

Tesis de Posgrado

Caracterización biológica y bioquímica de una mutante de virus Junín atenuada para ratón lactante

Scolaro, Luis Alberto

1991

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:

Scolaro, Luis Alberto. (1991). Caracterización biológica y bioquímica de una mutante de virus Junín atenuada para ratón lactante. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2424_Scolaro.pdf

Cita tipo Chicago:

Scolaro, Luis Alberto. "Caracterización biológica y bioquímica de una mutante de virus Junín atenuada para ratón lactante". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2424_Scolaro.pdf

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

"Caracterización biológica y bio-
química de una mutante de virus
Junín atenuada para ratón lactante"

Autor: Lic. Luis Alberto Scolaro.

Directora: Dra. Elsa Beatriz Damonte.

Lugar de trabajo: Laboratorio de Virología, Departamento de
Química Biológica. FCEyN. UBA.

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas

1991

Tesis.
2424
ej. 2.

A mi familia

Agradecimientos

A la Dra. Elsa Damonte por la inteligencia, el criterio y la objetividad con que guió mis primeros pasos en el mundo de la investigación científica y por su infinita paciencia para esperar el fruto de los mismos.

A la Dra. Celia Coto por su apoyo, la originalidad de sus ideas y sus siempre oportunas palabras de consejo en los momentos difíciles.

A la Dra. Susana Mersich por enseñarme a trabajar respetando la rigurosidad en la labor científica.

A mis compañeros, Nelly, Silvia, Vivi, Félix, Laura, Moñeque, Isa, Ceci, Fabián, Adri, Carlitos, Emi, Guille, Gracie, Jorge, Cristina, Juan y a Sofi, que vive en mi recuerdo, por sus opiniones, discusiones y por el estímulo constante.

A los integrantes del área de Microbiología por los gratos momentos compartidos.

A todos aquellos, que de una u otra manera, contribuyeron a la realización de este trabajo.

Abreviaturas

aprox.: aproximadamente. .
ADN: ácido deoxiribonucleico.
ARN: ácido ribonucleico.
mARN: ARN mensajero.
cél: célula/s.
CI: centros infecciosos.
μCi: microcurie/s.
C.m.: Calomys musculinus.
CP: células peritoneales.
cpm: cuentas por minuto.
CR: cultivos primarios de cerebro de ratón.
d: día/s.
Da: dalton/s.
KDa: kilodalton/s.
DI: partículas defectivas interferentes.
DICT₅₀: dosis infectiva 50% en cultivo de tejidos.
DL₅₀: dosis letal 50%.
DOC: deoxicolato de sodio.
EC: cultivos primarios de embrión de C.m..
EC3: cultivos de embrión de C.m. persistentemente infectados con XJC13.
EC7: cultivos de embrión de C.m. persistentemente infectados con C167.
EDTA: ácido etilén-diamino-tetracético.
ER: cultivos primarios de embrión de ratón.
ER3: cultivos de embrión de ratón persistentemente infectados con XJC13.
ER7: cultivos de embrión de ratón persistentemente infectados con C167.
FHA: fiebre hemorrágica argentina.
g: gramo/s.
μg: microgramo/s.
mg: miligramo/s.
GPC: precursor de las glicoproteínas.
GP1: glicoproteína de envoltura 1.
GP2 = GP38: glicoproteína de envoltura 2.
h: hora/s.
I.A.: índice de atenuación.
i.c.: intracerebral.
i.m.: intramuscular.
i.p.: intraperitoneal.
IFN: interferón.
LCMV: virus de la coriomeningitis linfocítica.
log: logaritmo decimal.
ml: mililitro.
μl: microlitro.
MBE: medio basal de Eagle.
MEM: medio mínimo esencial.
m.i.: multiplicidad de infección.

min: minuto/s.
NP: nucleoproteína.
PAGE-SDS: electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.
PBS: buffer fosfato salino.
p.i.: post-infección.
PM: peso molecular.
PPO: 2,5 difenil-oxazol.
POPOP: 1,4 bis (4-metil 5-fenil 2-oxazolil) benceno.
RC: cultivos de riñón de C.m. adulto.
ST: suero de ternera.
TEMED: 1,2-bis (dimetilamino) etano.
Tris: tris (hidroximetil) aminometano.
ts: termosensible.
UFP: unidades formadoras de placa.
V3: células Vero persistentemente infectadas con XJC13.
V7: células Vero persistentemente infectadas con C167.
VJ: virus Junín.
VSV: virus de la estomatitis vesicular.

Indice

I N T R O D U C C I O N.....	1
I) La variabilidad genética y su aplicación al estudio de los fenotipos virales.....	1
a) Principales parámetros involucrados en la caracterización de un virus.....	1
b) Las mutantes virales como resultado de la variabilidad genética.....	2
c) Empleo de mutantes en los estudios de patogenicidad y virulencia.....	3
II) Virus Junín.....	6
a) La familia Arenaviridae.....	6
b) Biología del virus Junín.....	8
1) Infecciones in vitro.....	8
2) Infecciones in vivo.....	9
III) Variación genética en arenavirus.....	12
a) Variantes virales obtenidas por rearrreglo genómico.....	12
b) Mutantes espontáneas.....	12
c) Mutantes inducidas.....	14
M A T E R I A L E S Y M E T O D O S.....	17
Virus.....	17
Animales.....	18
Células.....	18
Ensayos de infectividad.....	19
Curvas de crecimiento de XJCl3 y Cl67 en cultivos celulares.....	20
Persistencia de XJCl3 y Cl67 in vitro.....	20
Ensayo de adsorción.....	21
Ensayo de unión de virus purificado y iodinado.....	22
Ensayo de penetración.....	22
Síntesis de proteínas virales en células Vero y ER.....	22
Mapeo peptídico de las proteínas virales.....	23
Purificación y marcación de VJ por iodinación.....	24
Análisis de GP38 marcada con ¹²⁵ I.....	24
Patogenicidad para ratón.....	24
Multiplicación en ratón lactante.....	25
Detección de interferón.....	25
Protección de ratones experimentalmente infectados con Cl67 frente a la descarga con XJCl3.....	25
Patogenicidad para <u>Calomys musculinus</u>	26
Patogenicidad para cobayo adulto.....	26
Ensayos de neutralización.....	26

R E S U L T A D O S.....	27
I) Estudio de la patogenicidad de Cl67 en la infección experimental del ratón.....	27
a) Análisis de la influencia de diversos parámetros sobre la virulencia de Cl67 en ratón.....	27
1) Edad del animal.....	27
2) Vía de inoculación.....	31
3) Dosis de virus.....	31
4) Cepa de ratón.....	33
b) Características de la infección del ratón con Cl67.....	36
1) Distribución de virus en órganos.....	36
2) Replicación viral en células peritoneales.....	41
3) Producción de interferón.....	44
4) Cinética de aparición de anticuerpos neutralizantes.....	47
c) Comportamiento de ratones infectados con Cl67 frente al desafío con XJC13.....	47
II) Patogenicidad de Cl67 para otros modelos animales.....	51
a) <u>Calomys musculus</u>	51
b) Cobayo.....	51
III) Multiplicación y persistencia de Cl67 en cultivos celulares	53
a) Curvas de crecimiento en distintos sustratos celulares.....	54
1) Células Vero.....	54
2) Células BHK-21.....	56
3) Cultivos primarios de cerebro de ratón lactante.....	56
4) Cultivos primarios de embrión de ratón.....	59
5) Cultivos de células peritoneales de ratón.....	59
6) Cultivos primarios de embrión de <u>Calomys musculus</u>	61
7) Cultivos celulares de riñón de <u>Calomys musculus</u>	63
b) Persistencia de Cl67 y XJC13 en distintos sustratos celulares.....	63
1) Células Vero.....	66
2) Cultivos de embrión de ratón.....	68
3) Cultivos de embrión de <u>Calomys musculus</u>	71
IV) Etapas del ciclo de multiplicación de XJC13 y Cl67.....	71
a) Síntesis de proteínas virales.....	71
b) Adsorción.....	77
c) Penetración.....	80

V) Caracterización de la glicoproteína de superficie GP38.....80

- a) Reactividad cruzada de XJC13 y C167 por neutralización.82
- b) Movilidad electroforética de GP38.....82
- c) Análisis de GP38 por mapeo peptídico.....84

D I S C U S I O N.....88

B I B L I O G R A F I A.....97

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

I) LA VARIABILIDAD GENETICA Y SU APLICACION AL ESTUDIO DE LOS FENOTIPOS VIRALES.

a) Principales parámetros involucrados en la caracterización de un virus.

Las primeras clasificaciones de los virus animales agruparon a los mismos de acuerdo a las características de las enfermedades que estos agentes producían, ya sea en humanos o en animales. A fin de lograr una clasificación más objetiva, a este aspecto, puramente descriptivo y sin fundamento taxonómico, se le han ido sumando, con el transcurso del tiempo y el desarrollo de la tecnología, otra serie de criterios que incluyen conceptos básicos acerca de la estructura de los virus, su contenido genético y sus mecanismos de multiplicación. Es así como actualmente, el concepto de fenotipo viral surge del conjunto de las características propias de un virus expresadas no solamente a nivel biológico, sino también bioquímico, genético y fisicoquímico.

Los estudios del comportamiento biológico de un virus pueden desarrollarse in vivo o in vitro. En el primer caso se tienen en cuenta los aspectos referidos a las enfermedades producidas en hospedadores naturales y en animales de laboratorio utilizados como modelos de infección experimental. En el segundo caso se consideran las características que se manifiestan durante la multiplicación de un virus en cultivos celulares.

La caracterización a nivel bioquímico y genético abarca el estudio de la composición, función y organización de los principales componentes del virus: ácido nucleico y proteínas y la participación de los mismos en la estrategia de replicación viral.

Por último, la investigación de los parámetros fisicoquímicos apunta a la dilucidación de la estructura de los

distintos componentes del virus y de los factores que determinan su ordenamiento y distribución espacial en el virión.

Estos tres niveles están conectados entre sí, de forma que las variaciones detectadas en uno de ellos son una causa o un efecto de alteraciones en los otros dos. En los últimos años se han investigado este tipo de relaciones, fundamentalmente con el objeto de conocer las bases moleculares en las que se sustenta un determinado comportamiento biológico, completando de esta forma los estudios descriptivos de la patogenia viral.

b) Las mutantes virales como resultado de la variabilidad genética.

El fenotipo de un virus, definido de acuerdo a los tres niveles mencionados, está sujeto a cambios que ocurren con mayor o menor frecuencia. Estas modificaciones, que pueden producirse ya sea sobre el virus en su fase extracelular (viriones) o durante la replicación del mismo, se deben a mutaciones, espontáneas o inducidas. La consecuencia directa del proceso de mutación es el aumento en la variabilidad genética de la población viral.

Las mutaciones espontáneas son más frecuentes entre los virus con ARN como material genético respecto de aquellos con ADN, debido probablemente a que el sistema replicativo del ARN carece de enzimas correctoras y por lo tanto la probabilidad de que surjan errores durante dicho proceso aumenta. La inducción de mutaciones se emplea cuando se desea aumentar la frecuencia de variabilidad natural mediante el uso de agentes mutágenos.

No solamente las mutaciones contribuyen al aumento en la heterogeneidad de la población viral. En el caso de los virus con genomas fragmentados, el rearrreglo de los trozos de material genético es un proceso muy frecuente que conduce a la variabilidad, también puede ocurrir recombinación intramolecular en virus con genomas no fragmentados.

Los cambios en las propiedades del virus, que ocurren

durante una infección, dan lugar a la aparición de progenie con características distintivas respecto del virus original, el cual se conoce como virus parental o salvaje. El aislamiento de las nuevas poblaciones se realiza aplicando una presión de selección sobre un aspecto definido del comportamiento biológico, obteniéndose de esta manera cepas, tipos, mutantes o variantes virales que difieren del virus parental.

Si bien las mutantes pueden aislarse a partir de infecciones tanto in vitro como in vivo, la caracterización de las mismas se realiza frecuentemente de acuerdo a las propiedades ensayadas en cultivos celulares. Es así que han podido definirse algunos fenotipos característicos, siendo los más estudiados las mutantes de morfología de placa (según la citopatogenicidad en un determinado sustrato celular), las mutantes de rango de hospedador (según la capacidad de multiplicación de acuerdo al origen de las células del cultivo), las mutantes termosensibles o frías (de acuerdo a la incapacidad de multiplicar a determinada temperatura) y las mutantes de delección (según la necesidad de un virus "helper" para poder replicar).

c) Empleo de mutantes en los estudios de patogenicidad y virulencia.

Las clases de mutantes antes mencionadas pueden presentar combinación entre los distintos fenotipos descriptos y además exhibir un comportamiento in vivo particular, manifestando una alteración respecto de la cepa salvaje en sus propiedades de patogenicidad y virulencia.

La patogenicidad de un virus se define a través de la capacidad que el mismo posee para causar, en el hospedador infectado, un cuadro clínico particular que puede llevar a la enfermedad o muerte del animal. La severidad de la patología producida se correlaciona con el grado de virulencia del agente. Cuando la infección resulta subclínica o inaparente, es decir asintomática, se dice que el virus resulta no patógeno o

avirulento. Del mismo modo, cuando se estudian las infecciones in vitro, puede ocurrir que el virus replique sin producir alteraciones visibles en las células o que, por el contrario, ocasione un daño celular evidente conocido como efecto citopático o acción citopatogénica (ACP).

Los estudios de la patogénesis viral se inician a partir del momento en que el virus ingresa al organismo. Las vías naturales de entrada más frecuentes se ubican a lo largo del tracto gastrointestinal y del aparato respiratorio e incluso, en ciertos casos, las mucosas que revisten estos sistemas resultan el sitio de multiplicación viral. Este evento, en otras ocasiones, no sucede sino hasta que el virus, luego de atravesar las mucosas, llega, de acuerdo a su tropismo, al tejido u órgano blanco donde es capaz de replicar. Desde allí puede luego dispersarse, vía sistema circulatorio hacia el resto del organismo. A su vez, el hospedador responde a este proceso montando los mecanismos de defensa a través del sistema inmune. Esta respuesta también se da en las infecciones inaparentes y es un claro indicio de que el hospedador ha estado en contacto con determinado virus a pesar de no haber presentado signos de morbimortalidad. De esta forma la infección se circunscribe, el virus se elimina y el animal se recupera. Sin embargo puede suceder que, ya sea por fallas en el sistema inmune o como una consecuencia natural de la infección, el virus no desaparezca del organismo, pudiéndoselo aislar en forma continua o discontinua en las infecciones persistentes.

Surgen entonces de lo expuesto tres aspectos claves en la determinación de la patogenicidad: el tropismo viral, la capacidad de crecimiento del virus una vez que llegó al sitio de replicación y la interacción del mismo con el sistema inmune. La aplicación de mutantes virales al estudio de estos aspectos permitió conocer la función de los distintos componentes del virus responsables de los mecanismos que llevan a la patogénesis.

Usualmente, como primer paso en este tipo de

investigaciones, se trata de correlacionar la patogenicidad in vivo con el comportamiento del virus en un sistema celular in vitro. Así ha sido posible demostrar la asociación entre el fenotipo ts de ciertas mutantes con su atenuación en virulencia (11,48,64,83,95), como así también la correlación entre el rango de hospedador in vitro y la patogenicidad in vivo (6,36,97,105).

Como paso siguiente, se procede a identificar las alteraciones moleculares o bioquímicas, que pudieran ser las responsables del comportamiento biológico particular de la mutante. Las modificaciones en el genoma pueden conducir a un producto génico alterado o, si se producen en regiones no codificantes, pueden afectar los procesos de replicación o transcripción del ácido nucleico.

El hecho de que muchas variantes atenuadas se comporten en forma diferencial, respecto del virus parental, en ensayos de neutralización con inmunosueros específicos o anticuerpos monoclonales, indica que entre las proteínas de ambos virus existen diferencias estructurales (78,101,102). Estas diferencias, debidas a las proteínas externas del virión responsables de la inducción de los anticuerpos neutralizantes, son sumamente importantes en la determinación de la patogenicidad, tanto para virus envueltos como desnudos.

En el caso de los virus con envoltura, el rango de alteraciones detectadas dentro de los togavirus entre cepas atenuadas y virulentas abarca desde variaciones en el número y PM de las glicoproteínas de superficie (120) hasta cambios leves en las propiedades bioquímicas de las mismas (43) e incluso sustituciones de un único aminoácido en su estructura (41).

Dentro de los virus desnudos, en el caso de los reovirus se logró identificar a un determinado gen y a su producto como responsables de un fenotipo atenuado, definido ya sea por un tropismo viral alterado o por un crecimiento restringido en el órgano blanco (47). En virus Polio, mediante estudios de secuenciación, no solamente se comprobaron diferencias en los

genes correspondientes a proteínas de la cápside de cepas vacunales y virulentas, sino que además se consiguió demostrar que el cambio de un solo nucleótido en una región no codificante del genoma es capaz de alterar el neurotropismo viral (44,71).

La actividad diferencial de ciertas enzimas virales como ADN polimerasa y timidina quinasa también está involucrada en muchos ejemplos de variantes atenuadas, como en el caso del virus Herpes simplex (45,46). Del mismo modo, en virus Polio se comprobó que la eficiencia en la traducción in vitro del mRNA viral de cepas patógenas y atenuadas se correlaciona con el grado de virulencia de las mismas (103).

Por último, quedan por mencionar las mutantes de delección, que surgen espontáneamente durante el transcurso de las infecciones, tanto in vitro como in vivo. Conocidas con el nombre de partículas defectivas interferentes (DI), son capaces de modular los niveles de infectividad por competencia con el virus salvaje, hecho que determinaría la evolución de la infección (26,60).

Todos estos estudios apuntan fundamentalmente a la comprensión de los mecanismos subyacentes a la patogénesis viral, ya que el conocimiento de las bases moleculares de la virulencia resulta imprescindible en la prevención y tratamiento de las enfermedades causadas por virus. Los avances en el desarrollo de vacunas, en cuanto a su seguridad y efectividad, así como los éxitos obtenidos en las terapias antivirales dependen directamente de los resultados surgidos de los estudios acerca de la estructura viral y su antigenicidad y de la virulencia y las bases genéticas que la sustentan.

II) VIRUS JUNIN.

a) La familia Arenaviridae.

La familia Arenaviridae agrupa una serie de virus envueltos, con genoma de ARN simple cadena y con morfología característica

debido a la presencia de ribosomas celulares en el interior de los viriones. Entre los mismos se incluye al virus Junín (VJ), agente etiológico de la enfermedad denominada fiebre hemorrágica argentina (FHA), también conocida como "mal de los rastrojos".

Los miembros de esta familia pueden clasificarse de acuerdo a sus propiedades antigénicas en dos grandes grupos: arenavirus del viejo mundo y del complejo Tacaribe. Dentro de los primeros, se encuentra la especie tipo: el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), de amplia distribución geográfica, al que se suman los virus africanos Lassa, Mobala y Mopeia. El complejo Tacaribe abarca nueve especies de virus americanos: Tacaribe, Machupo, Junín, Amaparí, Pichindé, Paraná, Tamiami, Flexal y Latino.

El genoma de los arenavirus está formado por dos fragmentos de ARN que se denominan, según su tamaño, L (large) de $2-3 \cdot 10^6$ Da (33 S) y S (small) de $1,3 \cdot 10^6$ Da (25 S) (13,110).

De acuerdo a la especie, los viriones purificados pueden presentar dos o tres proteínas estructurales mayoritarias: una nucleoproteína de 60-68 KDa (NP) y una (Tacaribe y Tamiami) o dos (LCMV, VJ, Lassa y Pichindé) glicoproteínas de envoltura de 44-64 KDa (GP1) y de 35-41 KDa (GP2) (19). Entre las minoritarias aparece una proteína de 180-200 KDa, que podría ser la replicasa-transcriptasa (L) y otras de bajo PM, producto de la degradación de NP. En lisados de células infectadas, además de las proteínas nombradas, aparece una glicoproteína de 66-72 KDa (GPC) que es el precursor de las proteínas de envoltura (19).

En el interior de los viriones, NP y L se encontrarían asociadas con los fragmentos de ARN formando dos nucleocápsides helicoidales, mientras que en la envoltura se ubican GP1 y GP2. En el caso de VJ y LCMV, sólo una de las glicoproteínas parece estar expuesta en la superficie (18,69).

La expresión del genoma que lleva a la síntesis de las proteínas mencionadas ocurre de forma particular, encontrándose para los virus Lassa, Pichindé, Tacaribe y LCMV una codificación

"ambisense" de los genes de NP y GPC ubicados en el segmento S (7,8,49,100). Resultados similares se encontraron para el segmento L, donde se ubican los genes para la replicasa-transcriptasa y para una proteína de función desconocida con estructura "zinc-finger" (57,94).

En cuanto a las propiedades biológicas, los arenavirus se caracterizan por producir infecciones persistentes, tanto en roedores, que son sus hospedadores naturales, como en cultivos celulares (56). Entre los virus patógenos humanos, además de VJ, se encuentran: LCMV, que produce infecciones leves, Machupo, agente etiológico de la fiebre hemorrágica boliviana y Lassa, causante de una enfermedad febril con alta mortalidad (112).

b) Biología del virus Junín.

1) Infecciones in vitro:

El VJ es capaz de crecer in vitro en una amplia variedad de sustratos celulares, ya sea en cultivos primarios o en líneas continuas (33). Sin embargo, sólo se observa ACP durante la replicación del virus en células Vero y MRC5. En ambas líneas se han desarrollado métodos de titulación por formación de placas que permiten su cuantificación (38,114).

La citopatogenicidad en células Vero ocurre durante los primeros estadios de la infección, definiendo lo que se conoce como etapa aguda de la misma, en donde los niveles de multiplicación viral son máximos. A partir de los diez días post-infección, las células sobrevivientes a la acción viral comienzan a repoblar el cultivo estableciéndose un equilibrio entre el virus y la célula, que da origen a lo que se conoce como etapa persistente.

Las monocapas celulares persistentemente infectadas se caracterizan por ser morfológicamente indistinguibles de los cultivos sanos, producir virus en forma esporádica y ser resistentes a la sobreinfección con virus homólogo. A partir de estos cultivos es posible el aislamiento de variantes virales,

cuya existencia se postula como una condición necesaria en el establecimiento y mantenimiento de este tipo de infecciones (118).

2) Infecciones in vivo:

El estudio de la fisiopatología y tratamiento de la FHA llevó a la búsqueda de modelos de infección experimental en animales, de forma tal de poder reproducir en los mismos una patología asimilable a la que aparece en humanos. Así se comprobó que el VJ es capaz de infectar experimentalmente una gran variedad de animales, tanto de laboratorio (cobayo, ratón, rata y hamster) como salvajes (primates y roedores campestres)(118). Los dos primeros sistemas mencionados, cobayo y ratón, han sido los más utilizados y mejor caracterizados.

a) Cobayo:

La inoculación del cobayo con VJ constituye uno de los modelos más estudiados de infección experimental debido a que el cuadro clínico que reproduce este hospedador es semejante al humano. Es también sumamente útil como marcador de virulencia en la diferenciación de cepas virales de acuerdo con la patogenicidad que las mismas presenten para el hombre.

Los animales inoculados con la cepa XJ (prototipo de VJ) desarrollan una enfermedad fatal, de tipo hemorrágica y con alta mortalidad, independientemente de la vía utilizada (80).

Durante la infección es posible recuperar infectividad de la mayoría de los órganos, observándose en ellos lesiones y petequias, como causa directa de la acción deletérea del virus sobre las células (25).

Si se utiliza la cepa XJC13 o la cepa Candidi, ambas derivadas a partir de la cepa XJ (10,54), el curso de la enfermedad es más benigno y la mortalidad se reduce significativamente (9,54). Los animales sobrevivientes desarrollan anticuerpos neutralizantes que los protegen contra el

desafío con la cepa prototipo (14).

En la infección del cobayo con la cepa XJ se propone como causa de la patología a la destrucción de los tejidos infectados por acción directa del virus sobre las células, descartando la participación del sistema inmune, ya que no aparecen infiltrados linfocíticos en las lesiones (25), ni el tratamiento con suero antitímocito logra modificar el curso de la enfermedad (74).

b) Ratón:

La patogenicidad del VJ en este hospedador depende de la edad y cepa de animales ensayados, de la dosis y cepa de virus y de la vía de inoculación utilizada.

Los ratones de 1 a 10 días de edad son sumamente susceptibles a la infección por vía i.c. con cualesquiera de las cepas de VJ alcanzando una mortalidad cercana al 100% (16,50). Los animales inoculados antes de las 24 horas de edad presentan una sobrevida mayor, desarrollando luego una infección persistente (118). Este hecho depende de la cepa de virus empleada y se correlaciona con la capacidad de infección del timo que presente la misma (20).

A medida que aumenta la edad de los ratones al momento de la inoculación, se va perdiendo la sensibilidad al VJ, hecho que se comprueba con animales de 1 mes de vida que resultan totalmente resistentes a la infección (117). Para la cepa de ratones C3H/HeJ el límite de susceptibilidad se sitúa en los 5 meses de edad cuando se inocula con la cepa XJ, ya que si se utiliza XJC13 los animales adquieren la resistencia al mes de vida, tal como ocurre con el resto de las cepas murinas (21).

La pérdida de susceptibilidad con el aumento de edad de los ratones hace posible el empleo de este modelo en la diferenciación de cepas de VJ de acuerdo con la virulencia para cobayo que presenten las mismas. Es así que la infección de ratones de 11 días de edad permite diferenciar cepas con distinto grado de atenuación (31) o cepas crecidas en distintos sustratos

(23), mientras que los animales de 14 días se utilizan para discriminar entre cepas patógenas y atenuadas (30).

La inoculación por vía i.p. no se emplea con frecuencia debido a que la mortalidad que se alcanza no supera el 60-70%, valor que decrece rápidamente cuando los animales cumplen los 3-4 días de vida (16).

El ratón lactante inoculado con VJ presenta durante la segunda semana p.i. un cuadro clínico típico caracterizado por dificultad en la marcha, excitabilidad acentuada, convulsiones y, en algunos casos, parálisis flácida del tren posterior, sobreviniendo la muerte al comienzo de la tercera semana (117).

En los pocos ratones sobrevivientes a la infección se detectan anticuerpos neutralizantes a partir de la tercera semana p.i. (76). Acompaña esta patología la aparición de virus en los distintos órganos. En el caso de la infección i.c. se comienza a detectar infectividad en el cerebro de los animales al segundo día p.i. apareciendo luego en bazo, hígado, riñones, pulmones y sangre, donde también se detecta la presencia de niveles bajos de interferón (50). El interferón presente no tendría significancia en el curso de la enfermedad ya que aparece tanto en animales lactantes (susceptibles) como adultos (resistentes) (117). Al tiempo que aparecen altos títulos de virus en cerebro se producen lesiones típicas en el sistema nervioso central: coroiditis, meningitis, hiperplasia glial, vasculitis y perivasculitis caracterizadas por infiltrados inflamatorios de tipo linfocitario (116).

Estas observaciones sugieren que la patología producida en los ratones experimentalmente infectados con VJ no es una consecuencia de la acción directa del virus sino que surge a causa de la destrucción de células infectadas por parte del sistema inmune. La sobrevivencia de ratones infectados y tratados con suero antitímocito (75,104) o de ratones timentomizados o genéticamente atímicos (98,115,119) avalan esta hipótesis. Estos animales que no desarrollan enfermedad alguna tampoco presentan

las lesiones típicas en el sistema nervioso central, demostrando entonces que la infección de ratones lactantes con VJ lleva a una inmunopatología del tipo de hipersensibilidad retardada.

III) VARIACION GENETICA EN ARENAVIRUS.

a) Variantes virales obtenidas por rearreglo genómico.

En el curso de los estudios genéticos realizados con arenavirus, los primeros trabajos demostraron la capacidad que poseen estos virus de generar variantes virales por intercambio de los fragmentos de ARN genómicos cuando dos cepas coinfectan una célula. Utilizando esta metodología han podido mapearse los genes virales dentro de los segmentos del ARN genómico, estableciéndose que en el segmento S está codificada la información para la síntesis de las proteínas mayoritarias del virión (NP, GP1 y GP2) (109), confirmado posteriormente por secuenciación del mismo (13).

También ha podido determinarse que el segmento S de LCMV está involucrado en el desarrollo de una patología característica en el ratón debida a una producción deficiente de hormona de crecimiento (89), como así también en la inducción y activación de linfocitos T citotóxicos específicos contra el virus (90) y en la supresión de dicha respuesta durante la persistencia (93).

Por su parte, el segmento L de LCMV estaría implicado en la virulencia para cobayo (88).

b) Mutantes espontáneas.

Como se mencionó anteriormente, una de las características biológicas más importantes de los arenavirus es la de producir infecciones persistentes. Durante este proceso es posible detectar la aparición de mutantes o variantes virales que se producen espontáneamente durante la replicación del virus. La aparición de estas variantes durante la persistencia, tanto in

vivo como in vitro, ha sido postulada como un mecanismo regulador de la patogenicidad o citopatogenicidad respectivamente, tendiente a favorecer este tipo de infecciones.

a) In vitro:

Entre los mecanismos reguladores de la citopatogenicidad se destaca la presencia de partículas defectivas interferentes. En cultivos persistentemente infectados con LCMV se ha detectado la producción de partículas DI cuyo nivel sigue un patrón cíclico y alternado con la producción de virus salvaje (113). La importancia de la presencia de este tipo de mutantes en el establecimiento de las infecciones persistentes ha sido demostrada tanto para el caso anterior (58) como para el virus Tacaribe (37). Para este último también resultó posible el aislamiento, a partir de cultivos persistentemente infectados, de mutantes ts y de crecimiento lento (37). Del mismo modo, virus con fenotipo ts aparecieron durante la persistencia de VJ en células Vero y MRC5, acompañados, en estas últimas, de mutantes de morfología de placa (39,114).

b) In vivo:

Los primeros estudios de persistencia de LCMV en ratón demostraron una asociación entre las características del virus utilizado en la inoculación, particularmente en cuanto a su morfología de placa en células BHK-21, y su habilidad para producir persistencia en dicho hospedador (55). Estudios posteriores determinaron que los órganos del animal jugaban un papel fundamental en la selección de los distintos tipos de variantes, encontrándose que la replicación de las variantes de placa lítica se favorecía en cerebro y las de placa turbia en bazo (82). Recientemente, un nuevo enfoque en el análisis de la variabilidad viral permitió la caracterización de mutantes aisladas a partir de tejido linfoideo, comprobándose que dichos aislamientos, a diferencia de las variantes descriptas

previamente (81), eran incapaces de generar una respuesta de linfocitos T citotóxicos, estableciendo en consecuencia infecciones persistentes con suma facilidad (1,2).

La inoculación experimental del Calomys musculinus con VJ conduce a infecciones persistentes con facilidad (65,111). Durante dicho estadio también fue posible el aislamiento de variantes virales. En C.m. lactantes infectados con la cepa XJC13 por vía i.p. fue posible detectar en forma simultánea la presencia de altos títulos de virus en cerebro y de anticuerpos neutralizantes en circulación, lo que permitió postular un cambio en las propiedades antigénicas del virus aislado que le permitiera eludir la respuesta inmune (4). Las variantes antigénicas, aisladas a partir de cerebro o sangre de C.m. persistentemente infectados con VJ, resultaron resistentes a la neutralización frente a un antisuero contra el virus que inició la infección, mientras que los sueros obtenidos contra las variantes sí fueron capaces de reconocer al virus original. Por otro lado, las variantes no pudieron distinguirse del virus parental en cuanto a su morfología de placa, termosensibilidad o patogenicidad (5).

Estos resultados demuestran que los fenotipos mutantes de los virus aislados durante la persistencia in vivo se caracterizaron por presentar cambios en el tropismo y por interactuar en forma alterada con el sistema inmune, modificando de esta forma dos aspectos esenciales en los que se sustentan los mecanismos de la patogénesis viral.

c) Mutantes inducidas.

La mutagénesis inducida, mediante el empleo de 5-fluoruracilo como mutágeno, posibilitó la obtención de mutantes letales condicionales seleccionados en base a su fenotipo termosensible (ts) para los virus LCMV (91), Pichindé (108) y Junín (27).

La caracterización bioquímica de las mutantes ts de estos

dos últimos virus evidenció similitudes de comportamiento entre las mismas. Cuando se estudió la síntesis de proteínas de las mutantes ts de Pichindé a la temperatura restrictiva, pudieron identificarse varios patrones polipeptídicos, que incluyeron tanto esquemas similares al virus salvaje como síntesis reducida de proteínas virales o desaparición de ciertas bandas con acumulación de otras. Aquellas mutantes que fueron deficientes en la síntesis proteica también presentaron niveles reducidos de S ARN, ya sea de sentido viral como viral complementario, lo que sugirió una alteración a nivel de la actividad de la replicasa-transcriptasa viral (99). En el caso del VJ, se aislaron, a partir de la cepa XJC13, dos mutantes ts denominadas C132 y C140 (27). Mediante experimentos de "shift up" y "shift down" (cambios de temperatura permisiva a restrictiva o viceversa, respectivamente, durante la replicación viral) se ubicó al defecto ts en una etapa temprana del ciclo de multiplicación (a partir de las 2 h p.i.), posiblemente asociada con el comienzo de la transcripción (28). Asimismo, la síntesis de proteínas virales en células infectadas con estas mutantes, a la temperatura restrictiva, fue muy reducida y similar a uno de los patrones de las mutantes de Pichindé para el que también se postuló una actividad de transcriptasa alterada (99).

Tanto las mutantes de Pichindé como las de VJ presentaron eficiencias de plaqueo 40°C/37°C relativamente altas, indicando que eran capaces de crecer a la temperatura restrictiva y condicionando de esta manera su aplicación como mutantes ts. Este impedimento, en el caso de VJ, hizo enfocar los estudios de estas mutantes desde el punto de vista de la patogenicidad de las mismas para el ratón lactante, ya que durante su caracterización preliminar habían resultado atenuadas para dicho hospedador, pudiéndose comprobar en una de ellas la correlación entre atenuación y termosensibilidad (28). En una segunda selección de mutantes inducidas por 5-FU a partir de XJC13, se aisló otra mutante de VJ denominada C167. A pesar de haber sido seleccionada

- Introducción-

originalmente en base a su carácter ts, la propiedad más peculiar y distintiva que presentó dicha mutante fue su gran atenuación para ratón lactante. Debido a que el fenotipo ts de Cl67 resultó ser de carácter "leaky" (es decir que fue capaz de replicar relativamente bien a la temperatura restrictiva) y muy poco estable se descartó su uso como mutante ts enfocándose los estudios desde el punto de vista de su patogenicidad para ratón y las bases moleculares de dicho comportamiento. La caracterización de esta mutante y las causas de su virulencia diferencial respecto de XJCl3 son el objeto de estudio de esta tesis.

M A T E R I A L E S Y

M E T O D O S

Virus:

a) Junín (VJ).

C167: variante derivada a partir de la cepa parental XJC13 por mutagénesis inducida de la misma con 5-fluoruracilo (27). Monocapas de células Vero se infectaron con XJC13 a una m.i. de 0,1 UFP/cél y se mantuvieron a 34°C por 24 h en MBE con el agregado de 100 µg/ml de 5-FU (solución madre de 5-FU Sigma-USA de 50 mg/ml en NaOH 1N) tratamiento que redujo la infectividad en un 99% respecto de un control sin el mutágeno. De la población viral sometida al tratamiento se aislaron 90 clones que se titularon a 40°C (temperatura restrictiva, Tr) y a 34°C (temperatura permisiva, Tp), pudiéndose identificar a 6 de ellos como probables mutantes ts (eficiencia de plaqueo Tr/Tp < 1/100). Luego de la amplificación en células Vero se confirmó la naturaleza ts de 2 de estos aislamientos: C132 y C140. En una segunda titulación a Tr y Tp se seleccionó a la denominada C167. Esta última se purificó por 3 plaqueos en células Vero obteniéndose el stock de trabajo en el mismo sustrato con un título de 3.10⁶ UFP/ml.

El fenotipo ts de C167 se caracterizó por presentar una eficiencia de plaqueo relativamente alta y un comportamiento "leaky" muy marcado (Tabla 1), imposibilitándose en consecuencia su empleo como mutante ts.

Virus	Eficiencia de plaqueo Tr/Tp	Eficiencia de multiplicación Tr/Tp	
		5 p. i.	7 p. i.
XJC13	0,16	0,50	0,14
C167	0,04	0,01	0,16

Tabla 1. Eficiencia de titulación y multiplicación de C167.

La eficiencia de plaqueo se calculó como el cociente entre el título viral por UFP en células Vero incubadas a 40°C (Tr) respecto del obtenido a 37°C (Tp). Para calcular la eficiencia de multiplicación se infectaron cultivos de células Vero con XJC13 o C167 a una m.i. de 0,01 UFP/cél y se mantuvieron a 40°C (Tr) o 37°C (Tp). A los 5 y 7 días p.i. se cosecharon los sobrenadantes que se titularon por UFP en células Vero, expresándose la eficiencia de multiplicación como el cociente entre la producción viral a Tr respecto de Tp.

XJC13: derivada a partir de la cepa prototipo XJ de VJ por clonado en células MA-111 (54) y mantenida en el laboratorio por pasajes en cerebro de ratón lactante. El stock de trabajo se obtuvo a partir de las suspensiones de cerebro por clonado y amplificación del virus en células Vero lográndose un título de $1,5 \cdot 10^6$ UFP/ml.

b) Virus de la estomatitis vesicular (VSV).

Cepa Indiana, propagada en células Vero. El stock de trabajo presentó un título de 10^7 UFP/ml.

Animales:

a) Ratones: se utilizó una cepa de ratones de exocria, OF1, y dos cepas endocriadas, BALB/cJ y C3H/HeJ. La cepa OF1 (Iffa, Credo, Lyon, Francia) se obtuvo de la colonia cerrada del bioterio de la Cátedra de Virología, Fac. Cs. Exactas y Nat., UBA. La cepa BALB/cJ (Jackson Inst., USA) se obtuvo del Bioterio Central de la Fac. Cs. Exactas y Nat., UBA. La cepa C3H/HeJ (Jackson Inst., USA) se obtuvo del bioterio de la Cátedra de Microbiología de la Fac. Medicina, UBA.

b) Cricétidos: se utilizó el ratón de campo Calomys musculinus (C.m.). Los animales se obtuvieron de la colonia cerrada del bioterio de la Cátedra de Virología de la Fac. Cs. Exactas y Nat., UBA.

c) Cobayos: se emplearon animales de exocria de 250-300 g. de peso obtenidos del Bioterio Central de la Fac. Cs. Exactas y Nat., UBA.

Células:

a) Vero: los cultivos de células Vero, provenientes de riñón de mono verde africano Cercopithecus aethiops, se propagaron en monocapas a 37°C utilizando medio mínimo esencial de Eagle (MEM) en solución salina balanceada de Earle, con glutamina y aminoácidos no esenciales (medio sintético GIBCO), suplementado con 5% de suero de ternera (ST) GIBCO previamente inactivado durante 30 minutos a 56°C y adicionado de 50 µg/ml de gentamicina. Cuando las células alcanzaban la confluencia se las mantenía a 33°C con medio basal de Eagle (MBE) en solución salina balanceada de Earle, con glutamina (medio sintético GIBCO), suplementado con 2% ST GIBCO y 50 µg/ml de gentamicina.

b) L929: los cultivos de células L929, provenientes de fibroblastos de ratón, se crecieron en las mismas condiciones que las células Vero.

- Materiales y métodos-

c) BHK-21: los cultivos de células BHK-21, provenientes de riñón de hamster neonato, se crecieron en las mismas condiciones que las células Vero.

d) Cultivos primarios de embrión de ratón o de embrión de C.m.: la obtención de cultivos primarios de embrión de ratón (ER) de la cepa OF1 y de embrión de C.m. (EC) se realizó a partir de fetos de 15 a 18 días de gestación. Luego de ser extraídos del útero materno se lavaron con solución balanceada de fosfatos, PBS (NaCl 8,0 g, KCl 0,2 g, KH₂PO₄ 0,2 g, Na₂HPO₄ 1,44 g y H₂O c.s.p. 1000 ml), cortándose las placentas, cabezas y patas que se descartaron. De los cuerpos se eliminó el hígado fetal y se los cortó finamente con tijera. Los trozos se enjuagaron por decantación con PBS y se procedió a la disociación celular por el agregado de tripsina a 37°C. Luego de 15 minutos de tratamiento enzimático se decantó la suspensión y las células desprendidas se cosecharon por centrifugación, se resuspendieron en MEM 10% ST, se sembraron a alta densidad y se incubaron a 37°C.

e) Cultivos primarios de riñón de C.m. adulto: los cultivos primarios de riñón de C.m. (RC) se obtuvieron a partir de animales de 6 meses de edad. Para ello, los riñones se lavaron con PBS, se cortaron finamente con tijera, las células se disociaron por tratamiento con tripsina y se sembraron en un procedimiento similar al descripto anteriormente.

f) Cultivos primarios de cerebro de ratón lactante: los cultivos primarios de cerebro de ratón lactante (CR) se obtuvieron a partir de cerebros de ratones OF1 de 5 a 6 días de edad, los que fueron macerados en un mortero y resuspendidos en MEM 10% ST. Las células se dispersaron por pipeteo y se cultivaron en MEM con 10% de suero fetal bovino (SFB) GIBCO.

g) Cultivos de células peritoneales de ratón: el material utilizado en los cultivos de células peritoneales de ratón (CP) se obtuvo por lavado de la cavidad peritoneal de ratones OF1 de 2 días de edad o adultos con MEM 5% ST, cultivándolas en el mismo medio. En el caso de los animales lactantes el medio de lavado se adicionó con 0,02% de heparina para evitar que las células se agrumen.

Ensayos de infectividad:

a) Titulación en cultivo de células por unidades formadoras de placas (UFP): se utilizó el método de formación de placas bajo agar con las modificaciones correspondientes para VJ (38). Para ello, se infectaron monocapas de células Vero con diluciones seriadas decimales del virus, dejándose adsorber el inóculo por 1 h a 37°C. Al cabo de ese tiempo, se descartó el inóculo y las

monocapas se cubrieron con 3 ml de medio compuesto por una mezcla en partes iguales de agar 1,4% y MEM 2x (doble concentrado) 6% ST. Luego de 1 semana de incubación a 37°C las células se fijaron con formol 10% durante 1 h. Se extrajo el medio semisólido por lavado con agua y las células se tiñeron con cristal violeta 1% en etanol 10%. Se utilizaron dos botellas por dilución y los títulos se calcularon en base al promedio del número de placas de ambas botellas:

b) Titulación en cultivo de células por el método de punto final (ACP): células Vero crecidas en microplacas de plástico de 24 cavidades se inocularon con 0,1 ml de la suspensión viral por cuatriplicado. El inóculo se dejó adsorber por 1 h a 37°C y luego se descartó. Las células se mantuvieron con MBE 2% ST a la misma temperatura. Los cultivos se observaron a la lupa diariamente, efectuándose la lectura definitiva de la ACP a los 7 días p.i.. Se consideró como respuesta (+) aquella cavidad que presentaba por lo menos 1 foco de ACP. La dosis infectante 50% para cultivo de tejidos (DICT₅₀) se calculó de acuerdo al método de Reed y Muench (86).

c) Titulación en ratones por el método de punto final: ratones de 2 u 11 días de edad se inocularon por vía i.c. con 0,02 ml o por vía i.p. con 0,2 ml de diluciones seriadas al décimo de virus, utilizándose 9 animales por dilución. Los ratones se observaron durante 30 días p.i. registrándose diariamente la morbimortalidad. Como respuesta (+) se consideró la muerte del animal. La dosis letal 50% (DL₅₀) se calculó de acuerdo al método de Reed y Muench (86).

Curvas de crecimiento de XJC13 y C167 en cultivos celulares:

Monocapas de células Vero, ER, CR, EC, RC y CP se infectaron por duplicado con XJC13 o C167 a las m.i. indicadas para cada caso en las leyendas de las curvas presentadas en la sección "Resultados". Luego de 1 h de adsorción a 37°C se descartaron los inóculos y se agregó MBE 2% ST. Los cultivos infectados se incubaron a 37°C y a distintos días p.i. se cosecharon los sobrenadantes para su posterior titulación en células Vero.

Persistencia de XJC13 y C167 in vitro:

a) Células Vero: monocapas de células Vero se infectaron con XJC13 o C167 a una m.i. de 1 UFP/cél y se mantuvieron con MEM 2% ST a 37°C. El cambio del medio de cultivo se realizó cada 3 días hasta superar la etapa aguda de la infección (aprox. 3 semanas p.i.) y lograr la recuperación de la monocapa dañada por la acción citopatogénica del virus. Se continuó con cambios de medio

semanales hasta que a partir de los 46 días p.i. estos cultivos se manejaron como la línea celular que les dió origen. Los cultivos de células Vero persistentemente infectados con XJC13 o Cl67 se denominaron V3 y V7, respectivamente. Durante este proceso se cosecharon semanalmente los sobrenadantes de los cultivos y se titularon.

A los 150 días p.i. los cultivos V3 y V7 se sembraron en tubos de ensayo y se desafiaron con XJC13, Cl67 o VSV a una m.i. de 0,1 UFP/cél. A las 72 h de la sobreinfección se cosecharon los sobrenadantes y se titularon en células Vero. Como controles se utilizaron células Vero infectadas de la misma forma y cultivos V3 y V7 inoculados con PBS.

b) Cultivos de embrión de ratón: células ER se infectaron a una m.i. de 1 UFP/cél con XJC13 o Cl67 y se mantuvieron con MEM 5% ST a 37°C, cambiándoseles el medio cada 3 días hasta los 21 días p.i., momento a partir del cual se los comenzó a subcultivar mensualmente. Estos cultivos fueron denominados ER3 y ER7 de acuerdo a si habían sido infectados con la cepa parental o la mutante, respectivamente. Durante este lapso la infectividad de los sobrenadantes de ER3 y ER7 se cuantificó por UFP en células Vero.

A los 125 días p.i. ER3 y ER7 se sobreinfectaron con XJC13 o VSV a una m.i. de 1 UFP/cél cosechándose a los 5 días post-sobreinfección los sobrenadantes correspondientes para detectar infectividad. Como controles se utilizaron cultivos de embrión de ratón, con el mismo número de pasajes que los cultivos persistentemente infectados, que fueron infectados con cada uno de los virus y ER3 y ER7 inoculados con PBS.

c) Cultivos de embrión de C.m.: cultivos EC se infectaron con XJC13 o Cl67 a una m.i. de 1 UFP/cél y se mantuvieron y subcultivaron igual que los anteriores, cosechándose, a distintos momentos, los sobrenadantes para detectar infectividad. Los cultivos así obtenidos se denominaron EC3 y EC7 según provinieran de EC infectados con XJC13 o Cl67, respectivamente.

Ensayo de adsorción:

Monocapas de células Vero o ER se infectaron a una m.i. de 1 UFP/cél con XJC13 o Cl67. El inóculo se dejó adsorber a 4°C por distintos tiempos: 10, 20, 30 y 60 minutos. A cada uno de los tiempos indicados se descartó el virus no adsorbido y las células se lavaron con PBS frío, se agregó MEM 5% ST frío y la monocapa se despegó por raspado. Las células se rompieron por 3 congelamientos y descongelamientos sucesivos. Los restos celulares se separaron por centrifugación (15 min a 3000xg) y en el sobrenadante se cuantificó la cantidad de virus adsorbido por la técnica de UFP en células Vero.

Ensayo de unión de virus purificado y iodinado:

El virus purificado y marcado (ver Purificación y marcación de virus Junín por iodinación) se resuspendió en PBS y se utilizó para infectar monocapas de células Vero o ER crecidas en viales de aprox. 1 cm² de superficie y pre-enfriadas a 4°C. Los cultivos se inocularon con 50 µl de XJCl3 o Cl67 (aprox. 200000 cpm) dejándose adsorber por 0 o 30 min a 4°C. Luego de estos tiempos se descartaron los inóculos y las monocapas se lavaron 3 veces con PBS frío al cabo de lo cual las células se lisaron con una mezcla de NaOH 0,1M, SDS 1% durante 15 min. Al material así resuspendido se le agregó solución centelleadora (tritón X-100 30%, PPO 0,5% y POPOP 0,0001% en tolueno) y se procesó en un contador de centelleo líquido PRIAS (Packard).

Ensayo de penetración:

Monocapas de células Vero o ER se infectaron a una m.i. de 0,5 UFP/cél con XJCl3 o Cl67, dejándose adsorber por 1 h a 4°C. Se descartó el inóculo y los cultivos se lavaron con PBS frío. Se agregó MEM 5% ST precalentado a 37°C incubándose los cultivos otra hora a dicha temperatura. Cumplido el lapso, se agregó suero de cobayo anti-VJ para neutralizar al virus que no hubiera penetrado, prosiguiendo la incubación por 30 minutos. Se descartó el medio y las monocapas se lavaron 3 veces con PBS. Las células se desprendieron con tripsina y el virus internalizado se midió por un ensayo de centros infecciosos sobre células Vero.

Síntesis de proteínas virales en células Vero y en ER:

a) Marcación de las células e inmunoprecipitación de las proteínas virales: monocapas de células Vero y de ER se infectaron con XJCl3 o Cl67 a una m.i. de 1 UFP/cél. Se dejó adsorber 1 h a 37°C, se descartó el inóculo, se agregó MEM 2% ST y los cultivos se incubaron a 37°C. A 1, 2 y 3 días p.i. se descartó el sobrenadante y las células se lavaron con PBS, se agregó 1 ml de MBE con 2% ST dializado y sin metionina. Luego de un ayuno de 1 h se agregaron 50 µCi de ³⁵S-metionina (NEN, Dupont). Se continuó la incubación por espacio de 4 h, luego de la cual se descartó el sobrenadante, la monocapa se lavó con PBS y las células se lisaron utilizando buffer de lisis (Tris-HCl 0,01M pH 7,4, NaCl 0,15M, SDS 0,1%, tritón X-100 1%, fenil-metil-sulfonil fluoruro 0,4mM y deoxicolato de sodio 1%). La suspensión celular se congeló y descongeló 3 veces, se sonicó y se centrifugó 30 min a 10000xg. El sobrenadante se precipitó con suero hiperinmune de conejo anti-XJCl3, incubando 30 min a 37°C y

90 min a 0°C con agitación. Se agregó luego suero de cabra (fracción de Igs) anti-Igs de conejo y se incubó por 30 min a 37°C y luego 90 min a 0°C con agitación. Se centrifugó a 10000xg, lavándose el precipitado con buffer de lisis y finalmente se resuspendió en buffer para muestra de electroforesis (Tris-HCl 0,06M pH 6,8, SDS 5%, glicerol 10%, mercaptoetanol 2% y azul de bromofenol 0,05%). Se calentó en baño de agua a 100°C por 5 minutos y se conservó a -70°C.

b) Electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE): las proteínas virales marcadas con ³⁵S-metionina se sembraron en un gel plano de poliacrilamida 12% en Tris-HCl 0,375M pH 8,8 con agregado de SDS 0,1%, con un gel espaciador de poliacrilamida 3,8% en Tris-HCl 0,125M pH 6,8, SDS 0,1%. En el mismo gel se sembraron patrones de PM. Se corrió a 180 V durante 8 h usando como buffer de corrida Tris-HCl 0,05M pH 8,3, SDS 1% y glicina 0,005M. El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R.250 0,25% en metanol:agua:ácido acético (5:5:1) y se decoloró con metanol:agua:ácido acético (5:88:7).

c) Fluorografía: el gel desteñado se sometió a fluorografía de acuerdo a la técnica de Bonner y Laskey (15), se secó y se expuso a una película Agfa Curix RPI a -70°C.

Mapeo peptídico de las proteínas virales:

El mapeo peptídico de las proteínas virales se realizó mediante una proteólisis parcial según el método de Cleveland (29). Las proteínas virales provenientes de lisados de células Vero infectadas y marcadas con ³⁵S-metionina a los 2 días p.i. (100 µCi/ml), se inmunoprecipitaron y corrieron en geles de SDS-PAGE. La banda correspondiente a GP38 se cortó del gel seco localizándola previamente con ayuda de una autorradiografía del mismo. El pedazo del gel conteniendo la glicoproteína se sumergió en buffer de rehidratación (Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, SDS 0,1% y EDTA 0,001 M) colocándose luego en la calle de un gel SDS-PAGE 14%. Se lo cubrió con 15 µl del mismo buffer con seroalbúmina bovina (330 mg/ml) y 20% de glicerol. Sobre el mismo se colocaron 20 µl de una solución de 50 o 100 µg/ml de la proteasa correspondiente (ficina, papaína o proteasa XXIII de Aspergillus orizae, Sigma Chem Co USA) en buffer de rehidratación con 10% de glicerol y 0,0002% de azul de bromofenol. Se aplicó corriente eléctrica y las muestras se dejaron correr hasta la interfase entre el gel espaciador y el de resolución. Se detuvo la electroforesis dejándose al gel durante 30 min a temperatura ambiente para que se produzca la digestión parcial de la proteína, luego de lo cual se prosiguió la electroforesis hasta que el frente de corrida alcanzó el borde del gel. Los geles se procesaron para fluorografía.

Purificación y marcación de VJ por iodinación:

Monocapas de células Vero se infectaron con XJC13 o C167 a una m.i. de 0,1 UFP/cél. Se mantuvieron con MBE 2% ST incubándolas a 37°C. Los sobrenadantes se cosecharon entre los días 3 y 6 p.i. y se clarificaron a 10000xg durante 30 minutos para eliminar restos celulares. Luego se concentraron por ultracentrifugación a 100000xg por 2 h a 4°C. El sedimento de virus se resuspendió en buffer TES (Tris-HCl 0,01 M pH 7,2, EDTA 0,001 M y NaCl 0,1 M) usando 1/100 de volumen de buffer respecto del volumen inicial del material.

El virus resuspendido se sembró sobre un gradiente de sacarosa continuo 15-60% y se centrifugó por 2 h a 100000xg a 4°C. Las fracciones conteniendo virus fueron colectadas y concentradas nuevamente por ultracentrifugación, resuspendiendo el sedimento final en Na₂HPO₄ 0,2M. El virus así purificado se marcó con ¹²⁵I-NaI (CONEA) empleando la técnica de Enzymobeads (Bio-Rad, USA). Con esta metodología sólo se marcan proteínas externas del virión.

Análisis de GP38 marcada con ¹²⁵I:

El virus purificado y marcado según el punto anterior se resuspendió en buffer de muestra para electroforesis. Las proteínas virales se separaron por SDS-PAGE y se visualizaron por fluorografía (ver Síntesis de proteínas virales en células Vero y en ER).

Patogenicidad para ratón:

Lotes de 20 ratones se inocularon con 0,02 ml de suspensión viral de XJC13 o C167 por vía i.c., ensayándose las siguientes combinaciones de cepas murinas, edades y dosis, según los experimentos:

- 1) cepa OF1 de 2 días de edad con 10, 65, 100, 650 y 1000 UFP/dosis.
- 2) cepa OF1 de 7, 11, 14 y 30 días de edad con 1000 UFP/dosis.
- 3) cepas BALB/cJ o C3H/HeJ de 2 días de edad con 65 y 650 UFP/dosis.

En todos los casos, los animales se observaron durante 30 días p.i. registrando diariamente la morbimortalidad.

Multiplicación viral en ratón lactante:

Ratones de 2 días de edad se inocularon por vía i.c. con 100 o 650 UFP de XJC13 o C167 en el caso de la cepa OF1, o con 650 UFP en el caso de BALB/cJ y C3H/HeJ. A distintos días p.i. se escogieron al azar 2 animales infectados con cada uno de los virus, los cuales fueron sangrados a blanco y sacrificados, extrayéndoseles el cerebro, hígado, timo, bazo y riñones. La sangre se procesó para obtener suero, manteniéndola 30 minutos a 37°C y luego 12 h a 4°C después de lo cual el coágulo se separó por centrifugación, 30 minutos a 3000xg. Los órganos se homogeneizaron al 10% (P/V) con PBS 5% ST y las suspensiones así obtenidas se centrifugaron a 10000xg para eliminar restos celulares y bacterias. Los materiales se titularon por UFP en células Vero expresándose los títulos como UFP/g de órgano o UFP/ml suero.

Detección de interferón:

Las muestras de suero de ratones inoculados con XJC13 o C167 se diluyeron 1/5 con PBS y se acidificaron por adición de HCl 0,2 M hasta llegar a pH 2. Luego de dejarlas 10 min a temperatura ambiente se ajustó el pH a 7 por agregado de NaOH 0,2 M. Diluciones seriadas al 1/2 de los materiales así procesados se utilizaron para pretratar monocapas de células L929 crecidas en microplacas de 96 cavidades, empleándose 4 cavidades por dilución, durante 24 h. Pasado ese tiempo se descartó el sobrenadante y las monocapas se desafiaron con 100 UFP de VSV, manteniéndolas con MBE 3% ST e incubándolas a 37°C. A los 2 días p.i. se procedió a la lectura de la ACP en la microplaca. El título del IFN se calculó, de acuerdo al método de Reed y Muench (86), como la inversa de la máxima dilución de suero que confiere protección al 50% de las monocapas.

Protección de ratones experimentalmente infectados con C167 frente a la descarga con XJC13:

Grupos de entre 30 a 40 ratones lactantes OF1 de 1 día de edad se inocularon con 100 UFP de C167 o con PBS por vía i.c. o i.p.. A los 8 o a los 11 días de edad se desafiaron con 500 o 1500 UFP de XJC13 por vía i.c., inoculándose también grupos controles con PBS. Los animales se revisaron diariamente durante 1 mes luego del desafío registrándose la morbimortalidad.

Patogenicidad para C.m.:

Lotes de 10 cricétidos lactantes de 8 días de edad se inocularon con 650 UFP de XJC13 o C167 por vía i.c.. Los animales se observaron durante 30 días p.i. a fin de registrar la morbimortalidad.

Patogenicidad para cobayo adulto:

Lotes de 10 cobayos se inocularon con 1000 UFP (0,2 ml) de XJC13 o C167 por vía i.m. en la pata derecha. Los animales se observaron durante 30 días p.i. registrándose la morbimortalidad. A fin de obtener suero hiperinmune, a los 40 días p.i. se hizo una segunda inoculación con 1000 UFP de cada virus en las mismas condiciones. A la semana siguiente los animales se sangraron por punción cardíaca y la sangre se procesó para obtener el suero.

Ensayos de neutralización:

Se usó la técnica de virus constante-suero variable, para ello se enfrentaron 100 DICT₅₀ o 200 UFP con diluciones seriadas al medio de los sueros previamente de complementados 30 minutos a 56°C. Las mezclas se mantuvieron 1 h a 37°C cuantificándose la infectividad residual por el método de ACP o UFP, utilizando 4 tubos o 3 botellas por dilución, respectivamente. Los títulos se calcularon como la inversa de la mayor dilución que produce un 50% de protección.

R E S U L T A D O S

I) ESTUDIO DE LA PATOGENICIDAD DE C167 EN LA INFECCION EXPERIMENTAL DEL RATON.

Dentro de la gran variedad de modelos animales de infección experimental desarrollados para VJ, el ratón lactante es el hospedador más utilizado por la gran sensibilidad que presenta frente a todas las cepas de dicho virus.

Dado que experimentos preliminares habían sugerido que C167 presentaba una marcada atenuación para ratón lactante se decidió caracterizar el fenotipo de virulencia de la mutante, respecto de su cepa parental XJC13 en dicho modelo.

a) Análisis de la influencia de diversos parámetros sobre la virulencia de C167 en ratón:

1) Edad del animal:

Grupos de 20 ratones OF1 de 2, 7, 11, 14 y 30 días de edad se inocularon con 1000 UFP de cada virus por vía i.c., registrándose la mortalidad acumulada durante 30 días a partir de la infección. De estos grupos de animales, el correspondiente a los infectados a los 2 días de edad mostró una gran diferencia en mortalidad entre los inoculados con C167, que murieron en un 26% y aquellos infectados con la cepa parental que mató la totalidad de los ratones (Fig. 1). Esta diferencia se mantuvo para los ratones de 7 días de edad a pesar que la mortalidad, tanto para XJC13 (90%) como para C167 (6%) fue inferior a la registrada en el caso anterior (Fig. 1).

En los animales de 11 y 14 días de edad, C167 no produjo mortalidad, mientras que las muertes causadas por el virus parental oscilaron alrededor del 70 y 40% respectivamente (Fig. 1).

La pérdida de susceptibilidad característica que aparece en el ratón al incrementarse la edad en el momento de la inoculación

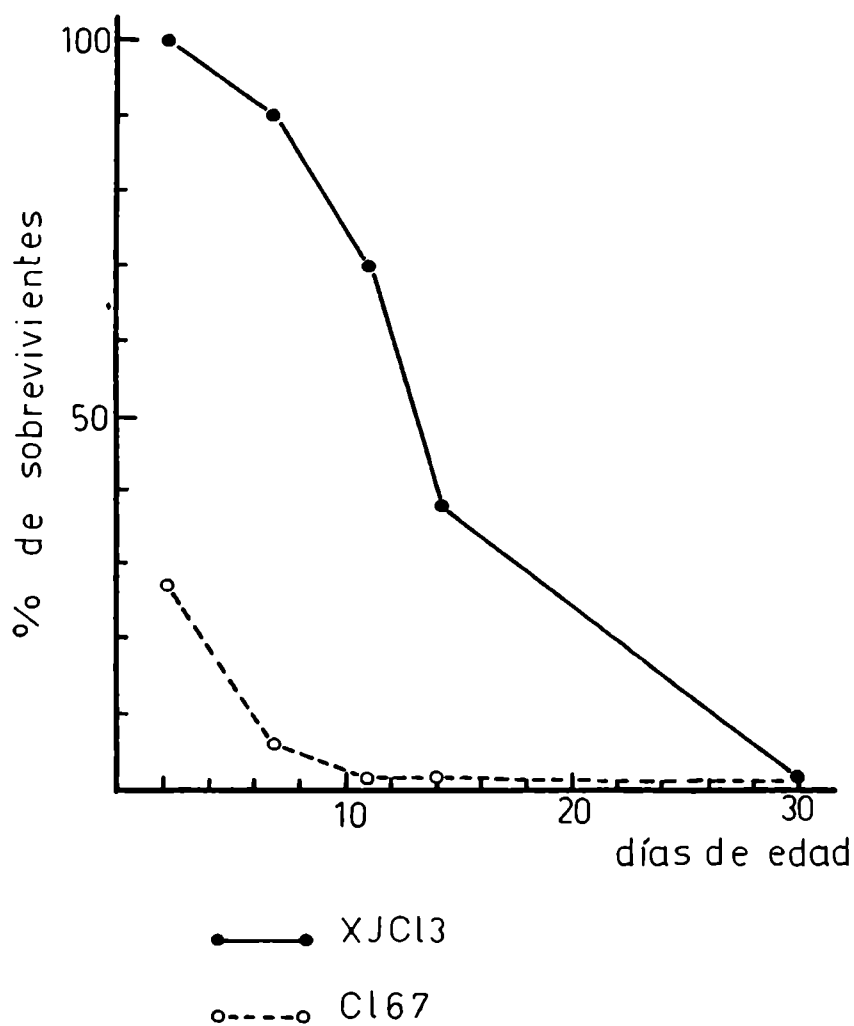


Figura 1. Susceptibilidad del ratón en función de la edad frente a la infección con XJCl3 o Cl67.

Ratones OF1 divididos en grupos de 20 animales de distintas edades se inocularon con 1000 UFP de XJCl3 o Cl67 por vía i.c. registrándose la mortalidad acumulada de cada lote durante 30 días p.i..

(16), se puso de manifiesto en los animales de 30 días que resultaron completamente resistentes a la inoculación con ambas cepas de VJ (Fig. 1).

La reducida patogenicidad de Cl67 para ratones de distintas edades se confirmó cuando los stocks de XJC13 y Cl67 se titularon en ratón OF1 de 2 y 11 días de edad por vía i.c.. Se eligieron estas edades para la titulación de ambos virus por ser los animales de 2 días los que presentaron la mayor susceptibilidad a las dos cepas y la máxima diferencia observable en el comportamiento de ambas (Fig. 1), en tanto que el ratón de 11 días de edad ha sido postulado como un marcador adecuado para diferenciar cepas de VJ de distinta virulencia (31). La titulación simultánea en animales y en células Vero permitió estimar la virulencia de la mutante a través del índice de atenuación (I.A.) que resulta de relacionar la infectividad viral cuantificada in vitro (cultivos celulares) respecto del valor obtenido in vivo (animales). Cuanto mayor sea este índice menos virulento será el virus en cuestión.

Para el ratón de 2 días de edad el I.A. (UFP/DL50) para Cl67 fue más de 2 log mayor que el correspondiente a la cepa parental (Tabla 2). Los pocos animales que murieron luego de ser inoculados con la mayor dosis de la mutante lo hicieron mostrando el cuadro clínico típico de la enfermedad (50,84). Para los animales de 11 días de edad, el I.A. aumentó para ambos virus, siendo el correspondiente a Cl67 sólo 10 veces mayor que el de XJC13 (Tabla 2).

Como se explicó anteriormente, esta pérdida de susceptibilidad del ratón se debe al aumento en edad al momento de inocular. Es por ello que si bien los ratones de 11 o más días de edad son totalmente resistentes a la infección con Cl67, también resultan menos sensibles a la inoculación con XJC13, lo que dificulta su empleo en los estudios comparativos de virulencia entre ambos virus, pues reducen las diferencias entre los mismos. Por lo tanto se eligió al ratón de 2 días de edad

Virus	Título			Indice de atenuación (I.A.) (UFP/DL50)	
	cél. Vero	ratón 2 ^d	ratón 11 ^d	ratón 2 ^d	ratón 11 ^d
	(UFP/ml)	(DL50/ml)	(DL50/ml)		
XJC13	1,3.10 ⁶	3.10 ⁵	5.10 ³	4,1	260
C167	5.10 ⁵	<2,3.10 ²	<1,6.10 ²	>2200	>3100

Tabla 2. Virulencia de XJC13 y C167 para ratón lactante. Los stocks de XJC13 y C167 se titularon en forma simultánea en células Vero y en ratones de 2 y 11 días de edad inoculados por vía i.c.. La virulencia se estimó a través del I.A. que se calcula como el cociente entre el título obtenido in vitro respecto del valor obtenido in vivo.

como modelo para continuar con los estudios de patogenicidad.

2) Vía de inoculación:

La reducida virulencia que Cl67 presentó para el ratón lactante de 2 días de edad infectado por vía i.c. podría señalarla como una variante viscerotrópica tal como ha sido descrito para algunos aislamientos del LCMV (55). Para comprobar esta posibilidad, se decidió introducir un cambio en la vía de inoculación del modelo anterior utilizando la vía i.p.. Se titularon entonces los stocks de XJC13 y Cl67 en ratones OF1 de 2 días de edad inoculados por vía i.p. y en forma simultánea en células Vero, a fin de poder calcular los I.A. correspondientes.

En los animales inoculados con Cl67 no se registró mortalidad ni aún en las diluciones más concentradas (10^4 UFP/dosis) calculándose un I.A. $>10^{4,5}$, mientras que para la cepa parental se obtuvo un I.A. $=10^{2,7}$. Estos resultados indican que el cambio en la vía de inoculación influye en la virulencia de ambos virus, ya que los I.A. tanto para XJC13 como para Cl67 en el caso de la vía i.p. fueron superiores a los calculados cuando se utilizó la vía i.c. (Tabla 2).

De esta manera pudo descartarse la posibilidad de que Cl67 fuera una variante viscerotrópica, ya que de haber sido así, la virulencia exhibida por una vía periférica, como es la i.p., debería haber sido mayor que la correspondiente a la vía i.c..

3) Dosis de virus:

La marcada atenuación de Cl67 para el ratón lactante también se comprobó cuando se estudió la influencia de la dosis de virus en dicho animal. Cuando distintos lotes de ratones OF1 de 2 días de edad se inocularon por vía i.c. con 10 o 100 UFP de XJC13 o Cl67, no se observó mortalidad en el caso de los animales infectados con la mutante mientras que para aquellos inoculados con el virus parental se registró una mortalidad del 45 y 100%, respectivamente (Fig. 2).

Cuando la dosis se aumentó a 1000 UFP, murieron todos los

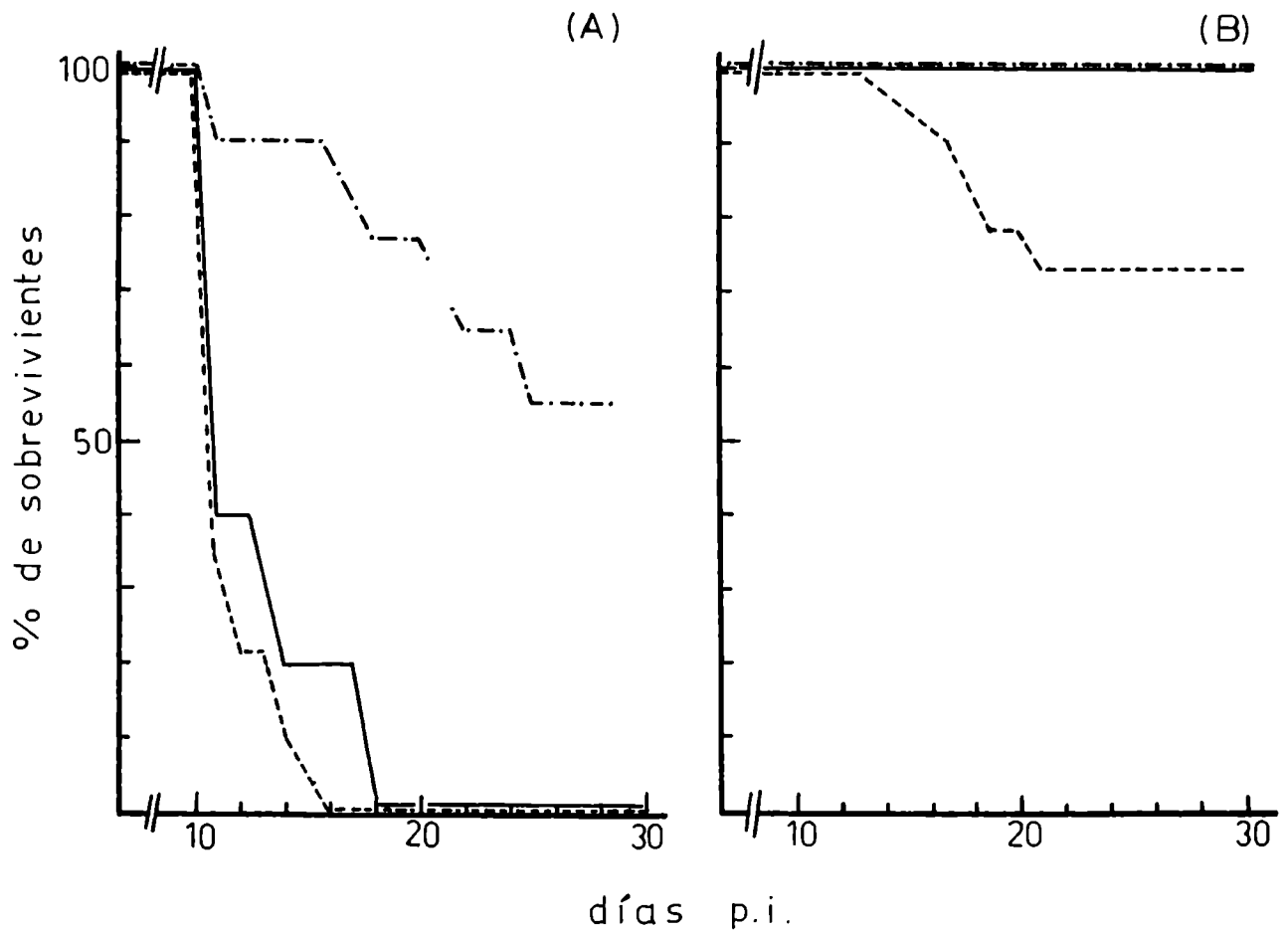


Figura 2. Mortalidad de ratones de 2 días de edad inoculados con distintas dosis de XJC13 o C167.

Lotés de 20 ratones OF1 de 2 días de edad se inocularon por vía i.c. con 10 (- - - - -), 100 (———) o 1000 (- - - - -) UFP de XJC13 (A) o C167 (B) registrándose la mortalidad hasta los 30 días p.i..

ratones infectados con XJC13 entre los 11 y 16 días p.i. mientras que con Cl67 sólo se registró 26% de mortalidad entre los 14 a 22 días p.i. (Fig. 2).

El retraso en el día de muerte de los ratones inoculados con Cl67 respecto de los correspondientes a la cepa parental es también una característica de la atenuación de la mutante para este animal (Fig. 2).

4) Cepa de ratón:

Los resultados expuestos, que señalan a Cl67 como una variante de VJ sumamente atenuada para ratón lactante, podrían ser propios para la cepa OF1 de ratones, que fue la utilizada en los experimentos mencionados hasta aquí. Por este motivo se decidió estudiar la patogenicidad para otras dos cepas murinas: C3H/HeJ y BALB/cJ, ambas endocriadas, de contenido genético conocido.

En primer lugar se determinaron los I.A. de XJC13 y Cl67 por titulación simultánea en células Vero y en ratones de 2 días de edad inoculados por vía i.c. pertenecientes a las 3 cepas murinas, ya que se incluyeron ratones OF1 como controles. Los valores de I.A. que presentó el virus parental oscilaron entre 1 y 6 (Tabla 3), coincidiendo con los datos correspondientes a los primeros estudios de patogenicidad de VJ para ratón, que indicaban que la virulencia de dicho agente era similar para el conjunto de cepas murinas ensayadas (16). Los I.A. correspondientes a Cl67 oscilaron entre 400 y >1800 confirmando la atenuación ya observada en ratones OF1 (Tabla 3).

De acuerdo a los I.A. obtenidos para Cl67, puede observarse que la cepa C3H/HeJ mostró una susceptibilidad ligeramente aumentada respecto de las otras dos. Esta sensibilidad acentuada también se manifestó cuando se estudió la mortalidad producida en ratones de las 3 cepas inoculados por vía i.c. con diferentes dosis de virus. Con la menor dosis, de 65 UFP, los animales inoculados con Cl67 no presentaron morbimortalidad, mientras que

Cepa de ratón	XJC13			C167		
	Título		I. A.	Título		I. A.
	UFP/ml	DL ₅₀ /ml	UFP/DL ₅₀	UFP/ml	DL ₅₀ /ml	UFP/DL ₅₀
OF1	2,5.10 ⁵	4,0.10 ⁴	6,2	3,2.10 ⁵	<1,8.10 ²	>1800
C3H/HeJ	2,0.10 ⁶	8,3.10 ⁵	2,4	3,2.10 ⁵	8,0.10 ²	400
BALB/cJ	2,5.10 ⁵	2,3.10 ⁵	1,1	3,2.10 ⁵	<3,1.10 ²	>1000

Tabla 3. Virulencia de XJC13 y C167 para diferentes cepas de ratones.

Los stocks de XJC13 y C167 se titularon en forma simultánea en células Vero y en ratones de 2 días de edad, cepas OF1, C3H/HeJ y BALB/cJ, por vía i.c.. El I.A. se calculó como el cociente entre el título obtenido in vitro respecto del correspondiente obtenido in vivo.

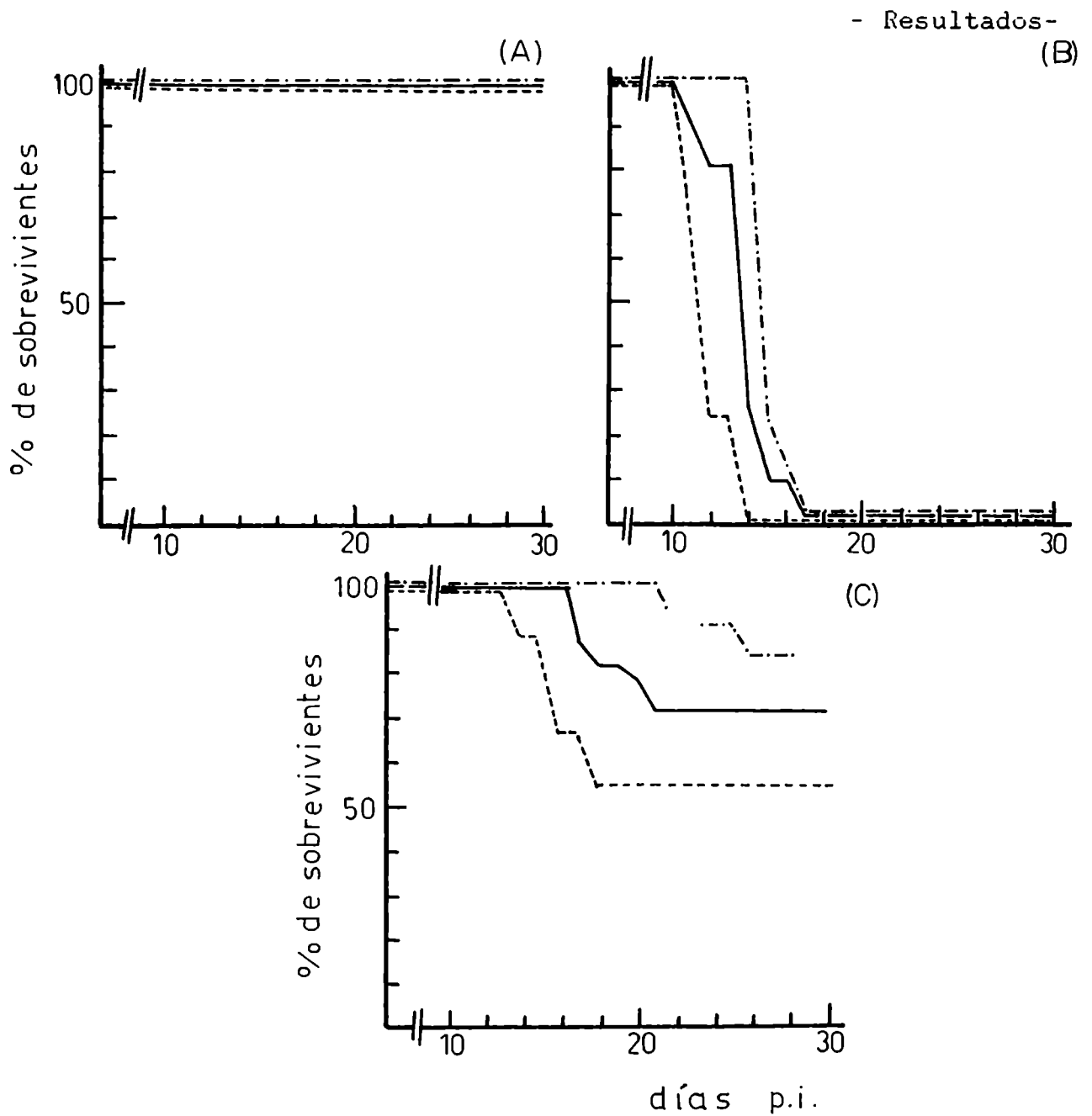


Figura 3. Mortalidad de ratones de diferentes cepas frente a la infección con C167 o XJC13.

Lotes de 20 ratones de 2 días de edad pertenecientes a las cepas OF1 (———), C3H/HeJ (- - - - -) y BALB/cJ (- · - · - ·) se inocularon por vía i. c. con 65 UFP de C167 (A) o XJC13 (B) o con 650 UFP de C167 (C), registrándose la mortalidad durante 30 días p. i. .

los infectados con XJC13 murieron en un 100% (Fig. 3A y 3B).

Cuando la dosis de C167 se aumentó a 650 UFP, algunos de los animales murieron a causa de la infección, obteniéndose el mayor valor de mortalidad (44%) para los ratones C3H/HeJ (Fig. 3C).

El tiempo que transcurre entre el momento de la inoculación y la detección de los signos clínicos de enfermedad o muerte es también un factor importante que permite caracterizar la patogenicidad del agente ensayado, ya que a menor tiempo de aparición de la sintomatología de la enfermedad mayor virulencia. Cuando se determinó el día promedio de muerte para ratones de las tres cepas inoculados con 650 UFP de XJC13 o C167 por vía i.c., se encontró que la atenuación de C167 se reflejó como un retraso en dicho parámetro respecto del correspondiente a XJC13 (Tabla 4). Dentro de los animales inoculados con la variante, aquellos pertenecientes a la cepa C3H/HeJ murieron antes que los correspondientes a OF1 o BALB/cJ, presentando esta última cepa el día promedio de muerte más tardío (Tabla 4).

En consecuencia, puede concluirse que a pesar de la leve gradación observada en la virulencia de C167 de acuerdo con la cepa murina ensayada, en todas ellas se mantuvo el fenotipo atenuado de la mutante en contraposición con una virulencia marcada de la cepa parental.

b) Características de la infección del ratón con C167:

A fin de estudiar las causas que conducían a C167 a exhibir un fenotipo atenuado en el ratón de 2 días de edad, se procedió a investigar la interacción del virus con su hospedador determinando los niveles de replicación viral durante la infección y las respuestas del animal frente a la misma.

1) Distribución de virus en órganos:

Para relacionar la atenuación de C167 con su capacidad de multiplicar en los tejidos u órganos del ratón, se determinaron las curvas de crecimiento de C167 y XJC13 en el cerebro de

Cepa de ratón	Dosis XJC13		Dosis C167	
	650 UFP	65 UFP	650 UFP	65 UFP
OF1	15,9 (0,9)	14,5 (0,8)	18,7 (0,7)	*S
C3H/HeJ	11,4 (0,4)	12,2 (0,5)	16,0 (0,7)	*S
BALB/cJ	N. H.	14,9 (0,4)	24,0 (1,4)	*S

Tabla 4. Día promedio de muerte para ratones lactantes inoculados con XJC13 o C167.

Ratones de las cepas OF1, C3H/HeJ y BALB/cJ se inocularon a los 2 días de edad por vía i.c. con 65 o 650 UFP de XJC13 o C167. Se utilizaron 20 animales por dosis y se observaron por 30 días p.i. registrándose la cantidad de animales muertos a los distintos días p.i.. El día promedio de muerte se calculó como $\sum n_i \cdot d_i / N$, donde n_i =número de animales muertos en el día d_i y N =número total de muertos, entre paréntesis figura la desviación standard.

*S= 100% de sobrevivencia. N.H. = no hecho.

ratones OF1 inoculados con 100 UFP por vía i.c. (Fig. 4). En el caso de la cepa parental aparecieron altos títulos de infectividad a tiempos tempranos con un máximo de 10^8 UFP/g cerebro al día 8 p.i., mientras que con C167 sólo se pudo detectar virus recién a partir del día 9 p.i., registrándose un máximo de $2,4 \cdot 10^6$ UFP/g cerebro a los 18 días p.i. (Fig. 4).

Cuando la dosis de C167 se aumentó a 1000 UFP, la curva de crecimiento en cerebro que se obtuvo fue similar a la de 100 UFP, ya que la aparición de virus estuvo retrasada hasta el día 9 p.i. y el título máximo de 10^7 UFP/g cerebro recién se alcanzó al día 18 p.i. (Fig. 4).

La multiplicación retrasada de C167 en cerebro no se debió a una reversión al virus salvaje, ya que el virus crecido en dicho órgano mantuvo la atenuación para ratón (I.A. = 130 UFP/DL₅₀). Esto se comprobó efectuando 3 pasajes seriados de la mutante y del virus parental por cerebro de ratón, procedimiento por el cual resulta posible la selección de variantes virulentas (85), obteniéndose progenie que presentó un I.A. = 112 y 1,2, respectivamente, lo que además indica una marcada estabilidad del fenotipo de atenuación de C167.

Cuando se determinó la infectividad en el resto de los órganos; luego de que el virus fuera inoculado en el cerebro del ratón, se encontró, para la mutante, una dispersión totalmente restringida, detectándose virus sólo en el sitio de inoculación (Fig. 5). En el caso de la cepa parental se detectó viremia temprana y pudo recuperarse infectividad a partir de todos los órganos extraídos: cerebro, bazo, timo, hígado y riñón (Fig 5).

A los 45 días p.i. se intentó la recuperación de virus por plaqueo directo en células Vero a partir de cerebro, bazo, hígado y sangre de los animales infectados con C167 obteniéndose resultados negativos.

El patrón de multiplicación y dispersión viral restringida de C167 también se observó en ratones de las cepas BALB/cJ y C3H/HeJ. Los niveles de infectividad recuperados a partir de

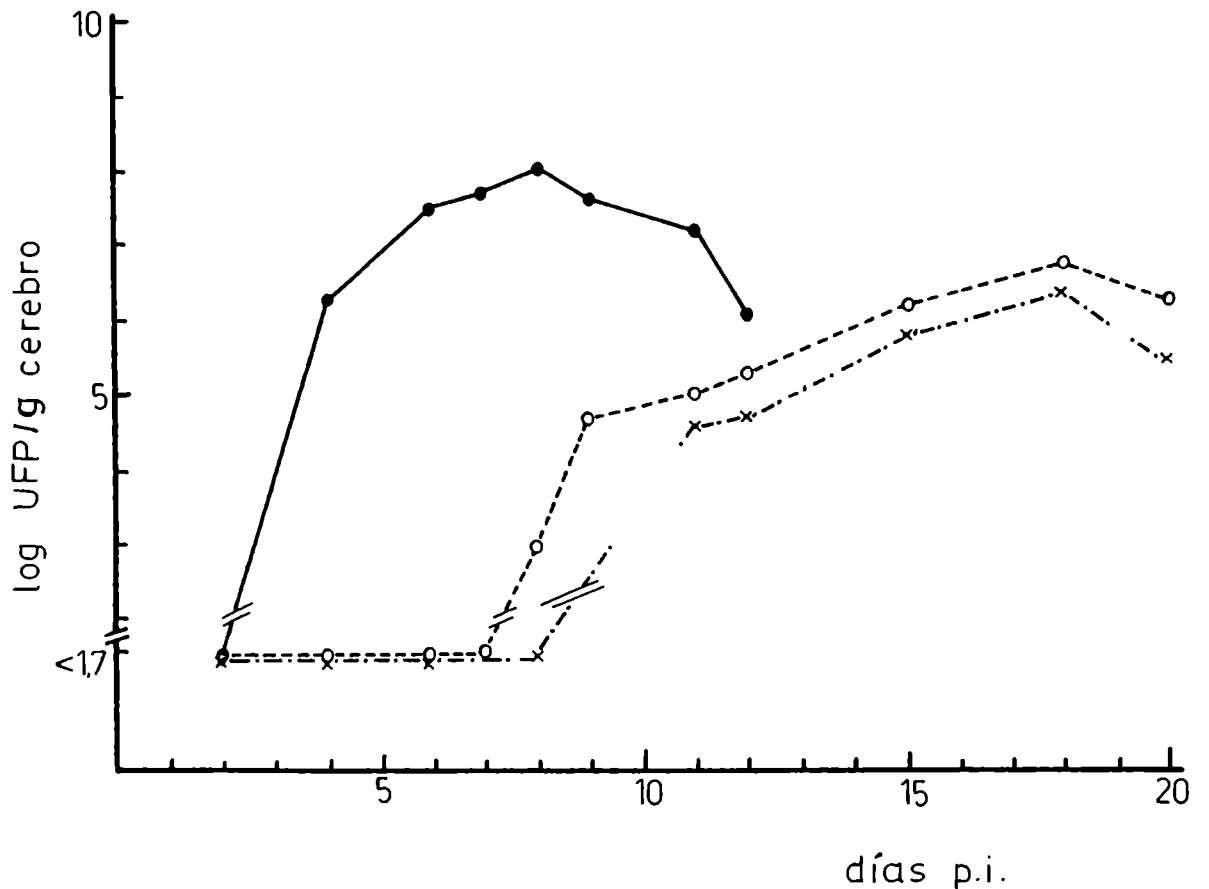


Figura 4. Curva de crecimiento de XJC13 y C167 en cerebro de ratón lactante.

Ratones OF1 de 2 días de edad se inocularon por vía i.c. con 100 UFP de C167 (x---x) o XJC13 (●—●) o con 1000 UFP de C167 (○---○). A distintos días p.i. se sacrificaron 2 animales de cada lote y se les extrajeron los cerebros, titulándose la infectividad presente en homogenatos de dicho órgano por UFP en células Vero.

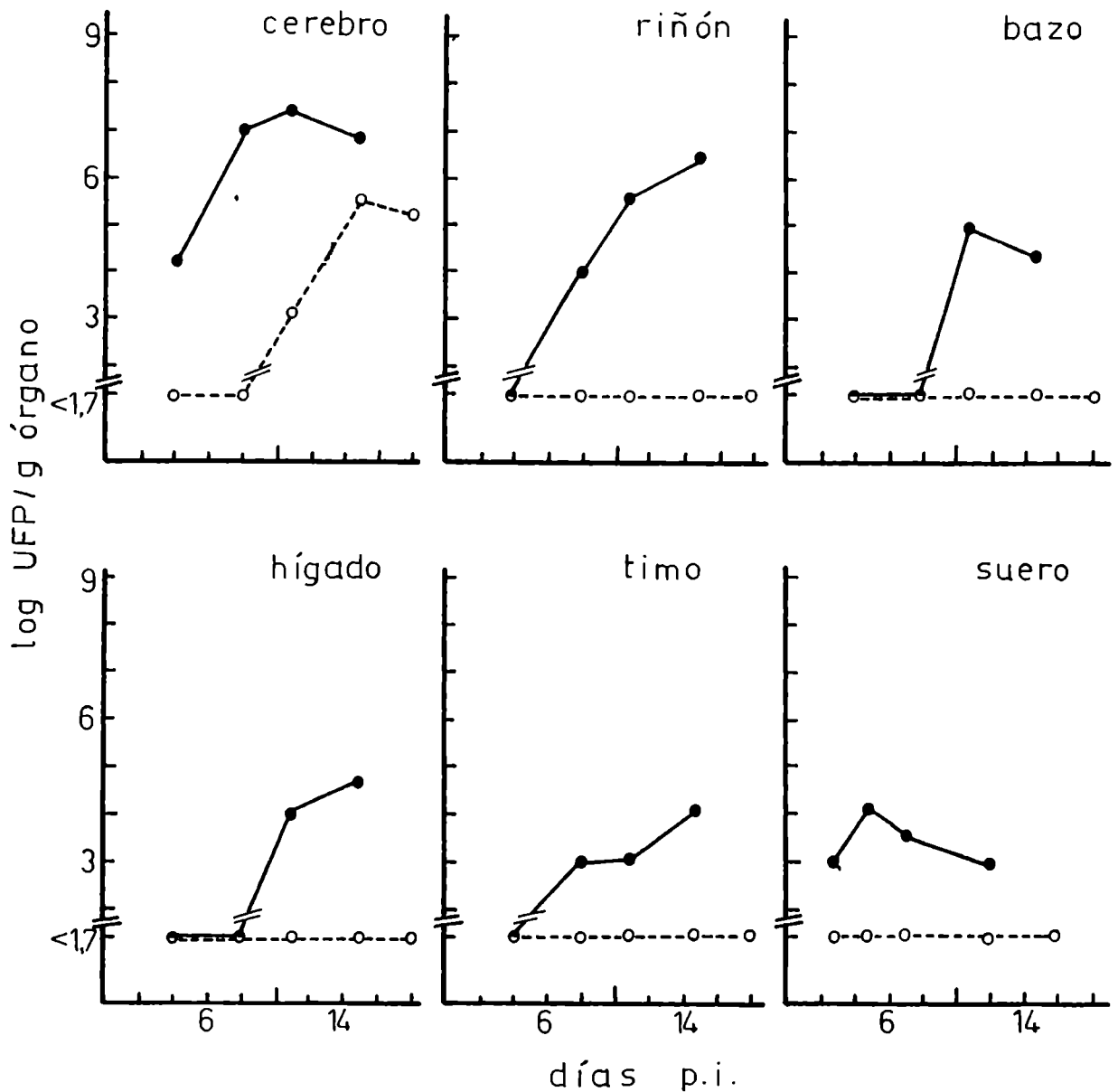


Figura 5. Distribución de virus en órganos y suero de ratones lactantes infectados con XJC13 o C167.

Ratones OF1 de 2 días de edad se inocularon con 100 UFP de XJC13 (●—●) o C167 (○- - -○) por vía i.c.. A distintos días p.i. los animales se sacrificaron extrayéndose distintos órganos y sangre en los que se cuantificó infectividad por UFP en células Vero.

cerebros y riñones de animales lactantes, pertenecientes a ambas cepas, inoculados con 650 UFP de Cl67 o XJCl3 por vía i.c. resultaron similares a los descritos para los ratones OF1. En el caso del virus parental aparecieron altos títulos en cerebro tanto al día 3 como 8 p.i. mientras que en riñón se detectó virus al día 8 p.i. (Fig. 6). De los animales inoculados con la mutante y sacrificados a los 3 días p.i. no se logró aislar virus. Aquellos sacrificados al día 8 p.i. mostraron bajos títulos de infectividad en cerebro sin poderse recuperar virus a partir de los riñones (Fig. 6).

En consecuencia, la reducida virulencia de Cl67 para ratón lactante puede asociarse con una capacidad restringida de multiplicación en el cerebro, sitio de la inoculación, hecho que provocaría una falta de diseminación del virus al resto de los órganos.

2) Replicación viral en células peritoneales:

La multiplicación restringida de Cl67 en ratones inoculados por vía i.c., también se manifestó cuando se investigó la producción de virus a partir de células peritoneales de estos animales. En este tipo de células, extraídas por lavado de la cavidad peritoneal, predominan los macrófagos que han demostrado ser un sustrato susceptible para la replicación de VJ tanto in vivo como in vitro (34,51).

Cuando se extrajeron células peritoneales de ratones lactantes OF1 infectados con 100 UFP de XJCl3 o Cl67 por vía i.c. y se las cultivó in vitro, se comprobó que solamente aquellas provenientes de animales infectados con la cepa parental liberaron virus al extracelular, mientras que en los sobrenadantes de las procedentes de ratones inoculados con la mutante no se detectó virus infeccioso, ni aún después de una semana de cultivo in vitro (Fig. 7).

La ausencia de replicación viral en los cultivos de células peritoneales de ratones inoculados con Cl67 por vía i.c. podría

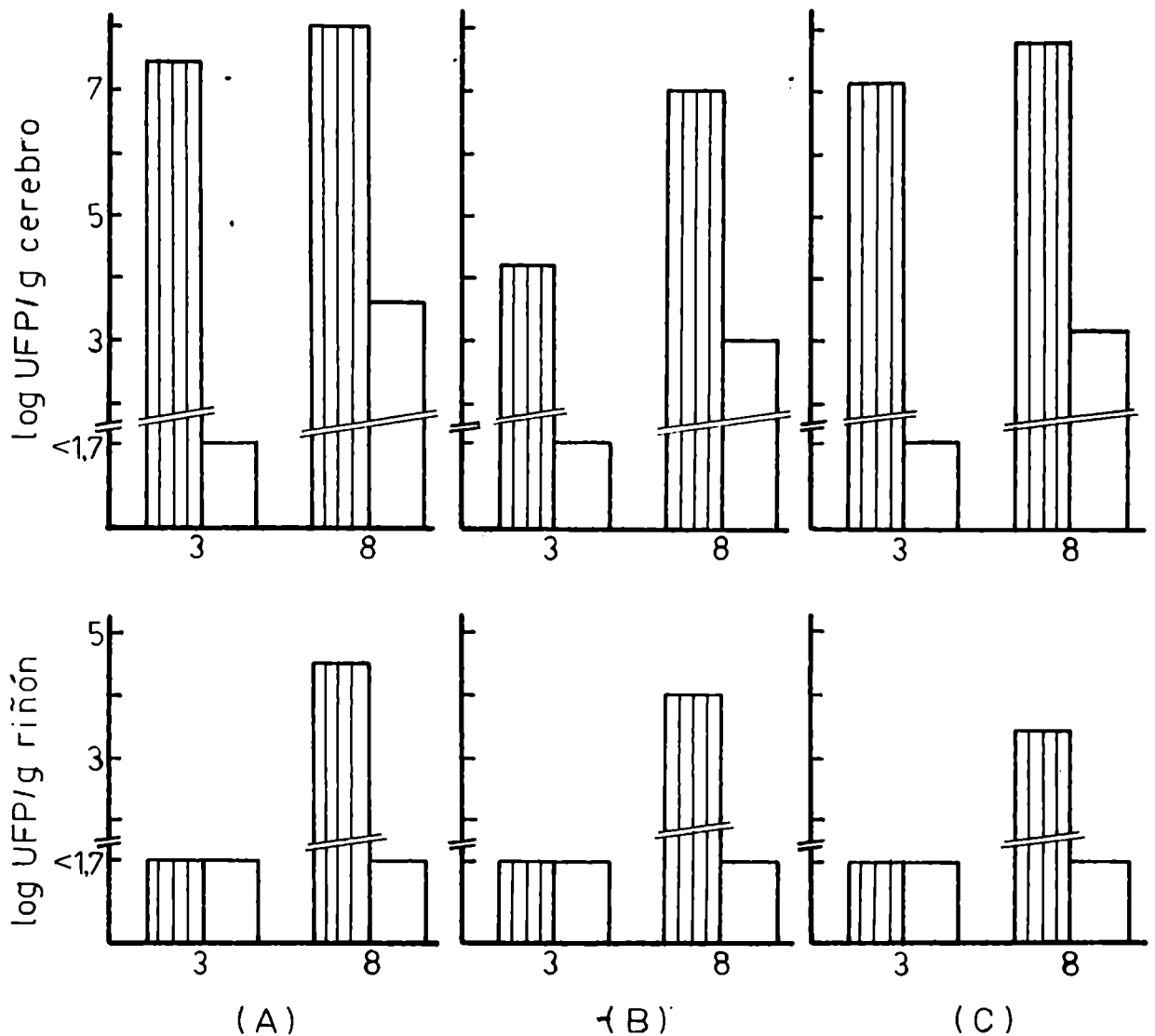




Figura 6. Presencia de virus en cerebro y riñón de ratones lactantes inoculados con XJC13 o C167. Ratones de 2 días de edad se inocularon por vía i.c. con 650 UFP de XJC13 () o C167 (), sacrificándose 2 animales por muestra a los 3 y 8 días p.i.. Los homogenatos de los órganos correspondientes a cada una de las cepas ensayadas C3H/HeJ (A), OF1 (B) y BALB/cJ (C) se titularon por UFP en células Vero.

- Resultados -

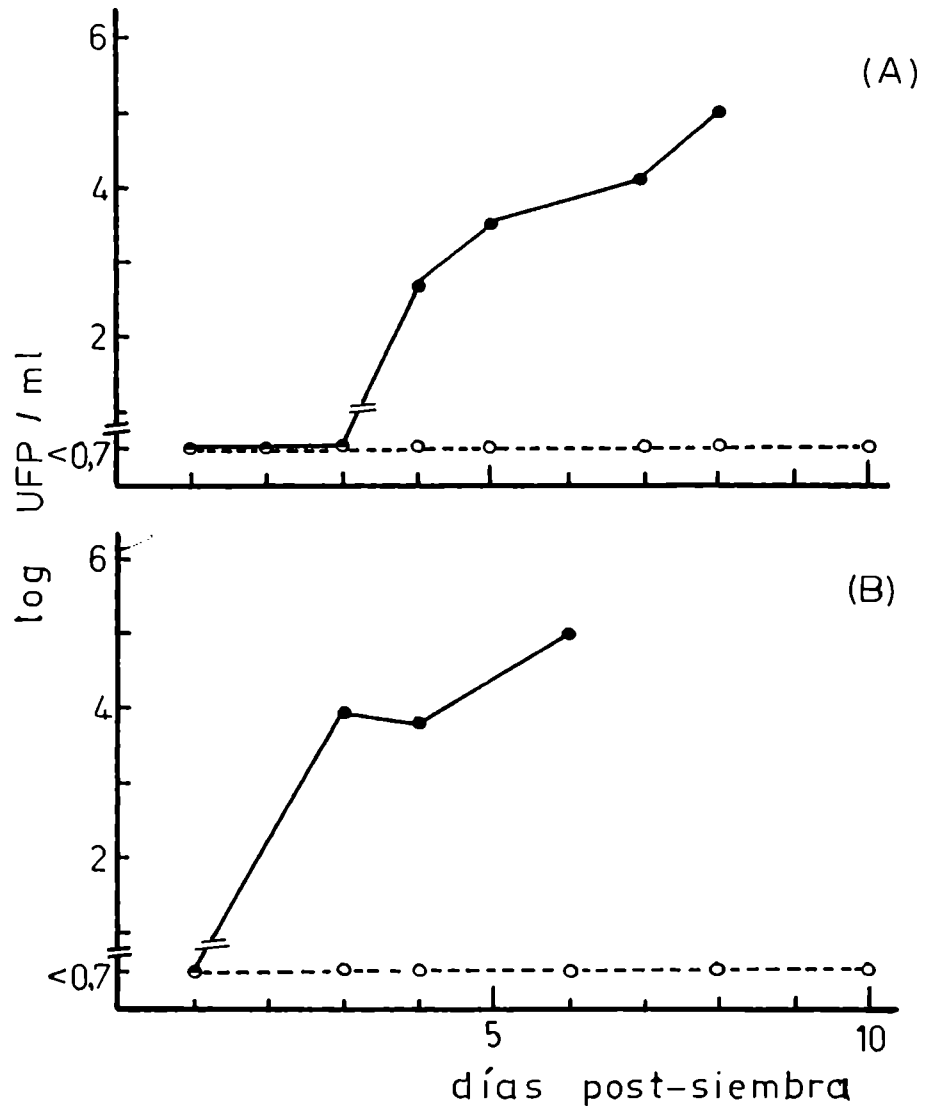


Figura 7. Producción viral de células peritoneales extraídas de ratones lactantes inoculados con XJC13 o C167 por vía i.c.. Ratones OF1 de 2 días de edad se infectaron por vía i.c. con 100 UFP de XJC13 (●—●) o C167 (○-----○). A los 3 (A) o a los 7 (B) días p.i. se extrajeron células de la cavidad peritoneal y se cultivaron in vitro. A distintos días post-siembra, se tomaron muestras de los sobrenadantes de los cultivos para su titulación por UFP en células Vero.

deberse a que las mismas no se encuentren infectadas con el virus debido a la dispersión restringida que la mutante presenta en este hospedador o porque resulten resistentes a la infección. Para dilucidar esto se llevó a cabo la inoculación por vía i.p., de forma tal de superar la barrera de la falta de dispersión cuando el virus se inocula en el cerebro. La infectividad de los sobrenadantes de los cultivos provenientes de los animales infectados por ruta periférica fue similar a la detectada en el caso de la inoculación por vía i.c. (Fig. 8). Las células obtenidas de animales infectados con XJC13 liberaron virus durante las tres semanas que fueron mantenidas in vitro, mientras que en el caso de la mutante no pudo detectarse infectividad (Fig. 8).

Por lo tanto, estos resultados demuestran que las células peritoneales murinas no son un sustrato apto para la multiplicación de la mutante. Este hecho podría explicar la falta total de patogenicidad cuando Cl67 es inoculado en el ratón por vía i.p., ya que se ha demostrado que las células peritoneales son el blanco principal de la replicación viral cuando se utiliza esta ruta.

3) Producción de interferón:

La reducida replicación de Cl67 en el cerebro de los ratones y la ausencia de dispersión viral podrían estar mediadas por algún tipo de mecanismo antiviral propio del hospedador. La producción de interferón (IFN), como respuesta a la infección viral, es capaz de determinar en muchos casos la severidad de la patología.

Cuando se investigó la presencia de IFN en el suero de ratones OF1 inoculados a los 2 días de edad con 100 UFP de XJC13 o Cl67 por vía i.c. se detectó actividad de IFN ácido-resistente al día 3, 4, 5 y 6 p.i. en el caso de la infección con el virus parental (Tabla 5). En los animales infectados con Cl67, los resultados fueron negativos para todas las muestras tomadas desde

- Resultados -

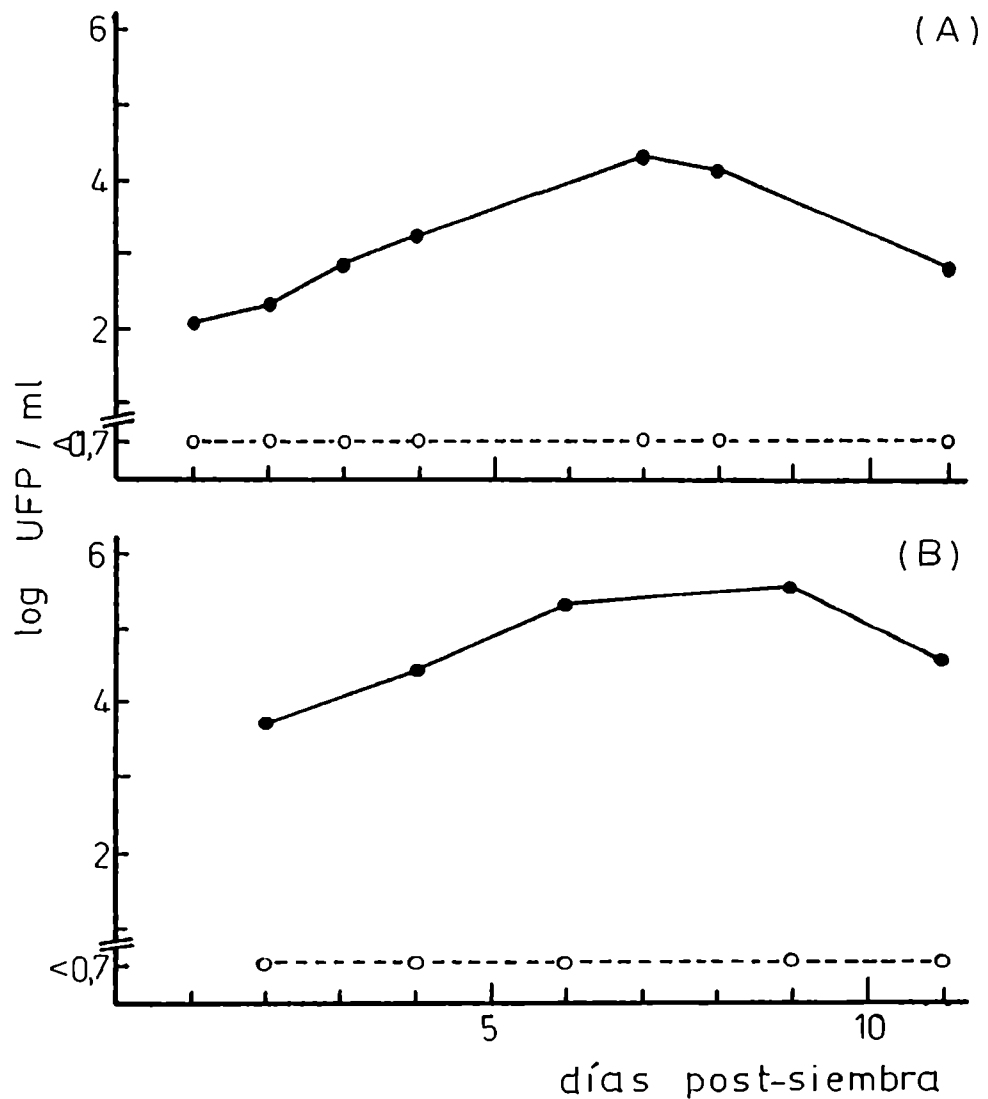


Figura 8. Producción viral de células peritoneales extraídas de ratones lactantes inoculados con XJC13 o C167 por vía i.p.. Ratones OF1 de 2 días de edad se inocularon por vía i.p. con $2 \cdot 10^4$ UFP de XJC13 (●—●) o C167 (○----○). A los 3 (A) o a los 5 (B) días p.i. se extrajeron células peritoneales de estos animales y se cultivaron in vitro. A distintos días post-siembra se ensayó la infectividad de los sobrenadantes de estos cultivos por UFP en células Vero.

Días p. i.	Título de interferón	
	XJC13	C167
1	< 10	< 10
2	< 10	< 10
3	223	< 10
4	223	< 10
5	640	< 10
6	550	< 10
7	10	< 10
12	< 10	< 10

Tabla 4. Presencia de interferón en suero de ratones infectados con XJC13 o C167.

Ratones OF1 de 2 días de edad se inocularon por vía i.c. con 100 UFP de XJC13 o C167 y se sangraron a distintos días p.i.. En las muestras de suero se cuantificó actividad de interferón por inhibición del efecto citopático de VSV en células L929. El título de interferón se expresa como la inversa de la máxima dilución de suero que confiere protección al 50% de las monocapas celulares.

el día 1 hasta el 12 p.i. inclusive (Tabla 5).

De esta manera es posible descartar que la escasa replicación de la variante in vivo se deba a una exacerbada producción de IFN, ya que de haber sido así, en los animales infectados con Cl67, se deberían haber obtenido títulos de IFN mayores que los registrados para el virus parental.

4) Cinética de aparición de anticuerpos neutralizantes:

Cuando se investigó la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero de ratones inoculados con 100 UFP de Cl67, una dosis que no produce mortalidad, se detectó un título de 20 al día 30 p.i., aumentando luego en forma pronunciada con el transcurso del tiempo (Fig. 9).

La presencia de anticuerpos neutralizantes en los ratones inoculados confirma la infección subclínica de los mismos e indica que los bajos niveles de replicación de la mutante son suficientes para evocar una respuesta inmune aunque no para desencadenar un proceso virulento para dicho hospedador.

c) Comportamiento de ratones infectados con Cl67 frente al desafío con XJCl3:

La infección subclínica que sufren los ratones inoculados con Cl67, puesta de manifiesto por la escasa replicación viral detectada en el sitio de la inoculación y por la aparición de anticuerpos neutralizantes, podría producir en los animales un estado de protección ante la sobreinfección con VJ.

Para comprobar esta hipótesis, los ratones lactantes inoculados con Cl67 fueron desafiados a distintos días p.i.. Dado que los ratones mayores de 20 días de edad ya no son susceptibles a la infección con XJCl3 (Fig. 1), estos experimentos de protección debieron diseñarse cuidadosamente, eligiendo un período de tiempo corto entre la primoinfección con Cl67 y el desafío con la cepa parental. Por lo tanto, ratones OF1 se inocularon con la mutante a las 24 h de edad, ya sea por vía i.c.

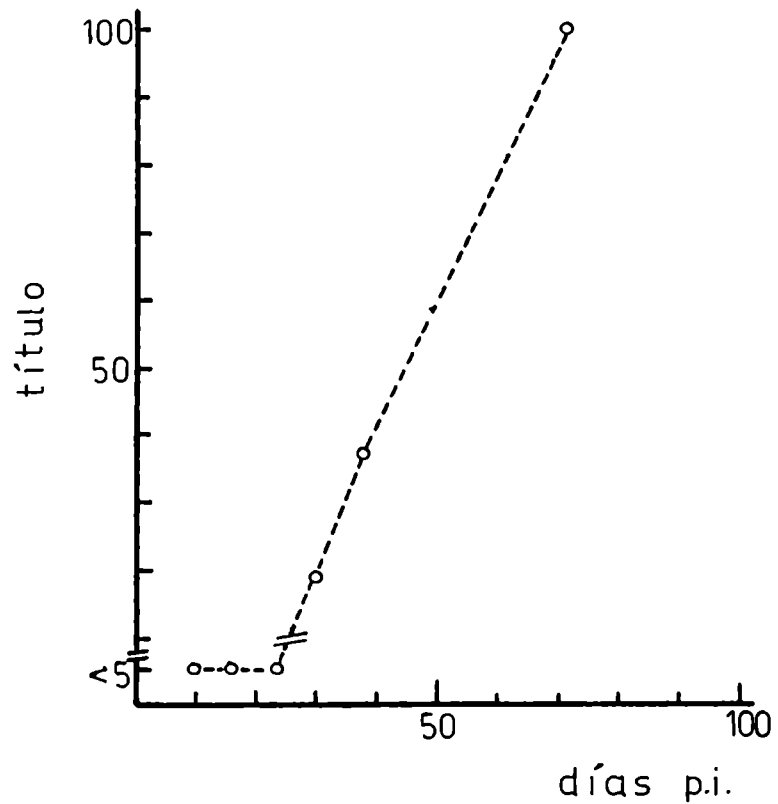


Figura 9. Cinética de aparición de anticuerpos neutralizantes en ratones infectados con C167.

Ratones OF1 de 2 días de edad se inocularon por vía i.c. con 100 UFP de C167 y se sangraron a distintos días p.i.. En los sueros se determinó el título de anticuerpos neutralizantes expresado como la inversa de la dilución que produce el 50% de reducción en el número de placas.

o i.p. desafiándolos a los 8 u 11 días de edad con distintas dosis de la cepa parental.

Cuando el tiempo transcurrido entre la preinoculación con 100 UFP de Cl67 por vía i.c. y el desafío con 500 UFP de XJCl3 por vía i.c. fue de 7 días no se observó protección significativa respecto de los animales infectados solamente con la cepa parental.

Cuando se aumentó el lapso a 10 días, se encontró que la mortalidad de los animales que habían sido previamente inoculados con Cl67 i.c. y desafiados con XJCl3 i.c. se redujo en un 63% respecto de los ratones que sólo recibieron la cepa parental, $p < 0,05$ (Fig. 10A). Esta reducción en la mortalidad de los animales preinoculados se mantiene aunque se aumente 3 veces la cantidad de virus desafiante, $p < 0,1$ (Fig. 10B). El hecho de que el efecto protector de la preinoculación con la mutante, frente al desafío con XJCl3, pueda comprobarse aún antes de la aparición de los anticuerpos neutralizantes permite descartarlos como responsables directos de dicho fenómeno. Por otro lado, la necesidad de que entre preinoculación y desafío deban transcurrir no menos de 10 días para lograr protección (tiempo requerido para detectar infectividad debida a la mutante en el cerebro de los animales) señala como causa probable de la protección a la interferencia que Cl67 ejercería sobre la replicación de XJCl3.

Esta hipótesis está avalada por los datos encontrados cuando se procedió a preinocular por vía i.p. y a desafiar 10 días más tarde por vía i.c., ya que en este caso no se detectó protección (Fig. 10A). Este comportamiento podría explicarse debido a que el cambio en la vía de inoculación impediría la presencia simultánea en cerebro de Cl67 y XJCl3, condición necesaria para que ocurra la interferencia.

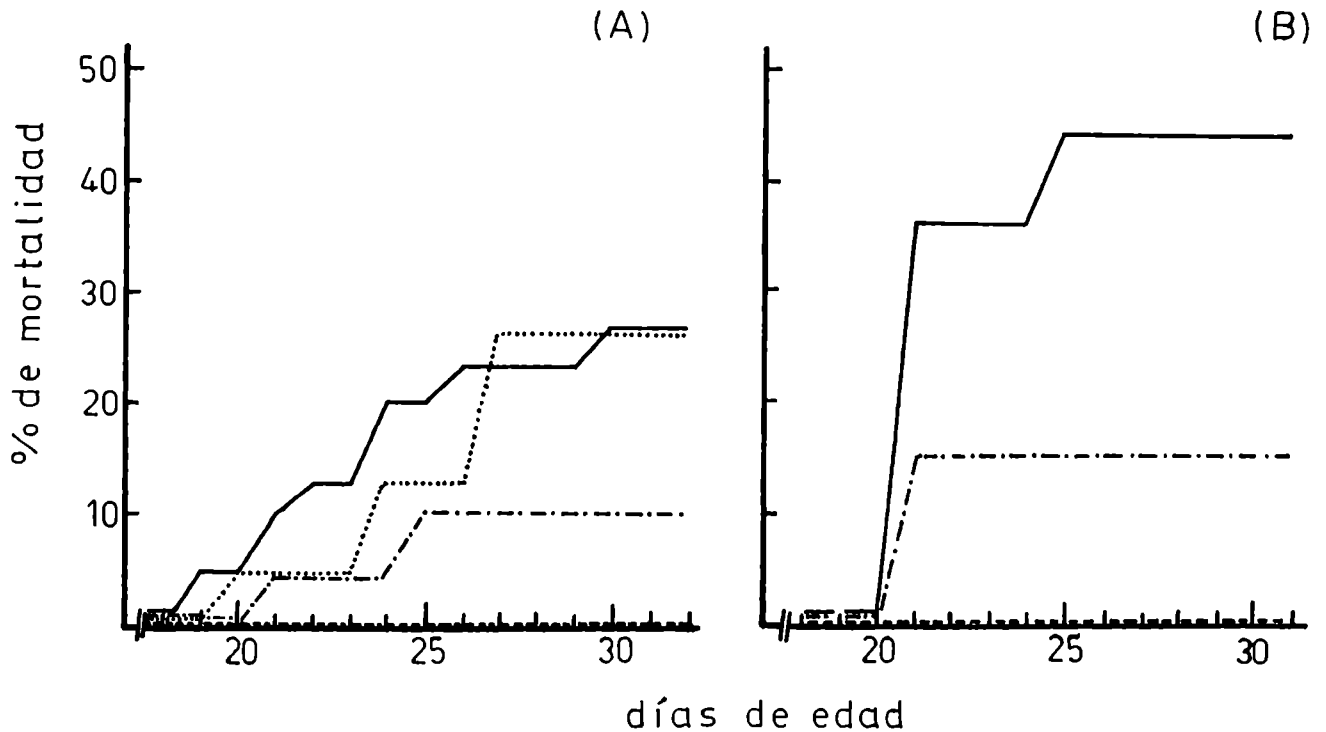


Figura 10. Protección de ratones inoculados con C167 frente al desafío con XJC13.

(A) Ratones OF1 de 1 día de edad se inocularon por vía i.c. (- · - · - · - · - ·) o i.p. (······) con 100 UFP de C167 y 10 días después se desafiaron con 500 UFP de XJC13 por vía i.c.. Como controles se utilizaron animales de 11 días de edad inoculados con 500 UFP de XJC13 por vía i.c. (———).

(B) Ratones OF1 de 1 día de edad se inocularon por vía i.c. con 100 UFP de C167 y 10 días después se desafiaron con 1500 UFP de XJC13 por vía i.c. (- · - · - · - · - ·). Como controles se utilizaron animales de 11 días de edad inoculados con 1500 UFP de XJC13 por vía i.c. (———).

En (A) y (B) cada grupo contenía entre 30 y 40 ratones, además se emplearon grupos controles de animales de 1 día de edad inoculados por vía i.c. con 100 UFP de C167 (- - - - -).

II) PATOGENICIDAD DE C167 PARA OTROS MODELOS ANIMALES.

Los resultados obtenidos a partir del modelo experimental de infección del ratón con C167 plantearon el interrogante del comportamiento de la variante en otros modelos animales. A fin de establecer si había alteraciones en la virulencia de C167 respecto de XJC13 en otros hospedadores, se eligieron para ensayar el Calomys musculinus, principal reservorio de VJ en la naturaleza (92) y el cobayo, uno de los más utilizados marcadores de atenuación para este virus (79).

a) Calomys musculinus:

Cuando el hospedador ensayado fue el ratón de campo, Calomys musculinus, los datos encontrados fueron semejantes a aquellos correspondientes al ratón.

C.m. de 8 días de edad inoculados con 650 UFP de XJC13 por vía i.c. murieron en un 88% mientras que los infectados con la mutante lo hicieron en un 25% (Fig. 11), sin que se registraran diferencias significativas en el día promedio de muerte entre ambos grupos: 11,6 +/- 0,9 y 13 +/- 0,7 respectivamente.

En consecuencia, la atenuación que C167 presentó para el ratón también se manifestó para el cricétido C.m. aunque no se registró el retraso en el día promedio de muerte tal como ocurre para el primero. Además, si bien la mortalidad causada por XJC13 se mantiene constante tanto para los cricétidos (88%) como para el ratón OF1 de 7 días de edad (90%), las muertes debidas a C167 son mayores en el caso de los C.m. (25%) que en los ratones OF1 (6%) (Fig. 1 y 11).

b) Cobayo:

La atenuación que C167 presentó para múridos y cricétidos también se dió en el caso del cobayo (cávido). Sin embargo, el

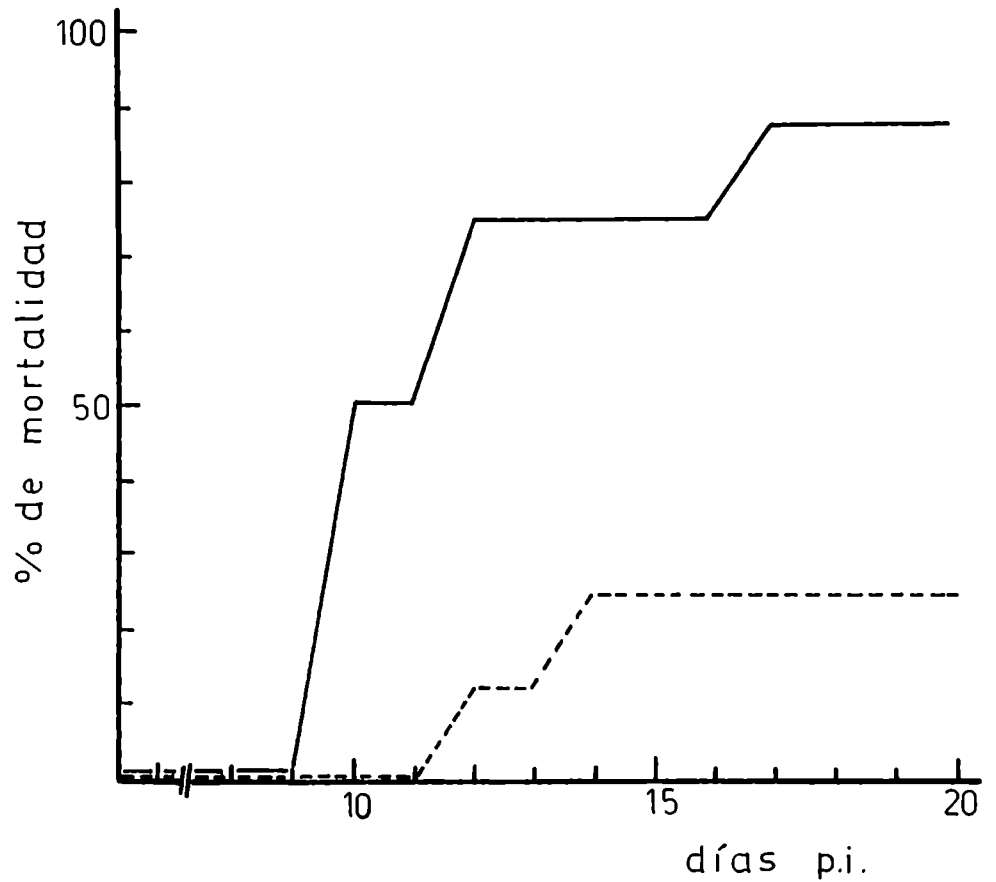


Figura 11. Mortalidad de cricétidos Calomys musculinus inoculados con XJC13 o C167.

Lotes de 10 cricétidos lactantes Calomys musculinus de 8 días de edad se inocularon por vía i.c. con 650 UFP de XJC13 (———) o C167 (- - - - -), observándose los animales durante 30 días p.i. a fin de registrar la morbimortalidad.

comportamiento de la mutante en este modelo no resulta sorprendente, ya que la cepa parental, XJC13 es una cepa atenuada para este hospedador.

Cuando se registró la mortalidad de cobayos adultos inoculados por vía i.m. con 1000 UFP de XJC13 o C167 se comprobó que ninguno de los 2 virus causaron morbimortalidad entre los animales infectados.

Luego de una segunda inoculación a los 40 días p.i. con la misma dosis anterior y utilizando la misma vía, los cobayos se sangraron y sacrificaron 7 días después procediéndose a la necropsia de los mismos. El aspecto macroscópico de los órganos internos de los animales infectados con la cepa parental o con la mutante no presentó signos hemorrágicos y fue similar al de animales controles sin infectar.

En los sueros obtenidos se detectó actividad neutralizante contra el virus homólogo con títulos de 100 y 400 para los cobayos inoculados con C167 y XJC13, respectivamente. La presencia de anticuerpos neutralizantes confirmó la infección de estos animales con ambos virus a pesar de la ausencia de morbimortalidad.

En consecuencia, C167 mantiene en la infección experimental del cobayo adulto la atenuación característica de XJC13 para dicho hospedador.

III) MULTIPLICACION Y PERSISTENCIA DE C167 EN CULTIVOS CELULARES.

La eficiencia reducida de C167 para crecer en cerebro de ratón y su incapacidad para diseminarse a otros órganos del animal podría deberse a un impedimento específico de la mutante para multiplicar en células de origen murino. Para probar esta hipótesis y analizar el espectro de tipos celulares en que se

podría manifestar esta restricción, se determinaron comparativamente las curvas de crecimiento de XJC13 y C167 en cultivos primarios de ratón obtenidos a partir de distintos tejidos. Además se estudió la posibilidad por parte de C167 de establecer infecciones persistentes en dichas células, propiedad típica del VJ.

a) Curvas de crecimiento de XJC13 y C167 en distintos sustratos celulares:

1) células Vero:

Como sistema control, se realizaron en primer lugar las curvas de crecimiento viral en células Vero, línea celular usada de rutina para propagar y cuantificar VJ.

Cuando se infectaron células Vero con C167 o XJC13, a una m.i. de 0,1 UFP/cél. se comprobó que ambos virus replicaban en forma semejante. Este comportamiento se evidenció a través de curvas de crecimiento con perfiles similares, tanto en la cinética de multiplicación como en los valores máximos de infectividad alcanzados, que oscilaron alrededor de 10^6 UFP/ml al día 6 p.i. (Fig. 12).

Al ensayar una m.i. de 0,01 UFP/cél. tanto el crecimiento de la variante como de la cepa parental se vieron retrasados, alcanzando recién al día 9 p.i. el máximo de infectividad (10^6 UFP/ml).

Durante la etapa aguda de la infección, ambos virus produjeron en los cultivos, a partir del día 3 p.i. un efecto citopático característico, apareciendo en primer término pequeños focos aislados de células muertas (redondeadas, refringentes) hasta llegar a la semana p.i. a zonas en la monocapa bien delimitadas y extensas que presentaban cambios evidentes en la morfología celular a causa de la actividad viral.

En consecuencia, la multiplicación de XJC13 y C167 en células Vero, durante la etapa aguda de la infección presenta

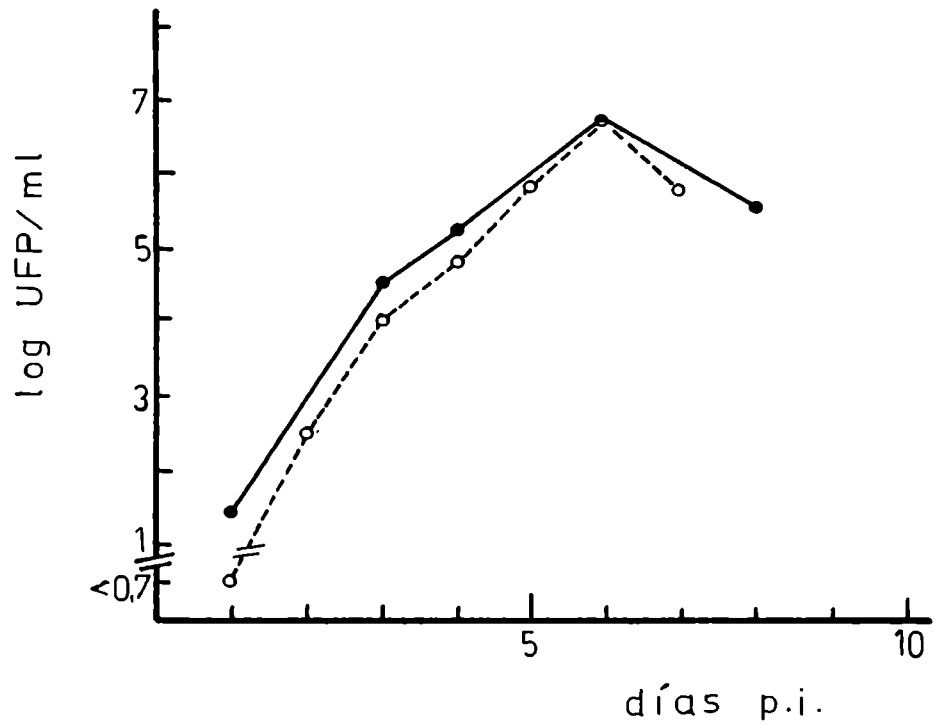


Figura 12. Curvas de crecimiento de XJC13 y Cl67 en células Vero. Monocapas de células Vero se infectaron a una m.i. de 0,1 UFP/cél con XJC13 (●—●) o Cl67 (○----○) y se incubaron a 37°C. A distintos días p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por UFP en células Vero.

características similares, tanto en las curvas de crecimiento obtenidas como en el grado de ACP producida.

2) células BHK-21:

Las células BHK-21, derivadas de riñón de hamster, resultan, al igual que las células Vero, un sustrato de uso frecuente en la propagación de VJ. Cuando se probó la capacidad de multiplicar de Cl67 en esta línea celular se encontró que los niveles de crecimiento de la mutante eran similares a los de la cepa parental y del mismo orden que los obtenidos en las células de mono (datos no presentados).

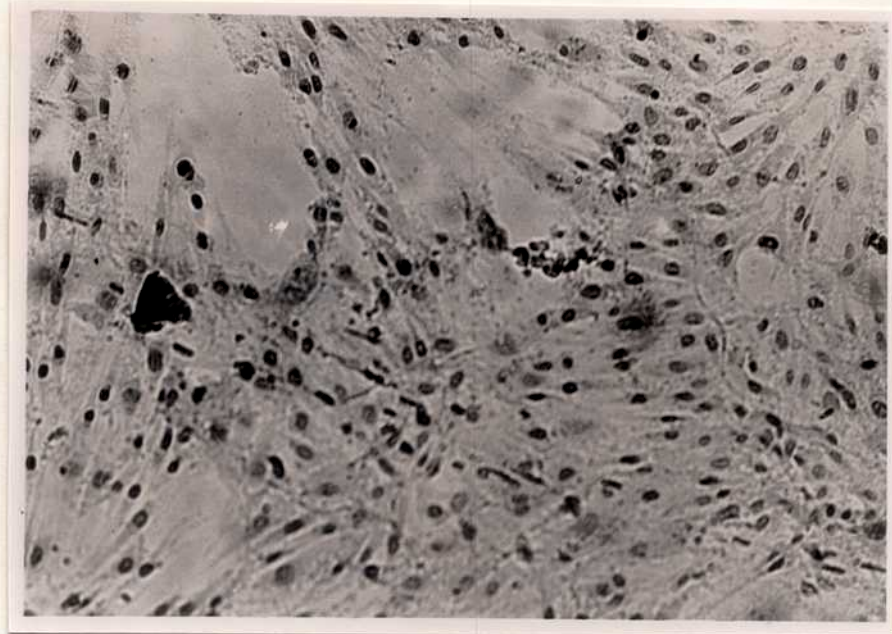
3) cultivos primarios de cerebro de ratón lactante:

En los ratones lactantes inoculados con Cl67 por vía i.c. se había encontrado un crecimiento retrasado de la mutante en cerebro con títulos significativamente menores que los correspondientes al virus parental (Fig. 4). A fin de conocer el comportamiento in vitro de ambos virus en un sistema similar, se estudió la replicación de los mismos en cultivos celulares obtenidos a partir de cerebro de ratón lactante.

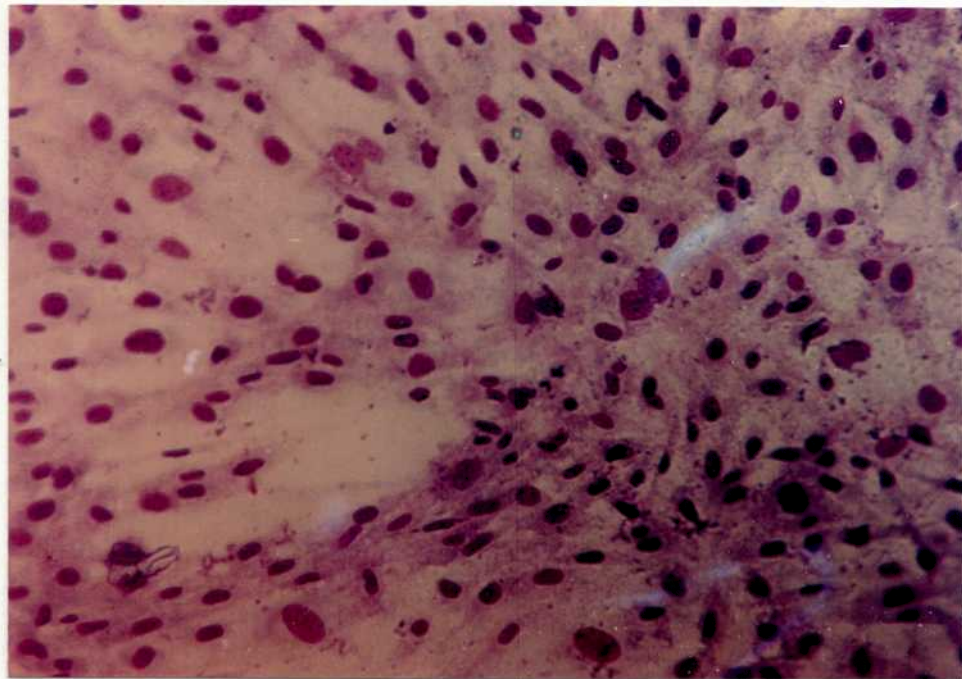
Los cultivos primarios de cerebro (CR) de ratones OF1 presentaron la heterogeneidad característica de este tipo de cultivo, siendo los astrocitos (células fibroblásticas) el tipo celular predominante en los mismos (Fig. 13).

Cuando estos cultivos se infectaron con Cl67 o XJCl3 a una m.i. de 0,01 UFP/cél, el virus parental multiplicó alcanzando un título de 10^6 UFP/ml al día 7 p.i.; por el contrario, la mutante no superó el valor de 10^3 UFP/ml, que recién alcanzó al día 12 p.i. (Fig. 14). Para ninguno de los virus se detectó acción citopatogénica en los cultivos infectados.

El comportamiento diferencial de Cl67 en los cultivos de células de cerebro de ratón in vitro sería entonces una causa probable de la replicación restringida de la mutante en el cerebro de los animales inoculados con la misma.



(A)



(B)

Figura 13. Cultivos primarios de cerebro de ratón. Monocapas de células CR se fijaron con formol 10% y se colorearon con hematoxilina observándose a 250x (A), o con hematoxilina-eosina a 400x (B).

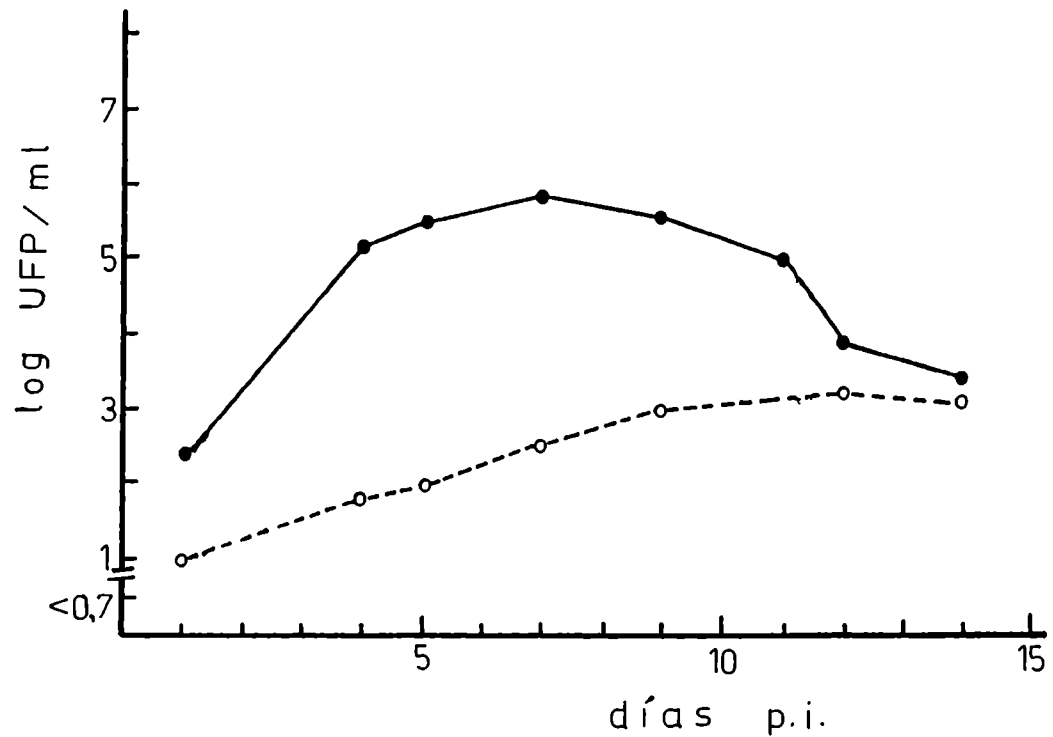


Figura 14. Curvas de crecimiento de XJC13 y C167 en cultivos primarios de cerebro de ratón lactante.

Cultivos CR se infectaron con XJC13 (●—●) o C167 (o----o) a m.i. de 0,01 UFP/cél y se incubaron a 37°C. A distintos días p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por UFP en células Vero.

4) Cultivos primarios de embrión de ratón:

La inhabilidad de C167 para replicar en cerebro de ratón o en cultivos celulares provenientes de dicho órgano podría deberse al origen nervioso del tejido involucrado. Para descartar esta posibilidad se investigó la multiplicación de ambos virus en cultivos primarios de embrión de ratón (ER) cuya población celular presenta un grado de diferenciación menor que los cultivos de cerebro. Además, resultaron morfológicamente más homogéneos que los de cerebro, con una elevada proporción celular de tipo fibroblástico.

Cuando se infectaron ER con C167 o XJC13, solamente se detectó virus en los sobrenadantes de los cultivos infectados con la cepa parental alcanzándose un título máximo de 10^6 UFP/ml al día 5 p.i. (Fig. 15). La replicación de XJC13 en estas células no causó ningún tipo de acción citopatogénica. En el caso de los cultivos inoculados con la mutante, los niveles de infectividad en los sobrenadantes permanecieron por debajo del límite de detección (Fig. 15).

5) Cultivos de células peritoneales de ratón:

Los cultivos murinos usados hasta el momento para ensayar el crecimiento de C167 y XJC13, en los que se comprobó una restricción en la replicación de la mutante, presentaban predominancia de células fibroblásticas.

Para completar la caracterización de la multiplicación de C167 en distintos tipos celulares murinos se decidió emplear como sustrato cultivos de células peritoneales de ratón (CP), compuestos casi exclusivamente por macrófagos, tipo celular de propiedades particulares, y que resultan permisivos para la replicación de VJ (51).

Debido al proceso de maduración que sufre el macrófago durante el desarrollo del animal, se ensayaron CP provenientes de ratones lactantes y adultos. En ambos casos se verificó una restricción total en la replicación de la mutante, registrándose

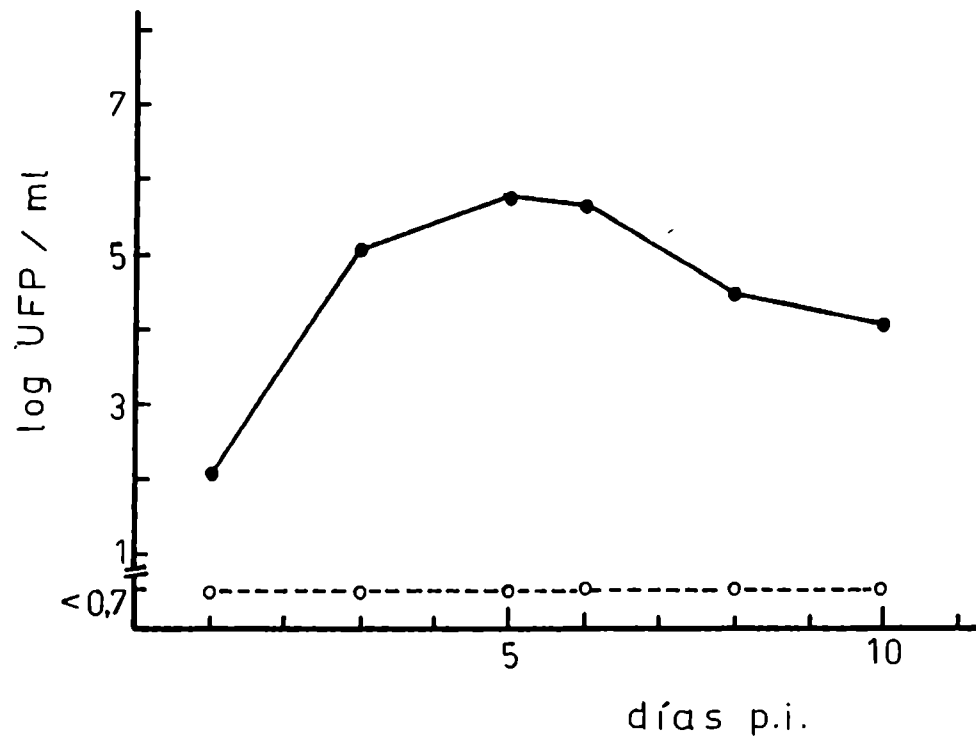


Figura 15. Curvas de crecimiento de XJC13 y Cl67 en cultivos primarios de embrión de ratón.

Cultivos ER se infectaron con XJC13 (●—●) o Cl67 (○----○) a una m.i. de 0,1 UFP/cél y se incubaron a 37°C. A distintos días p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por UFP en células Vero.

infectividad solamente en CP de adultos al día 1 p.i. debido probablemente al virus residual del inóculo (Fig. 16). Por otro lado, la cepa parental creció en estos cultivos sin presentar ACP, alcanzando títulos bajos, que no superaron 10^3 UFP/ml (Fig. 16).

Estos resultados demuestran que la inhabilidad de C167 para crecer en cultivos de células de ratón está ligada con el origen murino del sustrato de replicación, independientemente del tipo celular presente en dichos cultivos.

6) Cultivos primarios de embrión de Calomys musculinus:

La restricción en el crecimiento de C167 en cultivos celulares de origen murino sería la causa principal de su falta de patogenicidad para ratón. Esta correlación podría también ser válida para la atenuación en virulencia de C167 para Calomys musculinus. Para confirmar esta hipótesis se estudió entonces la replicación de C167 y XJC13 en cultivos primarios de embrión y de riñón de C.m.

Los cultivos primarios de embrión de C.m. (EC), presentaron, una morfología similar a los correspondientes murinos encontrándose, dentro de la típica heterogeneidad, predominancia de células fibroblásticas.

Cuando se infectaron EC con C167 o XJC13 se comprobó que ambos virus fueron capaces de crecer en dicho sustrato, presentando una cinética de multiplicación similar. Sin embargo, los títulos en los sobrenadantes de los cultivos infectados con la cepa parental fueron, en todo el ciclo, 2 log mayores que los correspondientes a C167 (Fig. 17). En el caso de los cultivos infectados con XJC13 se alcanzaron valores que oscilaron alrededor de $2 \cdot 10^5$ UFP/ml entre los días 5 y 11 p.i. mientras que para la mutante no superaron $3 \cdot 10^3$ UFP/ml (Fig. 17). Para ninguno de los virus, la replicación se puso en evidencia a través de la producción de ACP.

- Resultados -

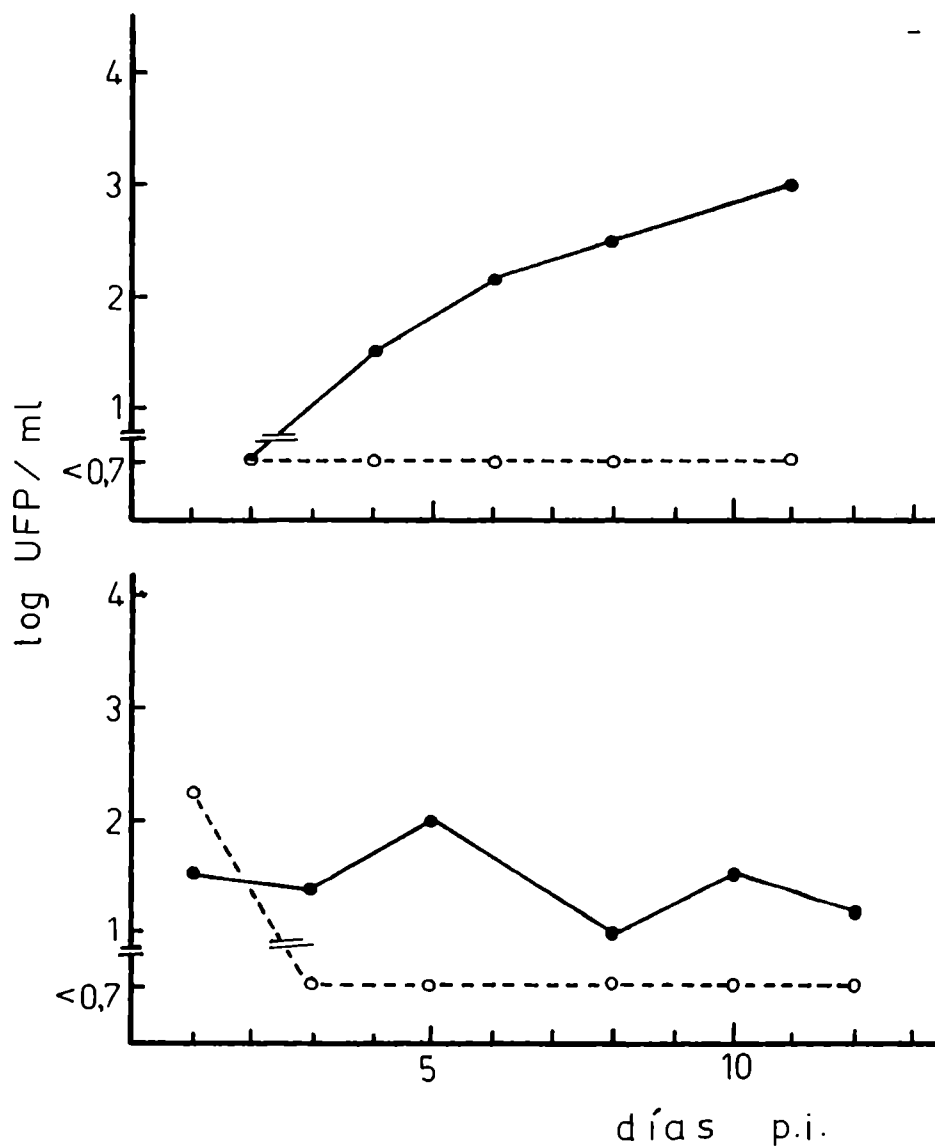


Figura 16. Curvas de crecimiento de XJC13 y C167 en cultivos de células peritoneales de ratón.

CP extraídas de ratones de 2 días (A) o de 10 semanas de edad (B) se infectaron con XJC13 (●—●) o C167 (○- - -○) a una m.i. de 0,1 (A) o 1 (B) UFP/cél y se incubaron a 37°C. A distintos días p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por UFP en células Vero.

Estos resultados demuestran que, si bien, la mutante es capaz de replicar en EC, esta multiplicación ocurre en forma disminuída, aunque no retrasada, respecto de la cepa parental.

7) Cultivos celulares de riñón de Calomys musculinus:

Los cultivos celulares de riñón de C.m. (RC) estuvieron compuestos casi exclusivamente por fibroblastos. Cuando se estudió el crecimiento de C167 y XJC13 en RC se encontró que ambos virus fueron capaces de multiplicar en dichas células, aunque para C167 se mantuvo la restricción en cuanto al título logrado. La cepa parental creció rápidamente alcanzando valores de infectividad de 10^6 UFP/ml al día 4 p.i. mientras que C167 sólo llegó a 10^3 UFP/ml recién al día 10 p.i. (Fig. 18). Al igual que en los cultivos anteriores, la replicación no se vió acompañada de ACP.

Teniendo en cuenta los resultados observados en EC y RC puede afirmarse que la virulencia reducida de C167 para el C.m. está asociada a una replicación restringida de la mutante en cultivos celulares provenientes de dicho hospedador, tal como ocurre en el caso del ratón. Esta relación también se manifiesta entre el grado de virulencia in vivo y el nivel de replicación in vitro, ya que el sistema murino, en el cual se observa la mayor atenuación in vivo es aquél en el que se presenta la restricción in vitro más marcada.

b) Persistencia de C167 y XJC13 en distintos sustratos celulares:

La producción de infecciones persistentes in vitro es una propiedad característica del VJ, puesta de manifiesto por distintas cepas en diversos tipos de cultivos celulares. Por lo tanto, se decidió estudiar la capacidad de C167 de establecer persistencia en tres sistemas celulares en los que la mutante mostró diferentes niveles de multiplicación: un sistema totalmente permisivo (células Vero), un sistema altamente restrictivo (células ER) y uno de comportamiento intermedio (células EC).

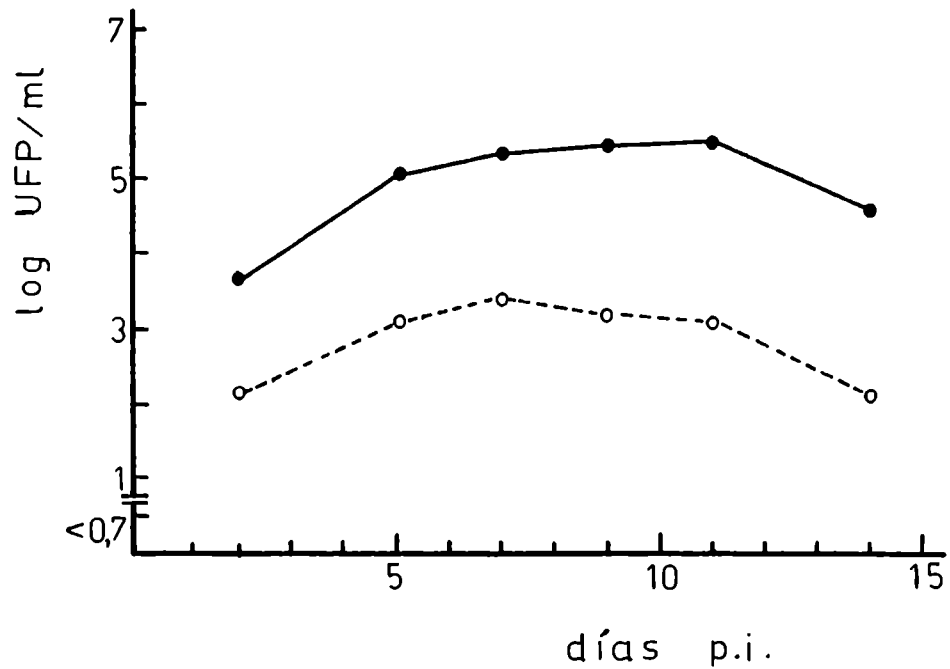


Figura 17. Curvas de crecimiento de XJC13 y C167 en cultivos primarios de embrión de Calomys musculinus.

Cultivos EC se infectaron con XJC13 (●—●) o C167 (○----○) a una m.i. de 0.5 UFP/cél y se incubaron a 37°C. A distintos días p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por UFP en células Vero.

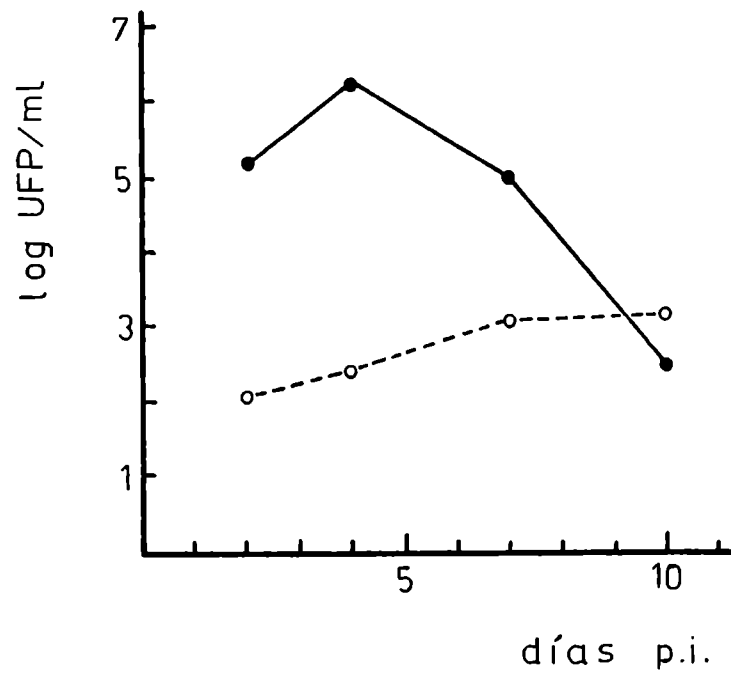


Figura 18. Curvas de crecimiento de XJC13 y C167 en cultivos primarios de riñón de Calomys musculinus.

Cultivos RC se infectaron con XJC13 (●—●) o C167 (o----o) a una m.i. de 0,5 UFP/cél y se incubaron a 37°C. A distintos días p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por UFP en células Vero.

1) células Vero:

Luego de transcurrida la etapa aguda de la infección de células Vero, es decir a partir de las 2 o 3 semanas p.i., la clásica ACP producida por el VJ en este tipo celular fue desapareciendo. A los 30-45 días p.i. los cultivos que habían sido infectados con XJC13 o con Cl67 presentaron un aspecto indistinguible respecto de cultivos controles sin infectar.

Las principales características estudiadas para decidir si los cultivos así obtenidos se encontraban persistentemente infectados fueron: la producción de virus y la resistencia a la sobreinfección con virus homólogo y heterólogo relacionado (40).

Cuando se cuantificó la infectividad presente en los sobrenadantes de los cultivos de células Vero infectados con Cl67 o con XJC13, denominados V7 y V3, respectivamente, se comprobó que, en el caso de la cepa parental, la producción de virus que había comenzado en la etapa aguda declinó alrededor del día 30 p.i.. A partir de ese momento, los cultivos V3 produjeron virus en forma cíclica y con títulos bajos, con picos a los 60 y 115 días p.i. de 10^4 UFF/ml (Fig. 19). En el caso de V7 también se detectó virus hasta los 30 días p.i.. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrió con la cepa parental, no volvieron a producir infectividad en etapas posteriores (Fig. 19).

La ausencia de infectividad en los sobrenadantes de V7 después del día 30 p.i. podría sugerir que las células infectadas con Cl67 hubiesen superado por completo la infección. Sin embargo, cuando se investigó la susceptibilidad de V7 y V3 a la sobreinfección con XJC13 o Cl67 se encontró que, tanto V7 como V3, eran resistentes al desafío con VJ, ya sea mediante ensayos de plaqueo directo o por cuantificación del rendimiento viral luego de la reinfección de cultivos persistentemente infectados. Tanto V3 como V7, resistieron el desafío con el virus homólogo y con virus heterólogo relacionado, tal es el caso de la infección de V7 con XJC13 y de V3 con Cl67, pero resultaron sensibles frente al desafío con un virus heterólogo perteneciente a otra

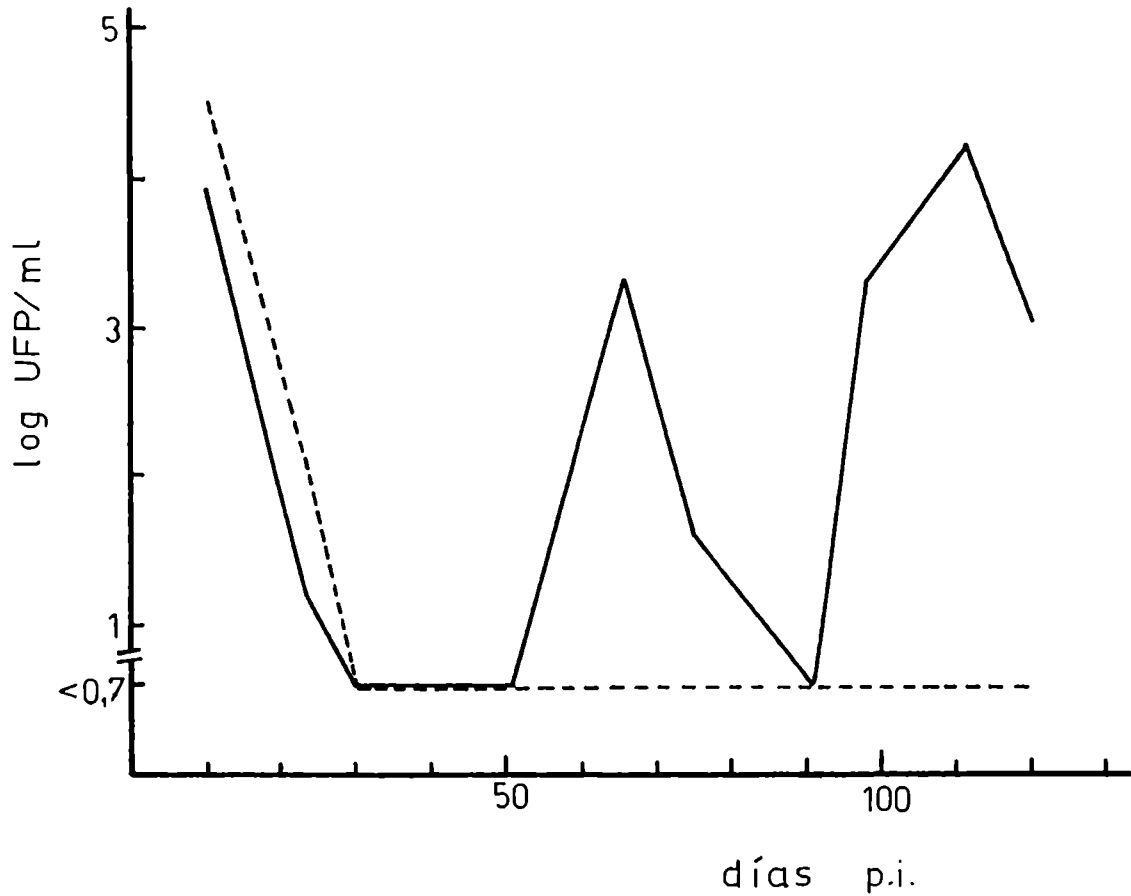


Figura 19. Producción viral de células Vero persistentemente infectadas con XJC13 o C167.

Células Vero se infectaron a una m.i. de 1 UFP/cél con XJC13, V3 (—) o C167, V7 (----) y se incubaron a 37°C con cambios semanales de medio hasta los 30 días p.i.. A partir de ese momento se subcultivaron semanalmente. Los sobrenadantes se cosecharon periódicamente y se titularon por UFP en células Vero.

familia como es VSV (Fig. 20).

En base a los resultados expuestos se concluye que las células Vero infectadas con C167 son capaces de desarrollar persistencia, tal como ocurre con la cepa parental y que dicha condición se pone de manifiesto por la resistencia a la sobreinfección con C167 y XJC13.

2) Cultivos de embrión de ratón:

Cultivos ER infectados con XJC13 o C167 se mantuvieron por repiques espaciados, denominándoselos ER3 y ER7, respectivamente. Los cultivos ER3 continuaron produciendo virus luego de lo que podría denominarse etapa aguda, ya que en estas células, al no producirse ACP, la delimitación temporal de dicha etapa no es precisa. Los mayores títulos de infectividad se alcanzaron entre los días 45 y 60 p.i. con valores que oscilaron alrededor de 10^4 UFP/ml, para decaer a partir del día 70 p.i. y volver a aumentar al día 110 p.i. (Fig. 21). Por el contrario, en los sobrenadantes de los cultivos ER7 no pudo detectarse infectividad en ningún momento (Fig. 21).

Cuando ER3 fue sometido a un ensayo de desafío, se comprobó resistencia a la sobreinfección con XJC13 y susceptibilidad frente a la multiplicación de VSV, mientras que ER7 resultó sensible a ambos (Fig. 22). En estos cultivos no se ensayó la replicación de C167 debido a la restricción en el crecimiento que la mutante presentó en las células de origen murino.

En consecuencia puede considerarse a ER3 como un cultivo persistentemente infectado, tanto por la producción prolongada de virus como por la resistencia que ofreció a la replicación de la cepa parental. Por el contrario, ER7 se comportó como un cultivo de células sanas permitiendo la replicación de XJC13. De esta manera se comprobó la incapacidad de C167 para infectar los cultivos murinos, hecho reflejado en la ausencia de infectividad en los sobrenadantes de ER7 y en la susceptibilidad de dichos

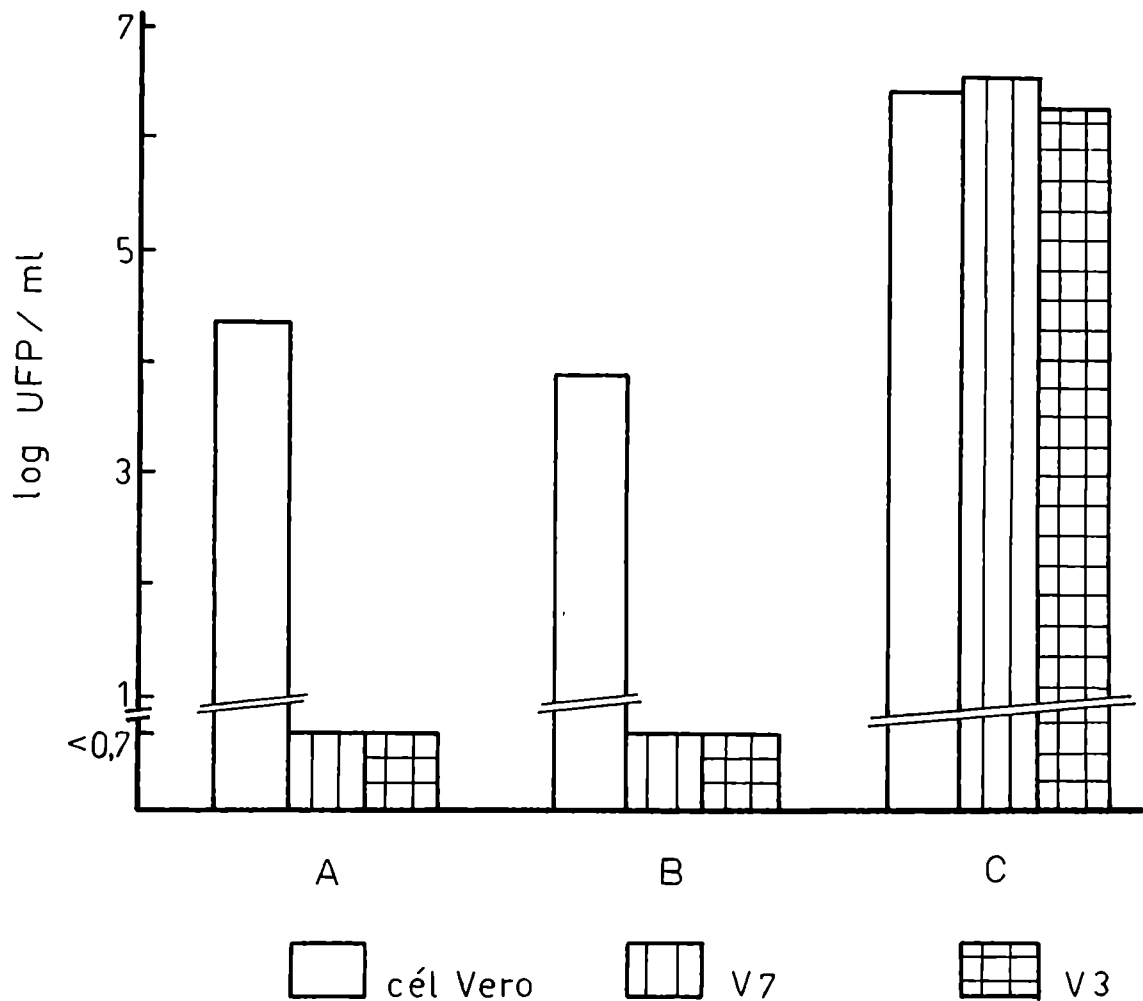


Figura 20. Multiplicación de virus homólogo y heterólogo en cultivos de células Vero infectados persistentemente con XJC13 o C167.

Cultivos V3 y V7 se infectaron a los 150 días p.i. con XJC13 (A), C167 (B), y VSV (C) a una m.i. de 0,01 UFP/cél y se incubaron a 37°C. A los 2 días post-sobreinfección se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por UFP en células Vero. Como controles se utilizaron cultivos de células Vero que se infectaron de la misma forma que los anteriores.

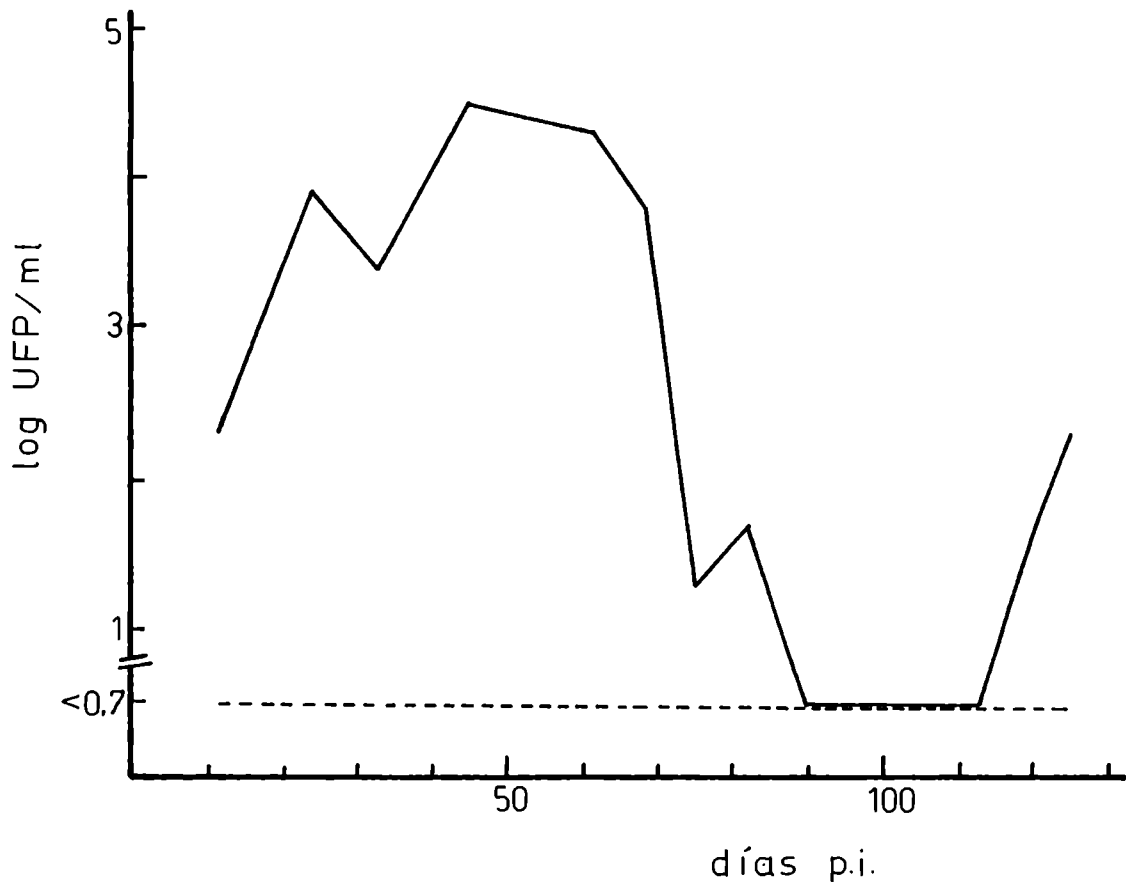


Figura 21. Producción viral de cultivos de embrión de ratón persistentemente infectados con XJC13 o C167.

Cultivos ER se infectaron con XJC13, ER3 (———) o C167, ER7 (- - - - -) a una m.i. de 1 UFP/cél y se incubaron a 37°C con cambios semanales de medio de cultivo hasta los 30 días p.i.. A partir de ese momento se subcultivaron cada 20-25 días. Los sobrenadantes se cosecharon periódicamente y se titularon por UFP en células Vero.

cultivos frente a la multiplicación de un virus antigénicamente relacionado, como es su cepa parental XJC13.

3) Cultivos de embrión de Calomys musculinus:

En células EC infectadas con XJC13 (EC3) o con C167 (EC7), luego de transcurrida la etapa aguda de la infección, los cultivos continuaron produciendo virus, alcanzando picos de infectividad similares alrededor del día 50 y 100 p.i. tanto para EC3 como EC7 (Fig. 23). La producción viral en EC7 recién decayó al día 120 p.i. sin volverse a detectar infectividad hasta el fin del experimento al día 150 p.i. (Fig. 23).

Por lo tanto, a diferencia de lo que ocurrió durante la etapa aguda de la infección, la persistencia de XJC13 y C167 en cultivos de embrión de C.m. presentó características similares para ambos virus con producción viral a títulos relativamente altos durante períodos prolongados.

En conclusión, XJC13 fue capaz de inducir persistencia en los tres tipos de cultivos ensayados, mientras que C167 sólo originó infecciones persistentes en células Vero y EC.

IV) ETAPAS DEL CICLO DE MULTIPLICACION DE XJC13 Y C167.

A fin de determinar a que nivel se encuentra el bloqueo que impide la replicación de C167 en las células murinas se decidió analizar en detalle las distintas etapas del ciclo de multiplicación de la mutante y la cepa parental en cultivos primarios de embrión de ratón, comparativamente con células Vero.

a) Síntesis de proteínas virales:

El primer evento del ciclo de multiplicación que se estudió fue la síntesis de proteínas, con el objeto de ubicar temporalmente al defecto como temprano o tardío. A tal fin, se infectaron células Vero y ER con XJC13 o C167 y a distintos días

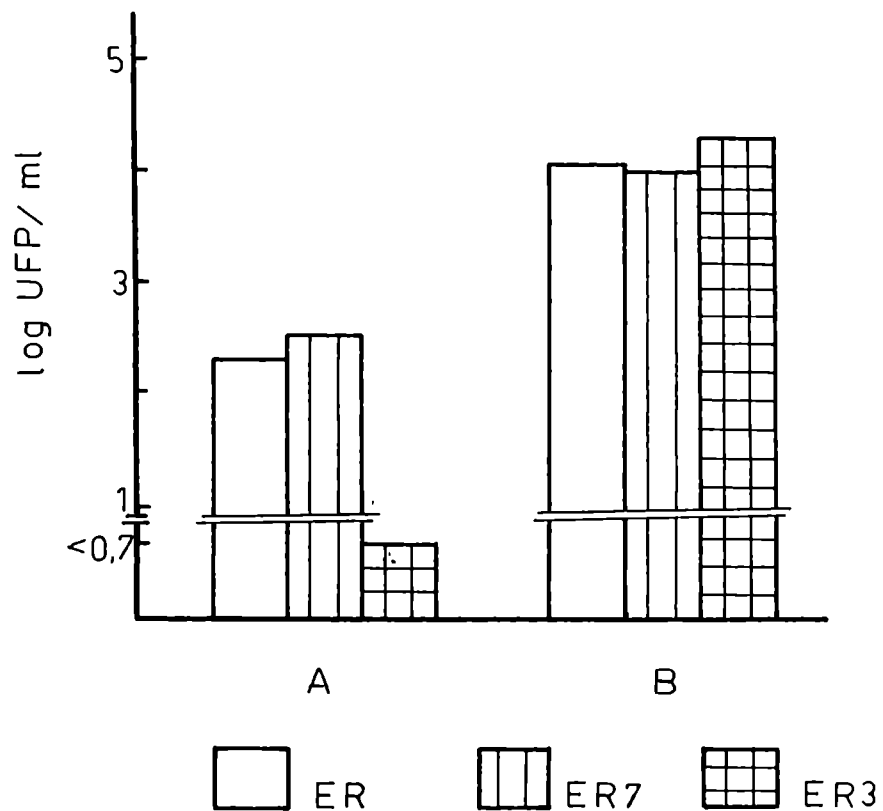


Figura 22. Multiplicación de virus homólogo y heterólogo en cultivos de embrión de ratón infectados persistentemente con XJC13 o C167.

Cultivos ER3 y ER7 se infectaron a los 100 días p.i. con XJC13 (A) o VSV (B) a una m.i. de 1 UFP/cél y se incubaron a 37°C. A las 24 h post-sobreinfección en el caso de VSV o 48 h en el caso de XJC13 se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por UFP en células Vero. Como controles se utilizaron cultivos ER que se infectaron de la misma forma que los anteriores.

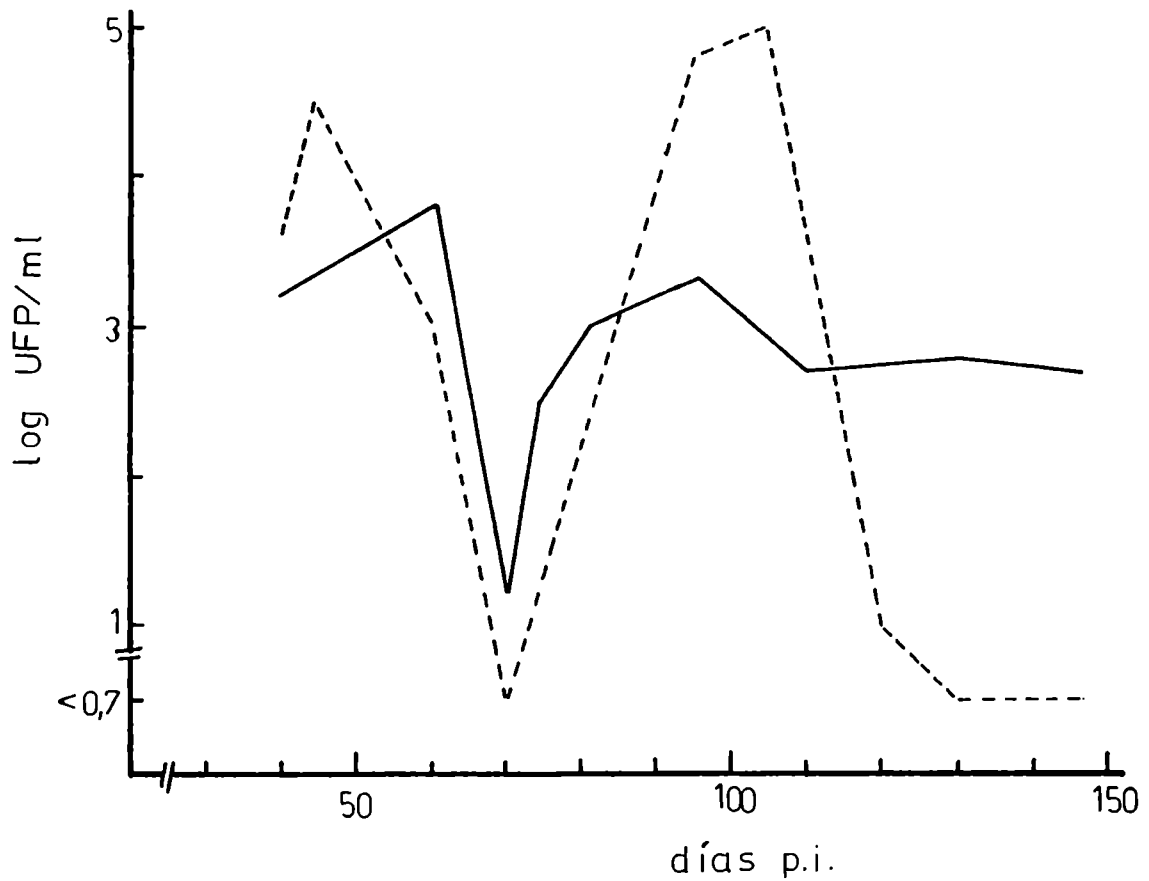


Figura 23. Producción viral de cultivos de embrión de Calomys musculus persistentemente infectados con XJC13 o C167.

Cultivos EC se infectaron con XJC13, EC3 (———) o C167, EC7 (- - - - -) a una m.i. de 1 UFP/cél y se incubaron a 37°C con cambios semanales de medio hasta los 30 días p.i.. A partir de ese momento se subcultivaron cada 20-25 días. Los sobrenadantes se cosecharon periódicamente y se titularon por UFP en células Vero.

p.i. se marcaron las proteínas mediante un pulso de ^{35}S -metionina. Las proteínas virales se inmunoprecipitaron del lisado celular y se separaron en geles de poliacrilamida con SDS, revelándolas por fluorografía.

En células Vero se observaron los principales polipéptidos descritos para células infectadas con VJ (42,69): GPC, precursor de las glicoproteínas de 64-67 KDa; NP, nucleoproteína de 60-64 KDa; GP1, glicoproteína de 45-50 KDa; GP2 o GP38, glicoproteína de 36-38 KDa. Además aparecen bandas de menor PM (18-25 KDa) que han sido descritas como productos de degradación de NP (42).

En este sistema existe comigración de GPC y NP debido a la similitud que presentan en sus PM, pudiéndose observar en la zona de 64-68 KDa una banda ancha que a veces llega a resolverse como un doblete (Fig. 24).

Para ambos virus tanto la cinética de aparición como la abundancia relativa de las distintas proteínas (inferida de acuerdo a la intensidad de la banda respectiva) resultaron similares, detectándose una leve diferencia al día 3 p.i. en el que aparece disminuida la proporción de NP correspondiente a C167 respecto de XJC13, ocurriendo para GP38 el caso inverso (Fig. 24). Las movilidades electroforéticas de las distintas proteínas coinciden para los dos virus.

Cuando este experimento se realizó utilizando ER como sustrato celular, no se pudo detectar síntesis de proteínas virales en los cultivos infectados con la mutante, ni aún en los marcados al día 3 p.i. (Fig. 25). La síntesis proteica en el caso de ER infectados con XJC13 se puso de manifiesto a través de la aparición de una banda intensa en la posición correspondiente a NP y GPC, tanto al día 2 como 3 p.i. (Fig. 25).

En la zona de PM menores no apareció ninguna de las bandas esperadas correspondientes a las glicoproteínas virales. Este hecho puede explicarse teniendo en cuenta que, a pesar de que XJC13 es capaz de crecer en este tipo celular, la eficiencia del proceso sería menor cuando se lo compara con el crecimiento en

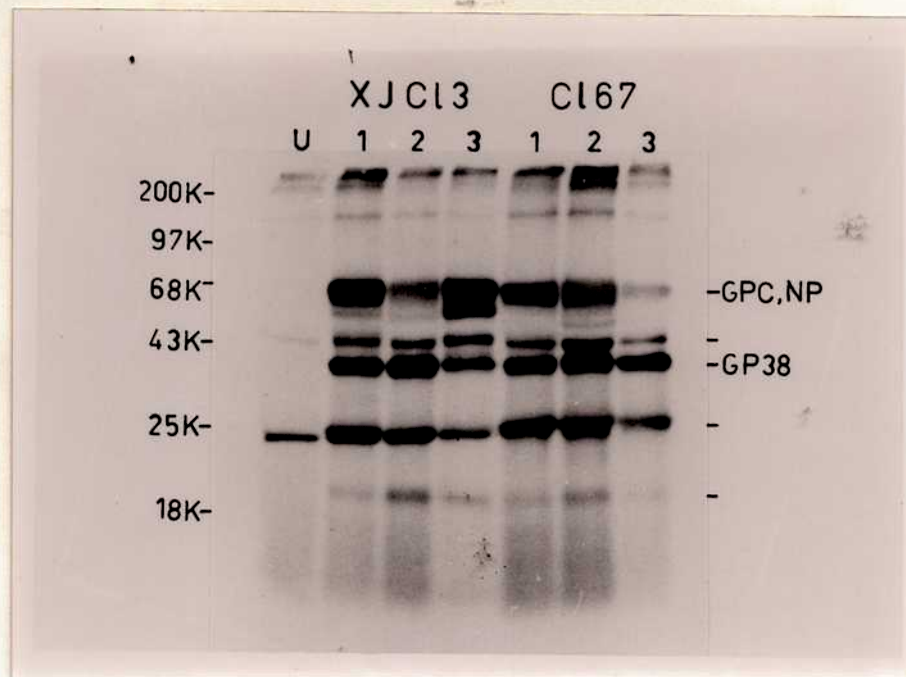


Figura 24. Síntesis de proteínas virales en células infectadas con XJC13 o C167.

Cultivos de células Vero se infectaron con XJC13 o C167 a una m.i. de 1 UFP/cél. A distintos tiempos p.i. las células se marcaron con ^{35}S -met. Las proteínas virales se inmunoprecipitaron y se separaron por PAGE-SDS, revelándose por fluorografía.

U: control de células sin infectar, 1: 24 h p.i., 2: 48 h p.i., 3: 72 h p.i.. En la fotografía, además de GPC, NP y GP38, se muestra la ubicación de GP1 (45-50 KDa) y de las proteínas de menor PM (18-25 KDa).

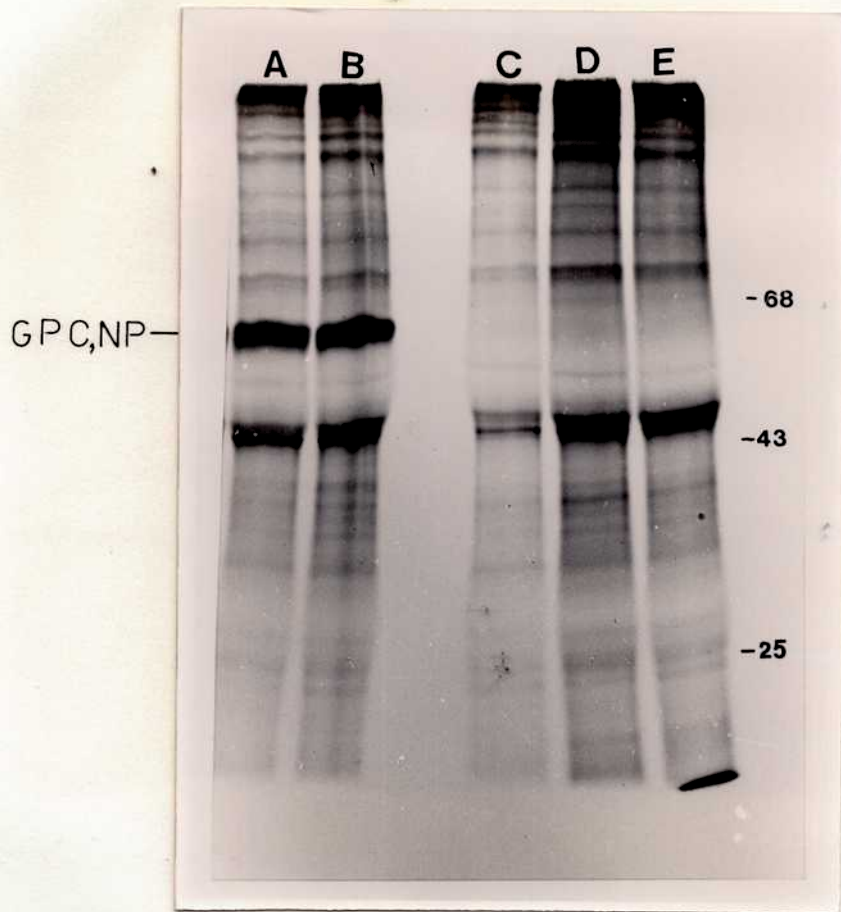


Figura 25. Síntesis de proteínas virales en células ER infectadas con XJC13 o C167.

Células ER se infectaron con XJC13 o C167 a una m.i. de 1 UFP/cél. A distintos tiempos p.i. las células se marcaron con ^{35}S -met. Las proteínas virales se inmunoprecipitaron y se separaron por PAGE-SDS revelándose por fluorografía.

A: XJC13 48 h p.i., B: XJC13 72 h p.i., C: control de células sin infectar, D: C167 48 h p.i., E: C167 72 h p.i..

células Vero, detectándose en consecuencia solamente las proteínas más abundantes, que en este caso son la nucleoproteína y GPC.

La ausencia de síntesis proteica en el caso de ER infectados con C167 indicó que este paso, o uno anterior en el ciclo de multiplicación, sería el responsable de la restricción en la replicación de la mutante en las células de ratón.

b) Adsorción:

Cuando se estudió la adsorción de XJC13 y C167 a células Vero, midiendo la infectividad asociada a los cultivos luego de distintos tiempos de contacto entre el virus y las células a 4°C, se comprobó que dicho proceso ocurría rápidamente mostrando dependencia del tiempo y saturabilidad, tanto para XJC13 como para C167 (Fig. 26). Los niveles de infectividad adsorbida a estas células fueron similares para ambos virus (Fig. 26).

En el caso de utilizar ER, la cepa parental se comportó del mismo modo que en células Vero. Sin embargo, la cantidad de infectividad adsorbida de C167 fue significativamente inferior a la correspondiente a XJC13. Esta diferencia de virus adsorbido, entre la mutante y la cepa parental, llegó a ser de 1,5 log a los 60 min de adsorción (Fig. 26).

Resultados similares se obtuvieron cuando se midió la unión de virus purificado y marcado radioactivamente con ^{125}I a ambos cultivos. En este tipo de ensayo es posible descartar los efectos sobre la actividad biológica del virus, que pudieran surgir a causa de la interacción con el receptor, de forma tal de estudiar solamente la adsorción desde un punto de vista físico a través del reconocimiento receptor-proteína viral. En estas condiciones la radioactividad asociada a células Vero luego de 30 min de adsorción a 4°C fue similar para ambos virus. Por el contrario en el caso de ER los niveles de unión de C167 resultaron inferiores en un 60% respecto de XJC13 (Fig. 27).

Este impedimento parcial en la adsorción de C167 a ER podría

- Resultados -

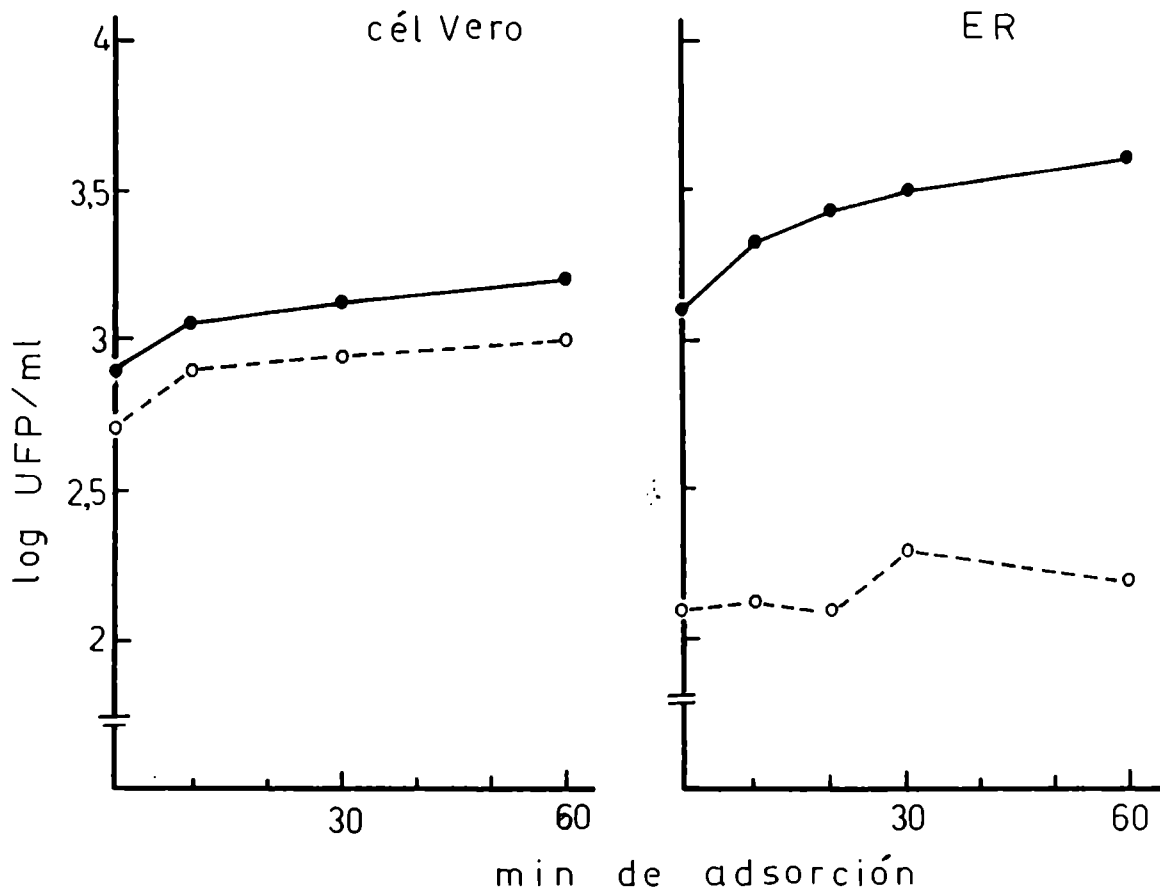


Figura 26. Adsorción de XJC13 y C167 a células Vero y ER. Células Vero o ER se infectaron con XJC13 (●—●) o C167 (○---○) a una m.i. de 1 UFP/cél. El inóculo se dejó adsorber por distintos tiempos a 4°C luego de lo cual se determinó la infectividad asociada a los cultivos celulares.

- Resultados -

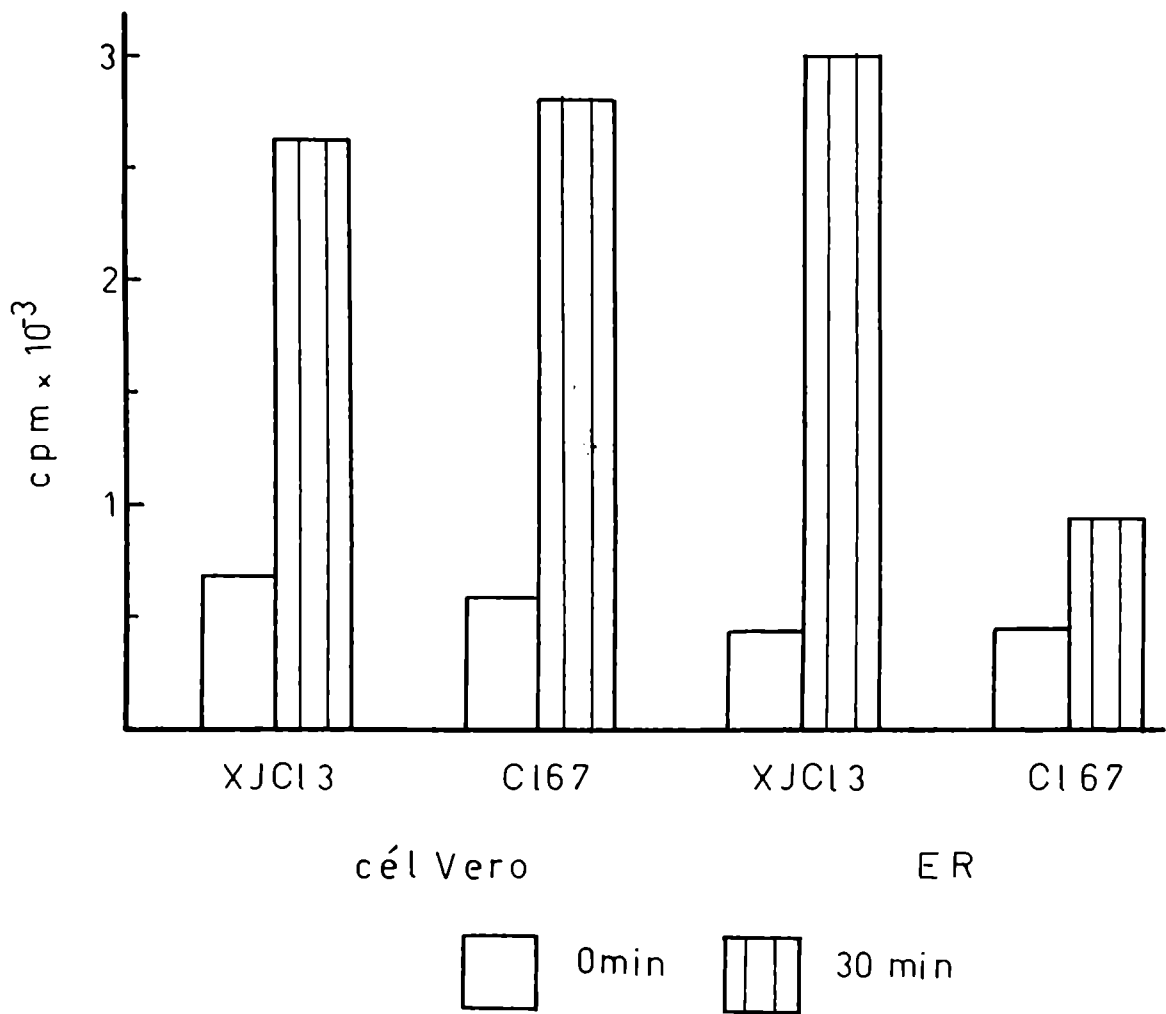


Figura 27. Unión de XJCl3 y Cl67 marcados con ¹²⁵I a células Vero y ER.

Monocapas de células Vero o ER se infectaron con 200000 cpm de virus purificado y marcado con ¹²⁵I. Los inóculos se dejaron adsorber por 0 o 30 min a 4°C, cuantificándose luego de cada tiempo la radioactividad asociada a los cultivos.

justificar la restricción en la replicación de la mutante en dichas células.

c) Penetración:

El bloqueo en la adsorción de C167 a las células murinas llevó al estudio del paso siguiente en el ciclo de multiplicación con el fin de corroborar si la internalización del virus se encontraba efectivamente anulada por la falta de unión del mismo a la célula.

La penetración de la mutante y del virus parental a células Vero y ER se cuantificó a través de la cantidad de centros infecciosos (CI) no neutralizables por antisuero específico presentes en los cultivos infectados. Transcurrida la etapa de adsorción (30 min a 4°C) y luego de 60 min a 37°C la cantidad de virus penetrado a células Vero fue similar para XJCl3 y C167, por el contrario, en ER sólo el virus parental fue capaz de ser internalizado mientras que de la mutante no se pudieron detectar CI (Tabla 6).

Estos resultados demuestran que el bloqueo en la adsorción de C167 a células murinas es el principal factor responsable de la restricción en la multiplicación de la mutante, lo que se traduce en una falta total de penetración del virus a la célula.

V) CARACTERIZACION DE LA GLICO- PROTEINA DE SUPERFICIE GP38.

La atenuación de C167 para el ratón lactante se correlacionó in vitro con su inhabilidad para crecer en cultivos celulares de origen murino debida a un bloqueo en las etapas de adsorción / penetración en el ciclo de multiplicación.

Este bloqueo, responsable en último término de las propiedades mencionadas, podría involucrar, a nivel molecular, una alteración en el reconocimiento o unión del receptor celular a la proteína viral externa responsable de llevar a cabo dicha

Virus	Centros infecciosos (CI/ml)	
	c. Vero	ER
XJC13	$7,30 \cdot 10^2$	$1,02 \cdot 10^3$
C167	$1,14 \cdot 10^3$	<5

Tabla 5. Penetración de XJC13 y C167 a células Vero y ER.

Cultivos de células Vero o ER se infectaron con XJC13 o C167 a una m.i. de 0,5 UFP/cél, dejando adsorber el virus durante 1 h a 4°C. Luego de la adsorción los cultivos se llevaron a estufa durante 1 h a 37°C. El virus no adsorbido y el adsorbido pero no penetrado se neutralizó con antisuero específico. El virus internalizado se midió por un ensayo de centros infecciosos en células Vero.

interacción. Por este motivo, se encararon estudios tendientes a dilucidar si el fenotipo alterado de C167 se correlacionaba con algún cambio a nivel de la principal glicoproteína de superficie, es decir GP38.

a) Reactividad cruzada de XJC13 y C167 por neutralización:

Estudios previos identificaron a GP38 como el blanco principal hacia el cual están dirigidos los anticuerpos neutralizantes (35). A fin de detectar alguna alteración antigénica en GP38 se efectuaron reacciones de neutralización cruzada con sueros hiperinmunes de cobayo contra XJC13 y C167. Esta metodología ha permitido diferenciar y clasificar diversas cepas de VJ (24).

Los resultados demostraron que los sueros obtenidos con XJC13 y con C167 fueron capaces de neutralizar ambos virus, lográndose títulos semejantes tanto contra el virus homólogo como contra el heterólogo (Tabla 7).

El hecho de que el inmunosuero reconozca con la misma eficiencia al virus que lo originó como al otro indica que, de existir diferencias antigénicas entre GP38 del virus parental y de la mutante, las mismas no se pondrían en evidencia a través de la reactividad de la glicoproteína con sueros policlonales.

b) Movilidad electroforética de GP38:

Cuando se estudió la cinética de síntesis de proteínas virales en células Vero infectadas con XJC13 o C167 no se observaron diferencias en la movilidad electroforética de la GP38 de ambos virus (Fig. 24).

El mismo resultado se obtuvo cuando el análisis de GP38 se llevó a cabo en viriones purificados y marcados externamente con ^{125}I . Como puede observarse en la figura 28, la posición de la glicoproteína fue la misma para ambos virus indicando que poseen el mismo PM o lo suficientemente cercano como para no mostrar una movilidad electroforética diferencial.

Virus	Antisuero XJC13	Antisuero C167
XJC13	400	100
C167	450	100

Tabla 7. Neutralización cruzada de XJC13 y C167.

Diluciones de inmunosueros de cobayo antiXJC13 y antiC167 se enfrentaron con 100 DICT₅₀ de los respectivos virus. Las mezclas se dejaron reaccionar por 1 h a 37°C cuantificándose luego la infectividad residual de cada una en células Vero por ACP. El título del suero se expresó como la inversa de la máxima dilución que protegió al 50% de las monocapas celulares de la acción citopatogénica del virus.

En conclusión, mediante el empleo de la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS no fue posible detectar diferencias entre XJC13 y C167 a nivel de la glicoproteína de superficie.

c) Análisis de GP38 por mapeo peptídico:

La técnica de proteólisis parcial aplicada a proteínas virales resulta particularmente útil para distinguir proteínas pertenecientes a distintas cepas de virus y cuyas diferencias son demasiado pequeñas como para reflejarse en cambios de PM. Se inició entonces un estudio de GP38 de XJC13 y C167 mediante un mapeo peptídico por proteólisis parcial a fin de encontrar diferencias sutiles no manifestadas cuando se analizó la movilidad electroforética de las mismas.

Las proteínas virales marcadas con ^{35}S -met se resolvieron por PAGE-SDS. La porción del gel que contenía la banda correspondiente a GP38 se sometió a la acción enzimática de ficina, papaína o proteasa XXIII de Aspergillus oryzae, separando los fragmentos obtenidos por la técnica habitual de electroforesis.

Cuando se empleó la proteasa XXIII, los polipéptidos resultantes se visualizaron como 4 bandas que resultaron similares en movilidad y abundancia relativa tanto para XJC13 como para C167 (Fig 29).

El tratamiento de GP38 con ficina reveló 5 fragmentos, de los cuales la banda más abundante presentó una leve diferencia de movilidad de acuerdo a si GP38 provenía del virus parental o de la variante (Fig 29).

Las mayores diferencias se obtuvieron cuando se utilizó papaína, ya que los 2 polipéptidos más livianos, obtenidos como producto de digestión de GP38 con la enzima, migraron como un doblete con diferente movilidad según si GP38 provenía de XJC13 o C167 (Fig 29).

Estas diferencias se confirmaron cuando se aumentó al doble



Figura 28. Movilidad electroforética de GP38 de viriones purificados y marcados con ^{125}I .

Virus purificado y marcado con ^{125}I se disoció y las proteínas virales se resolvieron por PAGE-SDS, revelándose por fluorografía. A: blanco de la reacción de iodación sin virus, B: C167, C: XJC13.

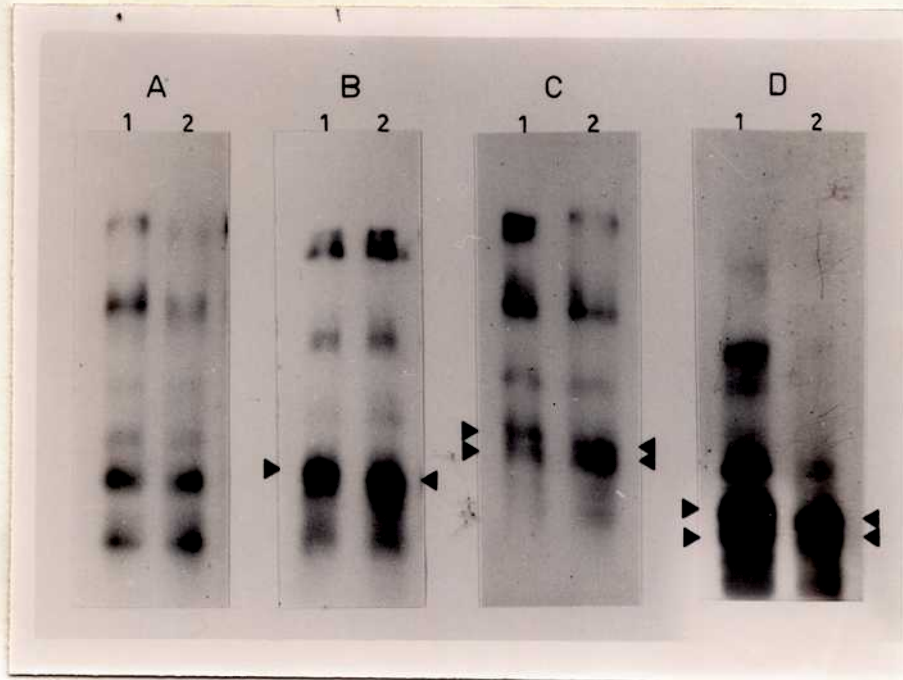


Figura 29. Mapeo peptídico de GP38 por proteólisis parcial. GP38 aislada a partir de células Vero infectadas con XJC13 (1) o Cl67 (2) se sometió a proteólisis parcial por acción de proteasa XXIII de Aspergillus oryzae (A), ficina (B) o papaína (C) a una concentración de 50 µg/ml y papaína (D) a una concentración de 100 µg/ml. Los fragmentos peptídicos obtenidos se separaron por PAGE-SDS y se revelaron por fluorografía. En la fotografía se indican las bandas que presentaron diferencias de movilidad entre ambos virus.

la concentración de papaína en el ensayo. Se obtuvo entonces gran cantidad de los fragmentos más livianos debido a la mayor actividad de la enzima y las alteraciones en movilidad se evidenciaron claramente (Fig 29).

Por lo tanto, las diferencias en movilidad de los fragmentos peptídicos más livianos obtenidos por proteólisis parcial de GP38 ya sea con ficina o papaína indican una diferencia estructural en esta glicoproteína de acuerdo a si la misma pertenece a XJC13 o C167.

D I S C U S I O N

A través de la caracterización biológica y bioquímica de la mutante de VJ denominada Cl67, realizada en forma comparativa con la de su cepa parental XJC13, han podido establecerse las bases de su atenuación en virulencia para ratón lactante. Dicho fenotipo es propio y singular de Cl67, ya que tanto la cepa parental como el resto de los aislamientos de VJ, de campo o laboratorio, realizados hasta el presente, resultaron sumamente virulentos para este hospedador.

Este comportamiento in vivo está basado en su condición de mutante de rango de hospedador, demostrada a través de los estudios realizados in vitro. Las curvas de crecimiento de ambos virus mostraron que mientras XJC13 fue capaz de replicar en cultivos celulares de distintos orígenes alcanzando niveles de infectividad variables que dependían del tipo de cultivo ensayado, Cl67 presentó patrones de crecimiento restringido cuando se utilizaron células de ratón o de Calomys musculinus como sustrato de replicación (Fig 12-18). Es así que, de acuerdo a la susceptibilidad frente a la infección con la mutante, los cultivos celulares pueden ser clasificados en tres grupos: a) susceptibles, tal es el caso de las células Vero (mono) en las que la mutante replica en forma similar a XJC13 (Fig 12); b) parcialmente susceptibles, como los cultivos primarios de riñón y de embrión de Calomys musculinus, donde multiplica alcanzando títulos menores que su cepa parental (Fig 17,18) y c) restrictivos, los cultivos primarios de células de ratón donde la multiplicación es mínima o nula (Fig 13-16). Por lo tanto, la restricción en la replicación de Cl67 en cultivos murinos fue la clave para analizar la alteración en su patogenicidad para ratón. De todas formas, esta relación entre el comportamiento in vitro e in vivo debió confirmarse a través del estudio de las características de la infección de este animal con la mutante, ya que por ejemplo en el caso de LCMV las cepas denominadas dóciles, es decir aquellas de menor virulencia, replicaron en cerebro a títulos mayores que las agresivas, demostrando que la conexión

entre una replicación disminuída y la atenuación en virulencia no siempre es válida (59).

El comportamiento de Cl67 se comprobó en las tres cepas de ratones que fueron ensayadas: OF1 (exocría), BALB/cJ (H2^d) y C3H/HeJ (H2^k), resultando esta última ligeramente más sensible que las dos primeras (Tablas 3,4 y Fig 3). La independencia entre cepa murina y virulencia sugiere que el contenido genético del hospedador no tiene mayor influencia en la infección producida por Cl67, a diferencia de lo que sucede con LCMV (87), virus Polio (62) o virus de la hepatitis murina (121), casos en los que de acuerdo a la cepa de ratones empleada se producen variaciones de la patogenia.

Los estudios de infección experimental del ratón lactante inoculado por vía i.c. con la cepa XJ de VJ demostraron que la muerte de los animales ocurre a consecuencia del conflicto inmunológico que se establece entre los tejidos infectados y una reacción de hipersensibilidad retardada contra los mismos. A esta conclusión se llegó a través de los experimentos realizados al suprimir la respuesta de linfocitos T, ya sea por timectomía, suministro de suero antitimocito o empleo de ratones genéticamente atímicos, casos en los que la mortalidad se reducía considerablemente respecto de aquéllos que mantenían una respuesta T normal (118). Hasta el presente, este mecanismo se creía válido para todas las cepas del VJ, sin embargo, recientemente se ha reportado que la infección de ratones atímicos con la cepa XJC13, conduce a una mortalidad similar a la de controles eutímicos, planteándose en consecuencia la necesidad de postular una hipótesis de patogénesis alternativa (122). Para analizar el comportamiento in vivo de la mutante debe considerarse que la inoculación de ratones lactantes por vía i.c. con Cl67 puede conducir a una infección subclínica o producir una escasa mortalidad según sea la dosis empleada (Fig 2), aunque en ambos casos los niveles de infectividad encontrados en cerebro, más bajos y retrasados respecto de los de XJC13, son similares

(Fig 4). Aceptando la hipótesis de la patogenicidad mediada por el conflicto inmune, la reducida cantidad de antígeno presente en el cerebro de estos animales, durante la primera semana p.i. (Fig 4), podría ser el factor responsable de la sobrevida de los mismos, pues el daño producido por la reacción de hipersensibilidad sería mínimo. Sin embargo, entre la segunda y tercera semana p.i., el nivel de infectividad en este órgano aumenta hasta títulos de 10^8 UFP/g cerebro (Fig 4). La cantidad de antígeno presente en ese momento podría ser entonces suficiente para causar la patología, razón por la cual debe postularse otro mecanismo que aparezca con el tiempo y que explique el cambio en el curso de la enfermedad. Uno de los factores principales a tener en cuenta es la maduración del sistema inmune del ratón con la edad, lo que permitiría el desarrollo de una actividad T'supresora (22) o de un mecanismo de defensa humoral más eficiente (12,73), superando de esta forma el conflicto inmune. Por otro lado, el hecho de que la mortalidad no esté relacionada con la cantidad de virus en cerebro pero sí dependa de la dosis inoculada sugiere la necesidad de superar un umbral de infectividad necesaria para desencadenar la patología, por debajo del cual el sistema inmune no podría ser estimulado.

Para las cepas XJ y XJC13 se ha encontrado que la supervivencia de los animales infectados, manifestada al inocular ratones de menos de 24 h de edad con altas dosis de virus, se relaciona con una infección temprana del timo (20). Este no es el caso de los ratones infectados con C167, ya que luego de la inoculación en cerebro, no resulta posible recuperar virus a partir del timo (Fig 5). Asimismo, la ausencia de infectividad en hígado, riñón, bazo y células peritoneales (Fig 5,7), sumada a la falta de patogenicidad de la mutante al emplear la vía i.p., permite descartar su condición de variante viscerotrópica, tal como se ha descrito para algunos aislamientos de LCMV (55).

El hecho de no encontrar virus en los órganos periféricos

del ratón en el período ensayado, es decir durante las tres primeras semanas p.i., podría explicarse en base al retraso en la multiplicación de Cl67 en el cerebro del animal (Fig 4), lo que provocaría una viremia y posterior dispersión muy tardía. De todas formas, la restricción en el crecimiento de la mutante en células murinas, sería causa suficiente como para bloquear la eventual replicación del virus que, proveniente del cerebro, alcanzara el resto de los órganos. Esta hipótesis se sustenta en el hecho de que el virus recuperado a partir de cerebro a las tres semanas p.i. sigue comportándose como atenuado para ratón y por lo tanto es de esperar que también experimente la misma restricción que el virus original. Del mismo modo, la capacidad de Cl67 para crecer en el cerebro del ratón tiene su contrapartida en los estudios in vitro, ya que los cultivos primarios de cerebro de ratón lactante resultaron menos restrictivos para la mutante que los fibroblastos de embrión.

La producción de interferón durante la etapa aguda de una infección viral contribuye, en gran medida, a superar la patología de la misma (52,53). Sin embargo, ésta no es la situación para los arenavirus, ya que la administración de IFN no logró modificar el curso de la enfermedad, tanto de cobayos inoculados con el virus Pichindé (67) como de ratones infectados con LCMV (96). En estos últimos, también se estudió la producción endógena de IFN en relación con la virulencia de la cepa ensayada. Fue así que se encontró que para ratones inoculados a las 3-4 semanas de edad aparecía una asociación directa entre los niveles de IFN en suero y la severidad de la patología (59). Por el contrario, en animales de 6-10 semanas de edad no se manifestó relación alguna entre los niveles de IFN ácido resistente con la docilidad o agresividad de la cepa empleada (66). En el caso de los ratones lactantes inoculados con Cl67 se descartó la participación del IFN en la disminución de los niveles de infectividad presente en dichos animales, pues solamente en los ratones infectados con XJC13 se detectó IFN en suero (Tabla 5).

La escasa replicación de la mutante in vivo sería entonces la causa más probable de la ausencia de una respuesta de IFN y no una consecuencia de la producción aumentada del mismo.

La infección de los ratones inoculados con dosis subletales de Cl67 se comprobó por la replicación de virus en cerebro (Fig 4), por la presencia de anticuerpos neutralizantes específicos, detectados en circulación a partir de los 30 días p.i. (Fig 9) y por la protección que dichos animales experimentaron al ser desafiados con XJCl3 (Fig 10). Los animales preinoculados con la mutante a las 24 h de edad por vía i.c. y desafiados a los diez días p.i. por la misma vía presentaron una reducción en la mortalidad respecto de los controles sin preinocular (Fig 10). Esta protección, en la que no participaría la respuesta inmune humoral ya que se verificó antes del mes p.i., estaría dada por un fenómeno de interferencia entre ambos virus. Esta hipótesis se sustenta en el hecho de que entre preinoculación y descarga deban pasar, por lo menos, diez días para que se manifieste la resistencia, lo que demuestra la necesidad de que en el sitio de inoculación, es decir en el cerebro, se alcancen títulos significativos de Cl67 al momento de desafiar con la cepa parental (Fig 4). Teniendo en cuenta además, la falta de protección que se observa cuando la preinoculación se realiza por vía i.p. y la descarga por vía i.c. (Fig 10) puede postularse que para que la misma se produzca es necesaria la interacción temporal y espacial entre ambos virus. Sin embargo, el fenómeno de interferencia no explicaría el retraso en el día promedio de muerte que se produce en el caso de preinocular y desafiar por distintas rutas, ya que la replicación de Cl67 en las células peritoneales se encuentra bloqueada. Las muertes tardías de dichos animales se deberían entonces a otro mecanismo, propio del ratón y que podría involucrar una respuesta de inmunidad celular, disparada por el antígeno viral presente en el inóculo.

La infección subclínica de los animales inoculados con la mutante no pudo demostrarse a través del aislamiento directo de

virus en etapas tardías de la infección. Este resultado concuerda con el hecho de que Cl67 replique en forma muy restringida en los tejidos del animal, por lo que la probabilidad de producir persistencia se vería notablemente disminuída, ya que justamente los repetidos ciclos de multiplicación en un determinado sustrato favorecen el 'establecimiento' del equilibrio necesario entre célula y virus para que se produzca dicho fenómeno. Del mismo modo, cuando se estudió la etapa tardía de la infección de los cultivos de ratón con Cl67 se comprobó que dichas células no presentaban las características típicas de los cultivos infectados persistentemente, es decir producción esporádica de infectividad y resistencia a la sobreinfección con virus antigénicamente relacionado (Fig 21,22). La incapacidad de la mutante para persistir en los cultivos murinos no fue un defecto generalizado de la misma ya que las células Vero infectadas con Cl67 desarrollaron persistencia luego de transcurrida la etapa aguda de la infección (Fig 19,20). De todas maneras, no puede descartarse la posibilidad de una infección crónica de Cl67 en el ratón, demostrable a través del empleo de otras técnicas como la detección de virus en los órganos por cocultivo con células susceptibles y asimismo la presencia de antígeno o material genético viral por inmunofluorescencia, inmunomarcación o hibridización.

Otro de los modelos de infección experimental en donde Cl67 exhibió su comportamiento atenuado fue el cricétido Calomys musculinus. La infección de C.m. lactantes con una dosis alta de Cl67 llevó a una patología neurológica con mortalidad reducida respecto de XJC13 (Fig 11). Sin embargo, las diferencias en los porcentajes de mortalidad entre ambos virus fueron menores en C.m. respecto de los ratones OF1 y además no se observaron variaciones significativas en el día promedio de muerte (Fig 2,11).

Teniendo en cuenta los resultados de patogenicidad para ratón y C.m. (Fig 2,11) y las curvas de crecimiento de la mutante

in vitro en cultivos de fibroblastos de embrión derivados de ambos animales (Fig 15,17); surge una correlación entre el nivel de replicación y la virulencia en ambos sistemas. Esta asociación se manifiesta entre la mayor virulencia de Cl67 para el C.m. respecto del ratón y el carácter menos restrictivo de los cultivos de embrión de C.m. respecto de los cultivos de embrión de ratón. Asimismo en los cultivos de embrión de C.m. Cl67 fue capaz de establecer una infección persistente caracterizada por la producción de virus en forma cíclica en contraposición a lo que sucedió en cultivos ER.

Una vez establecida que la inhabilidad de Cl67 para crecer en células murinas es la causa directa de su atenuación para ratón lactante, se analizó cuál es la etapa del ciclo de multiplicación viral en la que se produce el bloqueo responsable de la restricción. En células Vero, las cinéticas de adsorción (Fig 26) y síntesis de proteínas virales (Fig 24) así como los niveles de penetración (Tabla 6) fueron similares para la mutante y su cepa parental. En cultivos primarios de embrión de ratón el comportamiento de XJC13 no se diferenció del registrado en el sistema anterior. Por el contrario, para Cl67 se manifestó una ausencia total de síntesis de proteínas virales y de virus internalizado a las células, registrándose una adsorción muy deficiente. En base a estos resultados se postula que el paso afectado en el ciclo de multiplicación de Cl67 en cultivos murinos es la adsorción del virus a la célula y que luego se traduce en un bloqueo total de los pasos siguientes. Esta hipótesis fue reafirmada a través de la medida directa de la unión de viriones purificados radioiodinados a células intactas, ya que la capacidad de unión de Cl67 a las células murinas fue muy reducida en comparación con XJC13 (Fig 27).

La alteración en una etapa temprana del ciclo de multiplicación de Cl67 como responsable de la restricción para el crecimiento de la mutante en células murinas concuerda con los resultados encontrados para otras mutantes de rango de hospedador

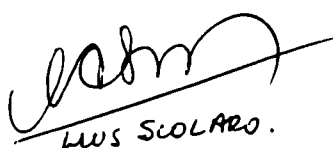
en donde la deficiencia aparece a nivel de la adsorción (17), penetración (77), una combinación entre estos dos pasos (107) o el desnudamiento (63). La adsorción es una etapa crucial en el proceso de infección y ha sido propuesta en muchas ocasiones como determinante del tropismo de un virus (68,70,72). En efecto, la posibilidad de que un determinado tejido sea infectado por un virus depende, en primera instancia, de la interacción inicial entre el receptor presente en la membrana celular y una proteína de la superficie externa del virión, denominada anti-receptor o proteína de unión. Asimismo existen numerosos ejemplos entre los virus envueltos en donde las variaciones en virulencia están asociadas con cambios en las glicoproteínas externas (32,41,61, 106). Dado que a través de estudios de marcación externa de viriones purificados se ha demostrado que GP38 es la única glicoproteína del VJ expuesta en la superficie del virión (69), en concordancia con estudios previos que la señalan como responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes (35), es probable que sea esta proteína la que actúe como anti-receptor. Por consiguiente, una alteración a nivel de GP38 de Cl67, de forma tal que la misma no pudiera adoptar la conformación adecuada como para unirse al receptor celular, podría ser la responsable de la adsorción deficiente de la mutante a células murinas lo que a su vez provocaría la alteración en patogenicidad.

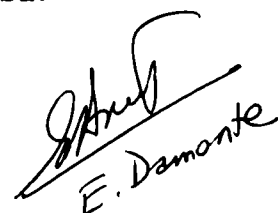
Ya que tanto la movilidad electroforética (Fig 24,28) como la reactividad cruzada frente a sueros policlonales (Tabla 7) no mostraron diferencias a nivel de GP38 entre Cl67 y XJC13, se ensayó la técnica de mapeo peptídico por proteólisis parcial a fin de detectar algún tipo de alteración en la glicoproteína. Esta metodología ha permitido en el caso de cepas de reovirus, por ejemplo, no solamente la comparación de identidad entre proteínas sino también la determinación de los dominios responsables de la unión al receptor, de la inducción de anticuerpos neutralizantes y de la reacción de hemoaglutinación

(123). En nuestro caso, el tratamiento proteolítico de GP38 produjo mapas peptídicos diferenciales entre ambos virus, con movilidad electroforética alterada en los dos péptidos de menor PM (Fig 29). Esta alteración estructural de GP38 quedó demostrada mediante el empleo de dos proteasas, ficina y papaína, las cuales presentan especificidad semejante, hidrolizando la unión peptídica que involucra el COOH de los aminoácidos Arg, Lys, Gly, y Leu. Por este motivo, evidenciaron la misma alteración en el patrón de clivaje de GP38 de la mutante y la cepa parental.

Teniendo en cuenta la adsorción deficiente de la mutante a las células murinas y el comportamiento alterado de su glicoproteína de superficie frente a la proteólisis parcial, puede concluirse que la restricción en la replicación de C167 en tejidos murinos, causa principal de su fenotipo de atenuación para ratón lactante, estaría determinada por cambios en la secuencia de aminoácidos en el dominio de GP38 responsable de la interacción con el receptor celular. De acuerdo a este modelo, podrían postularse por lo menos dos dominios de unión de GP38 de acuerdo al tipo celular: mientras que la glicoproteína de XJC13 sería capaz de unirse tanto al receptor de las células Vero como de células murinas, la perteneciente a C167 no podría hacerlo a estas últimas, debido a una alteración en la estructura del dominio correspondiente. La secuenciación de los péptidos diferenciales de GP38 en C167 y XJC13 permitirá confirmar esta posibilidad y caracterizar tanto al anti-receptor viral como al receptor celular responsables de la adsorción del virus a la célula.

Por último, cabe señalar que no puede descartarse que la alteración en virulencia de C167 no se deba exclusivamente a la variación detectada en GP38. Aún cuando los resultados obtenidos asignan a esta glicoproteína un papel preponderante en el fenómeno de atenuación, debe considerarse la posibilidad de que se hayan producido otras mutaciones, en el genoma de C167, que contribuyan a su fenotipo de menor virulencia.


Luis SCOLARO.


E. Damonte

B I B L I O G R A F I A

- 1) Ahmed R and Oldstone MBA. Organ specific selection of viral variants during chronic infection. J Exp Med 167:1719. 1988.
- 2) Ahmed R, Salmi A, Butler L, Chiller J and Oldstone MBA. Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice. J Exp Med 60:521. 1984.
- 3) Ahmed R, Simon RS, Matloubian M, Kolhekar SR, Southern PJ and Freedman DM. Genetic analysis of in vivo selected viral variants causing chronic infection: importance of mutation in the L RNA segment of lymphocytic choriomeningitis virus. J Virol 62:3301. 1988.
- 4) Alché LE and Coto CE. Antigenic variants of Junin virus isolated from infected Calomys musculus. Arch Virol 90:343-348. 1986.
- 5) Alché LE and Coto CE. Differentiation of Junin virus and antigenic variants isolated in vivo by kinetic neutralization assays. J Gen Virol 69:2123. 1988.
- 6) Atkins GJ. The avirulent A7 strain of Semliki-Forest virus has reduced citopathogenicity for neuroblastoma cells compared to the virulent L10 strain. J Gen Virol 64:1401-1404. 1983.
- 7) Auperin DD and Mc Cormick JB. Nucleotide sequence of the Lassa virus (Josiah strain) S genome RNA and aminoacid sequence comparison of the N and GPC proteins to other arenaviruses. Virology 168:421-425. 1989.
- 8) Auperin DD, Romanowski V, Galinski M and Bishop DHL. Sequencing studies of Pichinde arenavirus S RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA. J Virol 52:897-904. 1984.
- 9) Avila MM, Samoilovich SR y Weissenbacher MC. Infección del cobayo con la cepa atenuada del virus Junín XJC13. Medicina (BsAs) 39:597-603. 1979.
- 10) Barrera Oro JG and Eddy GA. Characteristics of candidate life attenuated Junin virus vaccine. 4th International Conference of Comparative Virology. Banft, Alberta, Canada. October 17-22. 1982.
- 11) Barret PN and Atkins GJ. Virulence of temperature-sensitive mutants of Sindbis virus in neonatal mice. Infect Immun 26:848-852. 1979.
- 12) Berría MI, Barrios HA, Lascano EF and Nota NR. Rescue of

Junin virus from adult mice by cocultivation procedures. *Comun Biol* 2:255-265. 1986.

13) Bishop DHL and Auperin DD. Arenavirus gene structure and organization. *Curr Top Microbiol Immunol* 133:5-18. 1987.

14) Blejer JL, Galassi NV, Nejamkis MR, Barrios H y Nota NR. Marcadores inmunológicos de atenuación en cobayos infectados con cepas o variantes del virus Junín. *Medicina (BsAs)* 41:44-52. 1981.

15) Bonner WM and Laskey RA. A film detection method for tritium labelled proteins and nucleic acids in polyacrilamide gels. *Europ J Biochem* 46:83-88. 1974.

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

17) Boyle JF, Weismiller DG and Holmes KV. Genetic resistance to mouse hepatitis virus correlates with absence of virus binding activity on target tissues. *J Virol* 61:185-189. 1987.

18) Bruns M and Lehman Grube F. Lymphocytic choriomeningitis virus. V Proposed structural arrangement of proteins in the virion. *J Gen Virol* 64:2157-2167. 1983.

19) Buchmeier MJ and Parekh BS. Protein structure and expression among arenaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 133:41. 1987.

20) Calello MA, Rabinovich RD, Boxaca MC and Weissenbacher MC. Relationship between Junin virus infection of thymus and the establishment of persistence in rodents. *Med Microbiol Immunol* 175:109-112. 1975.

21) Campetella OE, Galassi NV, San Juan N and Barrios HA. Susceptible adult murine model for Junin virus. *J Med Virol* 26:443-448. 1988.

22) Campetella OE, Barrios HA and Galassi NV. Suppressor T cell population induced by Junin virus in adult mice. *Immunology* 64:407-412. 1988.

23) Candurra NA y Coto CE. Susceptibilidad del ratón de 11 días a la infección con virus Junín propagado en distintos huéspedes. *Rev Arg Microbiol* 18:13-20. 1986.

24) Candurra NA, Damonte EB y Coto CE. Antigenic relationships between attenuated and pathogenic strains of Junin virus. *J Med*

Viol 27:145-150. 1989.

25) Carballal G, Cossio PM, Laguens RP, Ponzibio C, Oubiña J, Cabeza Meckert P, Rabinovich A and Arana RA. Junin virus infection of guinea pigs: immunohistochemical and ultrastructural studies of the hemopoietic tissue. J Infect Dis 143:1-14. 1981.

26) Cave DR, Hendrickson FM and Huang AS. Defective interfering particles modulate virulence. J Virol 55:366-373. 1985.

27) Ceriatti FS, Damonte EB y Coto CE. Inducción de mutantes termosensibles de virus Junín por efecto del 5-fluoruracilo. Rev Arg Microbiol 15:105. 1983.

28) Ceriatti FS, Damonte EB, Mersich SE and Coto CE. Partial characterization of two ts mutants of Junin virus. Microbiologica 9:343. 1986.

29) Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner HW and Laemmli UK. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulphate and analysis by gel electrophoresis. J Biol Chem 252:1103-1106. 1977.

30) Contigiani MS y Sabatini Ms. Virulencia diferencial de cepas de virus Junín por marcadores biológicos en ratones y en cobayos. Medicina (BsAs) 37, supl.3:244-251. 1977.

31) Contigiani MS y Sabatini MS. Letalidad producida por una cepa atenuada de virus Junín en ratones lactantes. Medicina (BsAs) 43:737. 1983.

32) Cordonier A, Montagnier L and Emerman M. Single aminoacid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding. Nature 340:571-574. 1989.

33) Coto CE. Junin virus. Prog Med Virol 18:127-142. 1974.

34) Coulombié FC, Alché LE, Lampuri JS and Coto CE. Role of Calomys musculinus peritoneal macrophages in age related resistance to Junin virus infection. J Med Virol 18:289-298. 1986.

35) Cresta B, Padula P and Martínez Zegovia Z. Biological properties of Junin virus proteins. I. Identification of the immunogenic glycoprotein. Intervirology 13:284-288. 1980.

36) Cheng Mayer C, Seto D, Tateno M and Levy J. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. Science 240:80-82. 1988.

- Bibliografía-

- 37) D'Aiutolo AC and Coto CE. Vero cells persistently infected with Tacaribe virus: role of interfering particles in the establishment of the infection. *Virus Res* 6:235. 1986.
- 38) Damonte EB y Coto CE. Análisis de los factores que condicionan la formación de placas en células Vero infectadas con virus Junín y Tacaribe. *Rev Asoc Arg Microbiol* 6:15-22. 1974.
- 39) Damonte EB and Coto CE. Temperature sensitivity of the arenavirus Junin isolated from persistently infected Vero cells. *Intervirology* 11:282. 1979.
- 40) Damonte EB, Mersich SE and Coto CE. Response of cells persistently infected with arenavirus to superinfection with homotypic and heterotypic viruses. *Virology* 129:474-478. 1983.
- 41) Davis NL, Fuller FJ, Dougherty WG, Olmsted RA and Johnston RE. A single nucleotide change in the E2 glycoprotein of Sindbis virus affects penetration rate in cell culture and virulence in neonatal mice. *Proc Natl Acad Sci* 83:6771-6775. 1986.
- 42) De Mitri MI and Martínez Zegovia ZM. Polypeptide synthesis in Junin virus infected BHK-21 cells. *Acta Virol* 29:97-103. 1985.
- 43) Emini EA and Wiebe ME. An attenuated mutant of Venezuelan encephalitis virus: biochemical alterations and their genetic association with attenuation. *Virology* 110:185-196. 1981.
- 44) Evans DMA, Dunn G, Minor PD, Schild GC, Cann AJ, Stanway G, Almond JW, Currey K and Maizel JV. Increased neurovirulence associated with a single nucleotide change in a non coding region of Sabin type 3 poliovaccine genome. *Nature* 314:548-550. 1985.
- 45) Field HJ and Coen DM. Pathogenicity of Herpes simplex virus mutants containing drug resistant mutations in the viral DNA polymerase gene. *J Virol* 60:286-289. 1986.
- 46) Field HJ and Wildy P. The pathogenicity of thymidine kinase-deficient mutants of Herpes simplex virus in mice. *J Hyg* 81:267-277. 1978.
- 47) Fields B and Greene M. Genetic and molecular mechanisms of viral pathogenesis: implication for prevention and treatment. *Nature* 300:19-23. 1982.
- 48) Fraizer G, Main O and Hardy J. Isolation and preliminary characterization of mutants of Western equine encephalomyelitis virus with altered virulence in chickens. *J Med Virol* 16:17-27. 1985.

- Bibliografía-

- 49) Franze Fernández MT, Zetina C, Iapalucci S, Lucero A, Bouisson C, López R, Rey O, Daheli M, Cohen GN and Zakin MM. Molecular structure and early events in the replication of Tacaribe arenavirus S RNA. *Virus Res* 7:309-324. 1987.
- 50) Giovanniello OA, Boxaca MC, Nota NR and Nejamkis MR. Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junín: enfermedad tipo. *Rev Asoc Arg Microbiol* 7:8-14. 1975.
- 51) González PH, Lampuri JS, Coto CE and Laguens RP. In vitro infection of murine macrophages with Junin virus. *Infect Immun* 35:356-358. 1982.
- 52) Gresser I, Tovey MG, Bandu MT, Maury CH and Brouty-Boye D. Role of interferon in the pathogenesis of virus diseases in mice as demonstrated by the use of anti-interferon serum. I Rapid evolution of encephalomyocarditis virus infection. *J Exp Med* 144:1305-1315. 1976.
- 53) Gresser I, Tovey MG, Maury CH and Bandu MT. Role of interferon in the pathogenesis of virus diseases as demonstrated by the use of anti-interferon serum. II Studies with Herpes simplex, Moloney sarcoma, vesicular stomatitis, Newcastle disease and Influenza viruses. *J Exp Med* 144:1316-1323. 1976.
- 54) Guerrero LB, Weissenbacher MC y Parodi AS. Inmunización contra la FHA con una cepa atenuada del virus Junín. 1. Estudio de una cepa modificada del virus Junín. Inmunización de cobayos. *Medicina (BsAs)* 29:1-5. 1969.
- 55) Hotchin J, Kinch W and Benson L. Lytic and turbid plaque-type mutants of lymphocytic choriomeningitis virus as a cause of neurological disease or persistent infection. *Infect Immun* 4:281. 1971.
- 56) Howard CR. Arenavirus replication. Perspectives in medical virology. Zuckerman AJ (ed). The Netherlands. 1986.
- 57) Iapalucci S, López N, Rey O, Zakin M, Cohen G and Franze Fernández MT. The 5' region of Tacaribe virus L RNA encodes a protein with a potential metal binding domain. *Virology* 173:357-361. 1989.
- 58) Jacobson S, Dutko F and Pfau C. Determinants of spontaneous recovery and persistence in MDCK cells infected with Lymphocytic choriomeningitis virus. *J Gen Virol* 44:113-121. 1979.
- 59) Jacobson S, Friedman RM and Pfau CJ. Interferon induction by Lymphocytic choriomeningitis virus correlates with maximum virulence. *J Gen Virol* 57:275-283. 1981.

- 60) Jacobson S and Pfau CJ. Viral pathogenesis and resistance to defective interfering particles. *Nature (London)* 283:311. 1980.
- 61) Johnson BJB, Kinney RM, Kost CL, and Trent DW. Molecular determinants of alphavirus neurovirulence: nucleotide and deduced protein sequence changes during attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus. *J Gen Virol* 67:1951-1960. 1986.
- 62) Jubelt B, Ropka S, Goldfarb S, Waltenbaugh C and Oates R. Susceptibility and resistance to poliovirus-induced paralysis of inbred mouse strains. *J Virol* 65:1035-1040. 1991.
- 63) Kooi C, Mizzen L, Alderson C, Daya M and Anderson R. Early events of importance in determining host cell permissiveness to mouse hepatitis virus infection. *J Gen Virol* 69:1125-1135. 1988.
- 64) Koolen MJM, Osterhaus ADME, Van Steenis G, Horzinek MC and Van der Zeijst BAM. Temperature - sensitive mutants of mouse hepatitis strain A59: isolation, characterization and neuropathogenic properties. *Virology* 125:393-420. 1983.
- 65) Lampuri JS, Vidal MC y Goto CE. Respuesta del Calomys musculinus a la infección experimental con virus Junín. *Medicina (BsAs)* 42:61-66. 1982.
- 66) Leist TP, Aguet M, Hassig M, Pevear DC, Pfau CJ and Zinkernagel RM. Lack of correlation between serum titres of interferon α β , natural killer cell activity and clinical susceptibility in mice infected with two isolates of Lymphocytic choriomeningitis virus. *J Gen Virol* 68:2213-2218. 1987.
- 67) Lucia HL, Coppenhaver DH and Baron S. Arenavirus infection in the guinea pig model: antiviral therapy with recombinant interferon α , the immunomodulator CL246,738 and ribavirin. *Antiviral Res* 12:279-292. 1989.
- 68) Marsh M and Helenius A. Virus entry into animal cells. *Advances Virus Res* 36:107-151. 1989.
- 69) Mersich SE, Castilla V and Damonte EB. Lectin affinity of Junin virus glycoproteins. *Ann Inst Pasteur Virol* 139:277-284. 1988.
- 70) Mims CA. Virus receptors and cell tropism. *J Infec* 12:199-203. 1986.
- 71) Minor PD, Schild GC, Cann AJ, Dunn G, Evans DMA, Ferguson M, Stanway G, Westrop G and Almond JW. Studies on the molecular aspects of antigenic structure and virulence of poliovirus. *Ann*

Inst Pasteur 137E:107-125. 1986.

72) Morishima T, Mc Clintock PR, Billups LL and Notkins AC. Expression and modulation of virus receptors on lymphoid and myeloid cells: relationship to infectivity. *Virology* 11:605-608. 1982.

73) Nejamkis MR, Giovanniello OA, Celeste F y Nota NR. Efecto de la ciclofosfamida y del suero antitimocito sobre la resistencia del ratón adulto al virus Junín. *Medicina (BsAs)* 40:31-37. 1980.

74) Nejamkis MR, Nota NR, Frigerio MJ y Carballal G. Estudios inmunológicos en Fiebre Hemorrágica Argentina experimental. IV. Acción del suero antilinfocítico en la enfermedad del cobayo. *Rev Asoc Arg Microbiol* 4:3-7. 1972.

75) Nota NR, Nejamkis MR, Frigerio MJ y Guerrero LB. Estudio de la infección experimental del ratón por virus Junín. Efecto del suero antitimocito. *Medicina (BsAs)* 33:398-403. 1973.

76) Nota NR, Nejamkis MR y Giovanniello OA. Patogenia de la encefalitis del ratón infectado por virus Junín. *Medicina (BsAs) supl.3*:114-120. 1977.

77) Olmsted RA, Baric RS, Sawyer BA and Johnston RE. Sindbis virus mutants selected for rapid growth in cell culture display attenuated virulence in animals. *Science* 225:424-427. 1984.

78) Olmsted RA, Meyer WJ and Johnston RE. Characterization of Sindbis virus epitopes important for penetration in cell culture and pathogenesis in animals. *Virology* 148:245-254. 1986.

79) Oubiña JR, Carballal G, Videla CM and Cossio PM. The guinea pig model for Argentine hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 33(6):1251-1257. 1984.

80) Peters CJ, Jahrling PB, Liu CT, Kenyon RH, Mc Kee KT and Barrera Oro JG. Experimental studies of arenaviral hemorrhagic fevers. *Curr Top Microbiol Immunol* 134:5-68. 1987.

81) Pfau CJ, Valenti JK, Jacobson S and Pevear DC. Cytotoxic T cells are induced in mice infected with Lymphocytic choriomeningitis virus strains of markedly different pathogenicities. *Infect Immun* 36:598. 1982.

82) Popescu M and Lehman Grube F. Diversity of Lymphocytic choriomeningitis virus: variation due to replication of the virus in the mouse. *J Gen Virol* 30:113. 1976.

83) Préhaud C, Coulon P, Diallo A, Martinet Edelist C and Flamand

- A. Characterization of a new temperature - sensitive and avirulent mutant of the rabies virus. *J Gen Virol* 70:133-143. 1989.
- 84) Rabinovich RD, Lascano EF y Boxaca MC. Diferentes manifestaciones clínicas del ratón lactante inoculado con distintas cepas del virus Junín. *Medicina (Bs.As.)* 43:532-540. 1983.
- 85) Rabinovich RD, Lascano EF and Boxaca MC. Modification of Junin virus neurotropism in mice by selective brain or spinal cord passaging. *Intervirology* 25:216-222. 1986.
- 86) Reed LJ and Muench HA. A simple method of estimating 50% end point. *Am J Hyg* 27:493-497. 1938.
- 87) Riviere Y. Mapping arenavirus genes causing virulence. *Curr Top Microbiol Immunol* 133:59. 1987.
- 88) Riviere Y, Ahmed R, Southern PJ, Buchmeier MJ and Oldstone MBA. Genetic mapping of Lymphocytic choriomeningitis virus pathogenicity: virulence in guinea pigs is associated with the L RNA segment. *J Virol* 55:704. 1985.
- 89) Riviere Y, Ahmed R, Southern PJ and Oldstone MBA. Perturbation of differentiated functions during viral infection in vivo. II. Viral reassortants map growth hormone defect to the S RNA of the Lymphocytic choriomeningitis virus genome. *Virology* 142: 175. 1985.
- 90) Riviere Y, Southern PJ, Ahmed R and Oldstone MBA. Biology of cloned cytotoxic T lymphocytes specific for Lymphocytic choriomeningitis virus. V. Recognition is restricted to the gene products encoded by the viral S RNA segment. *J Immunol* 136:304. 1986.
- 91) Romanowski V and Bishop DHL. The formation of arenaviruses that are genetically diploid. *Virology* 126:87. 1983.
- 92) Sabatini MS, González del Río L, Díaz G y Vega VR. Infección natural y experimental de roedores con virus Junín. *Medicina (BsAs)* 37 supl.3:149-161. 1977.
- 93) Salvato MS, Borrow P, Shimomaye E and Oldstone MBA. Molecular basis of viral persistence: a single aminoacid change in the glycoprotein of Lymphocytic choriomeningitis virus is associated with suppression of the antiviral cytotoxic T-lymphocyte response and establishment of persistence. *J Virol* 65:1863-1869. 1991.

- 94) Salvato MS and Shimomaye E. The completed sequence of Lymphocytic choriomeningitis virus reveals a unique RNA structure and a gene for a zinc finger protein. *Virology* 173:1-10. 1989.
- 95) Sammons CC and Sweet C. Isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of mouse CMV of differing virulence for 1 week-old mice. *J Gen Virol* 70:2373-2381. 1989.
- 96) Saron MF, Launay F and Guillon. Toxicité de l'acide polinosique-policitilique pour les souris infectées par le virus de la choriomeningite lymphocitaire. *Annales Virol* 131E:407-418. 1980.
- 97) Sedarati F and Stevens GJ. Biological basis for virulence of three strains of Herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 68:2389-2395. 1987.
- 98) Schmuñis G, Weissenbacher MC and Parodi AS. Tolerance to Junin virus in thymectomized mice. *Arch Ges Virusforsch* 21:200-204. 1967.
- 99) Shivaprakash M, Harnish D and Rawls W. Characterization of temperature-sensitive mutants of Pichinde virus. *J Virol* 62:4037-4043. 1988.
- 100) Southern PJ, Singh MK, Riviere Y, Jacoby DR, Buchmeier MJ and Oldstone MBA. Molecular characterization of the genomic S RNA segment from Lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 157:145-155. 1987.
- 101) Spriggs DR and Fields BN. Attenuated reovirus type 3 strains generated by selection of haemagglutinin antigenic variants. *Nature* 297:68-70. 1982.
- 102) Stanley J, Cooper SJ and Griffin DE. Alphavirus neurovirulence: monoclonal antibodies discriminating wild type from neuroadapted Sindbis virus. *J Virol* 56:110-119. 1985.
- 103) Svitkin YL, Maslova SV and Agol VI. The genomes of attenuated and virulent poliovirus strains differ in their in vitro translation efficiencies. *Virology* 147:243-252. 1985.
- 104) Taratuto AL, Tkaczewski LZ, Nota NR, Nejamkis MR and Giovanniello OA. Junin virus encephalitis in mice: its inhibition by antithymocyte serum. *Arch Ges Virusforsch* 43:173-183. 1973.
- 105) Tardieu M, Boespflug O and Barbé T. Selective tropism of a neurotropic coronavirus for ependymal cells, neurons and meningeal cells. *J Virol* 60:574-582. 1986.

- 106) Tucker P and Griffin D. Mechanism of altered Sindbis virus neurovirulence associated with a single aminoacid change in the E2 glycoprotein. *J Virol* 65:1551-1557. 1991.
- 107) Van Dinter S and Flintoff WF. Rat glial C6 cells are defective in murine coronavirus internalization. *J Gen Virol* 68:1677-1685. 1988.
- 108) Vezza AC and Bishop DHL. Recombination between temperature sensitive mutants of the arenavirus Pichinde. *J Virol* 24:712. 1977.
- 109) Vezza AC, Cash P, Jahrling P, Eddy G and Bishop DHL. Arenavirus recombination: the formation of recombinants between prototype Pichinde and Pichinde Munchique viruses and evidence that arenavirus S RNA codes for N polypeptide. *Virology* 106:250-260. 1980.
- 110) Vezza AC, Clewley JP, Gard GP, Abraham NZ, Compans RW and Bishop DHL. Virion RNA species of the arenaviruses Pichinde, Tacaribe and Tamiami. *J Virol* 26:485-497. 1978.
- 111) Vitullo A, Hodara V and Merani MS. Effect of persistent infection with Junin virus on growth and reproduction of its natural reservoir Calomys musculinus. *Am J Trop Med Hyg* 37:663-669. 1987.
- 112) Walker DH and Murphy FA. Pathology and pathogenesis of arenavirus infections. *Curr Top Microbiol Immunol* 133:89-113. 1987.
- 113) Weber C, Martínez Peralta L and Lehman Grube F. Persistent infection of cultivated cells with Lymphocytic choriomeningitis virus: regulation of virus replication. *Arch Virol* 77:271. 1983.
- 114) Weber EL, Guerrero LB and Boxaca MC. MRC5 cells: a model for Junin virus persistent infection. *J Gen Virol* 66:1179-1183. 1985.
- 115) Weissenbacher MC, Calello MA, Quintans CJ, Panisse H, Woykowski NM and Zanolli VH. Junin virus infection in genetically athymic mice. *Intervirology* 19:1-5. 1983.
- 116) Weissenbacher MC y Damonte EB. Fiebre Hemorrágica Argentina. Adelantos en Microbiología y enfermedades infecciosas. Coto, de Torres y Esparza (eds). Buenos Aires. Argentina. 1983.
- 117) Weissenbacher MC, Guerrero LB and Boxaca MC. Experimental biology and pathogenesis of Junin virus infection in animals and man. *Bull WHO* 52:507-515. 1975.

- Bibliografía-

- 118) Weissenbacher MC, Laguens RP and Coto CE. Argentine Hemorrhagic Fever. *Curr Top Microbiol Immunol* 134:79-116. 1987.
- 119) Weissenbacher MC, Schmuñis GA and Parodi AS. Junin virus multiplication in thymectomized mice. Effect of thymus and immunocompetent cells grafting. *Arch Ges Virusforsch* 26:63-73. 1969.
- 120) Wiebe ME and Scherer WF. Heterogeneity of envelope polypeptides among strains of Venezuelan encephalitis virus. *Virology* 94:474-478. 1979.
- 121) Wilson GAR and Dales S. In vivo and in vitro models of demyelinating disease: efficiency of virus spread and formation of infectious centers among glial cells is genetically determined by the murine host. *J virol* 62:3371-3377. 1988.
- 122) Winocur DH, Videla C, Laguens R y Carballal G. Infección intracerebral de ratones atímicos con una cepa atenuada de virus Junín. *Rev Arg Microbiol* 22:150-154. 1990.
- 123) Yeung MC, Lim D, Duncan R, Shahrabadi M, Cashdollar W and Lee PW. The cell attachment proteins of type 1 and 3 reovirus are differentially susceptible to trypsin and chymotrypsin. *Virology* 170:62-70. 1989.