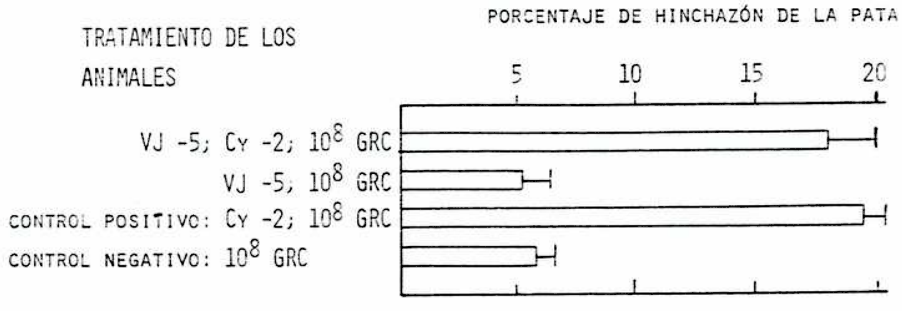
Como puede observarse en las Figs 10 y 11, la inoculación de VJ antes, durante o después de la sensibilización con GRC, no indujo en estos animales depresión de la respuesta de HR.

Figura 10



Se inocularon ratones en los días -1, 0 ó +1 con 10^3 DL_{50} de la cepa XJ a los que se les suministró una dosis de 200 mg/Kg de Cy en el día -2 y 10^8 GRC en el día cero. No se registraron diferencias significativas respecto del control positivo (Cy -2, 10^8 GRC). Al menos 5 animales en cada grupo.

Figura 11

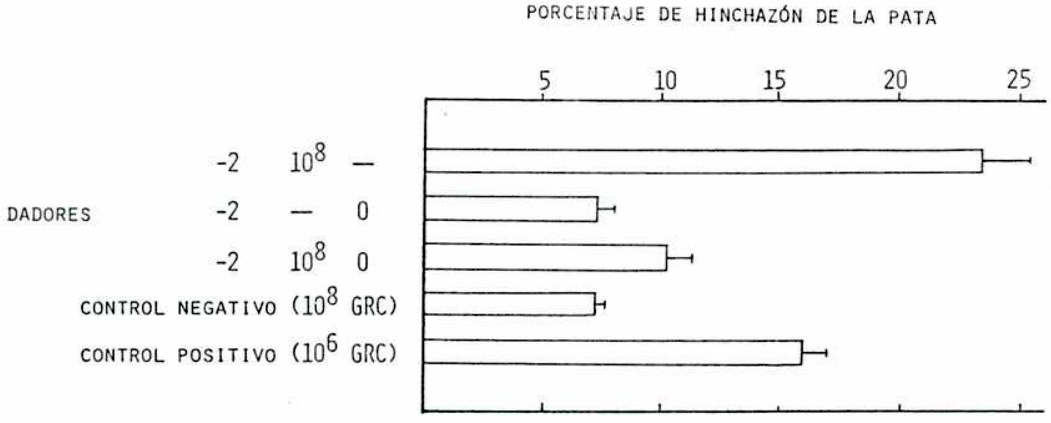


Se inocularon animales en el día -5 ps con 10^3 DL_{50} de la cepa XJ, que también recibieron 10^8 GRC en el día cero con o sin la administración de Cy (200 mg/kg) en el día -2. $P<0.001$ entre los animales infectados y tratados o no con Cy.

Una alternativa para explicar estos resultados, podría ser que la Cy afectara la aparición de las células supresoras inducidas por el virus. Para estudiar esta posibilidad, se tomaron células esplénicas de animales sensibilizados e infectados que habían recibido 200 mg/kg de Cy y de sus controles que recibieron, ya sea Cy y virus o Cy y GRC. Se transfirieron $40x10^6$ células viables/ratón a receptores sensibilizados 7 días antes con 10^6 GRC. De este modo si las células con actividad supresora inducidas por el virus, estaban presentes en los dadores podrían entonces, expresarse en el otro sistema indicador de HR.

Del análisis de la Fig 12 surge que, en los animales dadores infectados que reciben Cy, se generan células con actividad supresora de la respuesta de HR, inducidas por VJ. Es decir que, a pesar de la administración de una alta dosis de Cy, se inducen las células responsables de la inmunosupresión.

Figura 12



Se transfirieron $40x10^6$ células viables obtenidas de animales que recibieron una dosis de Cy (200 mg/kg) en el día -2 y 10^8 GRC (control) ó 10^3 DL_{50} de la cepa XJ de VJ por vía ic ó bien 10^8 GRC y 10^3 DL_{50} de la cepa XJ ic en el día cero; a ratones sensibilizados 7 días antes con 10^6 GRC. Se encontró $P<0.001$ entre Cy -2 10^8 GRC (control) y Cy-2 10^8 GRC y VJ, también $P<0.001$ entre 10^6 GRC (control receptores) y Cy -2 y VJ. Al menos 5 ratones en cada grupo.

De los resultados obtenidos (Fig 10, 11 y 12) podría concluírse que las células supresoras inducidas por VJ, no afectan la rama aferente de la reacción de HR cuando el virus es inoculado los días -5, -1 ó 0. Además, esta célula no sería afectada por una dosis de 200 mg/kg de Cy suministrada antes o después de la infección viral.

4.8 Actividad sobre la rama eferente de la repuesta de HR

Los resultados anteriores demuestran la existencia de diferencias en el comportamiento de las células supresoras inducidas por el virus Junin (Tsv), de acuerdo al indicador de HR que se utilice (10^6 GRC ó Cy 200-10^8 GRC).

En ambos casos se encuentra presente la célula T efectora de la reacción de HR (THR) y, la diferencia en la manifestación de la HR está basada [18] en la acción de la Cy sobre otras subpoblaciones celulares que interactúan con la THR para regular su expresión (circuitos supresores).

Las Figs 1 y subsiguientes, muestran que en el modelo 10^6 GRC, la Tsv actúa sobre la expresión de la reacción (rama eferente), mientras que las Fig 10 y 11, indican que en el otro sistema de HR (Cy 200-10^8 GRC), esta actividad supresora no es capaz de manifestarse.

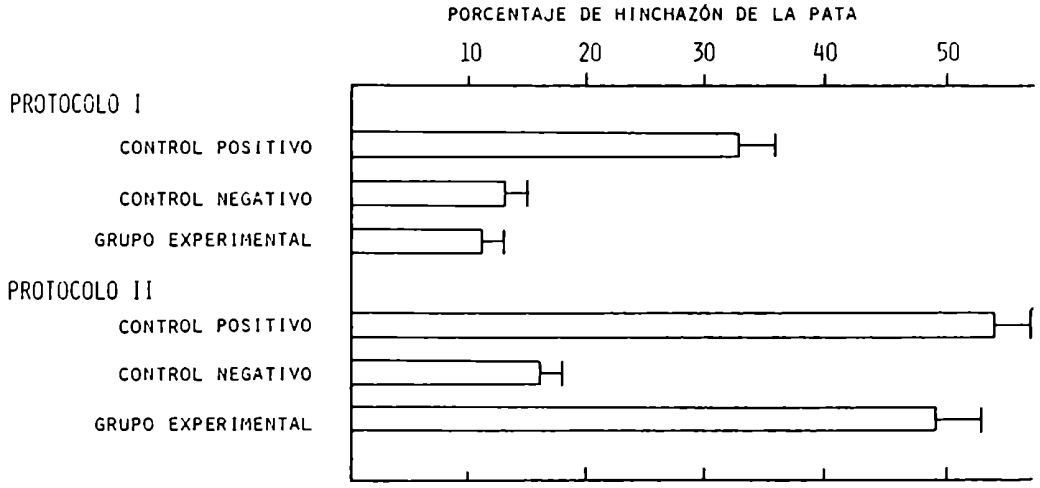
Podría entonces sugerirse que el blanco de acción de la Tsv no fuese directamente la THR, sino que su actividad se manifestase a través de la interacción con los circuitos celulares comprometidos en la reacción de HR específicos de antígeno.

Para estudiarlo, se obtuvieron células esplénicas a partir de dadores infectados 5 días antes con VJ (Tsv), las que fueron transferidas en el día de la descarga a receptores sensibilizados según los dos esquemas indicadores de HR mencionados.

Los resultados obtenidos se expresan en la Fig 13 y demuestran que la reacción es alterada solamente en el sistema 10^6 GRC.

Dado que el sistema Cy 200-10^8 GRC presenta la célula THR efectora libre de actividad supresora específica, mientras que 10^6 GRC posee THR y células supresoras, los resultados podrían sugerir que la Tsv no actúa directamente sobre la THR sino que lo hace a través de su interacción con células reguladoras antígeno-específicas.

Figura 13



Se transfirieron $40x10^6$ células viables obtenidas de animales infectados 5 días antes (Tsv) a receptores ya sea sensibilizados con 10^6 GRC sin otro tratamiento (Protocolo I), o.con 10^8 GRC tratados con Cy (200 mg/kg) (Protocolo II). En ambos casos la transferencia fue efectuada en el día de la descarga. No se encontraron diferencias significativas en el primer grupo (10^8 GRC con Cy), $P<0.001$ para los receptores 10^6 GRC transferidos con Tsv respecto de su control positivo (10^6 GRC sin transferir).

4.9 Actividad supresora en el esquema de administración de Cy: -1, +1,+4

Dado que 200 mg/kg de Cy administrados en el día -2 de la infección viral no produce mortalidad en el ratón adulto infectado [58] y, en el intento de determinar los mecanismos que conducen a la sensibilidad o a la resistencia de los animales a la infección con virus, debemos recordar que la administración de 3 dosis de 50 mg/kg cada una de Cy suministradas los días -1, +1 y +4 tomando como día cero el día de la infección viral, produce en los ratones adultos infectados por vía ic un 90% de mortalidad (mortalidad sin Cy: 8-10%). Por otra parte, el mismo esquema de administración de la droga es capaz de inducir en ratones adultos sensibilizados con 10^8 GRC, un marcado incremento en la respuesta de HR, que ha sido atribuído a la destrucción de algunos de los componentes del circuito supresor específico para GRC [74].

El esquema Cy -1, +1, +4 provee entonces, de un modelo de sumo interés para estudiar la HR en ratones adultos sensibles a la infección por el tratamiento inmunosupresor.

Con el propósito de establecer si estos animales, que al recibir el tratamiento con Cy se hacen sensibles a la infección viral, presentan alguna modificación en la actividad supresora inducida por el virus; distintos lotes de ratones dadores de células fueron infectados y tratados con diferentes esquemas de administración de Cy (50 mg/kg de Cy los días -1 ó -1 y +1 ó -1, +1 y +4 ó bien +1 ó +4 de la infección). Se transfirieron un total de $80x10^6$ células viables/ratón a receptores que habían sido sensibilizados 7 días antes con 10^6 GRC.

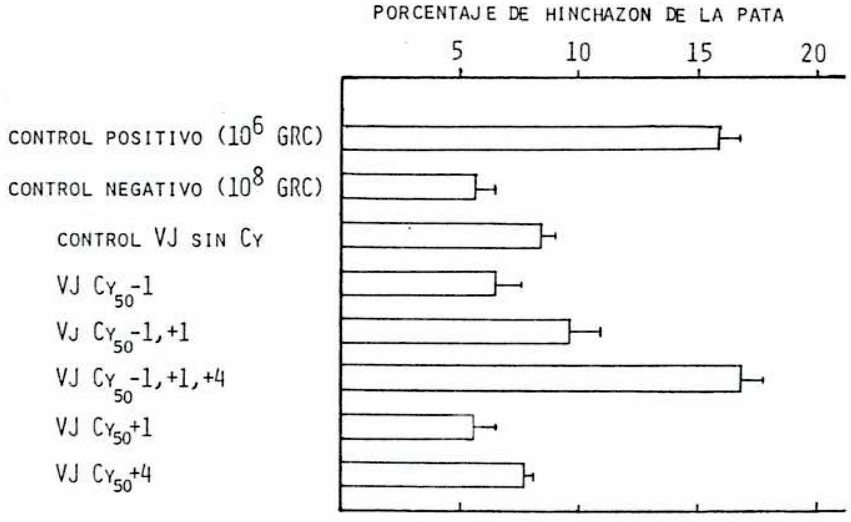
Los resultados expuestos en la Fig 14, muestran que la administración de esquemas incompletos (-1; ó -1 y +1; ó +1; ó +4) de Cy, no altera la actividad supresora generada por el virus, valorándosela al día +5.

De estas experiencias surge que, midiendo al día +5, en el esquema -1, +1, +4 parecería no haberse generado la actividad supresora de HR atribuible al virus. Hay que tener en cuenta que, como fue dicho, este tratamiento inmunosupresor produce una alta mortalidad en los ratones infectados [58]. Sin embargo (Fig 15), las células de dadores similarmente tratados pero obtenidas a los 7, 9 ú 11 días pi, manifestaron actividad supresora. Por lo tanto, la comparación de los resultados de las Figs 14 y 15, podrían sugerir que la actividad supresora generada por el virus en esas condiciones de trabajo, se regenera a partir del día +7 pi, perdurando por lo menos hasta el día +11.

Estos resultados son atrayentes para correlacionar sobrevida con la actividad supresora. Es necesario destacar que en los animales infectados y no tratados con Cy, la actividad supresora está presente a partir del día +1 (Fig 6). Por lo tanto, el retardo en la actividad supresora de la HR, inducido por la Cy, podría permitir el establecimiento de la reacción que conduciría a la muerte de los animales infectados.

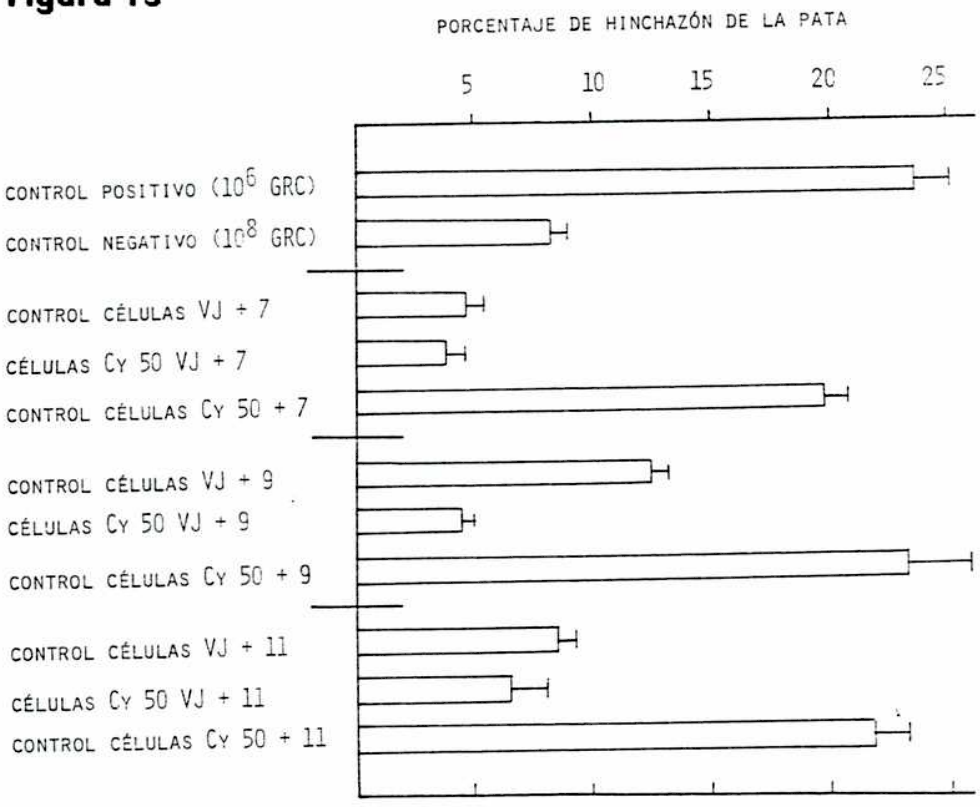
Otras alternativas podrían ser: que la Cy estuviera afectando la célula blanco de Tsv o que, la supresión de la reacción de HR en estos animales estuviese mediada por otro circuito celular.

Figura 14



Se transfirieron $80x10^6$ células viables/ratón obtenidas de dadores infectados con 10^3 DL_{50} de la cepa XJ por vía ic (día cero) y tratados con distintos esquemas de administración de Cy en dosis de 50 mg/kg cada una, a receptores sensibilizados 7 días antes con 10^6 GRC. En todos los casos, excepto con el esquema -1,+1,+4; se obtuvo $P<0.001$. El esquema -1,+1,+4 dió resultados no significativamente diferentes del control 10^6 GRC sin transferir. Al menos 5 animales en cada grupo experimental.

Figura 15



Similar a los experimentos descriptos en la **Fig 14**, pero admninistrando el esquema completo de Cy -1, +1, +4 (Cy 50) y transfiriendo a los días +7, +9 ó +11 pi. En todos los casos, se obtuvo P<0.001 respecto a los controles positivos. Al menos 5 animales en cada grupo.

4.9.1 Análisis de la actividad supresora viral en el esquema Cy -1, +1, +4

Teniendo en cuenta que el esquema de administración de Cy -1, +1, +4 (50 mg/kg cada una), induce en el ratón inoculado con 10^8 GRC un fuerte incremento en la respuesta de HR hacia GRC y, por otra parte, que la administración de este esquema en animales infectados con VJ, induce una mortalidad cercana al 90%; estamos frente a un modelo de sumo interés para estudiar algunas de las hipótesis mencionadas en el párrafo anterior.

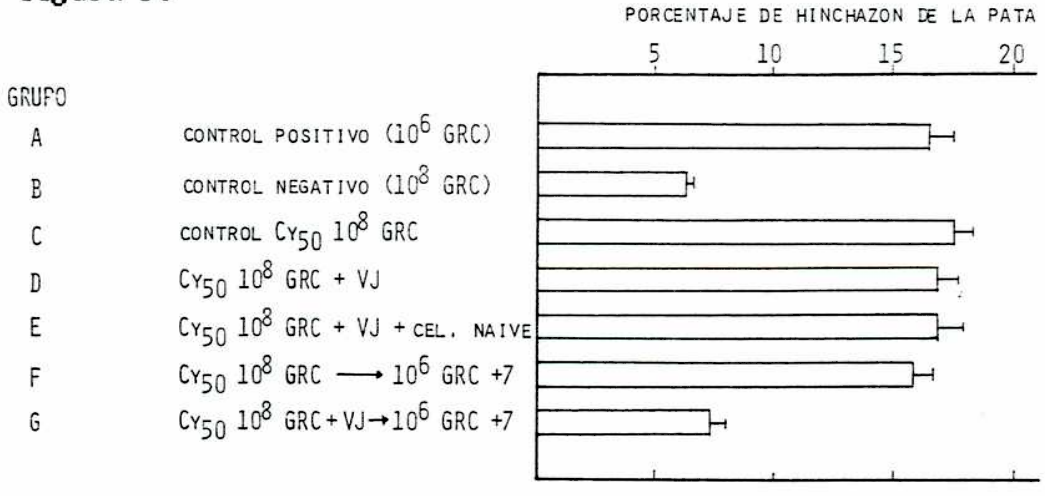
La existencia y características de la célula supresora de HR generada en ratones adultos como consecuencia solamente de la infección viral, han sido detalladas en los puntos **4.5-4.8**. En el punto **4.9**, surgió la posibilidad de que, como consecuencia del tratamiento con Cy, se origine otra subpoblación celular

con similar característica supresora, pero que difiera de la anterior en alguno de sus aspectos.

Como puede apreciarse en la Fig 16, la infección con 10^3 DL_{50} de VJ en el día cero (sensibilización) a ratones inmunosuprimidos (-1, +1, +4 Cy 50 mg/kg cada una) sensibilizados con 10^8 GRC no modifica la respuesta de HR (grupos C contra D). Este resultado no pudo ser revertido por la administración de células obtenidas de ratones 'naive', es decir sin impacto inmunosupresor ni antigénico (grupo E). De modo que la incapacidad de suprimir la reacción de HR no estaría dada por la ausencia de células no impactadas por la Cy que fuesen requeridas a diferenciarse o a entrar en actividad en el momento en que se ejerciera la supresión.

Sin embargo, las células esplénicas obtenidas en el día +7 de un lote de ratones tratados e infectados de modo similar al grupo D y transferidas a receptores sensibilizados 7 días antes con 10^6 GRC, marcadamente deprimen la reacción de HR (grupos A contra G), mientras que las células obtenidas de ratones tratados de forma similar pero no infectados fueron incapaces de suprimir la respuesta (grupos A contra F).

Figura 16



Grupo A: Ratones que reciben 10^6 GRC sin otro tratamiento.
Grupo B: Ratones que reciben 10^8 GRC sin otro tratamiento.
Grupo C: Ratones que reciben 10^8 GRC junto con el esquema de administración de Cy -1,+1,+4 (50 mg/kg c/u).
Grupo D: Idem que grupo C pero inoculados al día cero con 10^3 DL_{50} de la cepa XJ por vía ic.
Grupo E: Idem que D, pero reciben $50x10^6$ células normales ("naive") en el día de la descarga.
Grupo F: Receptores sensibilizados con 10^6 GRC 7 días antes, reciben $40x10^6$ células viables/ratón provenientes de animales tratados igual que el grupo C.

Grupo G: Receptores sensibilizados con 10^6 GRC 7 días antes, reciben $40x10^6$ celulas viables/ratón tomadas de dadores tratados al igual que el grupo D
Grupo A vs. G. P<0.001. Al menos 5 animales en cada grupo.
En todos los casos la descarga se efectuó al día +7 ps.

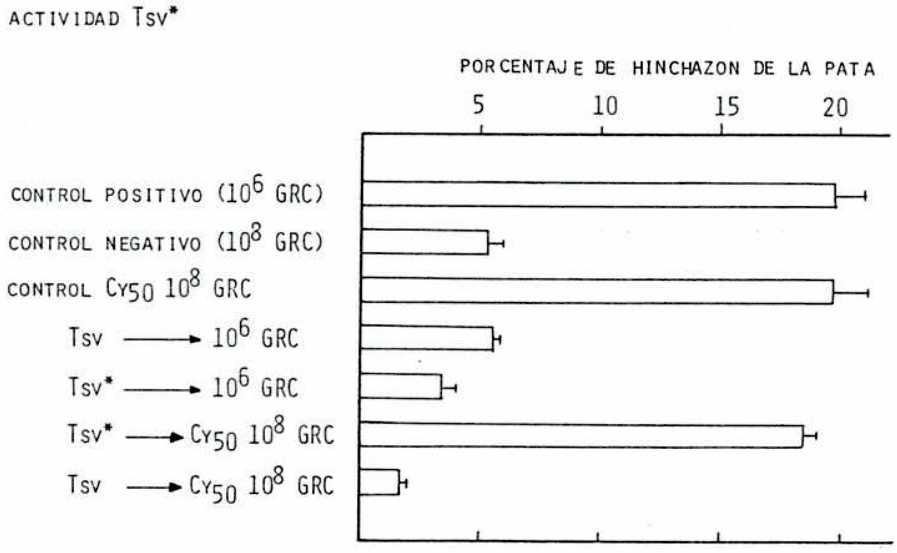
Para investigar si la actividad supresora presente en el día +7 en los animales infectados e inmunosuprimidos con Cy, estaba mediada por otro tipo de células que el presente en los animales infectados no tratados, se ensayo la actividad de células esplénicas presentes en ambos tipos de dadores.

Estas células fueron transferidas simultáneamente a receptores en los que se había inducido la reacción de HR ya sea por administración de 10^6 GRC o bien 10^8 GRC junto con el esquema de Cy -1, +1,+4.

Los resultados presentados en la Fig 17, indican que las celulas provenientes de un dador infectado sin tratar con Cy (Tsv), son capaces de suprimir la respuesta de HR en ambos receptores (con o sin tratamiento con Cy). Sin embargo las que se obtuvieron de dadores que habían recibido Cy (-1, +1, +4) tienen un comportamiento diferente de acuerdo al receptor. Mientras en 10^6 GRC suprimen la respuesta, no actúan en receptores sensibilizados con 10^8 GRC y tratados con Cy. Estas células supresoras fueron denominadas Tsv*, para diferenciarlas de aquellas obtenidas de animales infectados y no inmunosuprimidos con Cy.

Esto podría sugerir que las células supresoras generadas por la infección viral en animales infectados con (Tsv*) o sin (Tsv) tratamiento con Cy son diferentes y, por otra parte, que ambos sistemas receptores presentarían células blanco ("target") diferentes a cada uno de las supresoras inducidas por el virus (Fig 17).

Figura 17



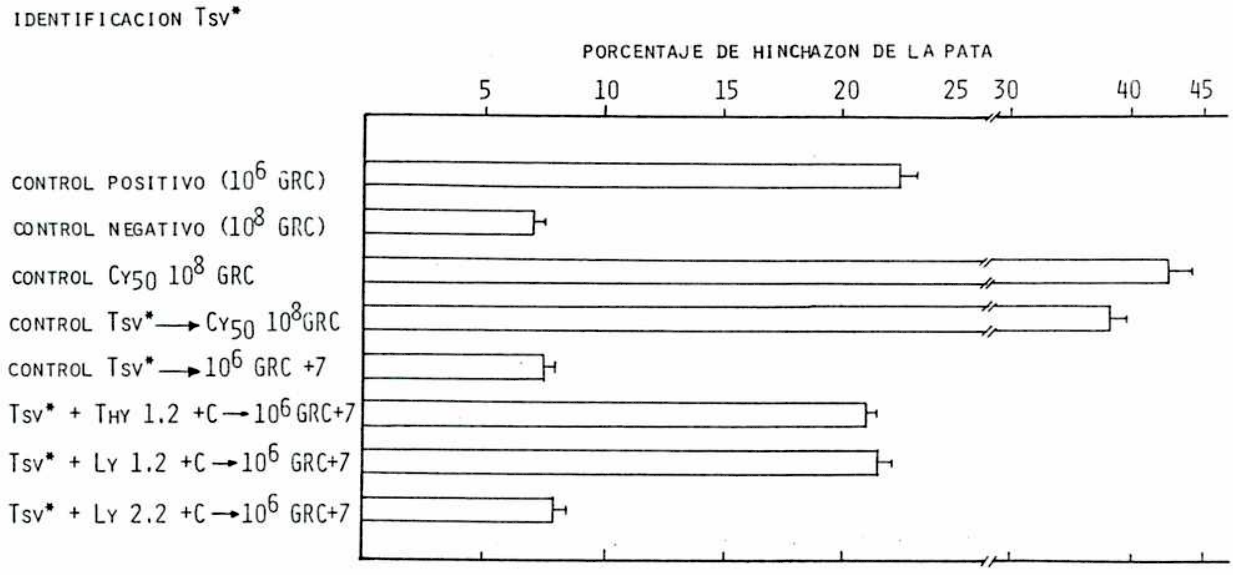
Se transfirieron $40x10^6$ células viables /ratón tomadas de dadores infectados con 10^3 DL_{50} de la cepa XJ por vía ic sin tratar (Tsv), o tratados (Tsv*) con el esquema de Cy -1,+1,+4 (50 mg/kg c/u) en el día +7 pi; a receptores sensibilizados 7 días antes con 10^6 GRC, o con 10^8 GRC seguido del tratamiento con el mismo esquema de Cy. Tsv en ambos receptores: $P<0.001$; Tsv* en 10^6 GRC: $P<0.001$, en receptores tratados con Cy: no significativo. Cada grupo es de al menos 5 animales.

4.9.2 Identificación fenotípica de las células Tsv*

Para determinar el fenotipo. de las células Tsv*, se realizaron ensayos de transferencia similares a los descriptos en el punto **4.9.1** sobre receptores 10^6 GRC, pero en este caso las células a ser transferidas fueron previamente tratadas con distintos anticuerpos monoclonales y complemento (anti-Thy 1.2, anti-Ly 1.2 ó anti-Ly 2.2).

Los resultados presentados en la Fig. 18, indican claramente que la célula responsable de la supresión responde al fenotipo Thy 1^+, Ly 1^+2^-. Este fenotipo no difiere del descripto para la célula Tsv (punto **4.6**), sin embargo antes de aceptar la identidad entre ambas, debe recordarse el diferente comportamiento frente a los distintos blancos que les fueron ofrecidos (Fig 17).

Figura 18



Se obtuvieron células esplénicas de dadores infectados con 10^3 DL_{50} de la cepa XJ por vía ic y tratados con el esquema de Cy -1,+1,+4 (50 mg/kg c/u), las que fueron tratadas con anticuerpos monoclonales y complemento. La actividad de las células se controló por transferencia ($20x10^6$ células viables/ratón) a ambos tipos de receptores (10^6 GRC y 10^8 GRC tratado con Cy). Las células se identificaron fenotípicamente por su actividad sobre receptores sensibilizados 7 días antes con 10^6 GRC. Tsv* sobre 10^6 GRC, y Tsv* tratados con anti-Ly 2.2 más complemento: $P<0.001$ respecto del control positivo (10^6 GRC sin transferir). Tsv* sobre receptores sensibilizados con 10^8 GRC y tratados con Cy, o Tsv* tratadas con anti-Thy 1.2 ó con anti Ly 1.2 más complemento y transferidas a receptores 10^6 GRC: no significativo respecto de sus controles (Cy 50 10^8 GRC en el primer caso y 10^6 GRC en el segundo). Al menos 5 animales en cada grupo.

4.9.3 Identificación de los blancos presentes en los receptores 10^6 GRC y 10^8 GRC-Cy -1, +1, +4

A partir de los resultados anteriormente expuestos (punto **4.9.1**, Fig 17), se sugirió que las células blanco de Tsv y Tsv* eran diferentes. Es decir entonces que los receptores sensibilizados con 10^8 GRC seguido del esquema inmunosupresor de Cy -1,+1,+4 o con 10^6 GRC sin tratamiento, ofrecerían diferentes tipos de células blanco a Tsv y Tsv*.

Para estudiar este aspecto, se llevaron a cabo experimentos de cotransferencia de células, en los que se ofrecieron las células blanco obtenidas separadamente de modo de facilitar su posterior identificación. Los ensayos de

cotransferencia celular con los que se obtuvieron los resultados a ser presentados se esquematizan en la Fig. 19.

Los receptores fueron en todos los casos, ratones *naive* a los cuales se les transfirió:

THR provenientes de dadores Cy 200-10^8 GRC ($50x10^6$ células viables/ratón obtenidas en el día +5 de la sensibilización).

Tsv provenientes de dadores infectados con VJ ($20x10^6$ células viables/ratón obtenidas en el día +5 pi).

Célula blanco:

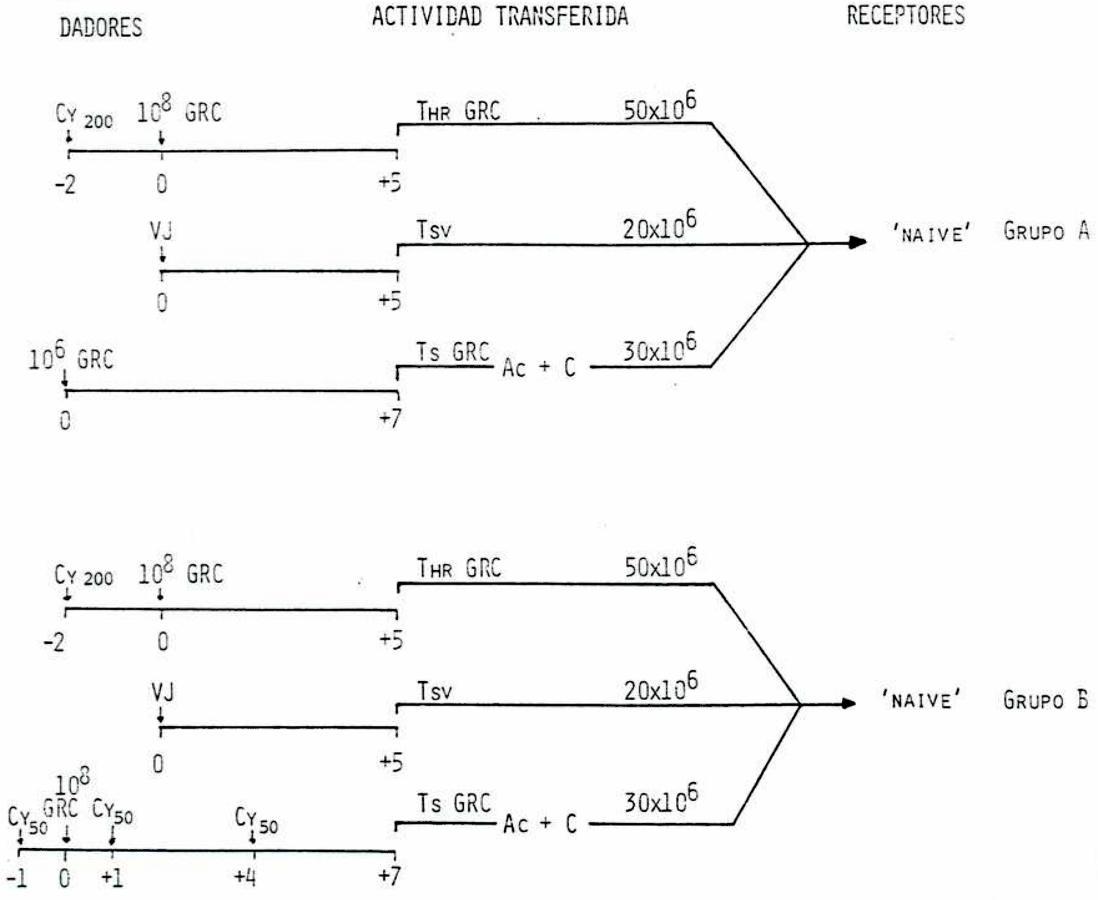
Grupo A: $30x10^6$ células viables/ratón tratadas ya sea con anti-Thy 1.2 ó anti-Ly 1.2 ó anti-Ly 2.2, más complemento, tomadas de dadores 10^6 GRC en el día +7.

Grupo B: $30x10^6$ células viables/ratón tratadas en forma similar al grupo A, pero obtenidas a los 7 días ps a partir de dadores sensibilizados con 10^8 GRC y tratados con Cy -1, +1, +4.

En todos los casos, las células transferidas fueron obtenidas a partir del bazo de los animales en los tiempos indicados.

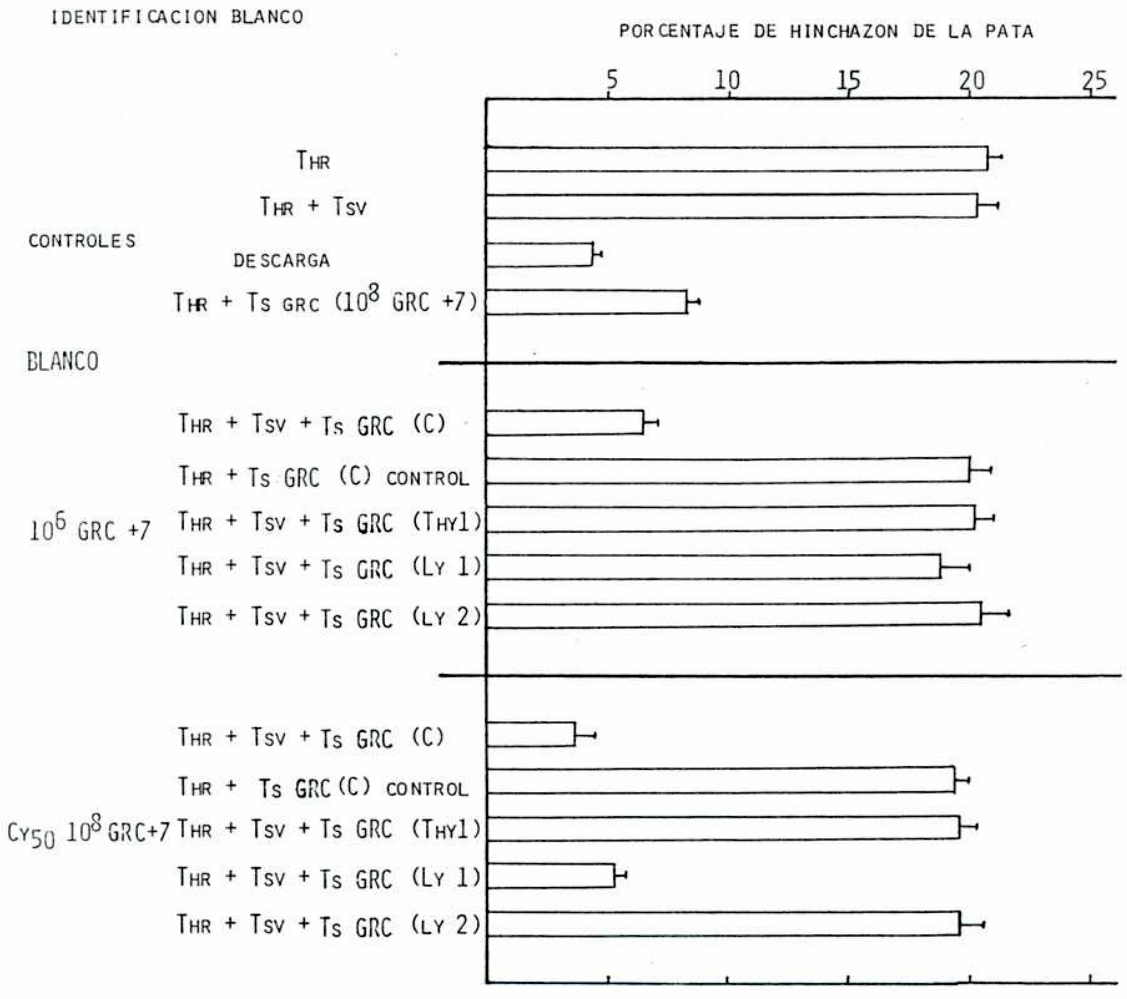
Los resultados se presentan en la Fig 20, y confirman la presunción de que en los dos sistemas indicadores empleados se presentan, a la Tsv, células blanco diferentes. En el caso del grupo A, es decir 10^6 GRC, el empleo de cualquiera de los tres anticuerpos monoclonales elimina la supresión. En el caso del grupo B, es decir 10^8 GRC-Cy -1, +1, +4; la supresión es eliminada mediante la depleción con anti-Thy 1.2 o con anti-Ly 2.2, indicando que, en este caso, la célula blanco de la Tsv es Thy 1^+, Ly 1^-2^+.

Figura 19



Esquema experimental del ensayo de identificación de las células blanco de las supresoras inducidas por VJ. Los dadores sensibilizados con 10^8 GRC y pretratados con 200 mg/kg 2 días antes, poseen al día +5 la célula efectora de la HR (THR) en ausencia de células T supresoras de la HR hacia GRC (Ts GRC). Los dadores infectados 5 días antes con 10^3 DL_{50} de la cepa XJ por vía ic, proveerán las células supresoras de la HR inducidas por VJ (Tsv), las que serán obtenidas al día +5 pi. La célula blanco de la Tsv será obtenida: Grupo A: a partir de animales sensibilizados 7 días antes con 10^6 GRC. Grupo B: a partir de animales sensibilizados 7 días antes con 10^8 GRC y tratados con el esquema de Cy -1,+1,+4 (50 mg/kg c/u). En todos los casos las células a transferir serán obtenidas a partir de los bazos de los dadores. Las células blanco obtenidas de ambos grupos (A y B), serán pretratadas con distintos anticuerpos monoclonales y complemento. El número de células viables de cada lote de dadores transferidas será el indicado en cada caso en la figura. Los receptores son animales no sensibilizados ("naive").

Figura 20



Ensayo de identificación de las células blanco de la Tsv, realizado según el esquema de la **Fig 19**. Controles: THR: células de dadores tratados con Cy (200 mg/kg) y sensibilizados con 10^8 GRC. THR + Tsv: células de los dadores anteriores más células de animales infectados. Descarga: animales "naive" sin transferir que son descargados con 10^8 GRC intradermoplantar el día del ensayo. THR + Ts GRC (10^8 GRC +7): Células THR más células tomadas de animales sensibilizados 7 días antes con 10^8 GRC sin otro tratamiento, las que poseen toda la actividad supresora específica de HR hacia GRC. (C)=complemento, lotes de células tratados sólo con complemento. Grupos "Descarga", "THR + Ts GRC (10^8 GRC +7)", "THR + Tsv +Ts GRC (C)" del grupo B: $P<0.001$ respecto de THR. El resto de los grupos no mostró diferencias significativas respecto de THR. Al menos 5 animales componen cada grupo.

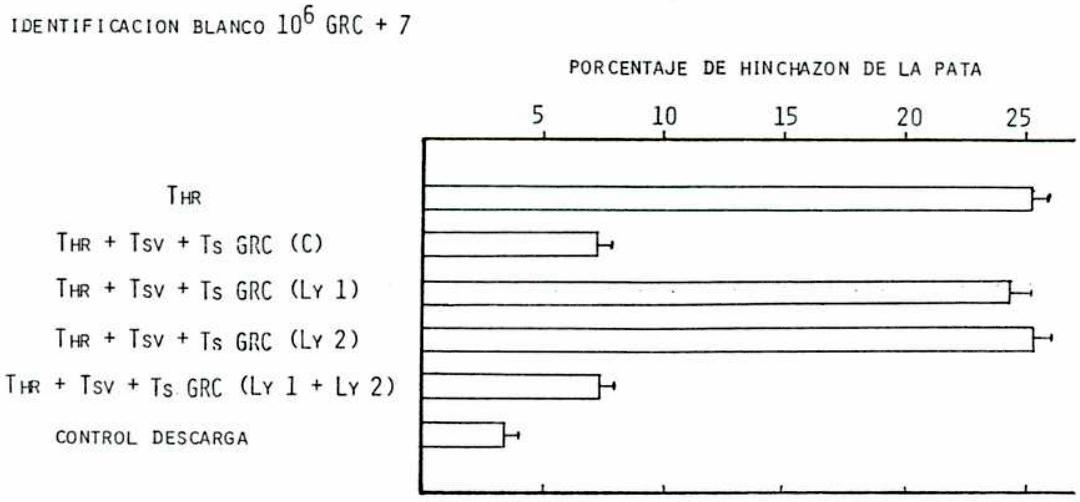
Los resultados encontrados en el grupo A, pueden ser interpretados de dos formas. Por una parte, la célula involucrada podría ser portadora del

fenotipo Thy 1^+, Ly 1^+2^+ o, podría tratarse del requerimiento de dos células supresoras inducidas por el antígeno (GRC) las que actuarían a través de una interacción entre sí en una cascada supresora. En este caso se trataría de dos células pertenecientes una al fenotipo Thy 1^+, Ly 1^+2^- y la otra al Thy 1^+, Ly 1^-2^+ y ambas serían requeridas para obtener el efecto supresor final.

Para estudiar estas hipótesis, se realizaron ensayos similares a los descriptos en la Fig 19 para el grupo A, pero agregando un lote de receptores que recibieron células tratadas con anti-Ly 1.2 ó anti-Ly 2.2 por separado pero que, previo a su transferencia, fueron mezcladas. De este modo, si la célula blanco era Thy 1^+, Ly 1^+2^+ no podría estar presente en la mezcla a ensayar.

Los resultados de estos experimentos, se muestran en la Fig. 21. De ella surge que la mezcla de ambos tipos de subpoblaciones, uno Ly 1^+2^- y el otro Ly 1^-2^+, es capaz de reconstituír el efecto supresor inducido por Tsv. De esta manera se confirma la hipótesis de que existen diferencias muy marcadas entre ambos sistemas indicadores de HR hacia GRC en cuanto a los blancos que ofrecen a las Tsv, dando así evidencia experimental a la suposición sobre la existencia de dos actividades diferentes inducidas por VJ, una en ausencia de Cy (Tsv) y otra luego del tratamiento con el esquema capaz de doblegar la resistencia del ratón adulto a la infección viral (Tsv*).

Figura 21



Ensayo realizado de acuerdo al esquema de la Fig 19, y similar al grupo A de la Fig 20. Aquí se agrega un lote de animales que recibieron células blanco pretratadas con anti-Ly 1.2 ó con anti-Ly 2.2 más complemento, las que se mezclaron en iguales proporciones antes de transferirlas junto con THR y Tsv (grupo THR + Tsv + Ts GRC (Ly 1 + Ly 2). Grupos: "THR + Tsv +Ts GRC (C)", "THR + Tsv + Ts GRC (Ly 1 + Ly 2)" y "control descarga": P<0.001

respecto de THR. El resto de los grupos no presentaron diferencias significativas respecto de THR. Cada grupo está compuesto de al menos 5 animales.

4.9.4 Análisis crítico del efecto de la administración de Cy según el esquema -1, +1, +4; sobre la actividad supresora inducida por VJ y sobre su blanco

Como pudo demostrarse [58], el tratamiento con Cy según este esquema es capaz de doblegar la resistencia del ratón adulto a VJ, obteniéndose mortalidades en el orden del 90%. Del mismo modo, este esquema es también capaz de afectar de alguna manera el circuito supresor de HR en el modelo 10^8 GRC [74] (véase también punto anterior).

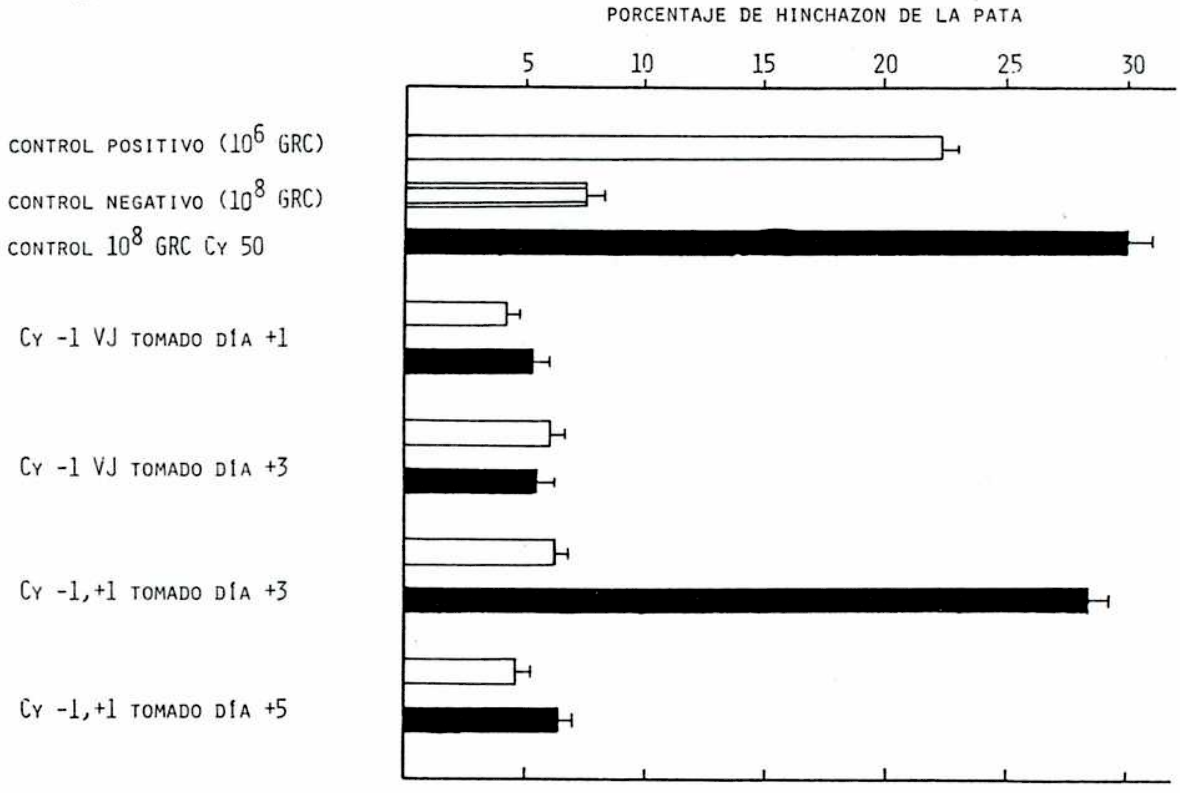
Llama poderosamente la atención el porqué de la necesidad de aplicar un esquema tan particular de administración de la droga para obtener mortalidad en los ratones adultos infectados con VJ. Previamente (Punto **4.9**) se demostró que, luego de la aplicación de Cy, las células esplénicas obtenidas al día +5 pi, no poseen actividad supresora Tsv o Tsv*, pero que la supresión se recuperaba parcialmente (Tsv*) a partir del día +7 pi. Estos resultados sugerían la importancia del "timing" en la administración de la droga sobre la posible regeneración de las células involucradas. Por esta razón se decidió ampliar el estudio de este esquema de administración de la droga y de su posible efecto sobre las diferentes poblaciones celulares generadas por VJ (Tsv, Tsv* y sobre sus blancos de acción).

Para analizar este punto, se aplicó parcial o totalmente este esquema de Cy a animales infectados con VJ, tomándose células esplénicas a diferentes momentos de la infección. Estas células fueron transferidas simultáneamente a los sistemas indicadores 10^6 GRC (que permite la expresión de ambas actividades [Tsv y Tsv*]) y 10^8 GRC-Cy -1, +1, +4 (que sólo permite la expresión de Tsv).

Como puede observarse en la Fig. 22, la administración de una única dosis de Cy al día -1, no impide la supresión de ambos sistemas indicadores mientras que si se administran las dosis correspondientes a los días -1 y +1, se observa que las células tomadas al día +3 son incapaces de alterar la HR en el sistema 10^8 GRC-Cy -1, +1, +4. Es decir que estas dos dosis afectan en parte la actividad supresora inducida por VJ. Sin embargo, si se transfieren células tomadas al día +5 pi de animales tratados en forma similar, éstas son capaces de suprimir ambos sistemas indicadores sugiriendo entonces la regeneración de las células supresoras.

Sin embargo, cabe recordar que la administración de una tercera dosis en el día +4, induce fuertes alteraciones en la actividad supresora, impidiendo la supresión del sistema indicador 10^6 GRC. Esta actividad luego se recupera, pero queda afectada la capacidad de suprimir la respuesta de HR sobre el sistema indicador 10^8 GRC-Cy -1, +1, +4 (Figs. 14-17).

Figura 22



Se transfirieron $40x10^6$ células tomadas en los días especificados de ratones adultos BALB/cJ infectados con VJ y tratados con Cy en los días -1 ó -1 y +1 (50 mg/kg cada dosis). Los receptores fueron ratones sensibilizados con 10^6 GRC 7 días antes o con 10^8 GRC y tratados con Cy según el esquema -1, +1, +4 (barras negras). Al menos 5 animales en cada grupo.

A la luz de estos resultados y, como la definición de las subpoblaciones celulares supresoras inducidas por VJ es totalmente operativa, debido al similar fenotipo que portan, se pueden ensayar dos hipótesis alternativas:

a) las células Tsv y Tsv* se encuentran presentes desde el principio de la infección.

Si consideramos Tsv como la capacidad de suprimir el esquema 10^8 GRC-Cy -1, +1, +4, y Tsv* como el de suprimir 10^6 GRC, la célula Tsv desaparecería por el tratamiento con Cy, y la Tsv* sería resistente al esquema de administración de la droga pudiendo regenerarse luego de su momentánea desaparición al día +5.

b) La célula Tsv es reemplazada por Tsv* luego de la tercera dosis de Cy.

Esta hipótesis sugiere que habría una secuencia en la aparición de las células debida a la depleción de la primera población (Tsv) por el tratamiento con Cy y al posible requerimiento de una actividad supresora de HR, lo cual induciría la aparición de Tsv*.

Lamentablemente, debido al similar fenotipo de ambas células no fue posible discernir entre las dos alternativas.

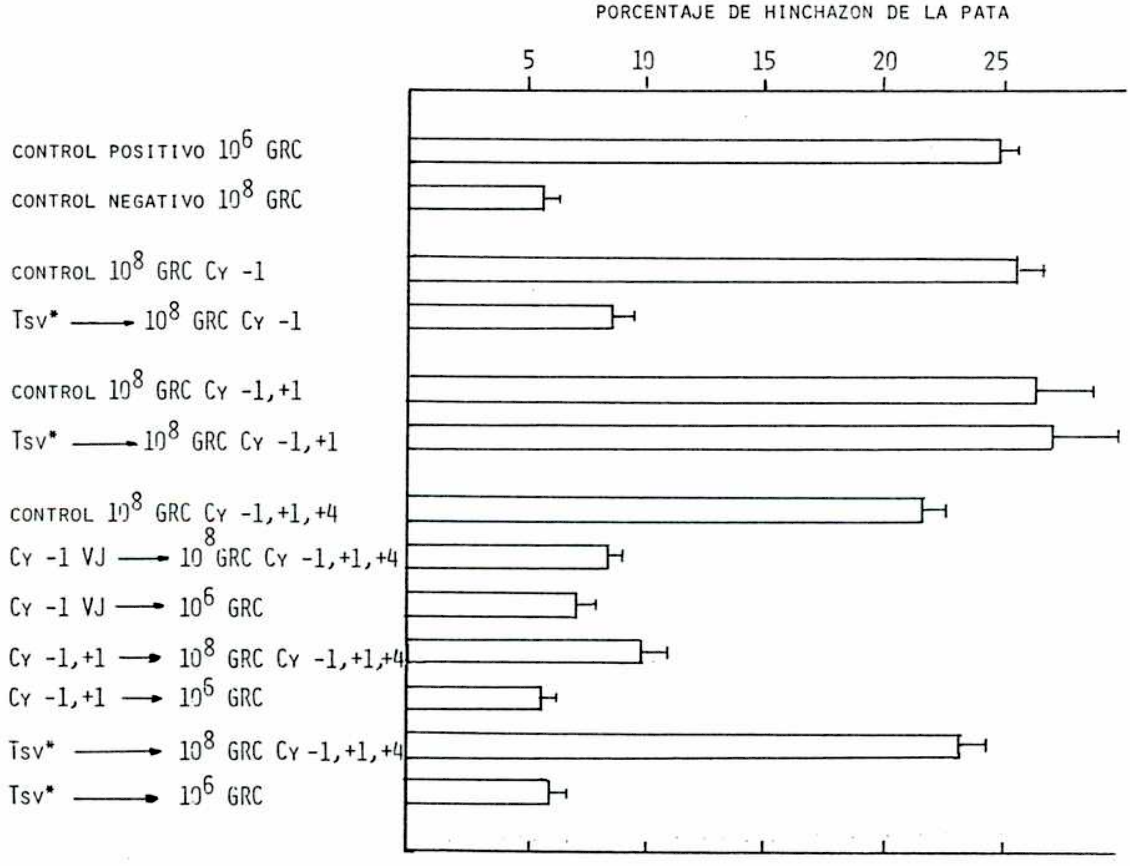
El efecto de la administración del esquema de Cy sobre la resistencia a VJ en los ratones adultos puede también, ser enfocado desde otro ángulo. Dado que tanto las células Tsv como las Tsv* requieren de células supresoras específicas de Ag, sobre las cuales actúan induciendo la supresión, el esquema de administración de la droga podría estar actuando simultáneamente sobre el blanco de acción de estas células. De hecho, en los sistemas indicadores de HR 10^6 GRC y 10^8 GRC-Cy -1, +1, +4, se ofrecen diferentes células blanco (ver punto **4.9.3**) y probablemente esto se deba, al menos en parte, a la acción de la droga.

Con el propósito de analizar el efecto de la Cy sobre el blanco requerido por las supresoras inducidas por el virus, se transfirieron células Tsv* a receptores sensibilizados con 10^8 GRC y tratados con esquemas parciales o completos de Cy. Como surge de la Fig 23, se pudo determinar que una única dosis de Cy al día -1 es incapaz de afectar la expresión de Tsv*, mientras que con sólo dos dosis desaparece el blanco de la célula pese a que el tiempo transcurrido entre la segunda dosis (día +1) y el ensayo (día +7) demostró ser suficiente para la regeneración de las células supresoras inducidas por VJ.

Estos resultados sugieren que, para la depleción del blanco bastaría con la aplicación de dos dosis de Cy, mientras que la tercera dosis sería críticamente necesaria para la eliminación de Tsv. Es de destacar que en animales infectados por vía ic y tratados con Cy según el esquema -1, +1; ya se registra una mortalidad de alrededor del 50% [89], lo cual se correlacionaría con la momentánea desaparición de células Tsv activas sobre el blanco generado por este esquema de Cy. Por lo tanto, la tercera dosis sería crítica para la total eliminación de Tsv, lo que traería aparejado la mayor sensibilidad a la

inoculación viral (mortalidad con el esquema completo de Cy: 90%), dado que esta célula es capaz de utilizar el blanco generado por este esquema de Cy aplicado en forma parcial o completa. De esta forma y en la asunción de que el blanco inducido por VJ sobre el que actuaría Tsv para protejer del daño potencial, presentaría una sensibilidad similar a la Cy que el de GRC; se proveería una base teórica con fundamentación experimental a un esquema inmunosupresor establecido en forma empírica y que es capaz capaz de doblegar la resistencia del ratón adulto a la inoculación con VJ.

Figura 23



Se transfirieron 40x10^6 esplenocitos obtenidos a partir de ratones adultos BALB/cJ infectados y tratados con Cy según se indica en la figura, a receptores sensibilizados con 10^6 GRC ó 10^8 GRC Estos últimos fueron tratados con esquemas completos o parciales de Cy según se indica en la figura. Cada grupo está compuesto por, al menos, 5 animales.

4.10 Regulación de la actividad Tsv

Habiéndose determinado las principales características de las células supresoras inducidas por VJ en el ratón adulto (Tsv), se consideró de interés establecer si sobre ellas se ejerce algún tipo de regulación. El sólo hecho de que esta célula pueda actuar únicamente sobre determinados circuitos supresores, constituye *per se* un sistema de regulación de su actividad en tanto la limita a aquellos Ags capaces de inducir circuitos supresores compatibles con su accionar. Sin embargo surge como interrogante si Tsv está bajo algún sistema activo de control de su actividad.

Sobre este punto cabe recordar que la actividad Tsv desaparece espontáneamente al día +24 pi (Fig 6). La pérdida de su actividad podría en principio ser interpretada de dos maneras diferentes. Por una parte, esta pérdida podría deberse simplemente a la desaparición de la célula responsable (Tsv). Por otra parte, podría postularse la aparición de un sistema regulador activo capaz de actuar sobre Tsv, el que se manifestaría inhibiendo su expresión.

Con el propósito de analizar estas alternativas, se realizó un ensayo de cotransferencia, a receptores sensibilizados 7 días antes con 10^6 GRC, de esplenocitos obtenidos de animales infectados a los 31 y a los 5 días pi. En los primeros ya no se detecta la actividad Tsv, mientras que los segundos sí la poseen. Entonces, si no se suprime la respuesta de HR en los receptores que reciben ambos tipos de células en forma simultánea, la actividad Tsv estaría bajo regulación mediada por un sistema celular transferible.

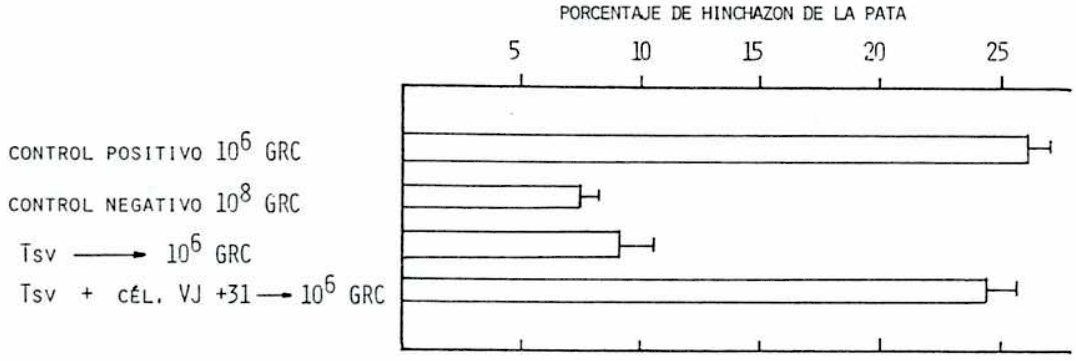
Los resultados obtenidos se esquematizan en la Fig 24. En ella se puede observar que, en los animales infectados 31 días antes, se indujo un sistema celular capaz de suprimir la célula Tsv es decir, se detectó actividad contrasupresora (CS) inducida por VJ.

Estos resultados son coincidentes con la hipótesis que sugiere que Tsv podría tener función en la prevenciób n de HR (respuesta mortal en el caso de la infección del ratón con VJ) hasta el establecimiento de una buena respuesta humoral protectora, valorada como anticuerpos neutralizantes, la cual es óptima recién al día +24 pi. [59]. Luego de ese momento, la célula Tsv dejaría de ser necesaria y, dado que es capaz de inhibir respuestas de tipo HR con el consiguiente riesgo frente a otros patógenos, debería ser eliminada. Es decir que se generaría un sistema activo de regulación de Tsv cuando ésta ya dejase de ser necesaria.

Para ensayar la hipótesis de la puesta en marcha del sistema de células CS cuando Tsv no es necesaria, se transfirieron esplenocitos obtenidos 5 días

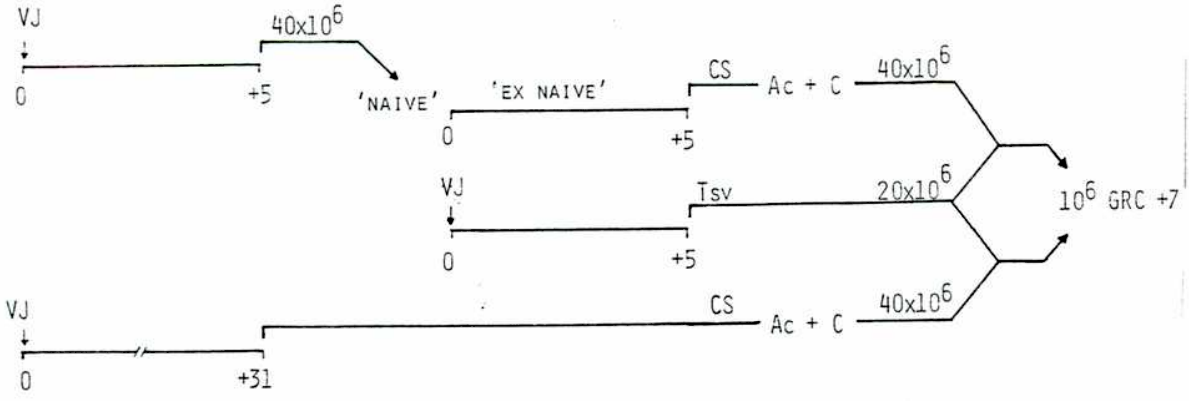
después de la infección viral (Tsv) cuando ya no se detecta virus en bazo ni en sangre ni aún por técnicas de alta sensibilidad como el cocultivo [68], a receptores "naive", los que 5 días después sirvieron como dadores (Ex-naive) en un ensayo de cotransferencia en búsqueda de actividad CS. El esquema experimental se muestra en la Fig 25.

Figura 24



Se cotransfirieron células Tsv ($20x10^6$ células/ratón) junto con esplenocitos obtenidos de animales infectados 31 días antes con VJ ($40x10^6$ células/ratón). Se utilizaron ratones adultos BALB/cJ de 60-90 días de vida. Cada grupo está compuesto por al menos 5 animales.

Figura 25



Esquema experimental utilizado para la inducción de las células CS, y para su caracterización. Ensayos efectuados en ratones BALB/cJ de 60-90 días de vida.

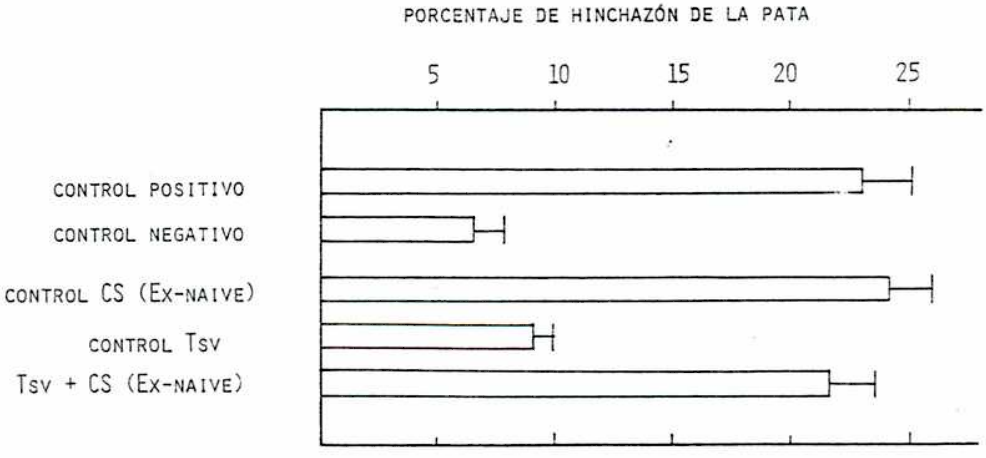
Los resultados obtenidos (Fig. 26) señalan que, en aquellos animales "naive" que recibieron Tsv, se generó actividad CS capaz de inhibirla.

Mediante el tratamiento de las células esplénicas obtenidas a los 31 días pi, con anticuerpos monoclonales seguido de complemento previo a la cotransferencia con Tsv, (Fig. 27) se estableció que esta actividad CS está asociada al fenotipo Thy 1^+, Ly 1^+2^-, coincidente con las descriptas para antígenos no infecciosos [90]. Es de destacar que, hasta el presente, no se había detectado este tipo de actividad en ninguna infección viral.

La identificación (Fig.27) de las células responsables de la actividad CS en el modelo Ex-naive, demostró su asociación también con un único fenotipo: Thy 1^+, Ly 1^+2^-. Es decir entonces que se trataría de una célula semejante a la generada naturalmente en los animales infectados.

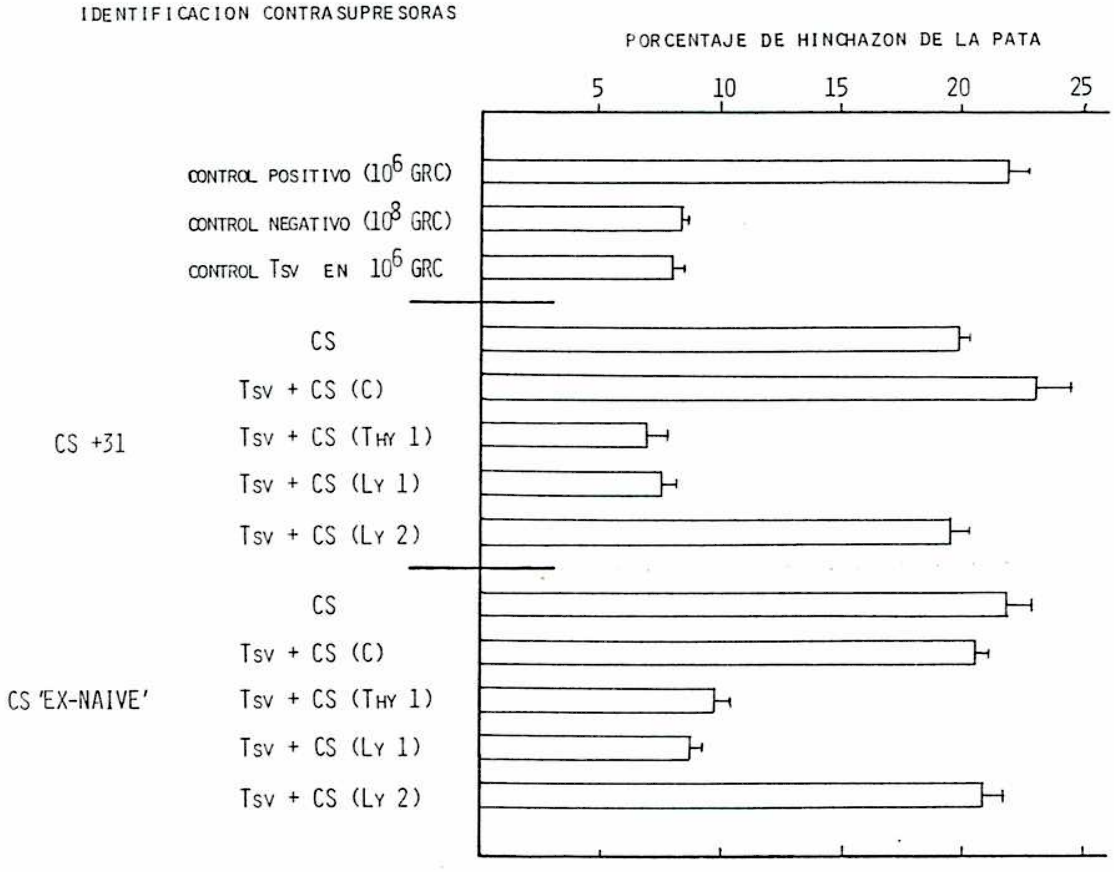
Desafortunadamente, debido al similar fenotipo de las células Tsv y CS, fue imposible determinar si ambas coexisten en un mismo animal en cualquiera de los dos modelos experimentales desarrollados, o si CS determina la desaparición de Tsv.

Figura 26



Se cotransfirieron células Tsv ($20x10^6$ células/ratón) junto con esplenocitos ($40x10^6$ células/ratón) obtenidos de animales "naive" que habían recibido 5 días antes $40x10^6$ células Tsv/ratón ("ex-naive"). Se utilizaron ratones adultos BALB/cJ de 60-90 días de vida. Cada grupo está compuesto por al menos 5 animales.

Figura 27



Se cotransfirieron células Tsv junto con células CS obtenidas de ratones a los 31 días pi o de ratones que habían recibido 5 días antes células Tsv (Ex-naive). Las células CS fueron tratadas con anticuerpos monoclonales seguidos de complemento previo a la mezcla de ambas poblaciones. Los receptores fueron sensibilizados 7 días antes con 10^6 GRC. Cada grupo constituído por, al menos, 5 animales. C: complemento.

4.11 Modo de acción de las células Tsv.

En los puntos **4.7** y **4.8** se había presentado evidencia indicativa de que las células inducidas por el virus requerían de actividades supresoras específicas de antígeno para poder actuar, siendo incapaces de hacerlo directamente sobre la célula T efectora de HR (THR). Estas células blanco fueron identificadas.

En este punto se describirán ensayos tendientes a ampliar nuestro conocimiento del modo de acción de las células Tsv.

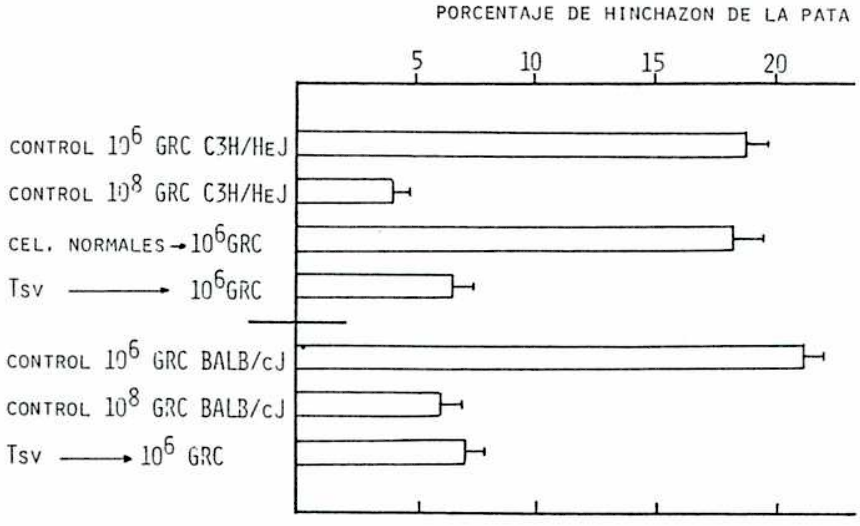
4.11.1 Restricción H2

A través del estudio de diferentes modelos experimentales, se ha podido demostrar que en algunos de ellos, la actividad supresora es capaz de actuar a través de la "barrera" del complejo mayor de histocompatibilidad (H2 en el caso del ratón), mientras que en otros sólo es capaz de hacerlo sobre células isogénicas. En general, las actividades supresoras antígeno-específicas poseen restricción H2 mientras que las inespecíficas, son capaces de actuar a través de esta "barrera".

Dado que la actividad supresora inducida por VJ es Ag-no específica, es de interés establecer si posee o no restricción H2. Para analizar este punto, se obtuvieron células Tsv y Tsv* en ratones BALB/cJ ($H2^d$), las que fueron transferidas a receptores C3H/HeJ ($H2^k$) previamente sensibilizados con 10^6 GRC, los que fueron inmediatamente desafiados con 10^8 GRC en la almohadilla plantar. En el caso de las células Tsv*, éstas fueron transferidas en forma simultánea también a receptores C3H/HeJ sensibilizados con 10^8 GRC y tratados con el esquema de Cy -1, +1, +4. Con la aplicación de este esquema se demostró previamente que estas células eran incapaces de actuar en receptores singeneicos (punto **4.9.1**).

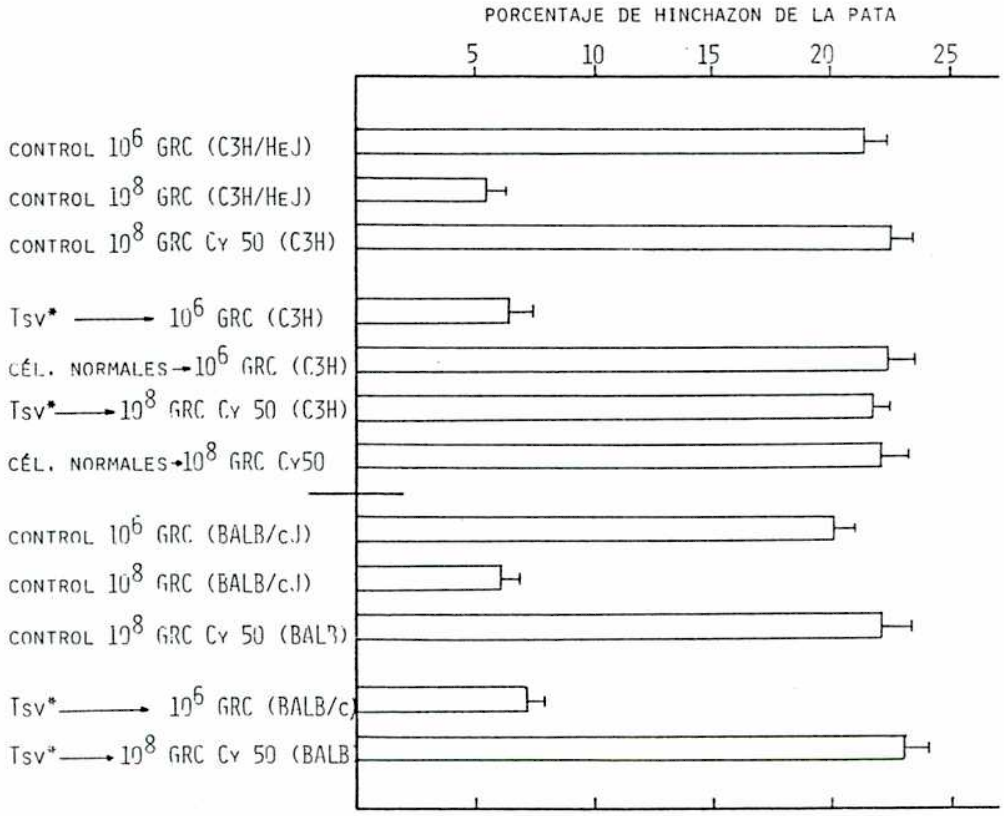
Los resultados obtenidos se expresan en la Fig 28 A y B, e indican claramente que tanto la actividad supresora Tsv como la Tsv*, no están restringidas en su accionar. Por otra parte, surge que las células Tsv* ($H2^d$) manifiestan similares requisitos por un determinado blanco que cuando son transferidas a receptores isogénicos, dado que son incapaces de suprimir el esquema de sensibilización 10^8 GRC-Cy -1, +1, +4; manteniendo así sus cacterísticas operativas en un entorno desconocido y sugiriendo una fuerte selección del circuito supresor sobre el que son capaces de actuar.

Figura 28 A



Se transfirieron 40x 10^6 células esplénicas obtenidas de ratones BALB/cJ infectados 5 días antes con VJ o normales a receptores C3H/HeJ o BALB/cJ sensibilizados 7 días antes con 10^6 GRC. Al menos 5 animales en cada grupo.

Figura 28 B



Se obtuvieron células esplénicas de ratones BALB/cJ infectados con VJ y tratados con Cy -1,+1,+4 las que fueron tomadas al día +7. Como receptores, se utilizaron ratones BALB/cJ y C3H/HeJ sensibilizados con 10^6 GRC ó con 10^8 GRC tratados con el mismo esquema de Cy. Como control, se transfirieron células de ratones normales. Al menos 5 animales en cada grupo.

4.11.2 Especificidad

Para poder actuar, Tsv requiere células supresoras específicas de Ag, siendo incapaces de inhibir la expresión de las células T efectoras de HR (THR) en forma directa. Surgió entonces, la hipótesis que sugiere la interacción de las células Tsv con las supresoras específicas de Ag.

En diversos modelos experimentales que involucran distintos Ags (ya sean éstos haptenos o particulados) se ha podido establecer que, aunque mediado por diferentes mecanismos, estas interacciones se activan de modo Ag-específico pero concluyen ejerciendo una supresión Ag-no específica. En

este sentido, se ha desarrollado el concepto de célula auxiliar o accesoria (acc), la que actúa como receptora de una señal Ag-específica. Una vez que ha ensamblado esa señal (normalmente un factor supresor), ésta actúa como receptora del Ag, el cual se comporta a su vez como segunda señal haciendo que la célula se active disparando un mediador supresor Ag-no específico [91].

Otra alternativa podría ser que, en realidad, la actividad supresora Ag no específica inducida por VJ actúe activando o exacerbando las células supresoras Ag-específicas.

Una tercera posibilidad a considerar sería que, como resultado de esta interacción, se genere en conjunto entre ambas células involucradas (Tsv y las supresoras específicas) un factor supresor con la especificidad de Ag eliminada por la actividad Tsv. A este respecto cabe señalar que, en diferentes sistemas supresores estudiados, los factores supresores que median esta actividad son generados como hemimoléculas por dos células diferentes, dando una de ellas la especificidad antigénica y la otra la restricción H2 [3].

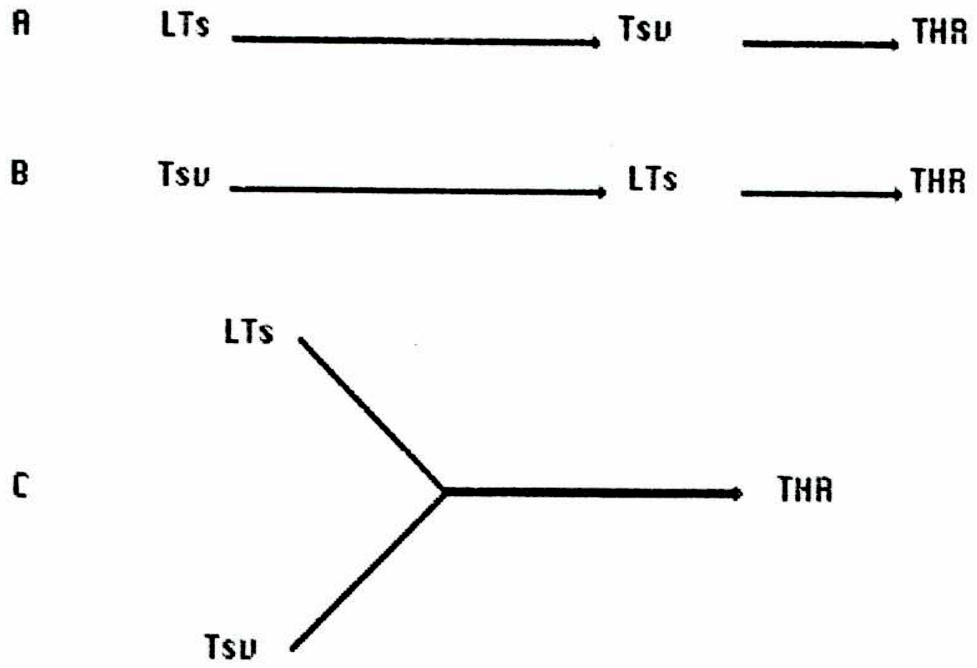
En resumen, se plantean tres hipótesis diferentes sobre el mecanismo de acción de las células Tsv (esquematizadas en la Fig 29):

A: la célula efectora de la supresión es directamente la Tsv, la cual podría actuar como receptora de una señal supresora Ag-específica. En este caso Tsv se comportaría como una célula supresora accesoria, de modo que al reconocer específicamente al Ag a través del factor supresor ensamblado en su superficie, se dispararía liberando una señal supresora Ag-no específica.

B: la célula supresora Ag-específica es activada o exacerbada por las células Tsv. En este caso, dado que la señal supresora sería generada por la célula Ag-específica, la supresión será específica de Ag.

C: la actividad supresora es en realidad fruto de un factor supresor generado en conjunto por ambas células, el cual mediaría supresión Ag-no específica.

Figura 29



La estrategia utilizada para analizar estas alternativas fue ofrecer como blanco final a las células Tsv, células T efectoras de HR dirigidas hacia diferentes Ags, las que deberían ser obtenidas libres de su actividad supresora específica. El propósito era establecer si, de la interacción entre Tsv y las células supresoras específicas de Ag, obtenidas separadamente, surgía la capacidad de bloquear la expresión de HR dirigida hacia Ags no relacionados. Es decir entonces que, si de la interacción Tsv-supresoras específicas surgía la capacidad de suprimir diferentes T efectoras de HR, la supresión estaría ejercida por las células Tsv de acuerdo a alguna de las hipótesis A ó C. Pero si la supresión se manifestase como Ag-específica, entonces la hipótesis a considerar como valedera sería la alternativa B, es decir que Tsv actuaría activando al circuito supresor Ag-específico.

Para ello, se eligieron dos Ags diferentes, uno fue un haptene (DNFB) y el otro un Ag particulado seleccionado por su similitud con GRC: glóbulos rojos de pollo (GRP).

DNFB permite fácilmente la obtención de HR libre de actividad supresora Ag-específica. De él se conoce que, mediante la estimulación por vía epicutánea, se inducen dos tipos celulares: la célula T efectora de HR y una célula T supresora auxiliar o accesoria (Ts-acc) Cy-sensible. Esta última puede

suprimir en forma inespecífica la respuesta de HR sólo en presencia de factores supresores específicos de Ag para los cuales posee receptores de superficie, siendo luego disparada por el Ag. Sin embargo, la actividad Ts-acc sólo se manifiesta cuando la célula supresora que produce el factor es H2 no compatible [91].

En la Fig 30, se esquematizan tres posibles mecanismos de interacción entre las células supresoras específicas de Ag, la Tsv, la Ts-acc y las T efectoras de HR dirigidas hacia GRC o DNFB. En el caso A la célula Tsv sería capaz de elaborar un factor supresor que se ensamblaría sobre T acc y luego ésta en contacto con un Ag capaz de disparar respuesta de HR, dispara una señal supresora Ag-no específica que por lo tanto sería capaz de actuar simultáneamente sobre las T efectoras de HR dirigidas hacia GRC o DNFB. Por otra parte el mismo factor podría ensamblarse sobre las Ts específicas de GRC (Ts-GRC) las que al ser disparadas por el Ag, den supresión Ag-específica. En el caso B, las células Ts-GRC serían capaces de elaborar un factor supresor capaz de ensamblarse sobre T-acc o sobre Tsv, en este caso la supresión sería Ag-no específica dado que ambas efectoras finales de supresión (T-acc o Tsv) son inespecíficas de Ag. No podríamos discernir cual de las dos células estaría actuando.

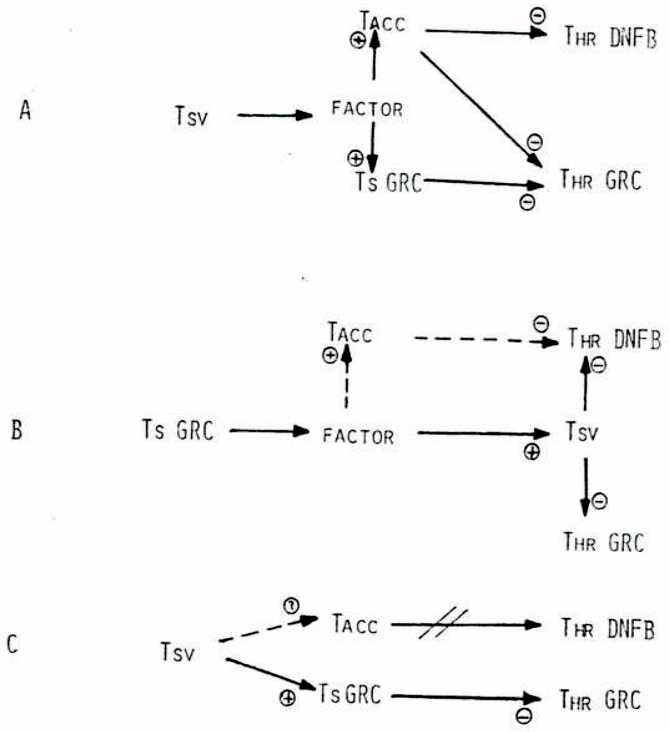
En el caso C, Tsv sería capaz de exacerbar a las células Ts-GRC pero no mediante la liberación de un factor supresor de modo que no podría actuar sobre T-acc. Aquí la supresión final sería Ag-específica dado que la célula efectora final de la supresión es Ag-específica (Ts-GRC).

Como era de esperar, dada la ausencia de células supresoras específicas en ensayos preliminares, se comprobó que la inoculación de VJ en animales sensibilizados con DNFB resultaba incapaz de afectar la respuesta de HR. Luego de esas comprobaciones preliminares, se inocularon animales sensibilizados simultáneamente con DNFB y 10^6 GRC. Se pudo verificar que la inoculación viral sólo pudo afectar la expresión de HR de aquel Ag que posee células supresoras específicas (GRC), sin alterar la de DNFB. Este resultado apoya la hipótesis de la activación de las células supresoras Ag-específicas por parte de Tsv.

Con el propósito de ensayar la posible presencia de factores supresores generados ya sea por la célula Tsv o por ésta en conjunto con los LTs específicos de Ag, se sensibilizaron receptores C3H/HeJ ($H2^k$) simultáneamente con DNFB (preservando la célula Ts-acc es decir, sin pretratamiento con Cy) y con 10^6 GRC. Estos animales sirvieron como receptores de células Tsv obtenidas en ratones BALB/cJ ($H2^d$). Si la Tsv liberase algún tipo de factor supresor, existe la posibilidad de que se activara la célula auxiliar presente en los receptores, la que liberaría la señal Ag-no específica, suprimiendo la HR hacia

ambos Ags. Si por el contrario no intervienen factores supresores, sólo se suprimiría la respuesta hacia GRC, dado que Ts-acc no actúa cuando se activan supresoras isogénicas. Se encontró (Fig. 31) que la HR a DNFB no pudo ser suprimida, lo que sugiere la no mediación de factores supresores capaces de activar a la célula Ts-acc.

Figura 30



Otro Ag, en este caso seleccionado por su similitud con GRC, fue GRP. En este caso, debido a su semejanza, su procesamiento por el sistema inmune es similar al que sufre GRC, aunque no dan reacción cruzada en respuesta HR. Sin embargo es de esperar que, dada la utilización de circuitos similares, las células Tsv posean más posibilidades de actuar sobre ambos Ags (GRP y GRC) cuando se les ofrecieran simultáneamente las THR respectivas.

Previamente se verificó que, del mismo modo que para GRC, la respuesta HR hacia GRP fuese inhibida por la inoculación de VJ en animales sensibilizados con 10^6 GRP pero no en animales pretratados con Cy (200 mg/kg) y sensibilizados con 10^8 GRP.

Los ensayos efectuados con GRC y GRP en forma simultánea se esquematizan en la Fig 32. En este caso, los receptores fueron animales *naive*, los que fueron transferidos con esplenocitos obtenidos a partir de diferentes

grupos de dadores. Cada lote de dadores fue sensibilizado de modo de contener una de las siguientes actividades:

LTs específicos de GRC (animales sensibilizados con 10^6 GRC, de los que se obtienen esplencitos el día +7).

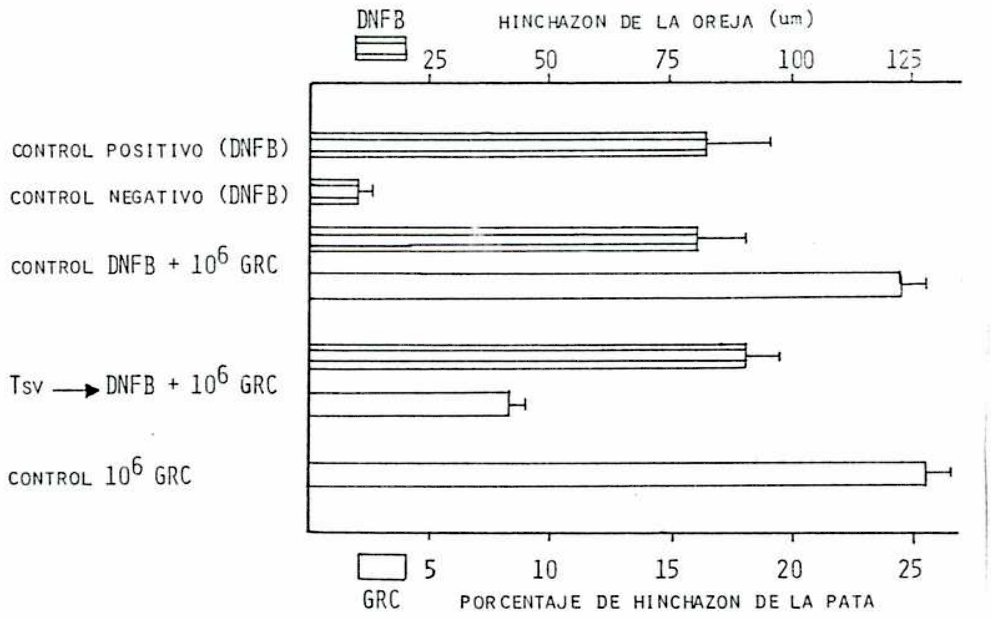
LTs específicos de GRP (animales sensibilizados con 10^6 GRP, de los que se obtienen esplencitos el día +7).

LT efectores de HR dirigida a GRC (animales pretratados con 200 mg/kg de Cy dos días antes de sensibilizarlos con 10^8 GRC, obteniéndose esplenocitos 5 días después).

LT efectores de HR dirigida a GRP (animales pretratados con 200 mg/kg de Cy dos días antes de sensibilizarlos con 10^8 GRP, obteniéndose esplenocitos 5 días después).

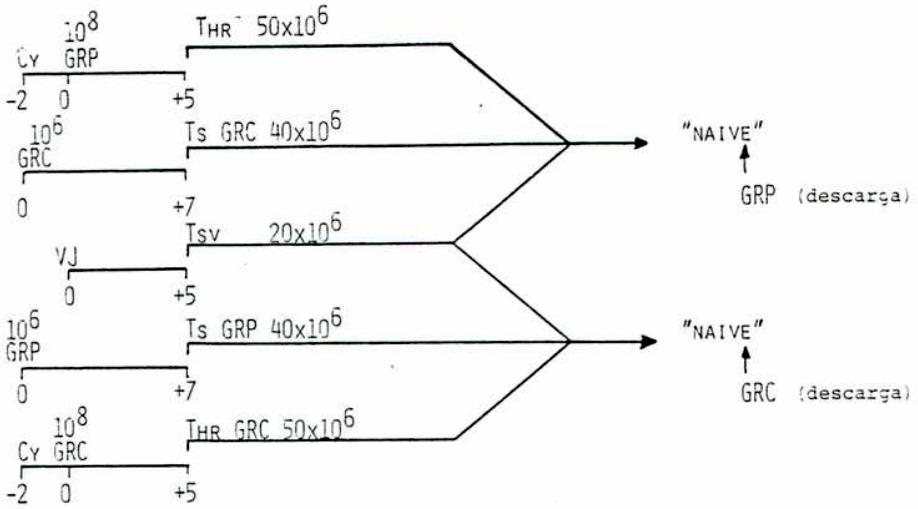
Tsv (esplenocitos obtenidos 5 días después de infectar ratones por vía ic con 10^3 DL_{50} de la cepa XJ de VJ).

Figura 31



Se transfirieron células Tsv obtenidas de ratones BALB/cJ infectados 5 días antes con VJ a receptores C3H/HeJ sensibilizados simultáneamente con DNFB y 10^6 GRC. Al menos 5 animales en cada grupo.

Figura 32

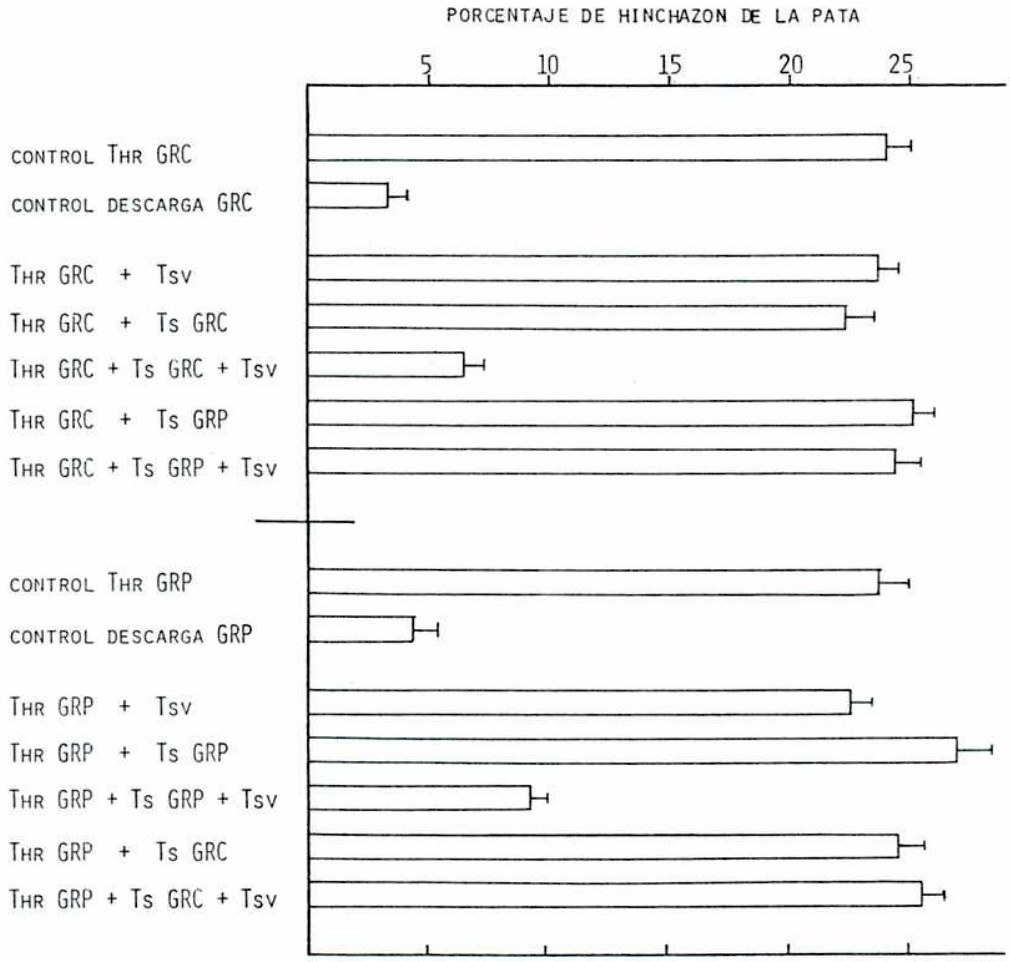


Esquema de obtención de las células involucradas y diseño experimental de ensayos de *especificidad* efectuados con una población supresora (GRC ó GRP).

Los resultados expuestos en la Fig 33, sugieren que Tsv es incapaz de suprimir una dada actividad THR cuando se le presentan como blanco células supresoras Ag-no relacionadas. Sin embargo, dado que los animales fueron descargados con sólo uno de los Ags, el que corresponde a la THR transferida, podría darse el caso de que no se activasen las supresoras ante la ausencia de su Ag, no se pudiera efectuar la interacción Tsv-Ts para generar la supresión final.

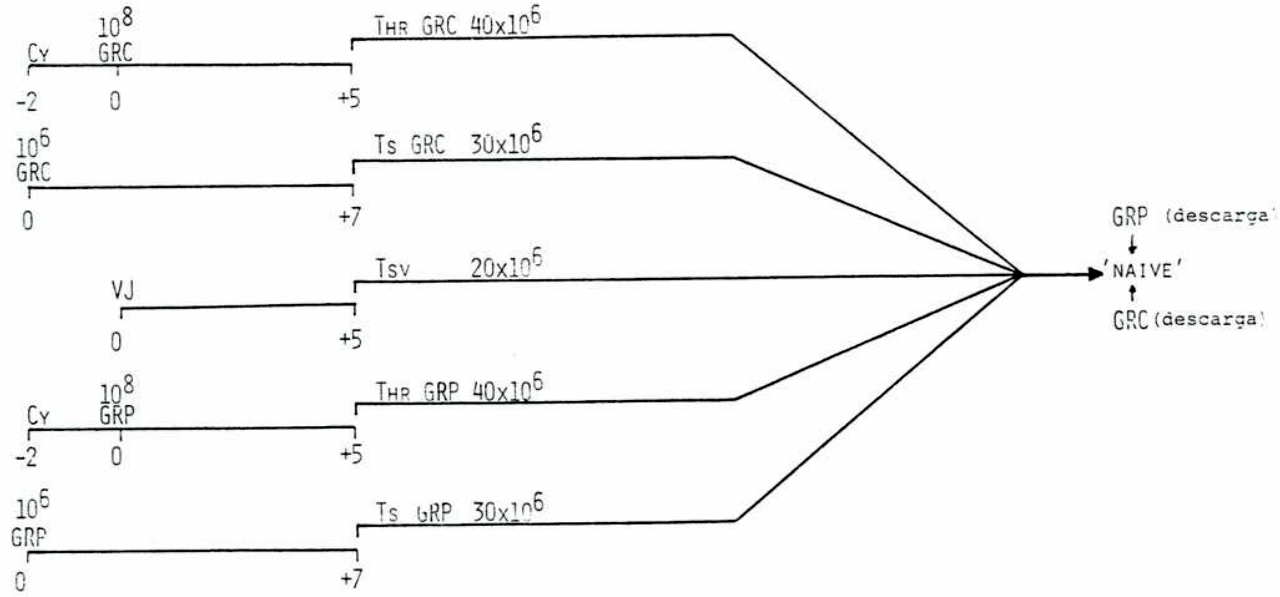
Para descartar esta posibilidad, se realizaron los ensayos esquematizados en la Fig. 34. En este caso, los receptores "naive", recibirían el mismo tipo de células pero, en todos los casos, estarían presentes ambas THR y serían descargados con ambos Ags en forma simultánea (uno en cada pata posterior). De este modo si Tsv es capaz de inducir supresión de una de las THR en presencia de los LTs del otro Ag, entonces la efectora de supresión sería la propia Tsv. Si por el contrario, Tsv inducía supresión de la actividad THR sólo en presencia de sus supresoras específicas, probablemente entonces Tsv actuaría activando los circuitos supresores específicos.

Figura 33



Resultados obtenidos en los ensayos esquematizados en la Figura anterior. Las diferencias sólo son significativas ($P<0.001$) entre los grupos control THR y THR + Tsv + su correspondiente Ts. Se utilizaron ratones BALB/cJ de 60-90 días de vida. Al menos 5 animales en cada grupo.

Figura 34



Esquema de obtención de las células involucradas y diseño experimental de los ensayos de especificidad efectuados con dos poblaciones supresoras.

Los resultados de estos ensayos, se expresan en la Fig 35. De ellos surge claramente que Tsv es capaz de actuar sólo sobre aquel Ag que posee sus propias supresoras. No se observa reacción cruzada en la actividad supresora, pese a la similitud de los Ags empleados y a que Tsv puede actuar sobre ambos.

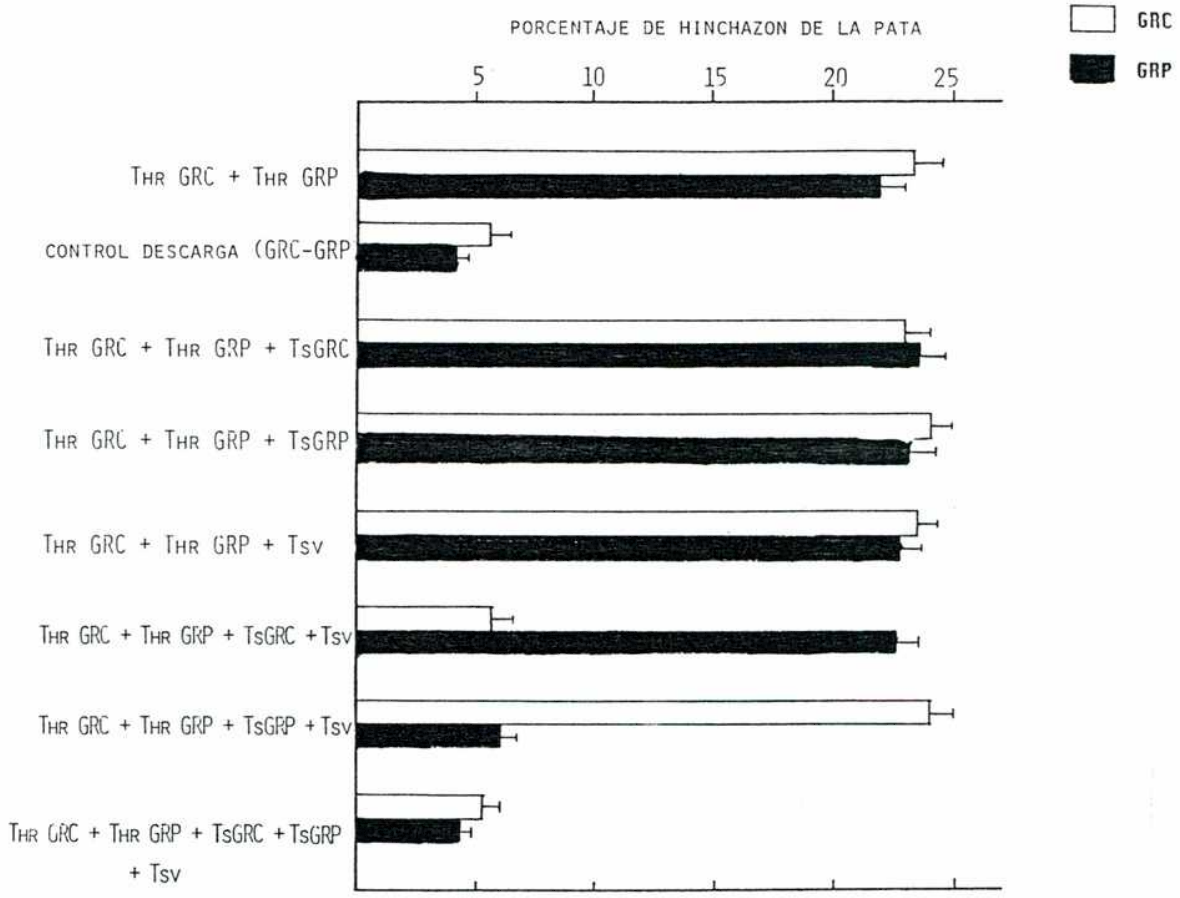
Estos resultados sustentan fuertemente la hipótesis según la cual las células Tsv actuarían activando a las células Ts específicas de Ag. Estas a su vez serían las verdaderas efectoras de la supresión, dado que la supresión final es Ag-específica. Por lo tanto, si bien Tsv es una célula supresora Ag-no específica debido a que es inducida por VJ y se muestra capaz de actuar sobre Ags no relacionados con el virus, en virtud de su requerimiento por células supresoras Ag-específicas y por su accionar sobre ellas surge que en realidad, Tsv podría considerarse como un tipo de célula específica de determinados circuitos supresores de HR, los que deben ser de algún modo compatibles con su mecanismo de acción.

Esto determina una forma de acción diferente de otras células supresoras inducidas por virus. Si bien hasta el presente son relativamente pocos los virus en los que se ha podido determinar su mecanismo de supresión Ag-no específica, cuando no destruyen las células del sistema inmune, en ningún caso

se estableció el requerimiento por células supresoras específicas de Ag para poder actuar.

Paralelamente estos resultados sugieren que, en el caso de VJ, de poseer esta célula algún grado de participación en la capacidad de sobrevida del ratón a la infección viral, debería generarse una célula blanco específica para VJ, la que sería activada por Tsv para inhibir la reacción de HR responsable de la muerte de los animales sensibles.

Figura 35



Resultados obtenidos en los ensayos esquematizados en la figura anterior. Con barras negras se expresan los porcentajes de hinchazón registrados con GRP. Sólo se obtiene diferencia significativa entre el correspondiente control y aquellos grupos que reciben Tsc y la Ts especifica. Al menos 5 animales en cada grupo. Controles negativo: animales descargados solamente.

4.12 Búsqueda de los marcadores IJ y L3T4 en las células Tsu

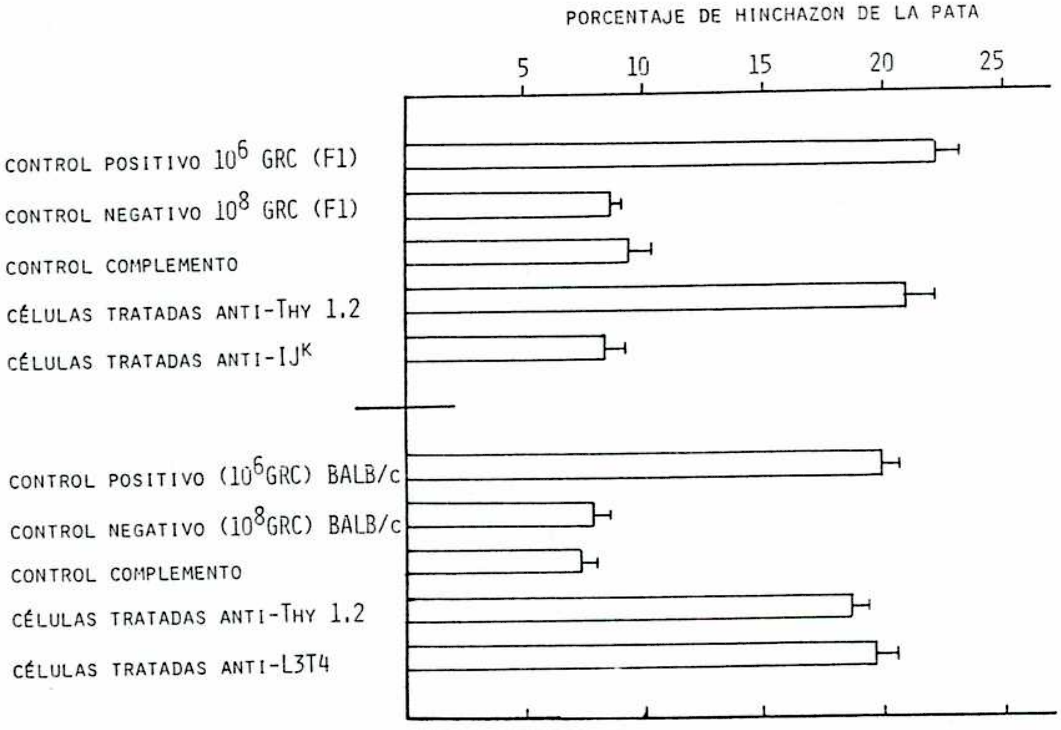
Las células Tsv fueron identificadas previamente (punto **4.6**) como portadoras del fenotipo Thy 1^+, Ly 1^+ 2^-. Con el propósito de completar en la mayor medida posible la caracterización fenotípica de estas células, se realizaron ensayos de depleción utilizando un aloantisuero anti-IJ^k y anticuerpos monoclonales obtenidos en rata anti-L3T4, seguidos de tratamiento con complemento de conejo.

El marcador IJ está relacionado con numerosas poblaciones celulares con actividad supresora [3]. Ante la ausencia de un Ac anti IJ^d (BALB/cJ es $H2^d$),se debió utilizar un Ac anti-IJ^k. Dado que los ratones C3H/HeJ ($H2^k$) son naturalmente sensibles a la inoculación viral y no poseen células supresoras (ver Puntos **4.13** y **4.14**), se decidió el empleo de híbridos (BALB/cJ X C3H/HeJ) F1 ($H2^{d/k}$) los que son resistentes y poseen actividad Tsv para estudiar la presencia del marcador. Como se puede observar en la Fig 36, las células demostraron ser resistentes al tratamiento. Como control interno, se agregó un grupo experimental que recibió células tratadas con anticuerpos monoclonales anti-Thy 1.2 donde se registró la pérdida de la supresión.

Por otra parte, se ensayó la presencia del marcador L3T4 relacionado con la actividad helper y THR, aunque también pudo ser detectado en algunas poblaciones supresoras que requieren de otros tipos celulares para efectuar la supresión de la respuesta [7, 92]. En la realización de estos ensayos, se utilizaron ratones BALB/cJ adultos. De la Fig. 36 surge claramente que las células Tsv son portadoras de este marcador, dado que la actividad supresora por ellas mediada desaparece por completo. Nuevamente como control interno, se adicionó un grupo que recibió células tratadas con anticuerpos monoclonales anti-Thy 1.2.

El resultado de estos ensayos, indica que las células Tsv son portadoras del fenotipo Thy 1^+, Ly 1^+ 2^-, IJ^-, $L3T4^+$.

Figura 36



Se ensayó la presencia del marcador IJ en los ratones híbridos (BALB/cJ X C3H/HeJ) F1 de 60-90 días de vida, transfiriendo esplenocitos obtenidos de animales infectados 5 días antes y tratados con suero anti-IJ^k seguido de complemento a receptores sensibilizados con 10^6 GRC 7 días antes. En otro ensayo, se determinó la presencia del marcador L3T4 utilizando un anticuerpo monoclonal seguido de complemento. Para ello se utilizaron ratones BALB/cJ de 60-90 días de vida. Al menos 5 animales en cada grupo.

4.13 Descripción de un modelo murino adulto naturalmente sensible a la inoculación con VJ

Como se comentó en el punto.**2.5.2.4**, clásicamente la infección del ratón lactante con VJ induce una meningoencefalitis letal que, histológicamente, resulta compatible con una reacción de HR. Paralelamente, los adultos son resistentes y no presentan signos neurológicos o daños en el tejido del SNC.

Aunque la resistencia del ratón adulto a la infección viral puede doblegarse mediante la aplicación de un esquema particular de administración de Cy, la ausencia de un modelo naturalmente sensible a la infección ha dificultado la investigación sobre la patogénesis de la FHA, habida cuenta de las dificultades propias del trabajo con animales recién nacidos.

La gran mayoría de los trabajos experimentales con el modelo ratón-VJ, han sido llevados a cabo con las cepas Rockland (exocriada) y BALB/c (endocriada). De esta manera no se posee aún un relevamiento amplio sobre la susceptibilidad de las diferentes cepas murinas actualmente disponibles. Existe sin embargo un estudio temprano [57], el cual sugiere que la susceptibilidad murina a la infección es independiente de la cepa empleada.

Durante el transcurso de los trabajos experimentales, se consiguió la importación de las cepas BALB/cJ y C3H/HeJ de The Jackson Lab. Inc. (USA). La inoculación de estas cepas, confirmó la resistencia de los ratones BALB/c adultos pero sorprendentemente, la cepa C3H/HeJ resultó altamente susceptible a la inoculación por vía intracerebral con VJ, transformándose asi en la primera cepa murina cuyos adultos son naturalmente sensibles a la inoculación.

Seguidamente se describirán los principales parámetros del curso de la enfermedad en esta cepa murina.

4.13.1 Susceptibilidad de los ratones de 3 meses de vida a VJ

La inoculación ic de 160 UFP (10^3 DL_{50} para ratones recién nacidos) de la cepa XJ de VJ llevó a la obtención de aproximadamente 8-10% de mortalidad en las cepas murinas BALB/cJ y C57BL en concordancia con los resultados previamente establecidos por otros autores [57-58].

En contraste, los ratones C3H/HeJ de la misma edad y similarmente infectados, presentaron 80-95% de mortalidad. Los animales se tornaron excitables tempranamente (8º día pi) mostrándose positivos al ensayo de *spin-test*, postura encorvada y el pelo erizado. Estos signos fueron agravándose con el transcurrir del tiempo agregándose pérdida de peso, lasitud e hipotermia, mostrando ausencia de respuesta frente a estímulos externos y culminando en muerte dentro de los 13 días pi. Ocasionalmente, la realización del ensayo de *spin-test* en animales aparentemente sanos al dia +8 pi, indujo signos neurológicos opistotónicos y muerte.

Paralelamente, los híbridos (C3H/HeJ X BALB/cJ) F1 y (BALB/cJ X C3H/HeJ) F1 resultaron resistentes a la inoculación permaneciendo aparentemente sanos con 100% de sobrevida, presentando patrones similares a los descriptos clásicamente para los ratones adultos.

4.13.2 Dependencia de la edad en la susceptibilidad

Tradicionalmente, se pueden discernir dos grupos contrastantes en el modelo ratón-VJ: el recién nacido (susceptible) y el adulto (resistente). Por ello, se analizó al susceptibilidad a la infección viral de los ratones C3H/HeJ desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad.

Luego de la inoculación de 160 UFP (10^3 DL_{50} en ratón BALB/c) de la cepa XJ de VJ por vía intracerebral, los ratones lactantes se mostraron obviamente enfermos mostrando signos neurológicos tales como temblor, ataxia e hiperkinesia alcanzándose mortalidades cercanas al 100% dentro de los 8-16 días (Fig. 37). Sin embargo, los animales de quince días de vida, mostraron porcentajes de mortalidad semejantes al de los adultos sensibles (Fig. 37 vs. Fig. 38).

La mortalidad fue alta en los adultos de hasta 4 meses de edad (Fig. 38) adquiriéndose resistencia completa recién a los 6 meses de edad con una sobrevida superior o igual al 90%.

Teniendo en cuenta estos resultados, se continuó con el análisis de este modelo eligiendo el grupo etario de 3 meses.

Figura 37

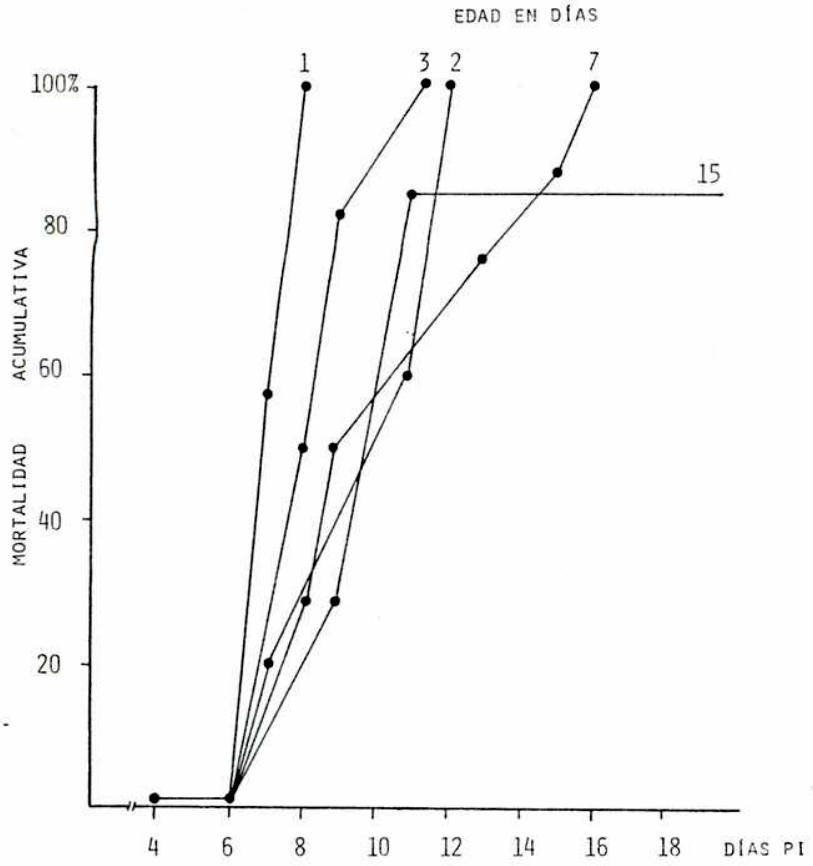
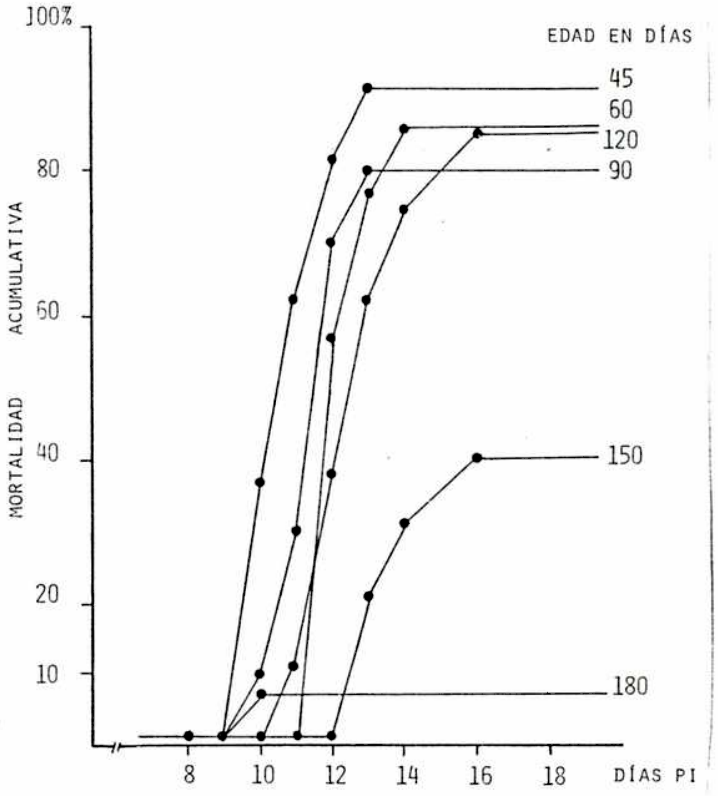


Figura 38



Mortalidad acumulativa respecto del tiempo post-inoculación (pi) en ratones C3H/HeJ. Cada grupo consistente de al menos 10 animales, fue inoculado con 160 UFP de VJ cepa XJ por vía ic a las edades indicadas en cada curva.

4.13.3 Correlación entre la atenuación viral, la dosis y la vía de inoculación con la susceptibilidad

En la Tabla III se detalla el efecto de la aplicación de dosis decrecientes de la cepa XJ de VJ por vía ic sobre la susceptibilidad de los ratones C3H/HeJ de 3 meses de edad. De esos valores, se puede estimar el título del stock viral en DL_{50} para ratón adulto en aproximadamente 10^6 DL_{50}/ml sólo 1.5 log menor que el obtenido en ratón lactante. (Estimación realizada según el método de Reed & Muench [79]).

Mediante la inoculación de 16 UFP (10^2 DL_{50} para ratón BALB/c) ic ya se logra obtener el 100% de mortalidad. Más aún, la inoculación de dosis mayores induce menores tiempos de sobrevida.

La utilización de vías alternativas de infección, (subcutánea, intramuscular o intraperitoneal) fue totalmente inefectiva, no observándose ningún signo de enfermedad.

Es de interés destacar que la cepa XJCL3 de VJ , atenuada para el hombre y el cobayo, aunque no para el ratón, falla en inducir mortalidad o aún signos clínicos cuando se aplican 400 UFP (10^3 DL_{50} para ratón BALB/c) por vía ic.

TABLA III: Efecto de distintas dosis, cepas y vías de inoculación de virus Junin en la mortalidad de los ratones C3H/HeJ de 3 meses de vida.

Dosis viral		Cepa viral	Vía	Mortalidad (%)	Día promedio de muerte
UFP	DL_{50} [a]				
1600	10^4	XJ	ic	100	8.6
160	10^3	XJ	ic	90	11.6
16	10^2	XJ	ic	100	10.3
1.6	10^1	XJ	ic	20	11
0.16	10^0	XJ	ic	0	—
160	10^3	XJ	ip	0	—
160	10^3	XJ	im	0	—
160	10^3	XJ	sc	0	—
400	10^3	XJCL3	ic	0	—

a) Según titulación en ratones BALB/c.
Los animales fueron infectados con la dosis indicada contenida en un volúmen de 0.02 ml para la vía ic, 0.1 ml para la im y 0.2 ml para las vías ip o sc.

$$\text{Día medio de muerte} = \frac{\sum (\text{día de muerte} \times \text{nº de animales encontrados muertos})}{\text{Nº total de muertes}}$$

Se utilizaron 10 animales para cada grupo experimental

4.13.4 Rescate de virus a partir de órganos y sangre

A pesar de la alta mortalidad registrada en la inoculación de 160 UFP de la cepa XJ de VJ por vía ic en el ratón C3H/HeJ de 3 meses de vida, en ningún caso se pudo recuperar virus a partir de macerados de cerebro (10% p/v) extraídos en los días 11-12 pi de animales muertos o moribundos. Por esta razón, se debió apelar a una técnica más sensible como el cocultivo con células permisivas. Para ello, se cocultivaron sangre, hígado, riñón, bazo, timo y cerebro obtenidos a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, y 11 días pi con células Vero como sustrato para la replicación viral.

En todos los tiempos ensayados, se pudo recuperar virus de cerebro pero resultó ser indetectable en todos los demás tejidos en todas las muestras extraídas.

4.13.5 Respuesta humoral

Los anticuerpos neutralizantes (Ac Nt) permanecieron con títulos inferiores a 1/10 hasta la muerte de los animales (adultos de 3 meses de edad). Sin embargo la detección por inmunofluorescencia indirecta (IFI) señaló la presencia de títulos bajos (1/5) a partir del día +7 pi.

Aquellos pocos sobrevivientes de los grupos susceptibles y los ratones resistentes inoculados ic con la cepa XJ , junto con los ratones de 3 meses de vida inoculados con la cepa XJCL3 ic mostraron altos títulos de Ac Nt (1/160) a los 25 días pi (Tabla IV). Por otra parte, los títulos variaron desde 1/20 a 1/80 cuando se emplearon vías de infección alternativas a la ic (Tabla V).

Con el propósito de determinar si los ratones que reciben la cepa XJ por vías extraneurales o XJCL3 por vía ic, eran capaces de resistir el desafío con XJ, se aplicó una dosis de 160 UFP a los 25 días pi. Se pudo demostrar protección debido a la ausencia de signos clínicos y mortalidad (sobrevida 100%) en todos los grupos desafiados, dentro del período de 30 días de observación.

TABLA IV: Niveles de anticuerpos séricos en los ratones C3H/HeJ adultos de diferentes edades, sobrevivientes a la infección intracerebral con VJ

Edad en días	Dosis viral UFP	Dosis viral DL_{50} [a]	Cepa viral	Título de Ac Nt [b]	Título de Ac IF [c]
45	160	10^3	XJ	1/160	1/20
60	160	10^3	XJ	1/160	1/10
90	160	10^3	XJ	1/160	1/10
150	160	10^3	XJ	1/160	1/5
180	160	10^3	XJ	1/160	1/5
90	160	10^3	XJCL3	1/160	1/5

[a] Por titulación en ratón lactante.
[b] Los títulos de Ac Nt están expresados como la mayor dilución capaz de protejer las monocapas de células vero en un 100% contra 100 UFP de la cepa XJ de VJ.
[c] Los títulos de Ac IF están expresados como la mayor dilución que pudo visualizarse por inmunofluorescencia indirectá sobre células BHK_{21} infectadas con VJ.
Para cada grupo experimental, se ensayó un "pool" de 3-5 sueros. El ensayo se efectuó a los 25 días pi.

TABLA V: Niveles de anticuerpos séricos en los ratones C3H/HeJ de 90 días de vida infectados con VJ por vías extraneurales.

Vía	Cepa viral	Dosis viral (UFP)	Título de Ac Nt[a]	Título de Ac IF[b]
im	XJ	160	1/20	1/5
sc	XJ	160	1/20	1/5
ip	XJ	160	1/80	1/5

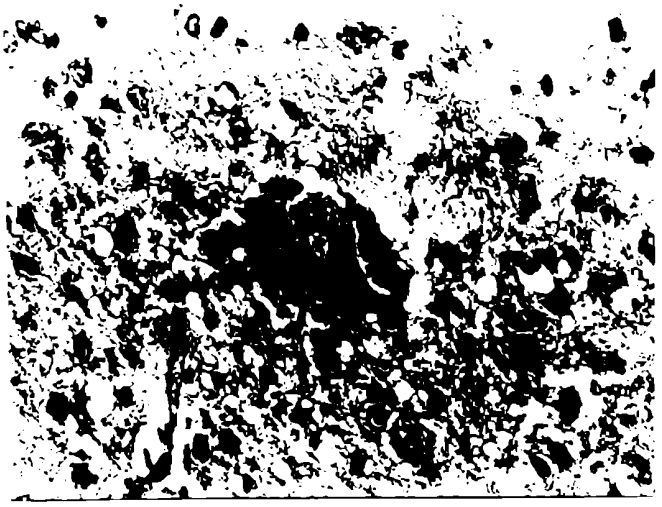
[a,b] Los Ac Nt e IF se expresan del mismo modo que en la TABLA IV.
Para cada punto experimental, se ensayó un "pool" de 3-5 sueros. El ensayo se efectuó a los 25 días pi.

4.13.6 Hallazgos histopatológicos

El análisis histológico de los cerebros extraídos entre los días 8-10 pi, mostró congestión vascular y leptomeningitis difusa. A partir del día +11, los daños se agravaron apareciendo manguitos perivasculares de células mononucleares (Fig 39) que ocasionalmente infiltraban el parénquima cerebral. Este cuadro persistió hasta la muerte a los 11-13 días pi excepto en los pocos animales (~15%) que mostraron mejoría clínica, donde los hallazgos fueron, en todos los casos, más leves. La leptomeningitis, de naturaleza uniforme y difusa, estaba invariablemente caracterizada por infiltrado predominantemente linfocítico, acompañado por monocitos en un grado menor.

En aquellos especímenes que mostraron daños más severos en las paredes de los vasos y mayor infiltrado linfomonocítico perivascular, las alteraciones fueron observadas dentro del parénquima cerebral en la vecindad de los ventrículos laterales, así como también en cerebelo, afectando en magnitud similar tanto al cerebro como al cerebelo. En todos los casos los hallazgos histopatológicos fueron compatibles con lesiones del tipo de las que se observan en una reacción de HR.

Figura 39



Corte histológico de cerebro de ratón C3H/HeJ de 90 días de edad, 12 días después de la inoculación de 160 UFP de VJ cepa XJ por vía ic, mostrando células inflamatorias mononucleadas en un vaso con manguito perivascular. 200X.

4.14 Relación entre la actividad supresora inducida por VJ y la capacidad de sobrevida de los ratones a la inoculación viral

La reacción de HR está aceptada como la responsable de mediar la muerte de los ratones sensibles. Esto es así en los ratones lactantes de todas las cepas ensayadas [60-65] y en los ratones BALB/c adultos tratados con Cy [58]. De forma similar, los ratones C3H/HeJ naturalmente sensibles a la inoculación muestran lesiones compatibles con este tipo de respuesta (punto **4.13**). De esta manera, el mecanismo supresor aquí descripto podría entonces estar directamente relacionado con la capacidad de sobrevida de los ratones adultos BALB/c.

Esta hipótesis ha encontrado apoyo experimental en los resultados expuestos en el punto **4.9**. En él se pudo establecer que, aquellos ratones que reciben el tratamiento completo con Cy capaz de doblegar su resistencia a la inoculación viral, se pierde la actividad Tsv apareciendo una forma de supresión de HR mediada por células Tsv* no operativa en su propio entorno. Por otra parte, se pudo comprobar que la tercera dosis de Cy aplicada al día +4 destruye la célula supresora inducida por el virus, ya que su blanco de acción es eliminado con la aplicación de las dos primeras dosis.

Si bien esos resultados pueden ser interpretados como indicativos de la existencia de una relación directa entre sobrevida y actividad supresora de HR, se decidió extender el análisis a otros modelos.

4.14.1 Modelo C3H/HeJ adulto

Con el propósito de establecer la presencia de alguna actividad supresora en este modelo naturalmente sensible a la inoculación con VJ, se inocularon ic con la cepa XJ de VJ (160 UFP), ratones adultos correspondientes a los grupos etarios sensibles y resistentes a la inoculación, los que fueron sensibilizados con 10^6 GRC. Los resultados de estos ensayos se expresan en la Fig 40. En ella se puede apreciar que la inoculación de VJ es incapaz de alterar la respuesta de HR en los animales sensibles (90 días de vida) mientras que se obtiene supresión significativa ($P<0.01$), aunque no total, en los animales resistentes a la inoculación (180 días de edad).

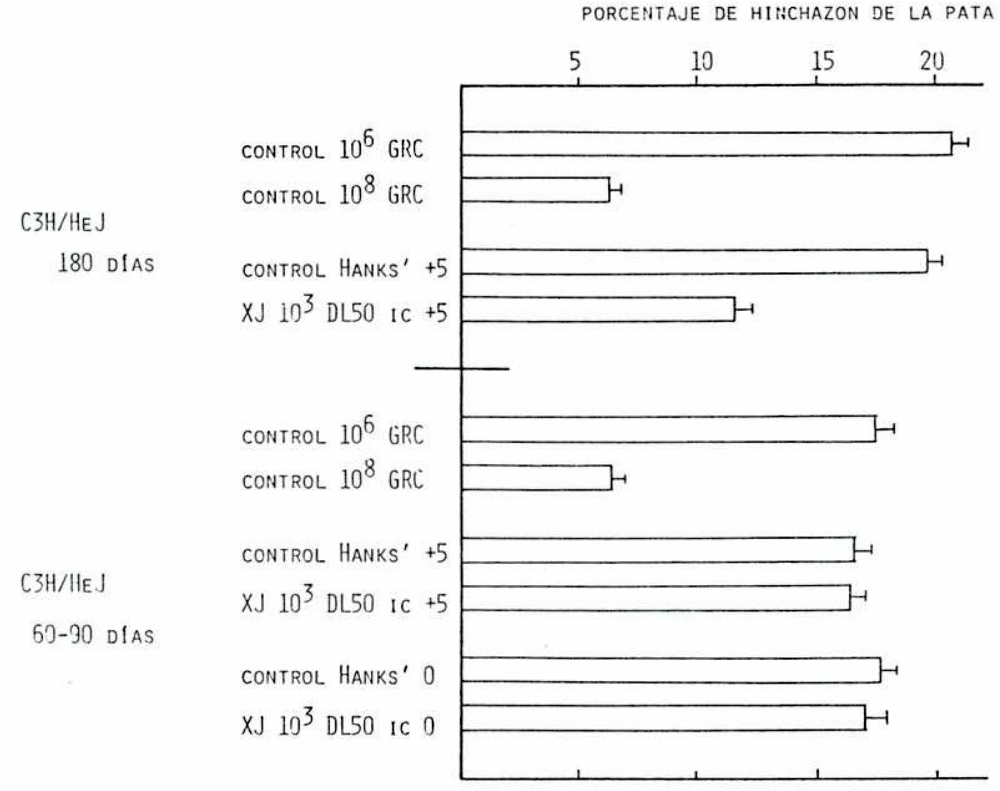
Estos resultados parecen apoyar la hipótesis que correlaciona supresión con sobrevida. Sin embargo se abre el interrogante sobre si las células Tsv

están presentes pero por alguna razón no pueden ejercer supresión en el grupo de animales susceptibles y también si el mecanismo supresor en los resistentes es similiar al descripto en los ratones BALB/c.

Con el propósito de establecer la presencia o ausencia de células inducidas por el virus con capacidad supresora de HR, se transfirieron esplenocitos obtenidos 5 días después de infectar ratones C3H/HeJ de 90 días de vida a receptores isogénicos sensibilizados 7 días antes con 10^6 GRC. Estos ensayos dieron sistemáticamente negativos, no pudiéndose detectar actividad supresora de HR. Ante la posibilidad de que en realidad se induzcan células supresoras pero que éstas no pudieran expresarse en los ratones C3H/HeJ por algún motivo y dado que las células Tsv mostraron no poseer restricción H2 en su accionar, se les ofreció la posibilidad de que, en caso de haberse inducido en los ratones C3H/HeJ, pudieran expresarse en animales BALB/cJ donde se ha establecido que las células Tsv poseen todos sus requerimientos de expresión completos. Los resultados se presentan en la Fig 41, donde se puede apreciar que no se consiguió detectar actividad supresora de HR mediada por células en los ratones C3H/HeJ susceptibles a la infección viral.

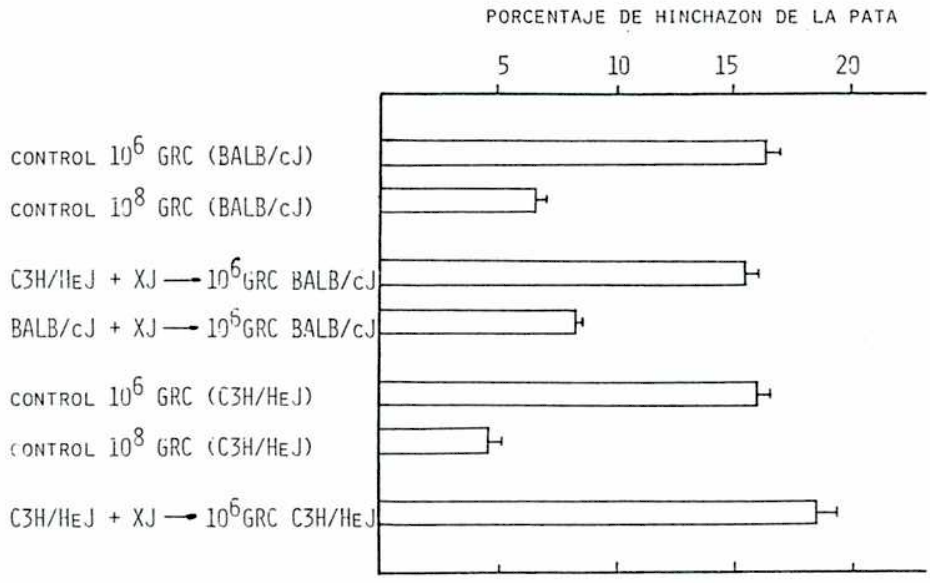
Para determinar si la actividad supresora detectada en los ratones C3H/HeJ resistentes a la inoculación con VJ (180 días de edad) estaba ligada a la presencia de células supresoras, se transfirieron esplenocitos tomados 5 días después de la inoculación a receptores isogénicos previamente sensibilizados con 10^6 GRC. El resultado se ilustra en la Fig. 42, donde se puede apreciar que la supresión previamente observada (Fig. 40) en los animales sensibilizados con GRC e inoculados con VJ, no resulta transferible por células, sugiriendo la existencia de otro mecanismo supresor diferente de Tsv en estos animales.

Figura 40



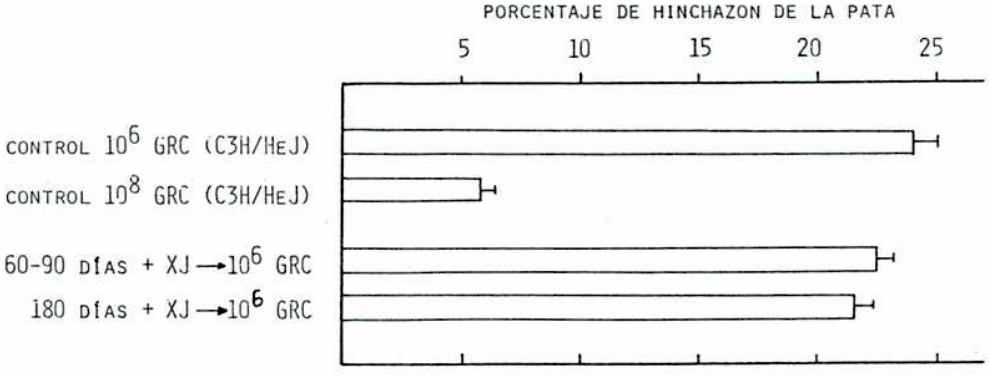
Se sensibilizaron con 10^6 GRC ratones C3H/HeJ adultos de más de 180 días de vida (arriba) o de entre 60-90 días (abajo). Distintos lotes recibieron 10^3 DL_{50} de la cepa XJ de VJ por vía ic en los días indicados. Los controles negativos de HR recibieron 10^8 GRC. Al menos 5 animales en cada grupo.

Figura 41



Se inocularon por vía ic ratones adultos de 60-90 días de vida C3H/HeJ y BALB/cJ de los que se obtuvieron 5 días después esplenocitos. Los receptores fueron ratones de las mismas cepas y edades sensibilizados con 10^6 GRC. Se transfirieron $40x10^6$ esplenocitos. Al menos 5 animales en cada grupo.

Figura 42



Se transfirieron $40x10^6$ esplenocitos obtenidos de ratones C3H/HeJ de 60-90 días o de más de 180 días de vida infectados ic con 160 UFP de la cepa XJ de VJ, a receptores isogénicos de 90 días de edad, sensibilizados con 10^6 GRC 7 días antes. Al menos 5 animales en cada grupo.

4.14.2 Modelo ratón lactante

Los ratones lactantes constituyen el modelo clásico de susceptibilidad a VJ, presentando daño histico compatible con una reacción de HR. En ellos se trató de determinar la presencia de actividad supresora de HR.

Para ello, se inocularon ic ratones lactantes con VJ (cepa XJ 10^3 DL_{50}). A los 7 días pi, se obtuvieron células de exudado meningeo por lavado de sus cráneos y cerebros con medio de cultivo y, paralelamente, se obtuvieron esplenocitos. Estas células fueron lavadas exhaustivamente con el propósito de eliminar la posible presencia de virus extracelular y fueron transferidas por separado a receptores adultos sensibilizados con 10^6 GRC 7 días antes. Sirvieron como controles, animales inyectados ic con 0.02 ml de Hanks' adicionado de 2% suero fetal bovino y antibióticos (diluyente del virus), de los que se obtuvieron células por los mismos procedimientos.

El exudado meningeo en ambos casos estaba compuesto por ≥96% linfocitos ≤3% monocitos y ≤1% neutrófilos como pudo establecerse por tinción de Giemsa efectuada sobre alícuotas de cada preparado.

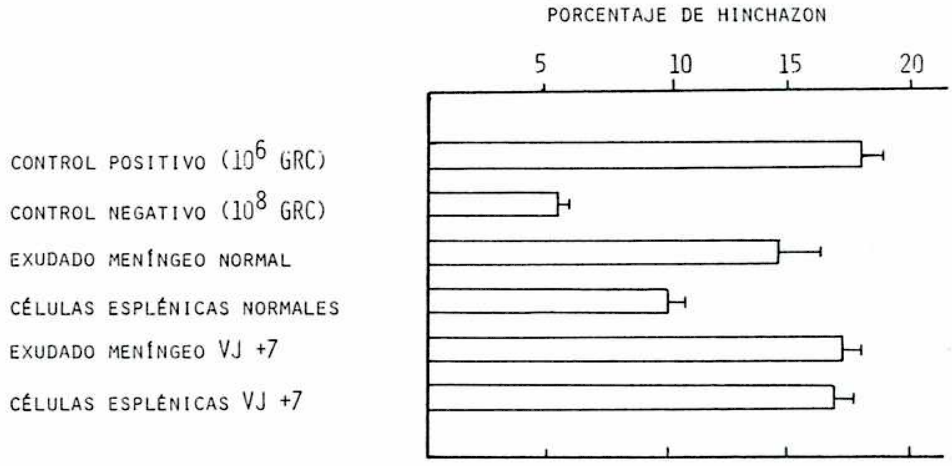
Los resultados expuestos en la Fig 43, indican que en los ratones no infectados es posible detectar supresión mediada por esplenocitos, la cual estaría reflejando la presencia de las células supresoras naturales demostrada en el bazo de los ratones lactantes y que se cree estarían relacionadas con la prevención de respuestas autoinmunes durante el proceso de "aprendizaje" de discriminación entre lo propio y lo no propio, que ocurre en estas edades en los ratones lactantes [93-97]. Esta actividad se pierde en los animales infectados. Ni en los animales control ni en los animales infectados fue posible detectar actividad supresora en las células de exudado meningeo.

Es decir entonces que, en el modelo ratón lactante, VJ no sólo no es capaz de inducir supresión de HR sino que, además, eliminaría la actividad supresora natural que, para algunos autores sería la responsable de prevenir las respuestas autoinmunes en estos animales.

Una alternativa a analizar en este punto era establecer si las células blanco de Tsv estaban presentes o no. Para ello se transfirieron por vía ip células provenientes de ratones adultos infectados 5 días antes a dos grupos de ratones lactantes diferentes. Uno de ellos conformado por animales que se infectaron al mismo momento de la transferencia y el otro compuesto por animales infectados 5 días antes. No se detectó transferencia de resistencia a la infección en ningún caso, ya sea valorada como sobrevida o como retardo de la

mortalidad, en los grupos que recibieron células de ratón infectado o normal, las que sirvieron como control. Tampoco se observó adelanto de la mortalidad como fue descripto para aquellos lactantes que reciben células de animales adultos inmunizados con varias dosis de VJ por vía ip [98].

Figura 43



Se transfirieron células de exudado meningeo y esplenocitos de ratones lactantes BALB/cJ infectados ic 10 días antes con VJ o de animales inyectados con diluyente (Hanks' adicionado de suero fetal bovino y antibióticos). Las células fueron lavadas exhaustivamente previo a su transferencia a receptores sensibilizados con 10^6 GRC 7 días antes ($40x10^6$ células de cada tipo). Al menos 5 animales en cada grupo.

Una explicación para este resultado podría estar dada por la presencia de actividad de prostaglandinas en los lactantes. Es conocido el hecho de que los recién nacidos poseen linfocitos insensibles a este mediador, el cual se encuentra en alto título en sus fluídos. Las prostaglandinas ejercen fuerte actividad supresora sobre los linfocitos provenientes de adultos de modo que pueden bloquear su actividad, eliminando entonces la funcionalidad de las células Tsv [99-100].

Otra posibilidad podría ser la presencia de células contrasupresoras en los ratones lactantes infectados como ha sido descripto frente a otros Ags [90], las que serían capaces de bloquear a las células Tsv de los ratones adultos.

Los resultados expuestos confirman la incapacidad de las células de ratón adulto de mediar resistencia a la infección con VJ en ratones lactantes.

4.14.3 Utilización de células contrasupresoras

Otra estrategia que fue utilizada como alternativa para estudiar la posible participación de células supresoras Tsv en la capacidad de sobrevida, fue tratar de eliminar esta actividad mediante la inducción de células contrasupresoras (CS).

Para ello se obtuvieron células de ratones adultos BALB/cJ infectados 5 días antes con VJ, las que fueron deplecionadas de linfocitos B mediante tratamiento con suero de conejo anti-gammaglobulinas de ratón seguido de suero fresco de cobayo como fuente de complemento. Las células así tratadas contienen la actividad Tsv libre de linfocitos B capaces de establecer respuesta inmune humoral (aunque las actividades T "helper" y citotóxica quedan conservadas) y fueron transferidos a receptores *naïve*. Dado que a los 5 días estos animales mostraron poseer actividad CS, se inoculó VJ (cepa XJ, 10^3 DL_{50}) ic en ese momento. Otro lote fue inoculado el mismo día en que fueron transferidos.

Los animales infectados al día +5 mostraron signos clínicos de enfermedad tales como: posición encorvada, pelo erizado ausencia de respuesta frente a estímulos externos, lasitud, ojos cerrados e hipotermia. Estos signos se hicieron evidentes a partir de los 10 días pi, agravándose hacia los 12 días pi. Sin embargo, los animales sorpresivamente mostraron signos francos de mejoría al día +13 recuperándose totalmente al día siguiente sin manifestar otros signos y manteniéndose aparentemente sanos por el resto del período de observación (30 días). Por el contrario, los animales infectados en el día de la transferencia no mostraron signo alguno de enfermedad. Lamentablemente, no fue posible realizar estudios histopatológicos en estos animales.

Estos resultados sugieren la posible participación de la actividad supresora en la sobrevida y la puesta en marcha de algún mecanismo alternativo de resistencia cuando la supresión no se consigue establecer.

4.14.4 Actividad supresora en los ratones híbridos (BALB/cJ H C3H/HeJ)F1 y (C3H/HeJ X BALB/cJ)F1

Los ratones adultos (60-90 días de vida) híbridos, demostraron ser resistentes a la infección ic con VJ sugiriendo una base genética en la capacidad de sobrevida a la infección (punto **4.13**). De esta manera proveen un modelo adicional en el cual ensayar la presencia de actividad supresora.

La transferencia de esplenocitos obtenidos 5 días después de la infección viral a receptores de la misma cepa sensibilizados 7 días antes con 10^6 GRC, indujo supresión comparable con la obtenida en adultos BALB/cJ.

Un ejemplo de estos resultados se puede observar en el punto **4.11.1** en la que se utilizaron estos híbridos para determinar la presencia del marcador IJ en las células transferidas. Los resultados obtenidos con los ratones híbridos (C3H/HeJ X BALB/cJ)F1 son similares demostrando supresión completa.

El conjunto de los resultados expuestos en este punto, sugieren la existencia de una correlación entre actividad supresora y sobrevida. Esto surge debido a que en aquellos animales incapaces de desarrollar supresión (lactantes BALB/c y ratones C3H/HeJ jóvenes) o que poseen una actividad supresora inoperante en su propio entorno (BALB/cJ tratados con Cy), son altamente sensibles a la inoculación. Por otra parte, aquellos adultos resistentes en los que se interfiere con el normal desarrollo de la actividad Tsv, muestran claros signos de enfermedad (modelo CS). En sentido opuesto, en los ratones resistentes a la infección se ha podido establecer la presencia de algún mecanismo supresor de la respuesta de HR. Entre estos últimos, se ha logrado determinar gran parte del sistema supresor puesto en juego en los animales infectados (Tsv) o se han detectado mecanismos alternativos que quedan aún por esclarecer (C3H/HeJ adultos de 180 días de vida).

5. DISCUSION

La respuesta inmune frente a un microorganismo patógeno se basa en un conjunto de mecanismos específicos e inespecíficos que *in vivo* actúan asociados, siendo prácticamente imposible disecarlos o contar con la expresión de sólo uno de ellos a la vez.

La comprensión cabal de estos mecanismos depende por una parte del conocimiento de las diferentes vías de activación, regulación y mediación de las diferentes clases de respuestas generadas y; por otra parte, de la complejidad estructural del antígeno en cuestión.

Un virus en particular, es capaz de inducir un conjunto de diferentes respuestas inmmunológicas dependiendo para ello de la naturaleza estructural de cada uno de los Ags que lo componen y de la forma en que éstos son presentados al sistema inmune. Frente a una infección viral se origina una amplia variedad de respuestas, haciendo que cada virus sea capaz de inducir una serie de mecanismos inmunes que caracterizan la respuesta a ese patógeno en un huésped dado. Paralelamente, los agentes virales poseen una serie de alternativas para lograr la evasión de la respuesta consiguiendo así la multiplicación y diseminación y, por lo tanto, su continuidad en la naturaleza.

La depresión de la respuesta inmune por una infección viral ha sido asociada tradicionalmente con la capacidad de los agentes virales de sobrevivir en un huésped determinado. Como consecuencia de ello, el virus sería favorecido en tanto extiende su período de infección aumentando así sus posibilidades de diseminación. Sin embargo, la depresión de respuestas de hipersensibilidad (humoral o celular) podría estar asociada con la puesta en marcha por el huésped de un mecanismo regulador activo de este tipo de respuestas potencialmente peligrosas, con lo cual se estaría frente a un mecanismo de defensa más que frente al sistema de ataque de un dado patógeno [23].

No existe al presente una teoría que explique en general los mecanismos por los cuales las infecciones virales podrían conducir a la depresión de la respuesta inmune. Probablemente, esto sea debido a que cada agente viral actúa de una manera particular, dependiendo del huésped y de la respuesta inmune ensayada, aunque se cree que las alteraciones observadas tienen lugar dentro del contexto de la estrategia inmune antiviral que el huésped está desarrollando [101].

Las alteraciones de la respuesta inmune pueden originarse a través de diferentes mecanismos. Los virus pueden inducir tolerancia inmunológica como consecuencia de una infección en las primeras etapas de la vida del huésped. Otra posibilidad, ésta inherente a la partícula viral en sí, sería que el agente infeccioso sea no inmunogénico (Scrapie y otras encefalopatías espongiformes). Un evento muy común en las infecciones virales es la infección de células comprometidas en la respuesta inmunológica, lo cual conduce a su alteración funcional independientemente del hecho de que el virus sea capaz o no de destruír estas células. Por otra parte, la infección viral puede eventualmente llevar a la alteración de la presentación antigénica [102] o de la interacción normal con las interleukinas [103]. También existe la posibilidad de que, como consecuencia de la infección, resulte alterada la expresión de glicoproteínas celulares entre las que se cuentan los Ags del CMH, lo cual resultaría en una falla en la capacidad de reconocimiento y eliminación de las células infectadas.

Un aspecto interesante de las alteraciones de la respuesta inmune inducida por las infecciones virales lo constituyen aquellas mediadas por células supresoras. Este tipo de respuesta ha sido estudiada con creciente interés en los últimos años, siendo de las más importantes dado que permiten entrever aspectos poco definidos de la inmunología.

Dentro de las actividades supresoras mediadas por células inducidas por virus, se pueden distinguir *a priori* dos grandes grupos: aquellas que se manifiestan como Ag-específicas y las que se comportan como no específicas de Ag. Entre las primeras se incluyen las dirigidas hacia los virus Herpes [23, 25], Coxsackie [29], Dengue [104], Influenza [23] cytomegalovirus [105], reovirus [106] y el agente causal de la encefalitis japonesa [107-108]. De los agentes virales capaces de inducir células supresoras Ag-no específicas, se pueden citar Dengue [109], Epstein Barr [110] y el virus aumentador de la lactato-deshidrogenasa [102] entre otros [23]. Nuestros resultados incluirían al virus Junin entre estos últimos.

En algunos casos, una respuesta dada potencialmente peligrosa es suprimida por el huésped. En particular, la supresión de la respuesta de HR está directamente relacionada con la sobrevida en algunos modelos experimentales murinos. Es el caso, entre otros, de Influenza donde la ausencia de este tipo de respuesta se correlaciona con un menor daño en el tejido pulmonar [23], LCM donde la inoculación de dosis virales altas genera la reducción de HR lográndose limitar el daño cerebral característico [107-108, 111] y Coxsackie donde la inducción de LTs de HR reduce la miocarditis mortal [29]

En el trabajo experimental aquí presentado, se ha prestado particular atención a los mecanismos inducidos por el virus Junin que participan en la regulación de la respuesta inmune celular responsable de la HR. Se ha demostrado una fuerte supresión de este tipo de respuesta en los ratones BALB/c adultos (resistentes) durante la etapa aguda de la infección, y se han descripto las principales características operativas del sistema supresor inducido en respuesta a la agresión viral.

En la infección del ratón con VJ, se pueden diferenciar dos modelos netamente diferentes: el ratón lactante y el adulto. Como ya fue señalado, el ratón lactante es sensible a la infección viral cualquiera sea la vía de inoculación empleada, mientras que el ratón BALB/c adulto es resistente. El conjunto de resultados experimentales obtenidos utilizando ratones timectomizados al nacimiento o tratados con suero anti-timocito o con Cy y con ratones genéticamente atímicos descartaron un posible efecto directo de VJ en la patogenia y establecieron claramente que la mortalidad, en el modelo ratón lactante, era debida a la inducción de un fenómeno inmunológico de fuerte dependencia tímica.

En el modelo ratón adulto (resistente) no es posible observar daños histológicos en el SNC aunque sí se pone de manifiesto una importante respuesta inmune humoral que hace su aparición al día +8 pi en bajo título y alcanza un pico luego de los 20 días pi. La importancia de los Ac Nt en la resistencia del ratón a la infección con VJ, ha sido puesta de manifiesto en repetidas oportunidades [58-59, 112-114]. De modo que, aparentemente, si los animales consiguen superar las primeras etapas de la infección eliminando la respuesta de HR letal hasta la inducción de una buena respuesta humoral, conseguirían la sobrevida.

Cuando los ratones adultos infectados con VJ por vía ic son tratados con Cy según el esquema -1, +1, +4; los animales se tornan susceptibles alcanzándose un 90% de mortalidad y presentando daños histológicos compatibles con los observados en el lactante y con una reacción de HR. Estos resultados sugirieron la posible puesta en marcha en los ratones adultos resistentes, de un mecanismo supresor de la respuesta de HR letal, de modo de permitir la sobrevida de los animales hasta tanto éstos logren montar una adecuada respuesta humoral protectora. Este mecanismo hipotético, además de suprimir la HR debería ser sensible a la Cy aplicada según el esquema -1,+1,+4 y, luego de que se alcance un grado de respuesta humoral adecuada, ser eliminado.

El primer paso fue analizar si la inoculación de VJ inducía supresión de respuesta HR. Dado que hasta el presente no se posee de un modelo indicador

de HR específica para VJ en ratones, se utilizaron Ags heterólogos aplicados de modo de inducir respuestas satisfactorias de HR.

Se pudo comprobar que la inoculación de VJ induce una profunda depresión de la respuesta de HR independientemente de la dosis, la cepa viral y la vía elegida. Del mismo modo esta depresión también era obtenida independientemente del momento de inoculación respecto del de sensibilización, requiriéndose virus infeccioso para obtenerla.

Un resultado importante fue establecer que la misma infección es capaz de inducir un incremento en la capacidad de respuesta humoral dado que ambos factores, la depresión de HR y una buena respuesta humoral, tendrían gran trascendencia en la sobrevida a la infección viral. De este modo se puede sugerir que la respuesta hacia GRC es un sistema adecuado para utilizar como indicador de las alteraciones de la respuesta inmune inducida por VJ.

Paralelamente, no fue posible detectar daños en el sistema inmunocompetente marcándose así una diferencia sustancial con el cobayo, en donde se produce una profunda inmunodepresión debida a la destrucción generalizada de las células linfoides [86].

Por otra parte, la supresión inducida por VJ en el ratón adulto resistente, persiste más allá de la presencia efectiva de virus en los animales infectados, lo cual sugirió que la inmunodepresión era un sistema activo puesto en marcha por el huésped como respuesta a la infección viral. Posteriormente, se intentó establecer el mecanismo que mediaba la depresión de la respuesta de HR. El hallazgo de células con capacidad supresora de HR (Tsv), permitió establecer que no se trataba de una alteración funcional ejercida directamente por el virus sobre las células efectoras de HR o sobre sus precursoras. Por otra parte, incluyó a VJ dentro del reducido grupo de virus capaces de inducir supresión con probable actividad protectora que incluye, etre otros, a Coxsackie [29], Influenza [23], Herpes [23, 25] y LCM (este último cuando se lo inocula en altas dosis) [30-31].

La duración de la supresión transferible por estas células (hasta 24 días), parece correlacionarse muy bien con el momento en el que se alcanza el pico de Ac Nt protectores. Si además se toma en cuenta su rápida aparición (24 h), se puede sugerir un mecanismo protector del daño potencial de la respuesta de HR en los primeros momentos de la infección.

Cuando se destruyeron por sonicación las células antes de transferirlas, se eliminó la capacidad de suprimir la respuesta de HR. Este resultado descarta la posible presencia de virus intracelular como responsable de la supresión y sugiere la ausencia de factores supresores que medien el mecanismo supresor.

Esto último también fue apoyado por la transferencia pasiva de sueros obtenidos a los días +5 ó +11 pi, la que fue incapaz de suprimir HR en los receptores.

Las células supresoras fueron identificadas como linfocitos pertenecientes al fenotipo Thy 1^+, Ly 1^+ 2^-. Este fenotipo clásicamente ha sido considerado como indicador de linfocitos T con actividad "helper" o T efectores de HR. Sin embargo, en determinados modelos experimentales se ha establecido que las actividades supresoras son mediadas por LT pertenecientes a este compartimento [71, 115-116], incluyendo algunos inducidos por virus (Herpes e Influenza [23]).

A diferencia de otros modelos virales en los que se inducen simultáneamente células con distintos fenotipos [23, 109], en el caso de VJ sólo se encuentra presente uno de ellos (Thy 1^+, Ly 1^+ 2^-).

A partir de los resultados obtenidos mediante la inoculación directa de los animales sensibilizados con 10^6 GRC, surgió que el virus era capaz de suprimir la respuesta independientemente del momento de inoculación respecto del de sensibilización. Luego, al descubrir la presencia de células Tsv, se pudo comprobar que éstas eran activas sobre la rama eferente de una respuesta de HR totalmente establecida.

A pesar de la comprobada existencia de células supresoras inducidas por VJ en los animales tratados con Cy en alta dosis (200 mg/kg), éstas fueron incapaces de afectar la respuesta de HR en animales inmunosuprimidos con Cy. Cuando las células esplénicas obtenidas de animales infectados con VJ, fueron transferidas a receptores en los que se había preservado el circuito supresor Ag-específico, se observó claramente la presencia de actividad supresora de HR, contrastando con la ausencia de supresión encontrada cuando los receptores habían sido previamente deplecionados de células supresoras Ag-específicas.

Este resultado también indicó que el blanco de las células inducidas por VJ no era la célula T efectora de HR, dado que ésta es totalmente funcional en los receptores tratados con Cy.

La inoculación de VJ antes de la sensibilización antigénica o aún antes del tratamiento con Cy no modificó la respuesta de HR, indicando que el virus es incapaz de afectar la rama aferente de esta respuesta. Es decir entonces que, su blanco de acción no eran las células precursoras de los T efectores de HR. En este punto es necesario recordar que LCM es capaz de afectar la maduración de las células T efectoras de HR Ag-específicas [31].

De esta manera surge que VJ induce células supresoras que sólo pueden actuar sobre la rama eferente de la respuesta de HR requiriendo para hacerlo que los circuitos supresores propios del sistema en estudio estén preservados, sugiriendo claramente que su blanco de acción se encuentra dentro de ese compartimento.

La administración de una única dosis de Cy de 200 mg/kg, es incapaz de doblegar la resistencia del ratón adulto a VJ [58-59]. Paralelamente, los resultados aquí expuestos, indican que la administración de Cy en una dosis alta aplicada antes o después de la inoculación viral es incapaz de eliminar la actividad supresora Tsv.

Un modelo experimental de sumo interés lo proveen los ratones BALB/c tratados con Cy en dosis de 50 mg/kg cada una aplicada en los días -1, +1, +4 tomando como cero el de la sensibilización antigénica. En este modelo, la inoculación viral al día cero induce alta mortalidad (90%) y se encuentran alteraciones histológicas en el SNC compatibles con una reacción de HR y semejantes a las halladas en los ratones lactantes infectados. En cambio, si en el día cero los animales son sensibilizados con 10^8 GRC, se observa que esta alta dosis de Ag es capaz de inducir una buena respuesta de HR. Esto fue atribuído a que la administración de Cy en ese esquema era capaz de alterar, de alguna manera, el circuito supresor específico que de otro modo debería eliminar la respuesta [74].

El esquema de Cy aplicado elimina entonces determinadas poblaciones supresoras de GRC y a la vez, es capaz de inducir alta mortalidad en ratones infectados. Esto determina que este modelo sea óptimo para analizar las posibles alteraciones provocadas sobre las células supresoras inducidas por VJ y para analizar la probable relación de éstas con la sobrevida a la infección.

En una primera aproximación se eligió el día +5 (el mismo que se venía utilizando para obtener Tsv), para efectuar la búsqueda de supresión inducida por VJ en animales que habían sido infectados (día cero) y tratados con Cy siguiendo el esquema de aplicación en los días -1, +1 ,+4 en forma parcial o completa. Se pudo comprobar que ningún esquema parcial era capaz de alterar definitivamente la expresión de las células supresoras inducidas por VJ aunque sí lo consiguió el esquema completo. Sin embargo, se encontró que, a partir del día +7, se recuperaba una actividad supresora que estaba presente aún en animales que se comenzaban a morir (día +11). Este resultado sugería que quizá bastaba con un retraso en la aparición (día +7 vs. +1 en los no tratados) debido a la aplicación de Cy para obtener alta mortalidad. Es decir, la droga afectaría a las precursoras de la célula supresora de modo que su aparición quedaba lo suficientemente retrasada como para no ser capaz de impedir el daño que ya se habría disparado.

Sin embargo quedaban dos alternativas a ser analizadas. Dado que las células Tsv requieren de otras células supresoras Ag-específicas para poder actuar, podría darse el caso de que éstas hayan sido eliminadas por la droga y entonces Tsv además de llegar tarde no encontrase un blanco de acción. Otra posibilidad sería que la supresión observada a partir del día +7 estuviera mediada por otro tipo de células. También podría darse la conjunción de estos factores.

Se profundizó entonces el análisis de este modelo. El primer resultado fue sorprendente al indicar que a pesar que en el día +7 pi estos animales tratados con Cy poseían células supresoras, éstas eran incapaces de suprimir la respuesta de HR en el mismo animal. Es decir, la inoculación de VJ en animales sensibilizados y tratados con Cy no alteraba la respuesta de HR respecto de los controles sin infectar. Este resultado no se revertía cuando a esos animales se les transferían células normales lo que sugirió que ello era debido a la depleción de determinadas poblaciones celulares más que a la ausencia de células no impactadas por la droga.

Quedaba claro entonces que los animales infectados con VJ y tratados con Cy poseían células supresoras de HR Ag-no específicas inducidas por la infección viral, pero que éstas no eran operativas en su propio entorno.

Mayor evidencia al respecto se obtuvo cuando se transfirieron en paralelo esplenocitos obtenidos de animales infectados sin tratar con Cy por una parte y por otra de animales infectados y tratados, a distintos lotes de receptores sensibilizados según los esquemas 10^8 GRC seguido de Cy en los días -1, +1, +4 ó 10^6 GRC solamente. De aquí surgió claramente que, en los animales infectados sin tratar con Cy, se generaban células capaces de suprimir ambos tipos de receptores mientras que en los tratados se encontraban también células supresoras inducidas por el virus pero que por alguna causa, eran capaces de suprimir sólo al sistema 10^6 GRC. De este modo se hizo aparente que luego de la inoculación viral, se estaba en presencia de 2 actividades supresoras distintas: una inducida en ausencia de Cy (actividad denominada Tsv) y otra en presencia del tratamiento inmunosupresor (denominada Tsv*).

Estos resultados indicaron que el tratamiento con Cy realmente era capaz de eliminar operativamente la supresión inducida por VJ dado que las células supresoras presentes a partir del día +7 no actuaban sobre los blancos ofrecidos en su propio entorno. Paralelamente, este hallazgo requería que ambos sistemas indicadores de HR utilizados ofrecieran blancos diferentes a las células supresoras inducidas por VJ.

Este aspecto fue estudiado mediante ensayos de cotransferencia de poblaciones celulares. Los ensayos se efectuaron tomando esplenocitos de

animales sensibilizados de modo tal de poseer uno u otro blanco a los que se les agregaron células efectoras de HR en exceso de modo de hacer comparables los valores de HR de ambos sistemas y de la supresión inducida por Tsv en ellos.

Se comprobó que los dos sistemas proveen blancos diferentes. En el sistema 10^8 GRC tratado con Cy (-1, +1, +4) se encontró el requerimiento por un solo tipo de célula específica de Ag, la que es portadora del fenotipo supresor clásico (Thy 1^+, $Ly1^-2^+$). Mientras que en el otro sistema, se requería de la presencia de 2 células supresoras en forma simultánea cada una con un fenotipo diferente (una Thy 1^+, $Ly1^+2^-$ y la otra Thy 1^+, $Ly1^-2^+$), las que actuarían en una cascada supresora.

Se estableció así en forma fehaciente el requerimiento de Tsv por células supresoras específicas de Ag las que interactúan con Tsv dando cascadas supresoras, la incapacidad de Tsv para actuar directamente sobre las efectoras de HR y la diferencia de blancos ofrecidos por ambos sistemas indicadores de HR. Esto último explica claramente la ausencia de supresión encontrada en los animales infectados y tratados con Cy, a la vez que explica también porqué se detectaba actividad supresora en las células tomadas de estos animales sobre el sistema 10^6 GRC.

Llegado este punto de la investigación y teniendo en cuenta que por una parte se demostró la ausencia de actividad Tsv en los animales tratados con Cy e infectados con VJ y, por otra parte, se encontró que el blanco generado en presencia del tratamiento es diferente del que se obtiene con bajas dosis de Ag (10^6 GRC), resultó de interés estudiar la influencia de la secuencia de aplicación de Cy sobre ambos tipos celulares (Tsv y su blanco). De esta manera quizá se lograse arrojar luz sobre las causas que llevan a la muerte a los ratones infectados con la aplicación de este esquema tan particular de Cy establecido empíricamente.

Se había comprobado previamente que una dosis de Cy, capaz de eliminar las supresoras de GRC, era incapaz de hacerlo con las células supresoras inducidas por VJ. Por otra parte, se vió que dosis menores, pero aplicadas según un esquema definido, afectaban notoriamente esta actividad. Estos resultados sugerían un papel central en el "timing" de aplicación de la droga. Probablemente las células se estarían regenerando luego de cada dosis hasta el agotamiento definitivo del clon precursor.

Esta hipótesis fue analizada mediante ensayos de transferencia realizados en forma simultánea sobre receptores sensibilizados con uno u otro sistema indicador de HR hacia GRC (10^8 GRC tratados con Cy -1, +1, +4 ó 10^6 GRC sin tratamiento) de modo de distinguir la actividad Tsv de la Tsv^*. Los dadores

fueron ratones infectados que recibieron esquemas parciales de Cy. Distintos lotes fueron sacrificados en diferentes días después de la última dosis de Cy para observar las alteraciones producidas por la droga sobre las células inducidas por VJ.

Se comprobó que una única dosis (día -1) no alteraba la actividad supresora, pero que con sólo dos dosis (correspondientes a los días -1 y +1) ya era posible detectar alteraciones sobre la actividad Tsv (considerando ésta como la capacidad de suprimir ambos sistemas indicadores) en el día +3 la cual se recuperaba para el día +5. Una tercera dosis en el día +4 consigue alterar la expresión de supresión (valorada al día +5) sobre 10^6 GRC aunque en forma temporal dado que esta actividad se recupera a partir del día +7 pi; pero resulta definitivamente destruída la capacidad de suprimir el sistema indicador 10^8 GRC tratado con Cy.

Quedaba aún por analizar el efecto que la administración de Cy según este esquema, tendría sobre el blanco de las células supresoras inducidas por VJ. Este aspecto fue estudiado transfiriendo células Tsv*, que son incapaces de aceptar el blanco generado con el esquema completo de Cy, a receptores sensibilizados con GRC y tratados con esquemas parciales de Cy. Los resultados indicaron que con sólo dos dosis de Cy correspondientes a los día -1 y +1, ya era destruído el blanco de Tsv*.

Este hallazgo, sumado al hecho de que con sólo dos dosis los animales infectados se tornan parcialmente susceptibles a la inoculación con VJ, señalan que la tercera dosis resultaría crítica para la eliminación definitiva de Tsv dejando al sistema supresor inducido en respuesta a la agresión viral fuera de operación. De este modo, se encuentra una posible relación entre la actividad supresora Tsv y la capacidad de sobrevida de los ratones adultos a la inoculación con VJ.

Estudios efectuados [58-59] en animales inoculados e inmunosuprimidos con Cy permitieron arribar a la conclusión de que los Ac Nt poseen alta capacidad protectora aunque se muestran incapaces de abortar la replicación viral dado que el título en cerebro (por otra parte indetectable en animales no inmunosuprimidos) no decae. A la vez se encontró que la inmunidad celular mediaba la limpieza viral pero que era incapaz de protejer a los animales. Ambos tipos de respuesta (humoral y celular) están deprimidas en los animales tratados con Cy.(-1,+1,+4). Sin embargo, una única dosis de Cy de 200 mg/kg aplicada previo a la inoculación, también deprime la respuesta humoral protectora, pero los animales sobreviven probablemente debido a que no se altera la limpieza viral. Por otra parte, aquí se demostró que esta única dosis de Cy no afecta a las células Tsv. Es decir que la capacidad de sobrevida de los ratones BALB/c adultos a la infección viral resultaría de una mezcla de

factores inmunes, donde el virus sólo representaría un Ag replicativo capaz de inducir una respuesta de HR letal. De modo que si no se consigue detener su incremento mediante la respuesta celular (que aparece tempranamente [59]) y a la vez de regular la respuesta de HR, los Ac protectores no alcanzarían a ser producidos simplemente porque el animal muere antes de hacerlo.

En distintos modelos experimentales que incluyen agentes virales como LCM, se pudo establecer que la función T efectora de HR está mediada por células diferentes de las T efectoras de citotoxicidad las que actúan primordialmente en la limpieza viral. Es aquí donde se insertaría el mecanismo supresor de HR descripto. Su función sería la regulación de la respuesta de HR preservando la actividad T citotóxica. De hecho esta actividad está presente en los animales infectados a pesar de la presencia de Tsv, dado que la limpieza viral se completa totalmente a partir del día +7 pi.

Esta hipótesis da una base teorica con sustento experimental a un esquema inmunosupresor empírico capaz de doblegar la resistencia del ratón adulto a la inoculación con VJ.

El sistema supresor puesto en marcha luego de la inoculación con VJ del ratón adulto BALB/c incluye algunos riesgos para el huésped. Si bien la fuerte supresión de la respuesta de HR puede ser beneficiosa para la sobrevida a la infección, también puede poner en peligro al huésped frente a otros patógenos contra los cuales este tipo de respuesta sería beneficiosa. Teniendo en cuenta que las células Tsv y Tsv* son Ag-no específicas se podría postular que las respuestas de HR hacia diferentes Ags están suprimidas simultáneamente por estas células, de modo que si alguno de estos Ags fuesen potenciales patógenos, éstos encontrarían un huésped deprimido en la respuesta de HR en los cuales replicar. Esto sugirió la probable existencia de algún tipo de regulación sobre las actividades supresoras inducidas por VJ. El hecho de que las células supresoras inducidas por VJ sean incapaces de suprimir directamente a la célula T efectora de HR requiriendo para hacerlo sistemas supresores propios del sistema del Ag en cuestión, constituye de por sí un control operativo. De ese modo no resultarían afectadas todas las respuestas de HR sino sólo aquellas que posean sistemas supresores que, de algún modo, sean compatibles es decir, sean aceptados por las células supresoras inducidas por VJ. Sin embargo la brusca desaparición a partir del día +24 pi de las células Tsv, sugirió la presencia de un sistema activo de control puesto en marcha a partir de ese momento. La detección de actividad CS confirmó estas sospechas y estableció la presencia de un mecanismo que aún no había sido descripto en otras infecciones virales.

Las células CS podrían proveer de un mecansimo que regule la supresión de HR mediada por Tsv de modo de prevenir su permanencia más allá de lo

necesario, con la consiguiente exposición a otras infecciones. De hecho, en general la recuperación de la funcionalidad luego de una inmunodepresión mediada por células T supresoras se cree que es mediada por células CS [90]. Cuando la actividad Tsv desaparece, es posible detectar altos títulos de Ac Nt [113]. A su vez, estos Ac son capaces de proteger eficientemente contra la infección [58-59, 112]. Esto parecería sugerir que una vez alcanzado un título capaz de establecer la protección de los animales, la supresión de la respuesta HR ya no es necesaria. Esta hipótesis se encuentra avalada por el hallazgo de que cuando se transfieren poblaciones Tsv a ratones 'naive', se genera actividad CS.

Se podría pensar que en todos los casos en que se transfieran células supresoras a ratones 'naive', se generarían células CS. A este respecto se puede alegar que cuando las células T supresoras inducidas por el virus Dengue, son transferidas a receptores 'naive', éstas permanecen activas durante 21 días, exactamente el período durante el cual estas células son activas en los ratones infectados [117]. Por otra parte, cuando las células supresoras de la reacción de HR dirigida a GRC son transferidas, éstas persisten por 30 días [72]. Por lo tanto es posible que la transferencia de células supresoras "innecesarias" no esté acompañado invariablemente por la inducción de células CS o que, al menos, el período de inducción de éstas sea fuertemente variable.

Las células CS inducidas por VJ son portadoras del mismo fenotipo que el descripto para otras células CS (Thy 1^+, Ly 1^+2^-). Aunque no se han efectuado experimentos de adherencia a la lectina de *Vicia villosa*, la actividad CS aquí descripta parece ser mediada por células portadoras de un fenotipo similar al descripto previamente para Ags no-patógenos [90]. Dado que el fenotipo es similar al encontrado para Tsv, no fue posible determinar si ambas células están presentes en forma simultánea en el mismo animal.

Las células Tsv son incapaces de alterar la expresión de las células efectoras de HR en forma directa, requiriendo células supresoras de Ag para poder hacerlo. De esta manera, existen diferentes sitios en los cuales las células CS inducidas por VJ podrían actuar. Se cree que las células CS tiene su blanco de acción dentro de la población de células "helper" o efectoras de HR, las que resultarían "desensibilizadas" a la acción de las supresoras [90]. A partir de los resultados obtenidos no es posible establecer cuál es el blanco de acción de las CS inducidas por VJ.

Cuando se estudió el blanco de acción de las células Tsv, se encontró que éstas actúan sobre los sitemas supresores Ag-específicos. Como resultado de esta interacción, quedan suprimidas las células T efectoras de HR. Se decidió entonces establecer si para que ocurra la interacción Tsv-células supresoras

Ag-específicas, se requería algún tipo de reconocimiento mediado a través del CMH.

Los ratones BALB/cJ ($H2^d$) son totalmente no histocompatibles con los C3H/HeJ ($H2^k$) de modo que la supresión transferida por células Tsv ó Tsv* obtenidas en ratones BALB/cJ sobre C3H/HeJ descartó el reconocimiento H2 como requerimiento indispensable para poder actuar. Si bien muchas de las actividades supresoras Ag-no específicas no son restringidas H2 en su accionar, la existencia en este caso de una interacción con determinadas células especializadas (Tsv* mantuvo sus características operativas en un entorno desconocido) y la ausencia aparente de mediación a través de factores solubles, dificultan una explicación directa para este hallazgo.

Al establecerse la existencia de una interacción con las células supresoras específicas de Ag, surgió el interrogante sobre cuál célula era la verdadera efectora de supresión sobre la T efectora de HR. La clave para determinarlo era la especificidad de la supresión. Tsv es Ag-no específica de modo que, si de la interacción con las supresoras específicas de un Ag A surgía la capacidad de suprimir la T efectora de HR dirigida hacia un Ag B, entonces Tsv participaba en forma directa en la rama eferente, es decir, en la ejecución de la supresión. Esto último podía ocurrir ya sea directamente vía la activación de Tsv por las supresoras específicas, o por la producción conjunta de un factor supresor con la especificidad de Ag perdida por acción de Tsv. Por el contrario si la supresión resultaba específica para el Ag A, es decir, no se podía suprimir al Ag B en ausencia de sus supresoras específicas, las células efectoras deberían ser, por fuerza, las células supresoras específicas del Ag A.

Mediante la utilización de DNFB y GRC se pudo establecer la incapacidad de Tsv para afectar la respuesta de HR dirigida a DNFB en ausencia de sus supresoras específicas, pese a contarse con las correspondientes a GRC. En estos ensayos, se descartó entonces la mediación por factores supresores solubles capaces de unirse a la célula supresora auxiliar inducida por DNFB y se confirmó el requerimiento por determinados circuitos supresores para que Tsv pueda actuar.

Normalmente GRC y GRP no dan reacción cruzada en respuesta de HR pese a su similitud en cuanto a las vías de procesamiento y regulación de la respuesta inmune. De este modo se utilizarían dos Ags semejantes con el consiguiente aumento en la posibilidad de que interactúen uno sobre el otro al ser interferidos sus circuitos supresores por Tsv.

Los ensayos efectuados con las poblaciones involucradas obtenidas separadamente, indicaron claramente que los efectores finales eran las supresoras específicas y que éstas no perdían su especificidad en el accionar

dado que sólo se pudo suprimir al Ag para el que se contaba con las supresoras específicas.

Este resultado acota en gran medida el rango de acción de las células Tsv y constituye un verdadero sistema de regulación dado que Tsv sólo puede actuar sobre sistemas supresores celulares disparándolos en forma Ag-específica. De modo que, si bien Tsv es un tipo de células supresoras Ag-no específicas dado que son inducidas en respuesta a la agresión viral pero pueden actuar sobre Ags no relacionados con el virus, la supresión que ejercen concluye siendo Ag-específica. Esta especificidad estaría dada por las células supresoras específicas de Ag, las que de alguna manera son activadas por Tsv para mediar la supresión. Por lo tanto, sólo resultarán suprimidos aquellos Ags capaces de inducir respuestas de HR tales que posean circuitos supresores Ag-específicos pasibles de ser activados por Tsv. Es decir que, cada Ag capaz de inducir una respuesta de HR será suprimido, sólo si a la vez induce un circuito supresor compatible con el accionar de Tsv.

Surge entonces que la supresión inducida por VJ no es generalizada hacia todos los Ags. Paralelamente, si dos Ags diferentes confluyen en el mismo huésped sólo se suprimirá aquel que posea un circuito supresor adecuado permitiéndose la respuesta de HR dirigida hacia el otro Ag.

De esta manera, el huésped reduce el riesgo de una exposición extensiva a una depresión de un dado tipo de respuesta inmune.

Estos resultados conllevan a la presunción de la existencia de una célula supresora específica para VJ que sería el blanco de Tsv en el huésped infectado. Como resultado de una interacción entre ambos tipos celulares, la respuesta de HR hacia VJ resultaría deprimida lográndose entonces la sobrevida a la infección.

Es de destacar que el mecanismo de acción encontrado sobre supresoras específicas no ha sido descripto hasta el presente en otras infecciones virales.

A diferencia de lo que ocurre con el virus LCM, VJ estaba descripto como incapaz de inducir mortalidad o al menos signos clínicos en ratones adultos [56-59]. Durante el presente trabajo experimental, se pudo comprobar este comportamiento en las cepas BALB/cJ y C57BL, pero se pudo establecer que la cepa C3H/HeJ era susceptible a la infección con la cepa XJ de VJ. Este hallazgo, sugiere la existencia de otras cepas sensibles.

Los ratones C3H/HeJ, probaron ser susceptibles hasta los 4 meses de vida a la cepa prototipo XJ de VJ, aunque únicamente cuando la inoculación es

efectuada por vía ic. En estos animales se hacen presentes signos neurológicos marcados, acompañados de alteraciones histopatológicas compatibles con una reacción de HR; estos signos se corresponden estrechamente con aquellos registrados en el modelo ratón lactante clásico [63]. Sin embargo, a pesar que la enfermedad se hace aparente aproximadamente al mismo tiempo pi que en el modelo clásico, se llega a la muerte dentro de un período estrecho (10-13 días pi) y no se observa mortalidad luego del día 15. La DL_{50} pudo estimarse como menor en sólo 1.5 log en los ratones adultos C3H/HeJ respecto de los lactantes albinos inoculados de modo similar. Este resultado sugiere que la susceptibilidad resulta comparable al modelo clásico.

La cepa XJCL3 de VJ, atenuada para el hombre y el cobayo [44], inesperadamente probó ser atenuada para el ratón C3H/HeJ adulto, a pesar que su patogenicidad en ratones estaba descripta como similar a la observada para la cepa XJ [56-57]. Sobre la base de este hallazgo, este modelo se muestra promisorio para la realización posterior de estudios sobre virulencia de diferentes cepas de VJ.

De la misma manera que ocurre con los ratones adultos resistentes BALB/c [58], no fue posible rescatar virus de cerebro en forma directa (por plaqueo de macerados 10% P/V sobre células Vero) de muestras tomadas de ratones C3H/HeJ adultos infectados. Sin embargo, hasta la muerte de los animales, el aislamiento resultó positivo a partir de cerebro mediante la utilización de técnicas de alta sensibilidad como el cocultivo con células permisivas; contrastando con el modelo resistente [68] donde la limpieza viral se completa a partir del día +7 pi. Otra diferencia entre ambos modelos, es la ausencia de viremia demostrable en los ratones C3H/HeJ contrastando con la viremia fugaz presente a los días 2-4 pi en el ratón BALB/c. Esta ausencia de viremia sugiere una remarcable restricción del virus al tejido cerebral, sin diseminación detectable hacia otros órganos o sangre.

La baja presencia de virus en el SNC, los hallazgos histopatológicos y los signos clínicos, son tres factores que, tomados en conjunto, apoyan fuertemente la naturaleza inmunológica de la enfermedad en los ratones adultos C3H/HeJ, lo cual coincide con lo descripto para el modelo ratón lactante.

Al igual que en el ratón recién nacido, no fue posible detectar Ac Nt en ningún momento en los ratones C3H/HeJ adultos infectados ic, aunque se detectaron bajos títulos (1/5) por inmunofluorescencia a partir del día +7 pi. En contraste, a partir del día +8 se detectan Ac Nt e inmunofluorescentes en el modelo adulto resistente [113]. El papel fundamental de los anticuerpos en la resistencia al VJ, ha sido confirmado mediante la protección obtenida pasivamente por transferencia de suero a ratones recién nacidos [114] o

adultos inmunosuprimidos con Cy [58-59, 112]. Los ratones C3H/HeJ adultos inoculados con la cepa XJ por vías extraneurales, fueron capaces de resistir el desafío por la vía ic efectuado con la cepa XJ 25 días más tarde cuando los Ac Nt alcanzaron niveles adecuados. En una coincidencia remarcable, Vetvicka et al [118] encontraron que el compartimento B en los ratones C3H/HeJ alcanzan solamente una respuesta del 40% a los 2.5 meses de edad y el 70% a los 5 meses, precisamente la edad a la cual los ratones se tornan resistentes. Lamentablemente, no se contaba con otras subcepas de la línea murina C3H para ensayar esta hipótesis.

El virus LCM, prototipo de la familia Arenaviridae, es capaz de llevar a la muerte a los ratones C3H, BALB/c y C57BL contrastando así con la cepa XJ de VJ, la cual no causa mortalidad en los últimos dos. Paralelamente, mientras que los ratones híbridos F1 son altamente susceptibles a la inoculación con LCM [119], en el caso de VJ los híbridos (BALB/cJ X C3H/HeJ)F1 o (C3H/HeJ X BALB/cJ)F1 probaron ser totalmente resistentes a la infección, sugiriendo una base genética en la adquisición de la resistencia. Por otra parte, la infección con altas dosis de LCM lleva a un alto porcentaje de sobrevida [29] debido a la inhibición de la maduración de las células T efectoras de HR mientras que, en los ratones C3H/HeJ altos inóculos de VJ inducen el 100% de mortalidad dentro de un período de sobrevida menor comparado con el observado a dosis menores.

Este nuevo modelo, abre sin duda interesantes perspectivas para el estudio de numerosos aspectos de la fisiopatogenia de la FHA experimental.

Los ratones C3H/HeJ adultos proveyeron un modelo interesante para la búsqueda de correlación entre la capacidad de sobrevida a la infección viral y la existencia de supresión de la respuesta de HR.

En ellos se pudo comprobar que en aquellos grupos etarios sensibles a la inoculación, no se inducían actividades supresoras de HR, mientras que se detectó supresión en los animales resistentes (180 días de vida).

La ausencia de supresión en los ratones sensibles de 90 días de vida podría deberse no a una falla en la inducción de células Tsv sino a la simultánea aparición de otras causas que afectaran su expresión. De este modo y para eliminar esta posibilidad, se transfirieron células a receptores singeneicos y, por otra parte, a ratones BALB/cJ donde las células Tsv (H2 no restringidas) poseen todos los requisitos para su expresión no alterados. En ningún caso se pudo detectar supresión de la respuesta de HR.

Tampoco se consiguió establecer que la supresión observada en los ratones C3H/HeJ de 180 días de edad estuviera mediada por células del tipo

de las descriptas en BALB/C. Sin embargo aunque quedan por determinar los mecanismos que median la supresión, la aparición de esta actividad supresora se correlaciona con la capacidad de sobrevida.

Otro modelo que fue estudiado en este aspecto, lo constituyen los ratones híbridos F1 resistentes a la infección. En ellos se pudo comprobar fehacientemente la presencia de células con capacidad supresora de la respuesta de HR Ag no relacionadas semejantes a las descriptas en BALB/c. Nuevamente se encontró supresión de HR en modelos resistentes a la infección viral.

En el intento de ampliar el estudio de la presencia de supresión de HR a otros modelos murinos sensibles, se analizaron los ratones lactantes infectados con VJ.

Ante la imposibilidad práctica de establecer una respuesta de HR en lactantes, se optó por extraer células esplénicas y de exudado meningeo de los animales infectados, las que se transfirieron al modelo indicador adulto 10^6 GRC en el día de la descarga antigénica. En este caso se demostró no sólo la ausencia de supresión en los lactantes infectados sino que pudo comprobarse la eliminación de la actividad supresora esplénica natural que estos animales poseen. Es de destacar que las supresoras naturales han sido relacionadas con la protección frente a respuestas autoinmunes en momentos en los que los animales "aprenden" a distinguir lo propio de lo no propio [93-96].

Los intentos de protección con células esplénicas tomadas de ratones adultos fracasaron. Con ellas se había intentado establecer si, a pesar de la ausencia de Tsv, se encontraba presente su blanco de acción. Los motivos posibles de esta falta de transferencia pasiva de resistencia fueron comentados (Punto **4.14.2**). Lo concreto es que en este modelo no fue posible detectar actividad supresora de Tsv y que por otra parte, VJ es capaz de destruír una actividad supresora natural con probable función protectora.

Por último se utilizó una aproximación diferente a la hasta ahora empleada para establecer una relación entre la supresión de HR y la capacidad de sobrevida. Para ello, se trató de bloquear la función Tsv mediante la inducción de células CS en animales "naive"'. Los graves signos clínicos de enfermedad que se hicieron evidentes en los animales infectados cinco dias después de la transferencia de Tsv es decir, cuando las células CS ya han sido inducidas, señalan que la depresión de la respuesta de HR está asociada con la ausencia de enfermedad. Alternativamente, las células CS podrían estar reguladas a su vez por otra población celular. Por otra parte, la respuesta humoral que se detecta por primera vez en los animales infectados a partir del día +8 [113] podrían alcanzar un título suficiente a partir del día +12 como

para protejer a los animales de la enfermedad, sobre todo considerando que al transferir las células Tsv se está cotransfiriendo células T citotóxicas y T "helper". En este sentido se debe recordar que los animales inoculados en el mismo momento de la transferencia, que tienen cinco días más para producir una respuesta humoral, no mostraron signo alguno de enfermedad.

De esta forma resultados obtenidos en modelos muy diversos, confluyen en apoyar la hipótesis que sugiere que las células supresoras inducidas por VJ son importantes en la prevención del ataque a los tejidos propios por la respuesta de HR y por consiguiente en la capacidad de sobrevida a la infección viral. En todos los modelos murinos susceptibles (lactantes, C3H/HeJ adultos jóvenes, BALB/c adultos tratados con Cy según el esquema -1,+1,+4) se pudo demostrar ausencia de supresión operativa de HR. Mientras que en los resistentes (BALB/c sin tratamiento, BALB/c tratado con una dosis de Cy 200 mg/kg o con dos dosis de Cy de 50 mg/kg cada una en los días -1 y +1, híbridos F1 sin tratamiento y C3H/HeJ adultos resistentes), se encontró actividad supresora de HR. Por otra parte, utilizando una aproximación experimental diferente (células CS), se pudo establecer que las células Tsv están relacionadas con la ausencia de enfermedad.

6. CONCLUSIONES

1.- Se demuestra actividad supresora de HR en ratones BALB/c adultos (60-90 días de vida) infectados con VJ, requiriéndose virus infeccioso para inducirla.

2.- La supresión aparece independientemente del momento de inoculación respecto del de sensibilización, de la atenuación de la cepa viral ensayada y de la vía utilizada para la inoculación.

3.- No se observó destrucción de células inmunocompetentes, encontrándose incremento en el porcentaje de linfocitos T esplénicos.

4.- VJ induce incremento significativo de la respuesta humoral hacia Ags particulados heterólogos, independientemente de la vía y del momento de inoculación repecto del de sensibilización.

5.- La supresión está mediada por células Thy 1^+, Ly 1^+ 2^-, Ag-no específicas (Tsv), presentes en el bazo de los animales infectados a partir de las 24 h y hasta los 24 días pi.

6.- Estas células manifiestan un alto grado de eficiencia ya que con sólo $5x10^6$ células esplénicas nucleadas totales/ratón, suministradas en el momento de la descarga, son capaces de suprimir totalmente la respuesta de HR.

7.- No se encontró evidencia que apoye la participación de factores solubles capaces de mediar la supresión.

8.- Estas células son incapaces de actuar sobre la rama aferente de la reacción de HR, actuando sólo sobre la rama eferente y, únicamente en presencia de células supresoras específicas del Ag utilizado como indicador (GRC). Es decir, su blanco de acción no son las células T efectoras de HR, sino las supresoras propias del sistema de HR indicador. Actúa por lo tanto, en forma indirecta.

9.- Las células Tsv fueron capaces de actuar sobre las diferentes células blanco que le fueron ofrecidas sugiriendo entonces, un amplio rango de acción sobre diferentes sistemas supresores.

10.- El tratamiento con Cy según el esquema -1, +1, +4 (50 mg/Kg de peso corporal c/u) demuestra en los ratones infectados con VJ, la presencia de una población residual de células supresoras Thy 1^+, Ly 1^+ 2^- Ag-no específicas (Tsv*) incapaces de aceptar el blanco generado con el mismo esquema de Cy. Estos resultados sugieren que esta célula, inoperante en su propio entorno, no

podría actuar protegiendo a los animales infectados e inmunosuprimidos por la acción de la Cy, pudiendo entonces tener relación con la presencia de lesiones del tipo HR presentes en el SNC de estos animales (mortalidad ~90%)

11.- Se logró la identificación de los blancos generados en dos sistemas indicadores de HR, sobre los que actúan las células supresoras inducidas por VJ. En el esquema 10^6 GRC, existe un requerimiento por la actividad conjunta de dos poblaciones celulares Ag-específicas diferentes, una Thy 1^+, Ly 1^+ 2^- y otra Thy 1^+, Ly 1^- 2^+ para mediar supresión de HR. En el esquema Cy -1, +1, +4 (50 mg/Kg c/u) y 10^8 GRC, el blanco está conformado por una única población Ag-específica portadora del fenotipo Thy 1^+, Ly 1^- 2^+.

12.- Ambas células supresoras inducidas por la infección con VJ (Tsv y Tsv*), demostraron no ser restringuidas por la "barrera" del CMH en su accionar.

13.- Tsv* mostró requisitos similares por un blanco determinado aún en un entorno desconocido (H2 no compatible).

14.- Las células Tsv activan las células supresoras específicas de Ag, induciéndolas a actuar sin perder su especificidad.

15.- Se determinó la presencia de células contrasupresoras con aparente función de regulación de la actividad supresora inducida por VJ, que coinciden en su aparición con el pico de Ac Nt. Esta misma actividad pudo ser inducida mediante la transferencia de células Tsv a receptores *naive*.

16.- Estas células contrasupresoras fueron identificadas como pertenecientes a la supoblación linfocitaria Thy 1^+, Ly 1^+ 2^-.

17.- Pudo establecerse que, en el esquema de aplicación de Cy -1, +1, +4; las dos primeras dosis serían suficientes para la depleción del blanco de las células Tsv*, mientras que la tercera dosis sería necesaria para la eliminación definitiva de Tsv (Tsv es capaz de utilizar ambos blancos). Estos resultados parecerían establecer bases experimentales sobre las causas de la alta mortalidad obtenida mediante el empleo de un esquema tan especial de Cy en los ratones adultos infectados con VJ.

18.- Pudo establecerse el fenotipo completo de la célula Tsv como Thy 1^+, Ly 1^+ 2^- IJ^-, $L3T4^+$.

19.- Se encontró el primer modelo murino adulto naturalmente susceptible a la inoculación con VJ (ratones C3H/HeJ), describiéndose sus principales características.

20.- Se pudo comprobar la presencia de supresión en todos los modelos murinos resistentes ensayados y su ausencia en aquellos susceptibles, sugiriendo una relación directa entre la capacidad de sobrevida y la actividad supresora.

OSCAR E. CAMPETELLA

MARTIN A. ISTURIZ.

Dra. MERCEDES C. WEISSENBACHER
PROFESORA REGULAR TITULAR
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

7. BIBLIOGRAFIA

1.- Golub ES. The cellular basis of the immune response. An approach to immunobiology. Sinauer Associates. Sunderland, Massachussets (USA). 1981.

2.- Asherson GL, Colizzi V, Zembala M. An overview of T-suppressor cell circuits. Ann. Rev. Immunol. **4**: 37 (1986).

3.- Murphy DB. The IJ puzzle. Ann. Rev. Immunol. **5**: 405 (1987).

4.- Green DR. Flood PM, Gershon RK. Immunoregulatory T-cell pathways. Ann. Rev. Immunol. **1**: 439 (1983).

5.- Germain RN, Benacerraf B. A single major pathway of T-lymphocyte interactions in antigen-specific immune suppression Scand. J. Immunol. **13**: 1 (1981).

6.- Golub ES. Brain-associated Ø antigen: Reactivity of rabbit anti-mouse brain with mouse lymphoid cells. Cell Immunol. **2**: 353 (1971).

7.- Charlton B, Burkhardt K, Mandel TE. How important is the L3T4 antigen to $L3T4^+$ cell function in vivo?. Immunol. Today **9**: 165 (1988).

8.- Brock N, Hohorst HJ. Über die aktivierung von cyclophosphamid in vivo und in vitro. Arzmeinittel-Forschung **13**: 1021 (1963).

9.- Brock N, Hohorst HJ. Über die aktivierung von cyclophosphamid in warmbluterorganismus. Naturwiss **49**: 610 (1962).

10.- Brock N. Farmacología y metabolismo de la ciclofosfamida y otros compuestos del éster fosfamídico de la mostaza nitrogenada. La Semana Médica **132 (30)**: 1 (1968).

11.- Cowens JW, Ozer H, Ehrke MJ, Greco WR, Colvin M, Mihich E. Inhibition of the development of suppressor cells in culture by 4-hydroperoxycyclophosphamide. J. Immunol. **132**: 95 (1984).

12.- Kaufmann SHE, Hahn H, Diamantstein T. Relative susceptibilities of T cell subsets involved in delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells to the in vitro action of 4-hydroperoxycyclophosphamide. J. Immunol. **125**: 1104 (1980).

13.- Kerckhaert JAM, Hoflwis FM, Villers JM. Effect of variations in time and dose of cyclophophamide injection on delayed hypersensitivity and antibody formation. Cell Immunol. **29**: 232 (1977).

14.- Askenase PW, Hayden BJ, Gershon RK. Augmentation of delayed-type hypersensitivity by doses of cyclophosphamide which do not affect antibody responses. J. Exp. Med. **141**: 697 (1975).

15.- Stockman GD, Heim LR, South MA, Trentin JJ. Differential effects of cyclophosphamide on the B and T cell compartments of adult mice. J. Immunol. **110**: 277 (1973).

16.- Santos GW, Owens AH, 19S and 7S antibody production in the cyclophosphamide or methotrexate-treated rat. Nature **209**: 622 (1966).

17.- Ghaffar A, Sigel MM, Huggins EM Jr. Resistance of Helper T lymphocytes to cyclophosphamide. Int. J. Immunopharmac. **7**: 449 (1985).

18.- Shand FL, Liew FY. Differential sensitivity to cyclophosphamide of Helper T cells for humoral responses and suppressor T cells for delayed-type hypersensitivity. Eur J. Immunol. **10**: 480(1980).

19.- Sy MS, Miller SD, Claman HN. Immune suppression in supraoptimal doses of antigen in contact sensitivity. I demonstration of suppressor cells and their sensitivity to cyclophosphamide. J. Immunol. **119**: 240 (1977).

20.- Liew FY, Russel SM, Brand CM. Induction and characterization of delayed-type hypersensitivity to influenza virus in mice. Eur. J. Immunol. **9**: 783 (1979).

21.- Pang T, Wong PY, Pathmanathan R. Induction and characterization of delayed-type hypersensitivity to dengue virus in mice. J. Infect. Dis. **146**: 235 (1982).

22.- Halstead SB. Immune enhancement of viral infection. Prog. Allergy **31**: 301 (1982).

23.- Nash AA. Tolerance and suppression in virus diseases. Br. Med. Bull. **41**:41 (1985).

24.- Schrier RD, Ishioka GY, Pizer I, Moorhead JW. Delayed hypersensitivity and immune protection against Herpes Simplex virus: Suppressor T cells that regulate the induction of delayed hypersensitivity effector T cell also regulate the induction of protective T cell. J. Immunol. **134**: 2889 (1985).

25.- Sissons JGP, Borysiewicz LK. Viral immunopathology. Br. Med. Bull. **41**: 34 (1985).

26.- McChesney MB, Oldstone MBA. Viruses perturb lymphocytes functions: Selected principles characterizing virus-induced immunosuppression. Ann. Rev. Immunol. **5**: 279 (1987).

27.- Liew FY, Russell SM. Inhibition of pathogenic effect of effector T cells by specific suppressor T cells during influenza virus infection in mice. Nature **304**: 541 (1983).

28.- Job LP, Lyden DC, Huber SA. Demonstration of suppressor cells in Coxsackievirus group B, type 3 infected female BALB/c mice which prevents myocarditis. Cell. Immunol. **98**: 104 (1986).

29.- Marker O, Thomsen AR, Volkert M, Hansen BL, Clemmensen IH. High-dose survival in the lymphocytic choriomeningitis virus infection is accompanied by suppressed DTH but unaffected T-cell cytotoxicity. Scand. J. Immunol. **21**: 81 (1985).

30.- Thomsen AR, Marker O. T cell effector function and unresponsiveness in the murine Lymphocytic Choriomeningitis virus infection. II. Delayed-type hypersensitivity unresponsiveness reflects a defective differentiation from T_D precursor to effector cell. Scand. J. Immunol. **24**:137 (1986).

31.- Parodi AS, Greenway DJ, Rugiero HR, Rivero E, Frigerio MJ, Mettler NE, Garzón F, Boxaca MC, Guerrero LB de, Nota NR. Sobre la etiología del brote epidémico de Junin. Día Medico **30**: 2300 (1958).

32.- Weissenbacher MC, Guerrero LB de, Boxaca MC. Experimental biology and pathogenesis of Junin virus infection in animals and man. Bull. WHO. **52**: 507 (1975).

33.- Kravetz F. Ecología y control de reservorios. Ciencia e Investigación 33: 235 (1977).

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

35.- Weissenbacher MC, Laguens RP, Coto CE. Argentine hemorrhagic fever. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **134**: 79 (1987).

36.- Lascano EF, Berría MI. Microscopía electrónica de virus Junin en cultivos primarios de riñón de conejo y de riñón de hamster. Medicina (Bs. Aires) **31**: 1 (1971).

37.- Boxaca MC; Parodi AS; Rugiero H; Blay R. Fiebre Hemorrágica experimental en cobayo. Rev. Soc. Arg. Biol. **37**: 170 (1961).

38.- González SM; Mejszenkier JD. Variaciones hematológicas en los cobayos con Fiebre hemorrágica experimental (virus Junin). Rev. Soc. Arg. Biol. **38**: 392 (1962).

39.- Nota NR; Frigerio MJ; Guerrero LB de; Nejamkis MR. Estudios hematológicos en cobayos infectados con virus Junin cepa XJ y cepa XJ Clon 3. Medicina (B. Aires) **29**: 171 (1969).

40.- Molinas FC,; Paz RA; Rimoldi MT; de Bracco MME. Studies of blood coagulation and pathology in experimental infection of guinea pigs with Junin virus. J. Infect. Dis. **137**: 740 (1972).

41.- Carballal G; Oubiña JR; Rondinone SN; Elsner B; Frigerio MJ. Cell-mediated immunity and lymphocyte populations in experimental Argentine Hemorrhagic Fever (Junin virus). Infect. Immun. **34**: 323 (1981).

42.- Parodi AS; Nota NR; Guerrero LB de; Frigerio MJ; Weissenbacher MC; Rey E. Inhibition of immune response in Experimental Hemorragic Fevers (Junin virus). Acta Virol. **2**: 120 (1967).

43.- Carballal G; Cossio PM; Laguens RR; Ponzinibio C; Oubiña JR; Cabeza Meckert P; Rabinovich A; Arana RM. Junin virus infection of guinea pigs: Immunohistochemical and ultrastructural studies of the hemopoeietic tissue. J. Infect. Dis. **143**: 1 (1981).

44.- Galassi NV, Blejer JL, Barrios HA, Nejamkis MR, Nota NR. New attenuation marker for Junin virus based on immunological responses of guinea pigs. J. Infect. Dis. **145**: 331 (1982).

45.- Guerrero LB de; Boxaca MC; Weissenbacher MC; Frigerio MJ. Infección experimental del cobayo con virus Junin. Cuadro clínico, diseminación y eliminación del virus. Medicina (B. Aires) **37**: 271 (1977).

46.- Nejamkis MR; Nota NR; Frigerio MJ; Carballal G. Estudios inmunológicos en Fiebre Hemorrágica Argentina experimental. IV.- Acción del suero antilinfocítico en la enfermedad del cobayo. Rev. Asoc. Arg. Microbiol. **4**: 3 (1972).

47.- Cossio PM; Laguens RR; Rabinovich A; Carballal G; Cabeza Meckert P; Maiztegui JI; Vázquez C; Arana RM. Estudios inmuhistoquímicos y ultraestructurales del riñón de cobayo infectado experimentalmente con virus Junin. Medicina (B. Aires) **37**: 108 (1977).

48.- Nejamkis MR; Weissenbacher MC; Callelo MA. Infección experimental con virus Junin en la rata. Medicina (B. Aires) **37**: 121 (1977).

49.- Lascano EF, Avila MM, Weissenbacher MC. Encefalitis subaguda en ratas inoculadas con virus Junin. (Resumen). XXVI Reunión Cientifica de la SAIC. 1982.

50.- Weissenbacher MC, Callelo MA, Colillas OJ, Golfera H, Rondinone SN, Frigerio MJ. Infección en primates del Nuevo Mundo con virus Junin. V. *Alouatta caraya* Medicina (Bs. Aires). **38**: 529. (1978).

51.- Frigerio MJ, Rondinone SN, Laguens RP, Calello MA, Cabeza Meckert P, Colillas O, Weissenbacher MC. Infección de primates del Nuevo Mundo con virus Junin. III *Saimiri sciurens.* Medicina (Bs. Aires) **42**: 519 (1982).

52.- Saimolovich SR, Rondinone SN, Laguens RP, Colillas O, Frigerio MJ, Weissenbacher MC. Infección de primates del Nuevo Mundo con virus JuninIV. *Aotus trivirgatus* Rev Asoc. Arg. Microbiol. **15**: 219 (1983).

53.- Carballal G, Cossio PM, Arana MR, Nagle C, Casanova MB. El *Cebus sp* como modelo experimental para la Fiebre Hemorrágica Argentina. Medicina (Bs. Aires) **40**: 734 (1980).

54.- Weissenbacher MC, Callelo MA, Rondinone SN, Travi B, Frigerio MJ. Infección de primates del Nuevo Mundo con virus Junin. II. *Callithrix jacchus* Medicina (Bs. Aires) **40**: 21. (1980).

55.- Gonzalez PH, Laguens RP, Frigerio MJ, Calello MA, Weissenbacher MC. Junin virus infection of *Callithrix jacchus* Pathologic features. AM. J. Trop. Med. Hyg. **32**: 417 (1983).

56.- Boxaca MC, Giovanniello OA, Nota NR, Nejamkis MR, de Guerrero LB, Frigerio MJ. Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junin. Cuadro clínico y susceptibilidad. Rev. Asoc. Arg. Microbiol. **5**: 2 (1973).

57.-Giovanniello OA, Boxaca MC, Nota NR, Nejamkis MR. Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junin: Enfermedad tipo. Rev. Asoc. Arg. Microbiol. **7**: 8 (1975).

58.-Barrios HA, Rondinone SN, Giovanniello OA, Lascano EF, Nota NR. Effect of staggered cyclophosphamide-immunosuppression on resistance to experimental Junin virus infection. Arch. Virol **83**: 285 (1985).

59.- Barrios HA. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN) UBA 1985.

60.- Taratuto AL, Tkaczevski LZ de, Nota NR, Nejamkis MR, Giovanniello OA. Junin virus encephalitis in mice: Its inhibition by antithymocyte serum. Arch. ges. Virusforsch. **43**: 173 (1973).

61.- Weissenbacher MC, Schmuñis GA, Parodi AS. Junin virus multiplication in thymectomized mice: Effect of thymus and immunocompetent cells. Arch. ges. Virusforsch. **26**: 63 (1969).

62.- Weissenbacher MC, Callelo MA, Quintans CJ, Panisse H, Woyskowsky NM, Zanoli VH. Junin virus infection in genetically athymic mice. Intervirol. **19**: 1 (1983).

63.- Giovanniello OA, Barrios HA, Rondinone SN, Lascano EF, Nota NR. Self destructive DTH response in Junin virus infected newborn mice. Comun. Biol. **1**: 259 (1983).

64.- Nota NR, Frigerio MJ, Nejamkis MR, Carballal G, Guerrero LB de. Acción del suero antitimocito en la Fiebre Hemorrágica Argentina experimental. Medicina (B. Aires) **31**: 298 (1971).

65.- Nota NR, Nejamkis MR, Giovanniello OA. Further experiments on the action of anti-thymocyte serum in experimental Junin virus infection. Acta Virol. **20**: 61 (1976).

66.- Nota NR,Nejamkis MR, Frigerio MJ, Guerrero LB de. Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junin. Efecto del suero antitimocito. Medicina (B. Aires). **33**:398 (1973).

67.- Rondinone SN, Armendáriz MA, Sanjuan N, Nota NR. Abrogation of Junin virus encephalitis by critical cyclophosphamide timing and dosage. Acta Virol. **31**: 260 (1987).

68.- Berría MI, Barrios HA, Lascano EF, Nota NR. Rescue of Junin virus from adult mice by cocultivation procedures. Comun. Biol. **2**: 255 (1983).

69.- Campetella OE, Sanchez A, Giovanniello OA. In vivo Junin virus-mouse macrophages interaction. Acta Virol. **32**: 198 (1988).

70.- González PH, Lampuri JS, Coto CE, Laguens RP. In vitro infection of murine macrophages with Junin virus. Infect. Immun. **35**: 356 (1982).

71.- Gill HK, Dhaliwal JS, Sukumaran KD, Liew FY. Effect of irradiation on the precursor, activated and memory suppressor T cells for delayed-type hypersensitivity to sheep erythrocytes in mice. Immunology **53**: 669 (1984).

72.- Liew, FY & Howard, JG Regulation of delayed type hypersensitivity. V. Suppressor cell memory in antigen-specific suppression of delayed type hypersensitivity to sheep erythrocytes. Eur. J. Immunol. **10**, 937 (1980)

73.- Rondinone SN, Giovanniello OA, Barrios HA, Nota NR. Circuito supresor de la hipersensibilidad mediada por células en el modelo ratón-glóbulos rojos de carnero. Rev Lat-amer. Microbiol.**28**: 211 (1986).

74.- Rondinone SN, Giovanniello OA, Barrios HA, Nota NR. Effect of fractional cyclophosphamide dosage on sheep red blood cells-delayed-type hypersensitivity response in mice. J. Immunol. **130**: 1600 (1983).

75.- Tamura S-I, Kikuta K, Kobayashi T, Sato Y, Sato H. Studies on primed precursors of effector T cells involved in delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells in mice. Cell. Immunol. **108**: 120 (1987).

76.- Yamaguchi K, Kishimoto S. Distinction between suppressor of the delayed-type hypersensitivity and the humoral response to sheep erythrocytes. Immunology **35**: 721 (1978).

77.- LeClercq SA, Bretscher PA. T cells expressing delayed-type hypersensitivity can be derived from a humorally immune lymphocyte population. Eur. J. Immunol. **17**: 949 (1987).

78.- Gill HK, Liew FY. Regulation of delayed-type hypersensitivity. III. Effect of cyclophosphamide on the suppressor cells for delayed-type hypersensitivity to sheep erythrocytes in mice. Eur. J. Immunol. **8**: 172 (1978).

79.- Reed LJ, Muench HA. A simple method of estimating fifty percent end points. Am J. Hyg. **27**: 493 (1938).

80.- Giovanniello OA, Weber EL, Rabinovich RD. Un nuevo ensayo de placas para la cuantificación del virus Junin. Rev. Arg. Microbiol. **13**: 18 (1981).

81.- Horta-Barbosa L, Fuccillo DA, Sever JL, Zerman W. Subacute sclerosing panencephalitis-isolation of measles virus from brain biopsy. Nature **221**: 974 (1969).

82.- Gilden DH, Wroblewska Z, Chesler M, Wellish MC, Liof FC, Wolinski JS, Rocke LB. Experimental panencephalitis induced in suckling mice by Parainfluenza type I (6/94) virus. J. Neuropathol. Exp. Neurol. **35**: 269 (1976).

83.- Carrigan DR, Mc Kendall RR, Kenneth PJ. CNS disease following of SSPE Measles virus from intraperitoneal inoculation of suckling hamsters. J. Med. Virol. **2**: 347 (1978).

84.- Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**: 265 (1951).

85.- Mizushima Y, Wepsic HT, Yamamura Y, DeSilva MA, Janns G, Larson CH. Negative and positive immunobiological responses in mice pretreated with Bacillus Calmette-Guérin cell wall. Cancer Res. **44**: 20 (1984).

86.- Tkaczevski LZ de, Nota NR, Nejamkis MR, Frigerio MJ, Carballal G. Immunosuppression by Junin virus. Ultrastructural study. Medicina (B. Aires) **34**: 173 (1974).

87.- Berencsi K, Bakay M, Beládi I. The role of macrophages in adenovirus-induced immunosuppression in mice. Acta Virol. **29**: 61 (1985).

88.- Morahan PS, Connor JR, Leary KR. Viruses and the versatile macrophages Br. Med. Bull. **41**: 15 (1985).

89.- Rondinone SN, Giovanniello OA, Barrios HA, Nota NR. Efecto de distintos esquemas de administración de ciclofosfamida en la mortalidad del ratón adulto infectado con virus Junin. Rev. Arg. Microbiol. **16**: 229 (1984).

90.- Green, D.R. & Ptak, W. Contrasuppression in the mouse. Immunol. Today **7**: 81.(1986)

91.-Sy MS, Miller SD, Claman HN. Immune suppression in supraoptimal doses of antigen in contact sensitivity. I demonstration of suppressor cells and their sensitivity to cyclophosphamide. J. Immunol. **119**: 240 (1977).

92.- Parnes JR, Hunkapiller T. L3T4 and the immunoglobulin gene superfamily: New relationships between the immune system and the nervous system. Immunol. Rev. **100**: 109 (1987).

93.- Argyris BF. The interaction between macrophages and suppressor cells in immunological maturation in mice. Immunol. Today **5**: 34 (1984).

94.- Argyris BF. Suppressor activity in the spleen of neonatal mice. Cell. Immunol. **36**: 354 (1978).

95.- Argyris BF. Further studies on suppressor cell activity in the spleen of neonatal mice. Cell. Immunol. **48**: 398 (1979).

96.- Maier T, Holda JH, Claman HN. Natural suppressor (NS) cells. Members of the LGL regulatory family. Immunol. Today **7**: 312 (1986).

97.- Piguet PF, Irle C, Vassalli P. Immunosuppressor cells from newborn mouse spleen are macrophages differentiating *in vitro* from monoblastic precursors. Eur. J. Immunol. **11**: 56 (1981).

98.- Giovanniello OA, Nejamkis MR, Nota NR. Studies of cell-mediated immunity to Junin virus. Acta virol. **22**: 37 (1978)

99.- Goodwin JS, Webb DR. Regulation of the immune response by prostaglandins. Clin. Immunol. Immunopathol. **15**: 106 (1980).

100.- Goodwin JS, Ceuppens J. Regulation of the immune response by prostaglandins. J. Clin. Immunol. **3**: 295 (1983).

101.- Semenov BF. Viruses as non-specific modulators of immunological reactivity. Acta Virol. **25**: 122 (1981).

102.- Inada T, Mims CA. Live Lactate Dehydrogenase-elevating virus (LDV) induces suppressor T cells that inhibit the development of delayed-type hypersensitivity to LDV. J. Gen. Virol. **67**: 2103 (1986).

103.- Colonna Romano G, Dieli F, Abrignani S, Salerno A, Colizzi V. Inhibition of lymphocyte mitogenesis in mice infected with Newcastle disease virus: viral interfernce with the interleukin system. Immunology **57**: 373 (1986).

104.- Chatuverdi UC, Singh N, Shukla MI, Mathur A, Kumar A. In vitro induction of suppressor T cells by Dengue virus. Ann. Virol./Inst. Pasteur **136E**: 341 (1985).

105.- Chong K, Mims CA. Antigen-specific suppression of delayed type hypersensitivity to murine cytomegalovirus in MCMV-infected mice. J. Gen. Virol. **64**: 2433 (1983).

106.- Greene RN, Weiner HL. Delayed hypersensitivity in mice infected with reovirus. II Induction of tolerance and suppressor T cells to viral specific gene products. J. Immunol. **125**: 283 (1980).

107.- Mathur A, Rawat S, Chatuverdi UC. Suppressor T cells for delayed-type hypersensitivity to Japanese encephalitis virus. Immunology **52**: 395 (1984).

108.- Mathur A, Kulshreshtha R, Rawat S, Chatuverdi UC. Memory suppressor T cells in latent Japanese encephalitis virus infection. Immunology **60**: 71 (1987).

109.- Wong PY, Devi S, McKenzie FC, Yap KL, Pang T. Induction and Ly phenotype of suppressor T cells in mice during primary infection with Dengue virus. Immunology **51**:51 (1984).

110.- Sundar SK, Menezes J. Epstein-Barr virus immunosuppression: II. Generation of nonspecific suppressor T lymphocytes *in vitro* Microb. Pathogen. **2**: 259 (1987).

111.- Marker O, Thomsen AR. T-cell effector function and unresponsiveness in the murine lymphocytic choriomeningitis virus infection. I. On the mechanism of a selective suppression of the virus-specific delayed-type hypersensitivity response. Scand. J. Immunol. **24**: 127 (1986).

112.- Barrios HA, Giovanniello OA, Rondinone SN, Campetella OE, Nota NR. Passive transfer protection against Junin virus in cyclophosphamide-suppressed mice. Acta Virol **28**: 343 (1984).

113.- Barrios HA, Rondinone SN, Blejer JL, Giovanniello OA, Nota NR. Development of specific immune response in mice infected with Junin virus. Acta virol. Acta Virol **26**: 156 (1982).

114.- Nejamkis MR, Nota NR, Weissenbacher MC, de Guerrero LB, Giovanniello OA. Acta Virol. Passive immunity against Junin virus in mice. **19**: 237 (1975).

115.- HayGlass KT, Strejan GH. Antigen- and isotype-specific regulation of IgE responses by Lyt 1^+, $2,3^-$ and Lyt 1^- $2,3^+$ T suppressor cells. Cell. Immunol. **91**:132 (1985).

116.- Komastopoulos K, Orbach-Arbouys S. J. Specific inhibition of hybrid resistance in F1 hybrid mice pretreated with parent strain spleen cells. I induction of a nylon-adherent, Thy1^+ Lyt1^+2^- suppressor cell. J. Immunol. **138**: 704 (1987).

117.- Shukla, MI, Chatuverdi, UC. Duration of adoptively transferred dengue virus-induced suppressor activity. Br. J. Exp. Pathol. **66**. 377.(1985).

118.- Vetvicka V, Lee G, Kincade PW. Intrinsic B lymphocyte and macrophage defects in C3H/HeJ mice. J. Immunol. **136**: 2370 (1986).

119.-Doherty PC, Zinkernagel RM. Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H2 gene complex. Nature **256**: 50 (1975).