



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Biblioteca Digital FCEN-UBA

Arenavirus : Persistencia de los virus Junín (FHA) y Tacaribe en células cultivadas in vitro

Damonte, Elsa Beatriz

1978

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

www.digital.bl.fcen.uba.ar

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ARENAVIRUS : PERSISTENCIA DE LOS VIRUS JUNIN (FHA) Y TACARIBE
EN CELULAS CULTIVADAS IN-VITRO

AUTOR : ELSA BEATRIZ DAMONTE.

DIRECTOR : DRA. CELIA E. COTO DE RAVASCHINO.

LUGAR DE TRABAJO : DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLÓGICA.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

Rep. N° 1551
y. 21

1551 =

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Celia E. Coto de Ravaschino, quien al brindarme su generosa dirección y amplio apoyo posibilitó la concreción de este trabajo.

A la Dra. Sonia Brisoux de Salum, por su inapreciable colaboración en la realización e interpretación de los estudios citogenéticos y morfológicos.

A mis compañeras de laboratorio Lics. Guillermina I. Help, Marta E. León y Susana E. Mersich, por su constante colaboración y estímulo.

INDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	1
<u>INTRODUCCION</u>	2
Persistencia in-vivo.....	4
Persistencia in-vitro.....	7
Objetivo de esta investigación.....	13
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	14
Virus.....	14
Cultivos celulares.....	15
Preparación de stocks de los virus Junín y Tacaribe.....	17
Determinación de infectividad.....	18
Determinación de centros infecciosos.....	27
Evolución de la acción citopatogénica.....	28
Estudios de morfología celular.....	28
Ensayo de neutralización viral.....	28
Ensayo de interferencia.....	29
Curvas de crecimiento celular.....	29
Técnicas citogenéticas.....	30
<u>RESULTADOS</u>	31
INFECCION PRIMARIA	
I. Aparición y evolución de la acción citopatogénica.....	31
II. Observación microscópica de la acción citopática.....	39
III. Producción de placas bajo agar.....	44
IV. Curvas de crecimiento viral.....	49

INFECCION PERSISTENTE

I. Infecciones prolongadas con los virus Junín y Tacaribe en cultivos estacionarios de células Vero..... 53

II. Iniciación y mantenimiento de sublíneas persistentemente infectadas

A.-Alteraciones producidas en la célula por la presencia del virus.. 57

 Morfología..... 57

 Condiciones de crecimiento..... 61

 Características citogenéticas..... 68

 Resistencia frente a la infección con virus homólogo..... 74

 Susceptibilidad frente a la infección con virus heterólogos..... 76

 Proporción de centros infecciosos..... 81

B.-Propiedades del virus recuperado de las células persistentemente infectadas..... 83

 Preparación de stocks en cultivo de tejido del virus recuperado del cultivo persistente..... 83

 Acción sobre cultivo de tejido..... 84

 Patogenicidad para ratón lactante..... 92

 Neutralización del virus liberado..... 94

 Crecimiento del virus VJ-3 en células Vero a diferentes temperaturas..... 95

 Inactivación térmica.....100

 Interferencia con la replicación del virus estandar.....104

C.-Factores ambientales que afectan la relación virus-célula.....109

 Efecto de la temperatura de incubación.....109

Efecto del metabolismo celular.....	113
Efecto del agregado de células sensibles.....	116
DISCUSION.....	119
BIBLIOGRAFIA.....	132

ABREVIATURAS

FHA : Fiebre Hemorrágica Argentina.
LCM : virus de coriomeningitis linfocitaria.
p.i. : post-infección.
ts : termosensible.
m : multiplicidad de infección.
ACP : acción citopatogénica.
UFP : unidad formadora de placas.
DICT50 : dosis infectante para cultivo de tejido 50%.
VSV : virus de estomatitis vesicular.
NDV : virus de la enfermedad de Newcastle.
DI : partícula defectiva interferente.
UHA : unidad hemoaglutinante.
PBS : buffer salino fosfatado.
ARN : ácido ribonucleico.
ADN : ácido desoxiribonucleico.
log : logaritmo en base 10.

INTRODUCCION

Las infecciones de etiología viral pueden dividirse en dos grandes grupos, de acuerdo a las características de la interacción que tiene lugar entre el virus y su célula huésped.

En las infecciones agudas se tiene como resultado final la liberación de nueva progenie viral acompañada de lisis celular que lleva a una destrucción casi total del tejido infectado. Por su parte, en las llamadas infecciones persistentes se establece un cierto equilibrio entre la producción de virus y la destrucción celular; la célula se divide en forma normal, manteniéndose sin sufrir daño aparente por la presencia del virus o de la información para su producción.

Durante muchos años los estudios virológicos se han centrado fundamentalmente en el esclarecimiento de las infecciones agudas que ocasionan graves enfermedades en el ser humano como viruela, polio, sarampión y otras. Tales enfermedades presentan un período de incubación asintomático relativamente breve que dura de 2 días a 2 ó 3 semanas, durante el cual transcurre la multiplicación viral. Cuando se supera un umbral crítico de diseminación de virus en el organismo, aparecen los síntomas de enfermedad acompañados de daño a nivel tisular. Las defensas antivirales del huésped incluyen especialmente la producción de interferón, anticuerpos neutralizantes y desarrollo de inmunidad mediada por células. Durante el período de incubación se movilizan todos estos mecanismos de defensa y, salvo que la enfermedad resulte fatal, se detiene el proceso infeccioso siendo eliminado el agente patógeno del organismo dentro de las pocas

semanas posteriores al comienzo de los síntomas. Enfrentado a una infección aguda el organismo registra una respuesta del tipo "todo o nada" : el resultado final es la muerte o recuperación total del individuo.

Estas enfermedades agudas poco a poco están siendo controladas mediante el empleo de vacunas adecuadas y es así como se ha ido desplazando el interés de las investigaciones hacia el estudio de las infecciones persistentes.

El concepto de persistencia no es nuevo y puede aplicarse a un amplio rango de microorganismos, siendo un hecho bastante frecuente en infecciones con ciertos protozoos, bacterias, rickettsias, clamidias y virus (1). Los virus pueden persistir en la célula por meses o años en un estado infeccioso completo, en una forma no infecciosa en la que sólo se detectan antígenos virales o como ácido nucleico integrado a la célula.

El origen de la infección persistente puede deberse a fallas de los mecanismos de defensa del huésped que deben eliminar de los tejidos los microorganismos invasores. De este modo, la persistencia representa una ventaja selectiva para el virus que logra perpetuarse en la naturaleza, ya sea porque el animal crónicamente infectado elimina virus constantemente o porque en determinado momento el genoma viral que se transmite de célula a célula se activa por algún factor determinado, desencadenándose la síntesis de virus infeccioso, que puede salir al extracelular y pasar luego a otro huésped.

En general, los virus que dan infecciones persistentes son aquéllos que causan mínima citopatología, dado que la sobrevivencia del huésped resulta fundamental para la propagación del virus en la naturaleza. Aunque la aso-

ciación entre virus persistente y huésped haya alcanzado un grado de estabilidad con mínima patogenicidad, estas infecciones persistentes no son completamente inocuas ya que existe la posibilidad de activación del proceso infeccioso con manifestaciones clínicas, como así también la producción a largo plazo de diversos efectos deletéreos sobre el organismo (enfermedades inmunopatológicas, neoplasias, etc.), que pueden originarse por la presencia de antígenos virales circulantes o del genoma viral que al estar integrado codifica por proteínas extrañas al organismo.

Persistencia in-vivo.

En la actualidad se conocen numerosos virus patógenos para el hombre que son capaces de originar infecciones prolongadas (1). Los mecanismos citopáticos y manifestaciones clínicas asociados a este tipo de infecciones son muy variados, resultando difícil clasificarlas en forma satisfactoria. Según Fenner (2), las infecciones persistentes de los animales se agrupan en tres categorías, aunque puede haber alguna superposición :

1) infecciones latentes : son infecciones persistentes con episodios agudos intermitentes de enfermedad entre los cuales el virus no es generalmente detectable.

2) infecciones crónicas : son aquéllas infecciones persistentes en las que el virus es siempre demostrable y a menudo parcialmente eliminado, pero la enfermedad está ausente o sobreviene tardíamente asociada con disturbios inmunopatológicos.

3) infecciones lentas : son infecciones persistentes con un largo período de incubación durante el cual la concentración de virus en el organismo aumenta gradualmente hasta que se produce enfermedad manifies-

ta, la que resulta generalmente letal.

En todos los casos, es poco lo que se sabe acerca del mecanismo de control y mantenimiento de la relación virus-célula a través del tiempo.

Entre los numerosos virus responsables de originar en los animales infecciones crónicas se encuentran los Arenavirus (3), género que comprende el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM) (4), el virus de Lassa (5) y los virus integrantes del complejo Tacaribe (6). A este último grupo pertenecen, entre otros, el virus Junín, agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) (7), y el virus Tacaribe (8), que presenta una muy estrecha relación antigénica con el anterior a pesar de no resultar patógeno para el hombre ni para ningún animal adulto (9).

El virus de LCM, prototipo del grupo Arenavirus, está considerado como el sistema modelo más ampliamente estudiado de infección persistente in-vivo. La producción de enfermedad en un ratón por infección con el virus de LCM dependerá de una respuesta inmune positiva, ya que se sabe que los ratones recién nacidos inoculados con el virus sobreviven a causa de la falta de esta respuesta (10). Los ratones adultos en cambio mueren invariablemente como resultado de la infección a menos que se los trate con rayos X o se les administre inmunosupresores, en cuyo caso al igual que los recién nacidos inoculados quedan persistentemente infectados.

Los ratones que presentan infección crónica con virus de LCM aparecen como normales durante el primer año de vida, sin embargo a medida que pasa el tiempo mayor es el número de células infectadas y también la reacción del sistema inmune contra el virus y las células donde multiplica, de modo que pasado ese primer año los animales desarrollan una enfermedad autoinmune (11) y mueren de glomerulonefritis. Experimentalmente se han

encontrado complejos de antígeno-anticuerpo atrapados en los capilares del riñón dando lugar a la reacción inflamatoria del mismo (12).

El virus Junín, relacionado antigénicamente con el virus de LCM, produce en el ratón recién nacido una encefalitis mortal cuando se lo infecta experimentalmente por vía intracerebral (13). También en este caso la encefalitis es debida a una reacción inmunológica de tipo celular puesto que la timectomía (14)(15) o el tratamiento con suero antitimocito inhiben las manifestaciones neurológicas (16)(17)(18). El virus multiplica en el cerebro de los ratones recién nacidos timectomizados o ratones adultos sin producirles enfermedad, de donde se deduce que no es la replicación viral la que afecta directamente al huésped (19).

El virus Junín puede aislarse de ratones aparentemente normales cuyo habitat son las zonas de las provincias de Buenos Aires y Córdoba donde se producen las epidemias de FHA (20). Estos animales eliminan continuamente virus por orina y saliva y tienen viremia constante, no presentando anticuerpos fijadores de complemento detectables. La infección experimental de roedores silvestres del género *Calomys musculinus* también lleva al desarrollo de un estado de persistencia viral con eliminación constante de virus, especialmente por saliva. A través de esta vía se facilitarían la diseminación del virus en la naturaleza y, al irrumpir el hombre en la zona infectada constituye un nuevo huésped susceptible para el virus, que se manifiesta entonces en forma virulenta produciéndole una enfermedad típica conocida como FHA. En el hombre, huésped no natural, no se ha investigado si el virus Junín persiste por mucho tiempo. Sin embargo, estudios recientes realizados con personal de laboratorio que estuvo en contacto con

el virus sin presentar síntomas de enfermedad, indicaron que hubo desarrollo de anticuerpos específicos contra el mismo (21). Esta evidencia de infección subclínica no permite descartar totalmente la posibilidad de que ocurran en el hombre infecciones prolongadas con virus Junín.

Persistencia in-vitro.

Además de producir infecciones crónicas en animales en la naturaleza, la mayoría de los Arenavirus tienen la capacidad de originar cultivos persistentemente infectados in-vitro, por lo que podría decirse que ésta es una propiedad característica de este grupo de virus.

Los cultivos crónicamente infectados se han utilizado como modelos para el estudio de las infecciones persistentes in-vivo desde los primeros tiempos del desarrollo de la metodología para cultivo de tejido. Se han establecido infecciones crónicas con células derivadas a partir de diferentes tejidos y especies animales y con virus de casi todos los grupos taxonómicos, incluyendo virus a ARN y ADN (22), cubriéndose un panorama mucho más amplio que en las infecciones persistentes in-vivo.

De acuerdo a los criterios establecidos por Walker (22), la gran variedad de interacciones virus-célula que han sido descritas como infecciones persistentes de células cultivadas puede ubicarse en dos categorías: infecciones reguladas y cultivos "carrier".

Las infecciones reguladas son comunes a la mayoría de los virus a ARN poco citocídicos que maduran por brotación. La mayoría o todas las células del cultivo están infectadas, a pesar de lo cual su metabolismo y multiplicación no se alteran. Hay transmisión intracelular de la infección a

través del proceso de mitosis. Las células liberan continuamente virus infeccioso pero la velocidad de multiplicación del virus es lo suficientemente lenta para permitir que haya sobrevivida celular. Se postula que mecanismos desconocidos, probablemente mediados por el genoma celular, controlan en forma eficiente la maduración y/o liberación de partículas virales. Este tipo de infección no se cura por el agregado de anticuerpos específicos al medio de cultivo.

Por el contrario, los denominados cultivos "carrier" contienen una pequeña proporción de células infectadas; en ellas tiene lugar un ciclo normal de multiplicación viral que termina con la muerte celular, pero el virus liberado infecta solamente un número pequeño de las células restantes. Esta reinfección puede hallarse limitada por diversas condiciones especiales de cada sistema virus-célula: resistencia genética de las células a la infección; presencia en el medio de agentes antivirales generados por las células infectadas (interferón) que evitan que los cultivos sean rápidamente destruidos; interferencia; etc. Si se previene la reinfección continua mediante el agregado de altas dosis de anticuerpos o interferón, el cultivo "carrier" a menudo se cura de la infección, puesto que así se evita la transmisión extracelular de la misma.

A pesar de que se conocen numerosos ejemplos de infecciones reguladas y cultivos "carrier", estos criterios de clasificación son de relativa utilidad ya que no pueden aplicarse a muchas de las infecciones persistentes conocidas. En muchos sistemas se presentan características comunes a uno y otro grupo, debido a que puede ocurrir a través del tiempo un proceso evolutivo en el tipo de relación virus-célula que se establece.

También son variados los mecanismos que se han sugerido para explicar el establecimiento y mantenimiento de la infección persistente. Huang y Baltimore (23) postularon que partículas virales defectivas interferentes cumplen un rol fundamental en la evolución de las infecciones persistentes, regulando la producción de virus. Esta teoría se apoya en la gran cantidad de sistemas crónicamente infectados a partir de los cuales se han aislado partículas virales defectivas en su replicación pero con capacidad de interferir en la replicación del virus parental utilizado para iniciar la infección crónica. Para el virus de estomatitis vesicular (VSV) se ha demostrado que la presencia de esas partículas defectivas en el stock original de virus es imprescindible para que pueda establecerse infección persistente en cultivo (24).

En otros sistemas, se ha comprobado que la infección persistente está asociada a mutantes termosensibles (ts) del virus (25). Preble y Youngner demostraron con el virus de la enfermedad de Newcastle que ocurre selección de mutantes ts en el establecimiento y mantenimiento de infecciones persistentes en distintos tipos de cultivos celulares (26)(27). Es cada vez mayor el número de cultivos crónicamente infectados a partir de los cuales se aíslan virus que difieren del parental en su capacidad de replicar a temperaturas elevadas. Así ocurre para los sistemas virus de estomatitis vesicular-células L (28); virus Sindbis-cultivos de *Aedes albopictus* (29); virus de sarampión-fibroblastos de embrión de hamster (30); virus Sendai-células BHK (31); virus de la encefalitis equina del oeste-células de ratón (32); etc. Estos estudios indican que la selección de mutantes ts en infecciones persistentes no está limitada a un tipo particular de virus o

de células cultivadas.

La selección de mutantes virales termosensibles y la producción de partículas defectivas interferentes en infecciones persistentes no parecen ser mecanismos mutuamente excluyentes, habiéndose descrito sistemas en los que se presentan ambos fenómenos (33).

Recientemente se ha propuesto un tercer mecanismo para explicar la persistencia de ribovirus en células eucarióticas. Estos virus tendrían la capacidad de formar intermediarios provirales de ADN que se integran al ADN celular, en forma similar a lo que ocurre con virus oncogénicos, perpetuándose de esa manera en células de mamíferos que se dividen activamente, sin que ocurra expresión genética viral detectable. Se ha observado ese estado de integración de los genes virales al cromosoma celular en cultivos persistentemente infectados con el virus respiratorio sincicial (34) y con sarampión (35).

Todos estos estudios señalan la complejidad de la relación que se establece entre el virus y su célula huésped en la infección persistente, siendo difícil evaluar la importancia relativa de cada uno de los factores responsables de la regulación del proceso infeccioso en cada caso.

En el grupo Arenavirus se han descrito infecciones de este tipo con virus de LCM (36)(37)(38), Parana (39), Pichinde (40) y Junín (41)(42). La obtención de líneas persistentemente infectadas con estos agentes es un hecho frecuente y reproducible que no requiere condiciones especiales de trabajo.

Una de las características comunes a las infecciones crónicas originadas in-vitro por los Arenavirus es la producción cíclica de virus estandar durante los primeros pasajes de las células infectadas. Luego no se puede de-

tectar virus en forma directa aunque puede haber iniciación de síntesis viral al inocular células normales con sobrenadantes de las líneas crónicamente infectadas, sugiriendo la presencia de bajos niveles de virus estándar (39). Esto lleva al establecimiento de una infección de tipo "regulado" en los pasajes tardíos de las líneas, registrándose en la mayoría de los casos un alto porcentaje de células con antígeno viral detectable por inmunofluorescencia en ausencia de células capaces de producir virus completo. Coincidentemente, Pfau y colaboradores han descrito la aparición en los sobrenadantes de las líneas crónicamente infectadas con LCM, Parana y Pichinde de actividad interferente con la replicación del virus estándar. Esta propiedad interferente ha sido asignada a partículas virales defectivas cuya acción es neutralizada por inmunosuero específico y resistente a la luz ultravioleta (43). Es así que estos autores afirman que la evolución de las infecciones persistentes con Arenavirus está condicionada por la síntesis de partículas defectivas. Trabajos de investigación realizados por otros autores en células L persistentemente infectadas con LCM revelan la presencia en los mismos de bajos niveles de una variante de LCM de crecimiento lento, no formadora de placas, no patógena para ratón y difícil de detectar (44), habiéndose postulado que el desarrollo de variantes virales de crecimiento lento y determinado tropismo puede ser factor determinante en el establecimiento de la persistencia.

En el caso particular del virus Junín, se presentan dos tipos de interacción in-vitro, según la célula huésped. En la mayoría de los cultivos primarios y líneas celulares estables estudiados el virus multiplica sin producir efecto citopático aparente pero rindiendo altos títulos (45)(46).

Solamente se ha descrito desarrollo de acción citopatogénica en células HeLa (47), Vero (48) y cultivo mixto de HeLa-rata (49). Aún en esos casos, el efecto lítico de la infección es moderado y depende de las condiciones de cultivo.

La línea de células de riñón de mono verde africano VERO (50) ha demostrado ser hasta ahora la más adecuada para el estudio de los virus del complejo Tacaribe. En ellas se cumple primero una etapa lítica de infección con gran destrucción celular, seguida luego de un proceso de recuperación del tejido que da lugar a regeneración de la monocapa. Así se han podido establecer sublíneas de células Vero persistentemente infectadas con la cepa atenuada de virus Junín XJCl₃ (41)(42). La infección persistente con virus Junín en células Vero fue estudiada enfatizando particularmente las variaciones de susceptibilidad viral producidas en la célula por la presencia del virus, habiéndose demostrado una resistencia absoluta y específica para virus del complejo Tacaribe (51). Hay aislamiento muy esporádico de virus infectante a través de estos cultivos mantenidos por numerosas generaciones (41). El virus puede aislarse a partir de los extractos celulares pero nunca de los sobrenadantes, siendo infeccioso para ratón lactante y cobayo pero no para células Vero. La incorporación de antisuero contra virus Junín al medio de cultivo no cura la infección, lo que sugiere que el virus pasa de célula a célula durante el proceso de división. Otros autores encontraron que este sistema produce una mayor proporción de virus interferente, probablemente defectivo (42).

Objetivo de esta investigación.

De acuerdo a esta breve reseña resulta evidente que una de las propiedades biológicas más importantes del virus Junín es su capacidad de establecer infecciones persistentes, cuyo mecanismo de control y regulación no está aún debidamente aclarado.

El objetivo de este trabajo de investigación, cuyos resultados aquí se presentan, fue estudiar detalladamente y desde diferentes perspectivas el fenómeno de persistencia in-vitro de los virus Junín y Tacaribe. Las investigaciones encararon el estudio de las alteraciones que pudo haber ocasionado en la célula la presencia continuada del virus, la caracterización de las propiedades del virus liberado durante la infección persistente respecto de la cepa parental y el análisis de los distintos factores que pueden determinar el establecimiento y mantenimiento de la persistencia de ambos virus.

El análisis de este modelo in-vitro pretende ser una contribución al esclarecimiento del mecanismo que regula la persistencia del virus Junín en los roedores silvestres, que permiten la diseminación del virus en la naturaleza y el posible contagio del ser humano.

MATERIALES Y METODOS

VIRUS

Junín : se trabajó con la cepa de virus Junín atenuada denominada XJC1₃ (52), mantenida en el laboratorio por pasajes a través de cerebro de ratón lactante, en el pasaje número 4 a partir de clonada.

Tacaribe : se empleó la cepa TRLV 11573, crecida en cerebro de ratón lactante. Los títulos de los stocks de virus Junín y Tacaribe fueron del orden de 10^8 UFP/ml para células Vero.

Virus de estomatitis vesicular (VSV) : se trabajó con un stock de la cepa Indiana preparado en células L, utilizando sobrenadante y células a las 48 horas después de la infección, con un título de 8.7×10^5 DICT50/ml para células L.

Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) : se utilizó la cepa Victoria; los stocks se prepararon inoculando embriones de pollo de 9 días y cosechando el líquido alantoideo a las 48 horas post-infección (p.i.). El título de los stocks fue de 128 UHA/ml.

Virus de poliomielitis : se usó la cepa Sabin (vacuna) que contenía las cepas de Polio tipo I, II y III, después de ser pasadas dos veces por células HeLa y una vez por Vero. El título en células Vero del stock usado fue de 3.8×10^6 UFP/ml.

Virus de sarampión : se trabajó con un stock de la cepa Edmonston que había sido preparado en células Vero, con un título de 7×10^3 UFP/ml.

Virus Sindbis : stock preparado sobre fibroblastos de embrión de pollo primario, cosechando el sobrenadante a las 24 horas p.i. El título

obtenido fue 10^{10} DI50/ml en embrión de pollo.

Virus Herpes simplex tipo I : stock preparado sobre células HEP-2, a partir de sobrenadante y células, teniendo un título en RK-13 de 2.5×10^{11} UFP/ml.

CULTIVOS CELULARES

Células Vero : en esta investigación se emplearon dos líneas de células Vero (riñón de mono verde africano), crecidas ambas en monocapa sobre superficies de vidrio. Una de ellas, en la que se realizaron todos los estudios virológicos y a partir de la cual se derivaron las sublíneas persistentemente infectadas que se describen, fue obtenida de la Dra. Selum y se mantuvo en el laboratorio por repiques semanales en medio 199 conteniendo 15% de suero de ternera inactivado y 50ug/ml de gentamicina. Se la empleó entre los pasajes 80 y 150 in-vitro. La otra línea de células Vero, utilizada únicamente para las titulaciones de los virus Junín y Tacaribe fue suministrada por el Dr. Larghi y se mantuvo por repiques semanales con medio 199 adicionado de 5% de suero de ternera inactivado y antibióticos, siendo utilizada entre los subcultivos 150 y 200. Los intentos de adaptar la primera línea a las condiciones de crecimiento de la segunda, disminuyendo la concentración de suero del medio no fueron exitosos pues no hubo multiplicación celular con formación de buenas monocapas por debajo del 10% de suero. La susceptibilidad de las dos líneas a los virus Junín y Tacaribe fue similar ya que los stocks de virus titulaban en ambas líneas con la misma eficiencia; sin embargo, las diferentes condiciones de mantenimiento aparentemente influyen sobre las carac-

terísticas de la relación virus-huésped que se establece como se detallará más adelante.

Cultivos estacionarios de células Vero infectados con los virus Junín o Tacaribe : se obtuvieron infectando células Vero en el pasaje 86 a una multiplicidad de infección (m) de 0.2 UFP/célula con los virus Junín o Tacaribe. Estos cultivos se mantuvieron sin repicar, con cambios de medio nutritivo (medio 199 conteniendo 6% de suero inactivado de ternera) cada 48 horas, durante un período de 35 días.

Sublínea Vero-J : esta sublínea se originó a partir de células Vero infectadas con virus Junín a una multiplicidad de infección de 0.2 en el subcultivo 119. Después de una intensa acción citopatógena acompañada por la destrucción de más del 90% del tejido, las células se recuperaron regenerando la monocapa. A partir del 18º día después de la infección el cultivo se repicó semanalmente, manteniendo las células en medio 199 con suero de ternera inactivado al 10% y antibióticos. Los resultados que se presentan en este trabajo se obtuvieron utilizando la sublínea hasta el pasaje 70, lo que equivale a 290 días de vida in-vitro.

Sublínea Vero-T : esta sublínea se obtuvo en forma similar a la Vero-J con la única diferencia que para la infección se usó virus Tacaribe. Se la estudió durante 70 pasajes in-vitro.

Cocultivos : se mezclaron suspensiones de 10^6 células Vero-J con 10^6 células Vero normales, sembrándose así seis botellas de 90 cc de capacidad en medio 199 con 10% de suero inactivado de ternera. Los cocultivos se observaron al microscopio óptico durante 4 días, junto con cultivos simples de células Vero y Vero-J como controles. A las 24 y 48 horas se cosechó so-

sobrenadante y células de dos cocultivos Vero-Vero-J y dos cultivos de Vero-J a los efectos de titular el virus infeccioso extra e intracelular presente en cada caso. Para virus intracelular se congelaron y descongelaron dos veces las botellas con células, habiendo recogido previamente el sobrenadante, lavado la monocapa con solución salina fosfatada (PBS) y agregado 1 ml de medio de mantenimiento. Después del segundo descongelamiento, la suspensión se centrifugó para eliminar restos celulares 10 minutos a 1500 rpm y el sobrenadante de dicha centrifugación se tituló como extracto celular.

PREPARACION DE STOCKS DE LOS VIRUS JUNIN Y TACARIBE

Cerebro de ratón lactante : ratones albinos de 24-48 horas de edad se inocularon intracerebralmente con 10^3 DLSO de virus Junín o Tacaribe; al 7º día después de la infección se sacrificaron los animales y se cosecharon los cerebros. Se preparó luego un homogeneizado al 10% de cerebro de ratón en solución de buffer fosfato isotónico pH 7.4, conteniendo suero de ternera inactivado al 10%. El homogeneizado se centrifugó a 13000g por 45 minutos utilizando el sobrenadante como fuente de virus (53). Los stocks de virus se guardaron a -70°C , siendo los títulos aproximadamente 10^8 UFP/ml.

Células Vero : se infectaron células Vero a diferentes multiplicidades, de acuerdo a las características del material. El virus se dejó adsorber por una hora a 37°C con agitación periódica cada 15 minutos. Al cabo de ese tiempo se retiró el inóculo y se le agregó medio de mantenimiento. Al 4º-6º día p.i. se cosechó el sobrenadante y se centrifugó a

1000 rpm 10 minutos para eliminar restos celulares. El sobrenadante así obtenido se usó como fuente de virus.

DETERMINACION DE INFECTIVIDAD

Todas las muestras de virus Junín y Tacaribe fueron tituladas en células Vero por registro de la acción citopatogénica (ACP) o mediante la técnica de unidades formadoras de placas (UFP), método este último que previamente debió ser puesto a punto debido a la poca reproducibilidad de los resultados obtenidos usando la técnica descrita por otros autores (48)(54).

Titulación por observación de la acción citopatogénica para cultivo.

Diluciones decimales seriadas de virus se inocularon en cantidades de 0.2 ml en cultivos de células crecidas en tubos de ensayo al 2º o 3º día después de la siembra. El inóculo se dejó adsorber por una hora a 37°C, luego se extrajo y agregó a cada tubo 1 ml de medio de mantenimiento (199 adicionado de 3% de suero inactivado de ternera). Se usaron 4 tubos por dilución. Los cultivos se observaron diariamente al microscopio óptico por un período de 10-12 días y se tabuló la ACP de 0 a 4 de acuerdo a lo que se describirá más adelante. La DICT50 (dosis infectante para cultivo de tejido 50) se calculó de acuerdo al método de Reed y Muench (55).

Titulación por formación de placas.

Ensayo de formación de placas : células Vero crecidas en botellas de 90 cc de capacidad se infectaron al tercer o cuarto día de sembradas con 0.4 ml de la dilución adecuada de muestra a titular. Se dejó adsorber el virus durante 1 hora a 37°C con agitación suave cada 15 minutos. Luego de

la adsorción se retiró el inóculo, se lavó la monocapa con PBS y se cubrió con 8 ml de medio sólido nutritivo. Las botellas se incubaron en forma invertida por el término de 7 u 8 días a 37°C en la oscuridad. Al cabo de ese tiempo se revelaron las placas fijando las células con formol al 10% durante 30 minutos y, una vez extraído el agar, se tiñeron por el agregado de una solución de cristal violeta que se mantuvo durante 15 minutos.

Medio usado para cubrir las células :

Soporte sólido : se ensayaron varios tipos de agares y agarosas de diferentes grados de pureza. Cada solución de agar preparada a una concentración final del 2% en agua bidestilada se sometió a un lavado continuo con agua corriente durante 3 días y posteriormente a varios lavados con agua destilada.

Medio nutriente : se utilizó una solución salina de Earle de doble concentración, conteniendo 6% de hidrolizado de lactoalbúmina al 5%; 6% de extracto de levadura al 1%; 10% de suero de ternera inactivado y antibióticos. El pH se ajustó a 7.2-7.4 por el agregado de bicarbonato de sodio.

El medio usado para cubrir las células consistió en la mezcla de partes iguales de nutrientes y solución de agar, de modo que la concentración final de este último resulte del 1%.

Las condiciones anteriormente descritas para el ensayo de titulación por formación de placas se establecieron luego de un detallado análisis de los requisitos necesarios para obtener resultados exactos y reproducibles con esta técnica. Con ese fin, se consideró en forma comparativa

el aspecto, morfología, tamaño y número de las placas producidas por el virus en diferentes condiciones experimentales, analizando en cada caso la influencia de los distintos factores que se enumeran a continuación :

a) Estado fisiológico de las células : las primeras titulaciones se realizaron utilizando los cultivos en el momento en que las monocapas de células eran confluentes. Posteriormente se buscó establecer cuál era la fase celular de crecimiento más apropiada para llevar a cabo la infección. Para ello, se infectaron con virus Junín células de diferentes edades, procediendo luego tal como se describiera en el ensayo de placas. Al octavo día p.i. los cultivos que fueron infectados cuando las células estaban multiplicando activamente, es decir a las 24 y 48 horas después de sembradas, presentaron placas apenas distinguibles sobre el resto del tejido celular, que apareció como una monocapa muy tenue. Por el contrario, con células que se encontraban en estado estacionario al momento de la infección, o sea 96 horas después de sembradas, las placas fueron bien visibles y de mayor tamaño, mientras que la eficiencia relativa de plaqueo se incrementó en más de dos veces.

Para dilucidar si era realmente necesario que las células hubieran alcanzado el estado estacionario o solamente se requería una adecuada densidad celular, se repitió la infección de células de 24 horas de edad duplicando el número de células sembradas por botella. Los resultados fueron similares a los anteriores.

b) pH de adsorción : se investigó la relación existente entre variación de pH del medio diluyente del inóculo y eficiencia de plaqueo, no

encontrándose diferencias significativas para el virus Junín en el rango de pH 6.4-7.4. A pH 6.4 el título obtenido fue 1.9×10^8 UFP/ml mientras que a pH 7.4 el valor fue 1.7×10^8 UFP/ml.

c.) Toxicidad de la capa sólida : la fracción agaropectina del agar contiene sustancias inhibitoras que impiden la formación de placas por algunos virus (56). En nuestro caso, además de ese efecto directo sobre el virus se debe considerar la acción que estas sustancias pueden tener sobre las células, debido al prolongado tiempo de incubación que se requiere para el desarrollo de las placas.

En la Tabla 1 se ven los datos obtenidos al titular los virus Junín y Tacaribe utilizando distintos tipos de agares y agarosas. En forma comparativa se probó la eficiencia de la formación de placas en medio sólido lavado y sin lavar de las siguientes marcas y clases : Ionagar Nº 2 Oxoid; Agarosa Seakem lotes 711205 y 291402; agarosa obtenida de acuerdo al método descrito por Barteling (57) que denominamos agarosa B; agarosa francesa y agar-agar.

La agarosa francesa y el Ionagar Nº 2 sin lavar permiten la obtención de placas solamente cuando el estado fisiológico de las células usadas es óptimo. Después de ser sometido a la técnica de lavado el Ionagar resulta ser tan eficiente como la Agarosa Seakem, la que previamente parecía ser la única capaz de dar resultados repetitivos.

Algunos autores han señalado que el grado de electroendosmosis de un agar está relacionado con su falta de toxicidad para determinados virus (58). De acuerdo a esto, se decidió estudiar si el proceso de lavado había

TABLA 1

Relación entre la formación de placas y el porcentaje de electroendosmosis
del agar usado

Medio sólido	Título (UFP/mlx10 ⁸)	Electroen. %	Características de las placas
Ionagar 2 ^a	1.1	25	muy turbias ^c
Ionagar 2 ^b	1.0	24	turbias de centro lítico
Agarosa Seakem ^a	1.5	12	turbias y claras
Agarosa Seakem ^b	-	12	no se probó
Agarosa B ^a	1.2	0	claras y pequeñas
Agarosa B ^b	1.4	0	turbias
Agarosa francesa ^a	1.2	16	turbias, poco vi- sibles
Agarosa francesa ^b	1.1	14	turbias, poco vi- sibles

a : sin lavar ; b : lavado ; c : placas turbias son las que presentan una base de células muertas cuando se las observa al microscopio.

modificado el grado de electroendosmosis del agar. El porcentaje de electroendosmosis de cada muestra de agar se determinó de la siguiente manera : se prepararon soluciones al 2% de cada agar, mezclándolo luego en volúmenes iguales con buffer veronal. Se cubrieron portaobjetos con una película de agar común (0.1 ml que se extendió con una varilla), secándolos a 37°C 15 minutos. Luego se volcó sobre cada porta 3 ml de la solución de agar o agarosa en buffer. Una vez bien solidificado, se hizo un orificio en el centro con una pipeta Pasteur, sembrándose en él una gota de suero de conejo. Luego de efectuada la corrida electroforética se tiñó con solución colorante de negro amido por 4-5 horas y se decoloró en acético-glicerina. El porcentaje de electroendosmosis se calculó efectuando el cociente entre las distancias recorridas por la globulina y la albúmina hacia atrás y adelante del punto de siembra respectivamente.

De los datos expuestos en la Tabla 1 resulta evidente que el grado de electroendosmosis no disminuyó significativamente por el lavado; además si bien la agarosa no tiene electroendosmosis, no resulta mejor que el Ionagar lavado que tiene un 24% de electroendosmosis. Por lo tanto, lo único que se puede aseverar es que el lavado elimina algún factor soluble tóxico para las células o para el virus.

d) Influencia del oxígeno : para conocer los requerimientos de oxígeno de los virus Junín y Tacaribe, se tituló una dilución estandar de los mismos en varias botellas, cubriéndose c/u de ellas con diferentes volúmenes de medio sólido. Para poder obtener placas el espesor de la capa de agar debía ser superior a 0.3 cm, lo que resultó equivalente a 8 ml de

medio de acuerdo a la capacidad de las botellas usadas para crecer las células.

e) Volumen de inóculo : se buscó establecer el volumen de inóculo viral que permitiera la máxima adsorción de virus y al mismo tiempo una buena distribución de las placas.

Para ello se infectaron monocapas de células Vero con 100 UFP de virus Junín diluidas con volúmenes crecientes de medio 199, desde 0.2 ml hasta 1.0 ml. Se procedió luego en la forma ya descrita.

TABLA 2

Efecto de la variación del volumen de inóculo sobre la adsorción del virus Junín en células Vero

Volumen (ml)	Eficiencia relativa de plaqueo
0.2	100*
0.4	53
0.6	65
0.8	45
1.0	56

*Al máximo título de virus obtenido que fue 1.5×10^8 UFP/ml se le asignó una eficiencia del 100%.

Se obtuvo mayor eficiencia de plaqueo cuando se inoculó menor volumen (Tabla 2).

f) Concentración de suero : se determinó que la mayor eficiencia de plaqueo se consigue con una concentración de suero del 5%. Para ello se tituló una cantidad constante de virus Junín o Tacaribe, variando el suero presente en el medio sólido nutritivo desde 2 al 8%. Los resultados obtenidos con cada concentración de suero (Tabla 3) son el promedio de cuatro determinaciones.

TABLA 3

Efecto de la concentración de suero del medio sólido sobre la formación de placas de virus Junín en células Vero

Suero %	Título (UFP/mlx10 ⁸)	Características de las placas
2	1.1	poco visibles
3	1.0	turbias y pequeñas
4	1.2	turbias y pequeñas
5	1.9	bien visibles y claras
8	1.3	visibles y pequeñas

La mayor eficiencia es una consecuencia de una mejor preservación de la monocapa celular durante el período de incubación.

g) Temperatura de incubación : es condición primordial para la multiplicación de estos virus mantener constante la temperatura de incubación. Se realizaron experiencias variando las temperaturas de incubación de los cultivos infectados, después de cubrirlos con el medio sólido; se probaron 32°C y 39°C como temperaturas extremas, llevando paralelamente una serie control en cada caso a 37°C. En el rango de temperaturas ensayadas no se vieron diferencias en el mantenimiento de la monocapa observando los cultivos al microscopio. Sin embargo, a 32°C las placas fueron muy turbias y hubo un 50% de disminución en el valor del título obtenido para el virus Tacaribe, respecto del control a 37°C. Entre 37°C y 39°C no hubo grandes diferencias en cuanto a morfología, tamaño y número de placas.

h) Agregado de nutrientes : en algunos sistemas virus-célula se mejoran las condiciones de preservación celular mediante el empleo de multicapas sólidas o medio líquido sobre la capa sólida. Sin embargo, las placas producidas por Junín y Tacaribe no se ven afectadas por el agregado de medio de crecimiento 199 a los 3 y 5 días después de la infección.

i) Presencia de rojo neutro : las placas resultaron muy poco visibles cuando se agregó rojo neutro al medio sólido en el momento de cubrir las células, como así también adicionándolo en una segunda capa delgada de agar el día de lectura de las placas. Por ello se prefirió revelar las placas fijando primero las células con formol y tiñendo luego con cris-

tal violeta.

En conclusión, el análisis de la influencia de los distintos factores intervinientes en la titulación permitió establecer que para la obtención de placas, utilizando monocapas de células Vero crecidas en botellas de 90 cc de capacidad, se debe infectar con un volumen de virus de 0.2-0.4 ml en medio cuyo pH puede variar entre 6.4-7.4; incubar a una temperatura constante de 37°C; cubrir las células con 8 ml de medio nutritivo conteniendo 5% de suero inactivado de ternera y agar lavado en forma adecuada. Las células deben estar en su fase estacionaria de crecimiento al momento de la infección (59).

DETERMINACION DE CENTROS INFECCIOSOS

La cantidad de centros infecciosos en cultivos de células Vero-J se midió de la siguiente manera : monocapas de células Vero-J se tripsinaron, se lavaron las células dos veces con PBS por centrifugación a fin de eliminar todos los restos de tripsina y se resuspendieron finalmente en medio nutritivo, contándose el número de células viables en una cámara de Neubauer. Se infectaron monocapas normales de células Vero con diluciones decimales de dicha suspensión celular. Después de dejar 2 horas a 37°C, se agregó cuidadosamente agar nutritivo y 8 días más tarde se contaron las placas como en una titulación habitual, determinándose así el número de células formadoras de placas en base al hecho de que en este caso una placa se origina a partir de una célula infectada productora de virus.

EVOLUCION DE LA ACCION CITOPATOGENICA

Para observar el tipo de lesiones producidas por el virus en las células Vero se infectaron células crecidas en tubos Leighton. A diferentes días después de la infección se fijaron y tiñeron las células con May Grünwald-Giemsa y se observaron al microscopio óptico.

ESTUDIOS DE MORFOLOGIA CELULAR

A fin de estudiar las alteraciones morfológicas que presentaban las células persistentemente infectadas, se hicieron crecer en tubos Leighton cultivos de células Vero, Vero-J y Vero-T que luego fueron teñidos con May Grünwald-Giemsa, observados al microscopio óptico y fotografiados.

ENSAYO DE NEUTRALIZACION VIRAL

Se trabajó con suero inmune anti-virus Junín de origen humano con capacidad neutralizante mayor de 4 logaritmos. Dicho inmunosuero se inactivó por calentamiento a 56°C durante 30 minutos. Luego se mezclaron volúmenes iguales de inmunosuero diluido 1:5 y diluciones decimales crecientes de la muestra de virus a ensayar. Estas mezclas se incubaron a 37°C por 30 minutos. Simultáneamente se incubaron mezclas controles de virus con suero normal. Luego se inocularon monocapas de células Vero crecidas en tubos de ensayo con 0.2 ml de las muestras tratadas con inmunosuero y las controles, usándose 4 tubos por dilución. Se hizo la observación microscópica de la ACP hasta completar la titulación de ambas series, calculándose los títulos de acuerdo a Reed y Muench (55). Los resultados se expresaron como % de neutralización, haciéndose el cociente

entre el título de la serie tratada con inmunosuero y el título de la serie control.

ENSAYO DE INTERFERENCIA

Células Vero crecidas en botellas de 30 cc de capacidad se infectaron con 0.2 ml de sobrenadantes correspondientes a diferentes pasajes de la línea Vero-J. Luego de una hora de adsorción a 37°C, se volcó el inóculo, se lavaron las monocapas con PBS y se re infectaron con 0.2 ml de virus estandar XJCl₃ a una multiplicidad de 1 UFP/célula. Después de un período de una hora de adsorción a 37°C, se volcó el inóculo y se agregó medio de mantenimiento. Simultáneamente se infectaron cultivos paralelos de células Vero con XJCl₃ solamente o con sobrenadante de Vero-J. A las 24 horas se cosechó sobrenadante de todos los cultivos a fin de titular la infectividad y determinar los rendimientos virales. El medio de mantenimiento se renovó con posterioridad cada 2 días, observándose la evolución de la ACP en los cultivos doble y simplemente infectados por el término de 15 días.

CURVAS DE CRECIMIENTO CELULAR

Células Vero, Vero-J y Vero-T se hicieron crecer en medio 199 conteniendo distintas concentraciones de suero. A distintos días post-siembra se tripsinaron dos cultivos de cada serie y las células resuspendidas en 1 ml de medio se tiñeron durante 15 minutos por agregado de 0.1 ml de una solución acuosa al 0.5% de azul Tripán, colorante que permite diferenciar entre células vivas y células muertas. Transcurrido ese tiempo,

las células viables se contaron en una cámara de Neubauer.

TECNICAS CITOGENETICAS

Para el estudio citogenético de las líneas celulares Vero y Vero-T se emplearon cultivos crecidos en botellas de 90 cc de capacidad. A las 24-48 horas de sembradas, se le agregó a cada botella 0.3 ml de una solución 1/100 de colchicina, incubándose luego a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido ese lapso se tripsinaron las monocapas celulares a fin de obtener las células en suspensión. Estas se trataron luego con una solución hipotónica de ClK 0.53% durante 25 minutos a 37°C. Posteriormente, las células fueron fijadas en una mezcla de metanol-ácido acético (1:3) durante 30 minutos a 4°C, con dos cambios de fijador. Sobre los extendidos en portaobjetos se aplicaron las técnicas de coloración estandar con colorante de Giemsa (para efectuar recuentos cromosómicos) y de bandeos G (60) y C(61).

RESULTADOS

Las infecciones originadas por los virus Junín y Tacaribe en células Vero presentan dos etapas marcadamente diferentes, de acuerdo al comportamiento del virus : una fase inicial virulenta con producción de alto título de virus acompañada de marcado efecto citopático, y una etapa posterior de recuperación celular en la que se establece la persistencia viral (41).

En esta investigación se analizaron las características de la infección primaria, en la que el virus se manifiesta en forma virulenta cumpliendo un ciclo lítico, como paso previo al estudio de la infección crónica.

INFECCION PRIMARIA

I. APARICION Y EVOLUCION DE LA ACCION CITOPATOGENICA.

Los virus Junín y Tacaribe multiplican en las células Vero originando una marcada ACP. Para seguir la evolución de la misma, se infectaron células Vero, crecidas en tubos de ensayo, a las 72 horas después de sembradas, con los virus Junín cepa XJCl₃ y Tacaribe a multiplicidades de infección que variaron en escala decimal desde 20 a 2×10^{-5} UFP/célula. Luego de una hora de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo de virus y se agregó medio de mantenimiento. Los cultivos fueron incubados a 37°C y observados al microscopio óptico diariamente por el término de 15 días durante los cuales se renovó el medio de mantenimiento de los mismos ca-

da 2 días. El grado de ACP se tabuló según la escala que se describe más adelante.

Como se ve en la Figura 1, el tiempo de aparición de la ACP depende de la dosis inicial de infección. Para las dosis mayores de virus la ACP comienza al día 3, mientras que para los inóculos más diluidos lo hace 1, 2 ó 3 días más tarde. Para altas multiplicidades la relación entre la aparición de ACP y la dosis no es lineal, debido probablemente al fenómeno de autointerferencia descrito para otros Arenavirus in-vitro (62) y para virus Junín in-vivo (63) e in-vitro (64). La relación lineal entre la concentración de virus usada para infectar y el día de aparición de ACP recién se establece para el virus Junín a partir de la multiplicidad de 0.02 UFP/cél. en adelante, mientras que para el virus Tacaribe la linealidad comienza a partir de 0.002.

En las Figuras 2 y 3 se detallan el grado, evolución y duración de la ACP según las diferentes multiplicidades de infección, para los virus Junín y Tacaribe, respectivamente. La presencia de ACP temprana se caracteriza por la aparición de una cantidad regular de células en el sobrenadante (grado 1); a medida que transcurre la infección se observa una gran cantidad de células en suspensión y sobre el tejido focos aislados de células granulosas y oscuras (grado 2); posteriormente todo el tejido está formado por células redondas y se observan áreas de lisis donde falta la monocapa (grado 3). Por último, sólo permanecen adheridas al vidrio algunas zonas constituidas por células oscuras (grado 4). Los estadios en los que se produce la involución de la ACP se pueden asimilar a esta gradación.

FIGURA 1

Aparición de la acción citopatogénica en células Vero infectadas con virus Junín o Tacaribe, en función de la dosis infectante.

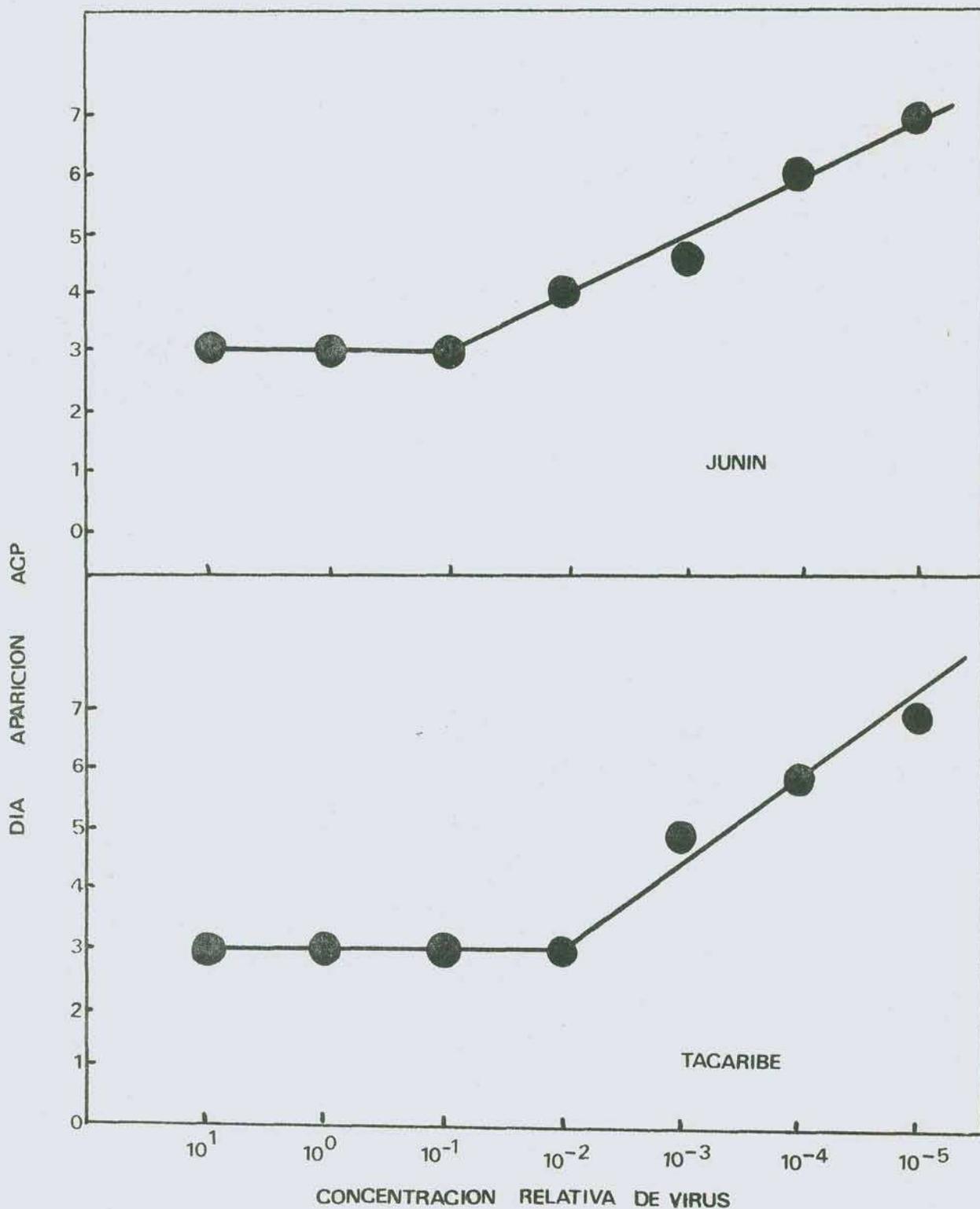


FIGURA 2

Grado y evolución de la ACP en células Vero infectadas con virus Junín (XJCI₃) a distintas multiplicidades.

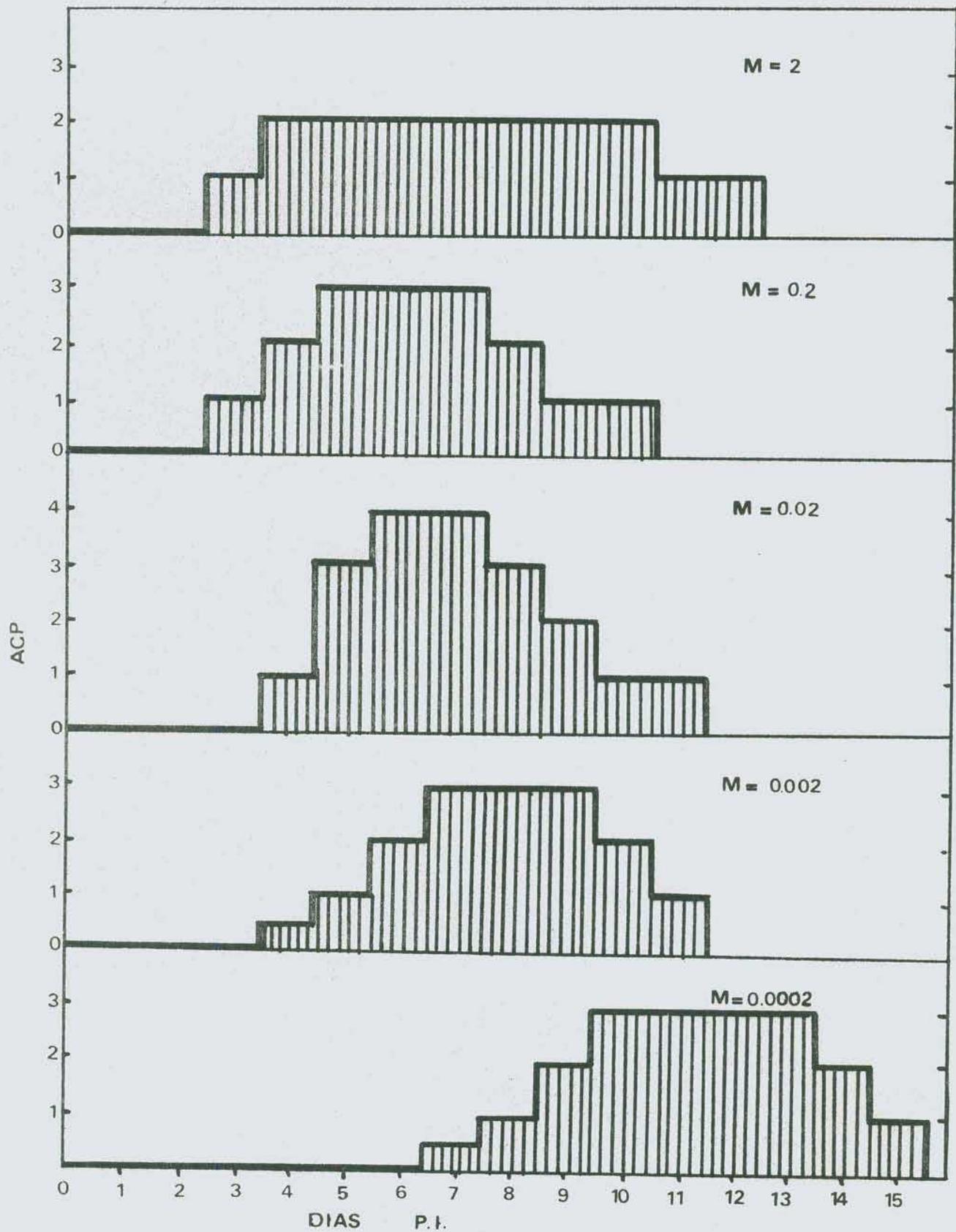
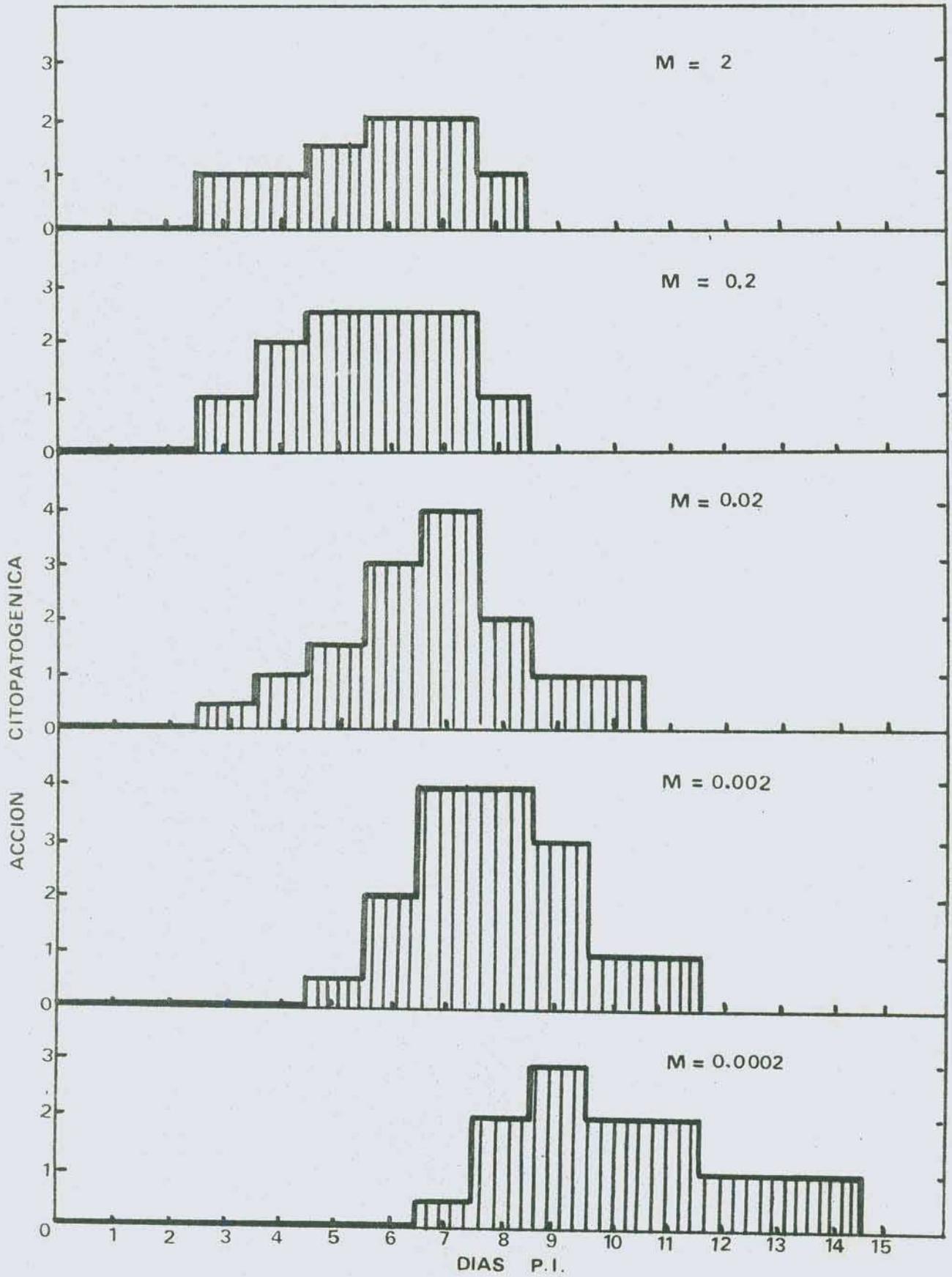


FIGURA 3

Grado y evolución de la ACP en células Vero infectadas con virus Tacaribe a distintas multiplicidades.



Se puede apreciar (Figura 2) que el mayor grado de ACP aparece en los cultivos celulares infectados a baja multiplicidad (0.02), señalando nuevamente la presencia de autointerferencia. A pesar de la gran destrucción celular que afecta más del 90% del cultivo entre 6-7 días p.i., éste entra luego en una etapa de recuperación, regenerándose la monocapa y produciéndose la involución de la ACP al cabo de 2-3 días.

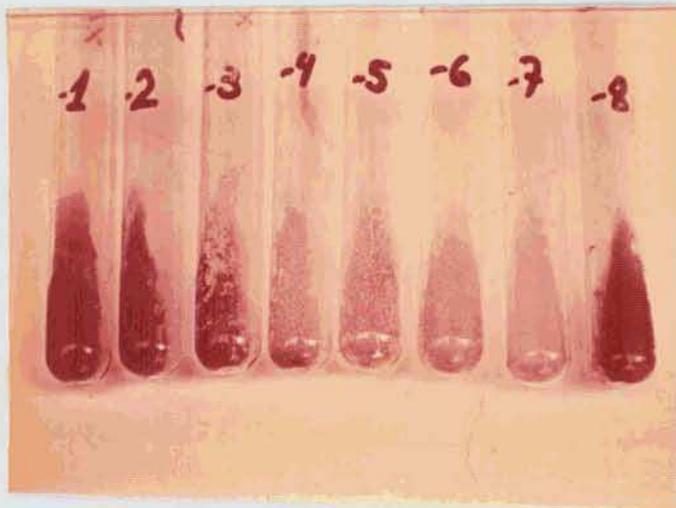
El aspecto del tejido recuperado no es el normal ya que presenta acúmulos de células oscuras, que quedaron adheridas al vidrio y a partir de las cuales se regeneró el cultivo. La destrucción y recuperación celulares ocurren simultáneamente en el mismo cultivo; así al octavo día p.i. (m : 0.002) se observan grandes zonas de lisis junto a otras áreas donde la monocapa se encuentra en recuperación. La recuperación celular se produjo en las condiciones descritas para todas las multiplicidades ensayadas.

Independientemente de la multiplicidad de infección y de la intensidad del efecto citopático, el período de tiempo entre la aparición del mismo y la regeneración del cultivo es de 7 a 10 días.

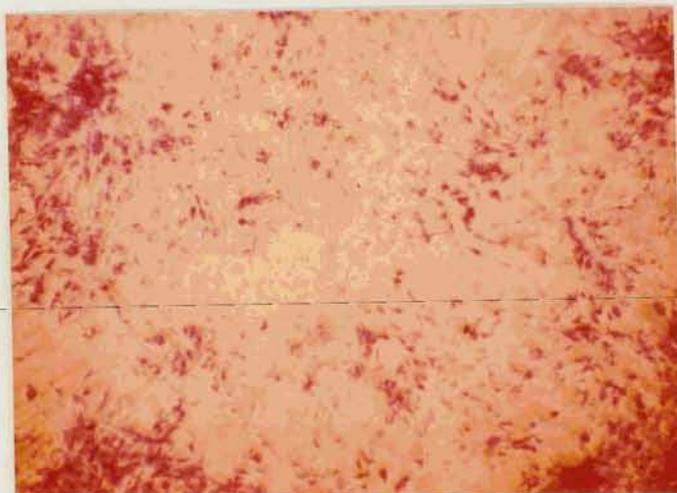
Consideraciones similares se pueden hacer para describir la evolución de la ACP producida por el virus Tacaribe (Figura 3), con una diferencia significativa. El período que transcurre entre la aparición y la involución de la ACP es más corto, lo que se observa principalmente para las multiplicidades de 2 y 0.2 (6 días). Además, aún cuando por razones de simplicidad las acciones citopáticas se graduaron con la misma escala, la infección con virus Tacaribe produce la destrucción de casi el 99% de las células de la monocapa. A pesar de esta mayor intensidad de ACP

que manifiesta el virus Tacaribe sobre las células Vero respecto de $XCCl_3$, en todos los casos hay recuperación celular con regeneración de la monocapa en pocos días.

En la fotografía 1 se muestran los cultivos de células Vero infectados con diluciones decimales seriadas de virus Junín y teñidos con cristal violeta al 8º día p.i. Se puede observar en los tubos infectados con las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} de virus la recuperación casi total del tejido, evidenciada por una densidad de color similar a la del tejido inoculado con una dilución 10^{-8} , considerado en este caso como control; por el contrario, los cultivos infectados con las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} muestran una ACP activa. En la dilución 10^{-3} se observan grandes zonas de lisis junto a otras áreas donde la densidad de coloración indica recuperación de la monocapa. Estas observaciones son coincidentes con los datos presentados en la Figura 2, aún cuando hay que considerar que la gradación de la ACP es de carácter subjetivo.



FOTOGRAFIA 1. Cultivos teñidos que muestran el grado de ACP del virus Junín para células Vero. La tinción se realizó al día 8 p.i. en tubos infectados con diluciones crecientes de virus. Dilución -1 equivale a una multiplicidad de 20.



FOTOGRAFIA 2. Arriba : enfoque de una monocapa de células Vero infectada con virus Tacaribe (m : 0.02) y teñida al 6º día p.i. Abajo : enfoque de una monocapa de células Vero sin infectar, mantenida en las mismas condiciones.

En la fotografía 2 se observan enfoques de una monocapa de células Vero infectada con dilución 10^{-4} de virus Tacaribe (m:0.02) y una monocapa normal mantenida paralelamente, teñidas ambas con colorante Giemsa. Se puede ver el gran efecto citopático desarrollado por el virus que produjo desprendimiento de la mayoría de las células, quedando adheridos al vidrio solamente algunos acúmulos de células alteradas, alrededor de los cuales comenzará luego la regeneración del tejido.

Las células que pasan al sobrenadante por efecto de la infección son células que se adhieren al vidrio pero que han perdido la capacidad de multiplicarse cuando se las resiembró con medio de crecimiento fresco.

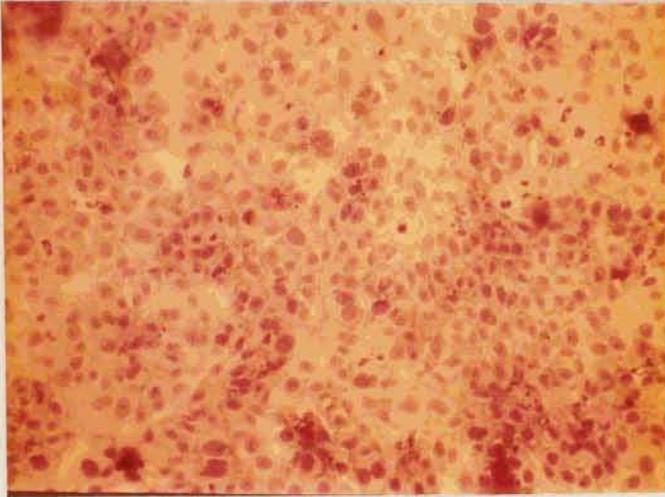
Los virus Junín y Tacaribe, por pasajes seriados a través de células Vero, mantienen su capacidad infectante con producción de ACP típica, la que es neutralizable por inmunosuero específico.

II. OBSERVACION MICROSCOPICA DE LA ACCION CITOPATICA

Estas observaciones se hicieron en células crecidas en tubos Leighton y teñidas con colorante May Grünwald-Giemsa, según se explicó en Materiales y Métodos.

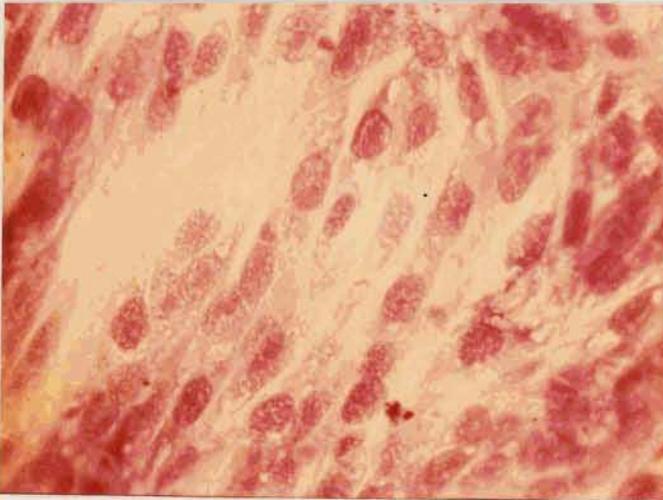
Entre el tercer y noveno día después de la siembra, las monocapas normales de la línea Vero aparecen formadas por células poligonales, elongadas, con núcleos pleomórficos que presentan un solo nucleolo. En el citoplasma se observa discreta vacuolización (Fotografías 3 y 4).

Luego del undécimo día de cultivo in-vitro, se observan multicapas densas de células entrecruzadas junto con zonas donde las células presentan un crecimiento paralelo (de igual orientación) (Fotografía 5).



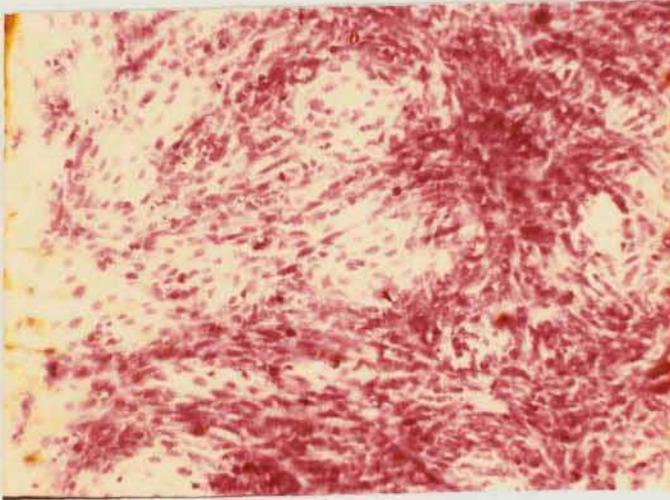
FOTOGRAFIA 3

Células Vero normales : aspecto de la monocapa al día 3 in-vitro. Tinción May Grünwald-Giemsa (100x).



FOTOGRAFIA 4

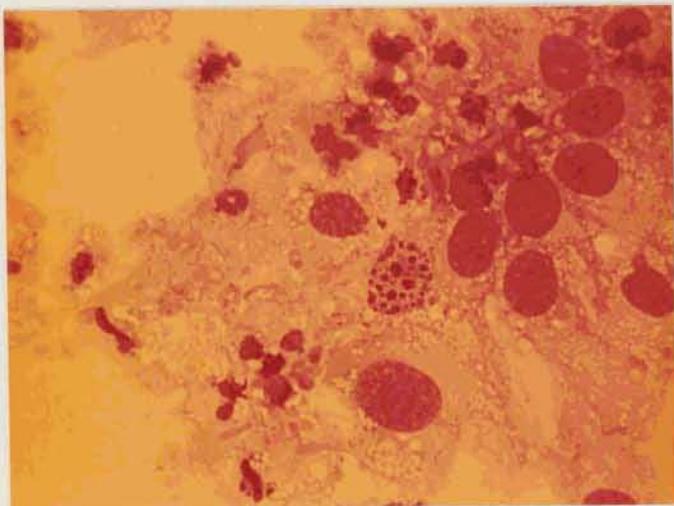
Células Vero normales : aspecto del crecimiento a los 9 días in-vitro (400x).



FOTOGRAFIA 5

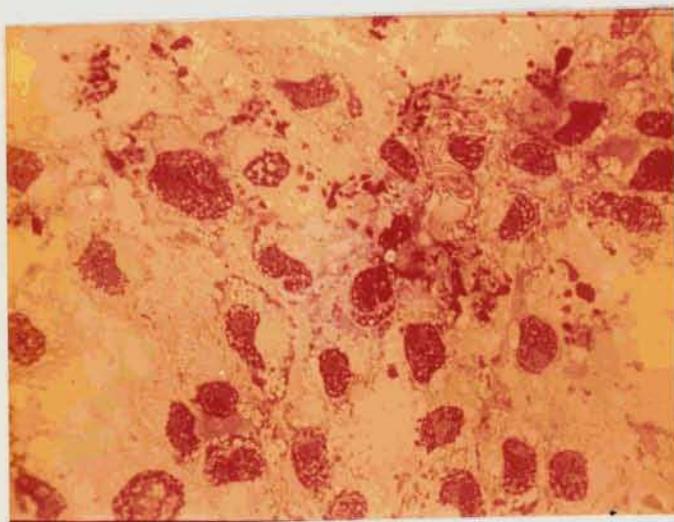
Aspecto de las células Vero normales de 11 días in-vitro; crecimiento en multicapas con centros densos de apilamiento mostrando orientación entrecruzada.

Para hacer las observaciones citológicas de los cultivos infectados se utilizó la cepa XJCl₃ de virus Junín a una multiplicidad de 0.2. Estos cultivos se estudiaron entre el tercer y undécimo día p.i., encontrándose áreas focales netas de células picnóticas rodeadas de células normales. Esta destrucción celular se hace más evidente en los bordes de la monocapa. Los núcleos se presentan encogidos con la cromatina alterada (lisis) y cambios citoplásmicos consistentes en granulación y extensa vacuolización. Se observan cuerpos basófilos, polimorfos, de diversos tamaños, distribuidos en todo el citoplasma; los nucleolos son también muy basófilos. Hay cantidad de detritus cromatínico en las áreas de destrucción celular lo que se hace más evidente al 7º día p.i. Las áreas de lisis son producidas por el desprendimiento de las células adheridas al vidrio; sus bordes están formados por células picnóticas con la red cromatínica rodeando restos nucleolares (Fotografías 6, 7, 8 y 9).



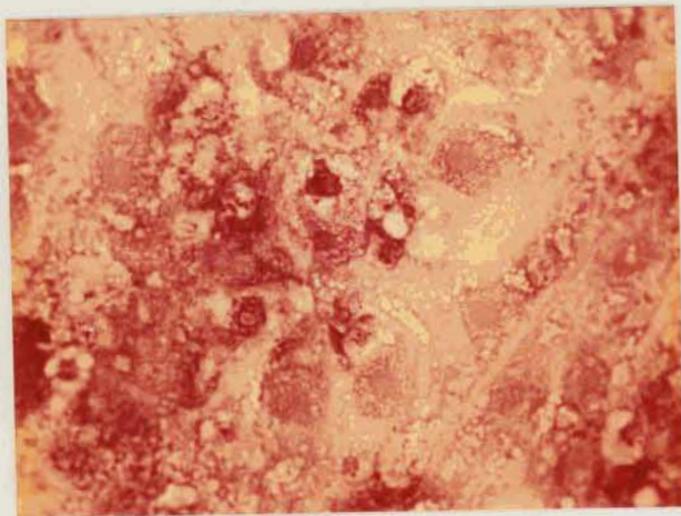
FOTOGRAFIA 6

Células Vero al día 3 p.i.
Se observan núcleos destruí-
dos, encogidos, los cito-
plasmata extensamente vacuo-
lados y lisis cromatínica
(400x).



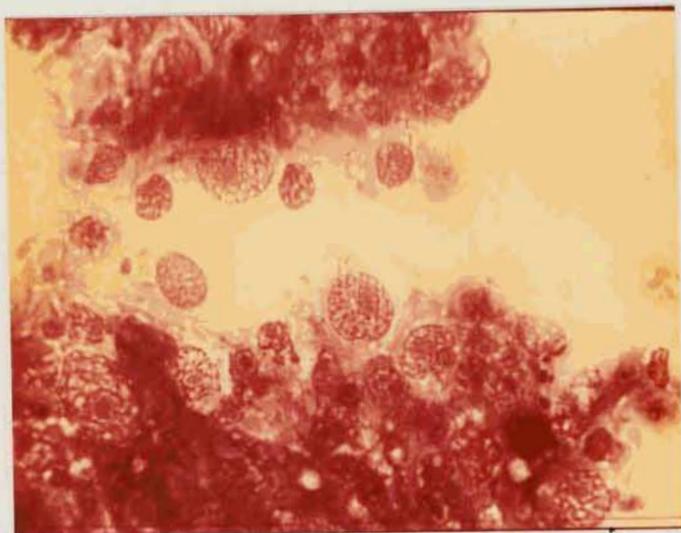
FOTOGRAFIA 7

Células Vero al día 4 p.i.
Se observa lisis de la cro-
matina, formando acúmulos;
vacuolización citoplásmica
intensa, enormes nucleolos.



FOTOGRAFIA 8

Aspecto de las células Vero luego de 11 días de infección con virus Junín. Degeneración vacuolante de la capa celular; células picnóticas.



FOTOGRAFIA 9

Borde de placa de destrucción en células Vero a los 11 días p.i.; núcleos encogidos, en cariorrexis.

Las observaciones citológicas de la ACP de Tacaribe en células Vero no ofrecen diferencias de importancia respecto del Junín.

III. PRODUCCION DE PLACAS BAJO AGAR.

Los virus Junín y Tacaribe originan placas bajo agar sobre monocapas de células Vero (48).

Debido al prolongado período de incubación necesario para el desarrollo de las placas por estos virus, es imprescindible realizar el ensayo cumpliendo rigurosamente con una serie de condiciones que aseguran la preservación de la monocapa durante 7 u 8 días bajo agar. Como se describe detalladamente en Materiales y Métodos, los requisitos fundamentales que deben cumplirse son :

- a) falta de toxicidad del medio sólido con que se cubre la monocapa celular;
- b) temperatura constante de incubación;
- c) utilización de las células en óptimo estado fisiológico y durante la fase estacionaria de crecimiento.

En esas condiciones, se obtiene óptima preservación de las monocapas luego de mantener bajo agar el cultivo durante el tiempo necesario, como se revela por fijación y tinción con cristal violeta (Fotografía 10). Las placas de virus Junín aparecen al día 6º p.i., momento en que son muy turbias, pequeñas y apenas distinguibles sobre el tejido (Fotografía 11). Con el transcurso del tiempo van aumentando de tamaño y resultan más nítidas (Fotografía 12), sin variar su número total.

El virus Tacaribe produce placas similares (Fotografías 13 y 14), no

siendo posible diferenciar un virus de otro por tamaño o morfología de placas.

Ambos virus, crecidos en cerebro de ratón lactante, producen una mezcla de placas líticas y turbias de alrededor de 1 mm de diámetro. El tamaño mayor que alcanzan es de 2 mm y se obtiene al 9º y 10º día p.i.

En la fotografía 15 se ve un enfoque de placa lítica producida por el virus Tacaribe en células Vero : los bordes no son netos y el centro aparece transparente; en la Fotografía 16 se ve un enfoque de placa turbia, que presenta en su centro restos celulares adheridos aún al vidrio.



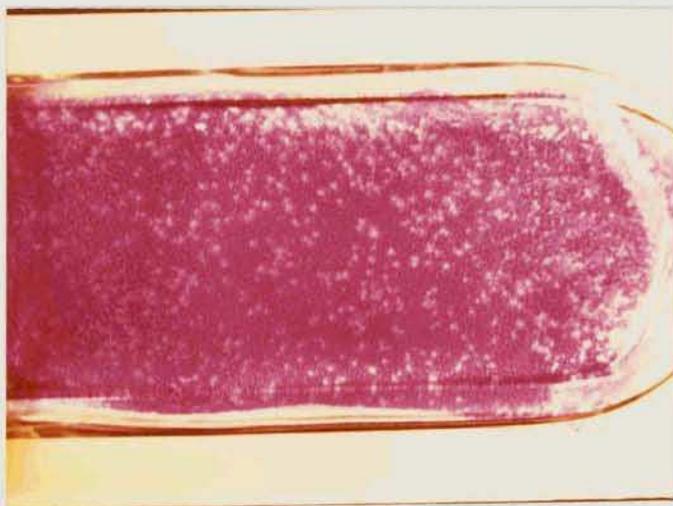
FOTOGRAFIA 10

Tejido de células Vero sin infectar, mantenidas en las condiciones descritas para el ensayo de placas.



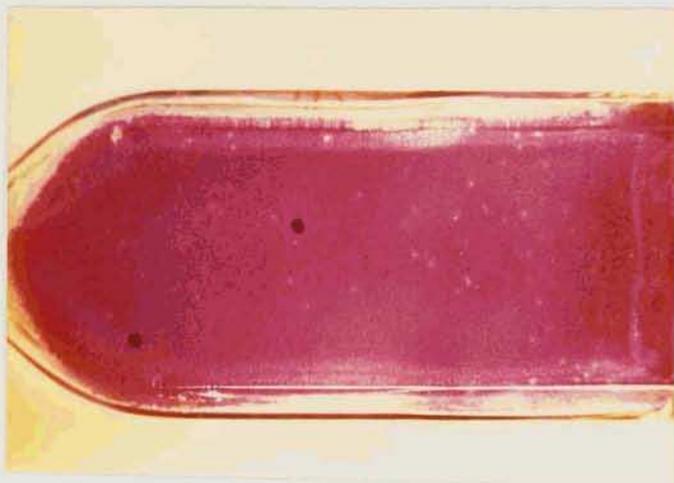
FOTOGRAFIA 11

Placas producidas por la cepa XJCl₃ de virus Junín en células Vero al día 6 p.i.



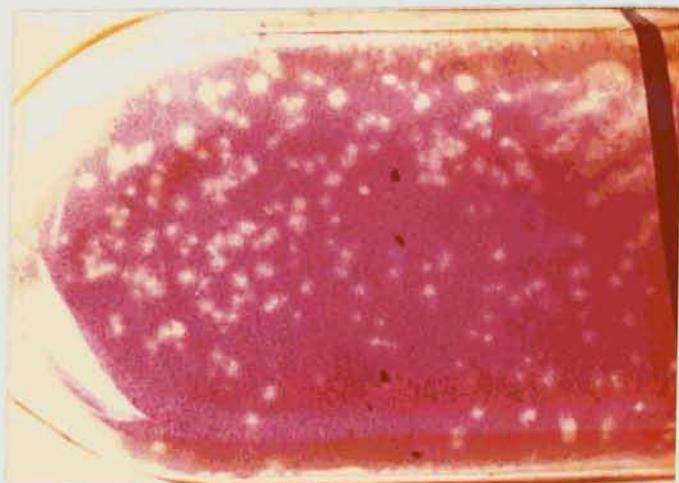
FOTOGRAFIA 12

Placas producidas por la cepa XJCl₃ de virus Junín en células Vero al día 8 p.i.



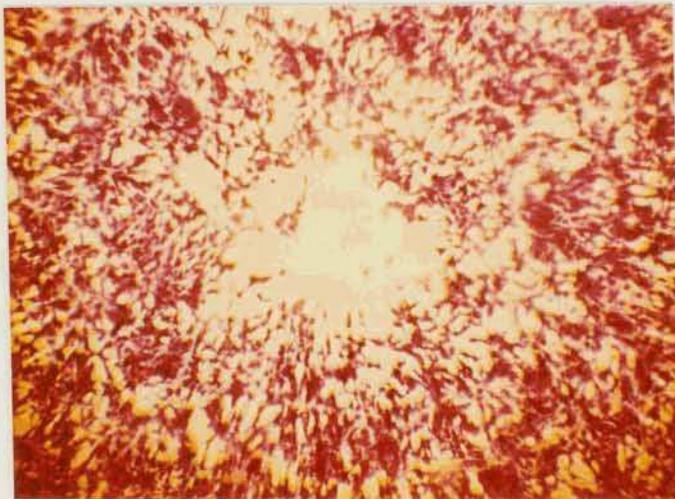
FOTOGRAFIA 13

Placas producidas por el virus Tacaribe en células Vero al día 7 p.i.



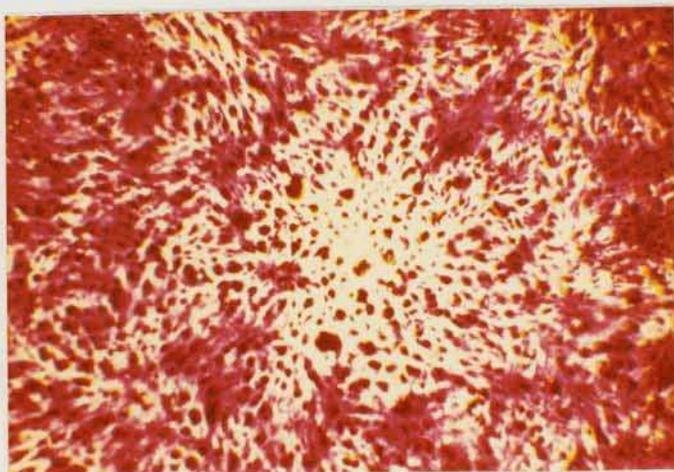
FOTOGRAFIA 14

Placas producidas por el virus Tacaribe en células Vero al día 9 p.i.



FOTOGRAFIA 15

Enfoque de placa lítica originada por el virus Tacaribe en células Vero al día 9 p.i.



FOTOGRAFIA 16

Enfoque de placa turbia originada por el virus Tacaribe en células Vero al día 9 p.i.

Es de hacer notar que en las placas producidas por los sobrenadantes de células Vero (crecidas en 15% de suero) infectadas con Junín o Tacaribe se observa predominio del tipo lítico, mientras que los stocks crecidos en cerebro de ratón o en la línea de células Vero mantenida con menos suero producen predominantemente placas turbias. Sin embargo, la morfología de placas es muy variable, dependiendo fundamentalmente del estado en que se encuentra la monocapa al momento de la infección.

IV. CURVAS DE CRECIMIENTO VIRAL.

La producción de virus se investigó inoculando células Vero en su subcultivo 86, 72 horas después de sembradas, con una multiplicidad de 0.2. Luego de 1 hora de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y los cultivos se reincubaron a 37°C con medio de mantenimiento. Diariamente se cosechó el sobrenadante que se centrifugó a baja velocidad para eliminar restos celulares y las muestras se conservaron a -70°C hasta el momento de su titulación por UFP.

En la Figura 4 se muestra la curva de crecimiento de virus Junín extracelular junto con la evolución de la acción citopática. Se observa que el período de latencia es aproximadamente de 24 horas con un máximo título de virus al tercer día p.i., aunque puede decirse que entre los días 2 y 4 hay una producción casi constante de virus, aproximadamente 10^6 UFP/ml. Luego estos valores comienzan a declinar pero manteniéndose la liberación continua de virus aún en el período de recuperación celular como ser al día 13 p.i.

En la Figura 5 se muestran las curvas de crecimiento extracelulares

y los gráficos de evolución de la ACP correspondientes al virus Tacaribe, a dos multiplicidades de infección diferentes, 20 y 0.2. La curva de producción del virus Tacaribe en células Vero es similar a la originada por el virus Junín. Nuevamente aquí se pone de manifiesto el fenómeno de autointerferencia que caracteriza las infecciones por Arenavirus ya que hay una sensible diferencia en el rendimiento de virus al variar la multiplicidad. Para el virus Tacaribe el título máximo correspondiente al tercer día p.i. disminuyó 10 veces al aumentar 100 veces (de 0.2 a 20) la multiplicidad.

Tanto para Junín como para Tacaribe la producción de virus precede en dos días a la aparición de ACP y continúa aún cuando el tejido ha comenzado a regenerarse. Se inicia así la etapa de persistencia del virus sin destrucción celular, después de una etapa virulenta en que muy pocas células sobreviven a la infección.

FIGURA 4

Gráfico comparativo de la curva de crecimiento del virus Junín (XJCl₃)
y la evolución de la acción citopatógena en células Vero.

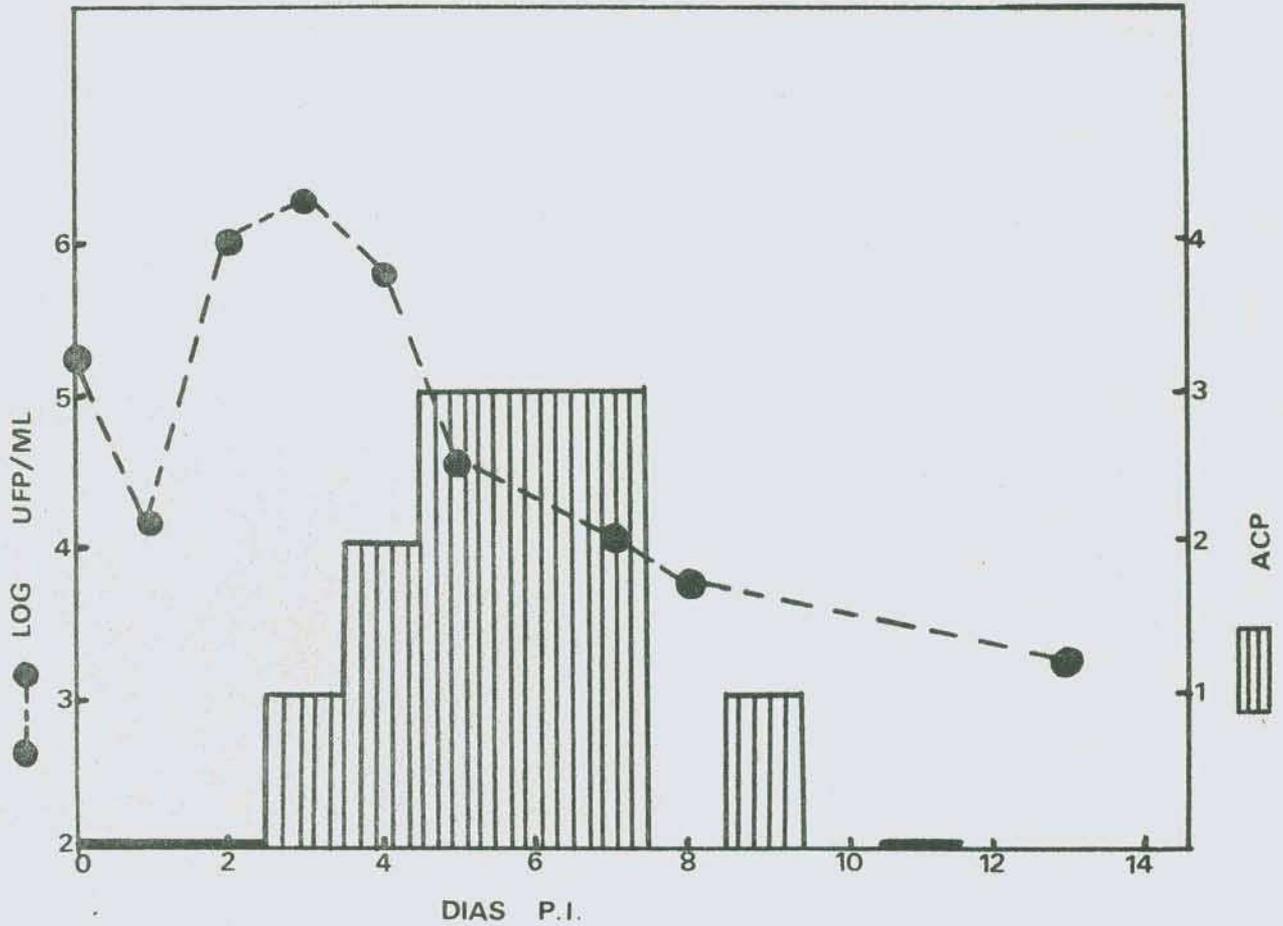
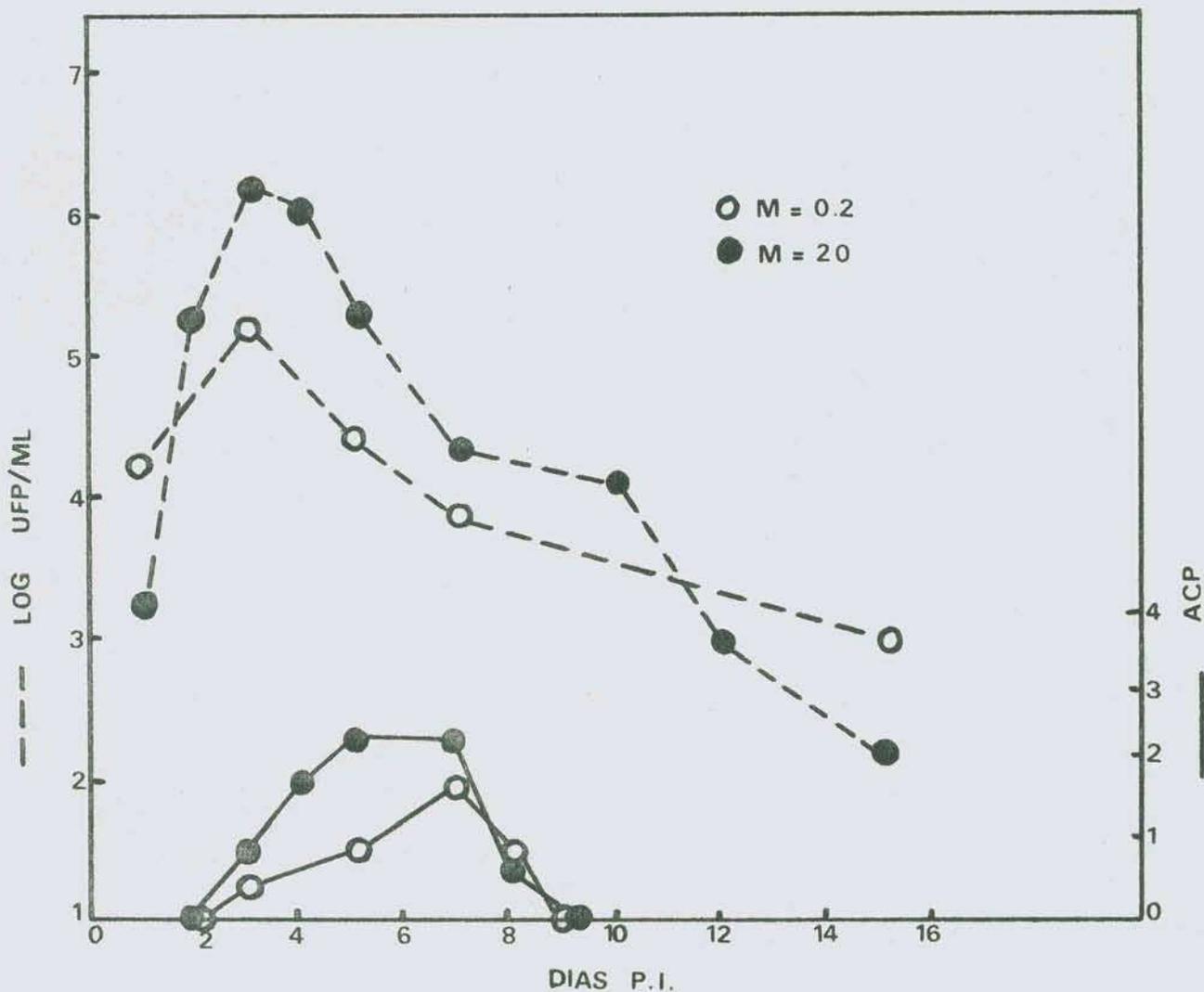


FIGURA 5

Curvas de crecimiento y evolución de la ACP del virus Tacaribe en células Vero infectadas a distintas multiplicidades.



INFECCION PERSISTENTE

I. INFECCIONES PROLONGADAS CON LOS VIRUS JUNIN Y TACARIBE EN CULTIVOS ESTACIONARIOS DE CELULAS VERO.

Al haber observado que durante la infección primaria la síntesis de virus acompañaba tanto la etapa de destrucción celular como la de recuperación (figuras 4 y 5) se consideró apropiado examinar las características del sistema durante un período de tiempo más prolongado. Este estudio se encaró teniendo en cuenta dos aspectos : la observación de las variaciones morfológicas de los tejidos como así también la posibilidad de que los mismos continuasen produciendo partículas virales.

Con ese fin, se infectaron células Vero pasaje 86, crecidas en botellas de 90 cc de capacidad, en forma paralela con virus Tacaribe y Junín, a una multiplicidad de 0.2. Luego de dejar adsorber el virus 2 horas, se retiró el inóculo, se agregó medio de mantenimiento y se incubaron a 37°C. En forma similar se trataron controles celulares no infectados. Los cultivos se observaron al microscopio diariamente durante un período de 35 días siguiéndose la evolución de la ACP. Cada 48 horas se cambió el medio de mantenimiento de los mismos, recogiendo en cada caso alícuotas de los sobrenadantes, las cuales fueron después tituladas en células Vero por UFP. Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 6 y 7.

Como se observa en la Figura 6, las células infectadas con virus Tacaribe manifestaron una extensa ACP entre los días 3 y 12 p.i. Luego comenzó la etapa de recuperación celular, la cual se completó en un lapso de 3 días. El tejido ya regenerado volvió a producir ACP en forma espontánea

al día 19 p.i. y esta ACP se mantuvo hasta el día 33 p.i. en que comenzó a observarse una nueva recuperación. Es decir, se presentaron ciclos de producción de ACP y regeneración, notándose que en el segundo ciclo la ACP se prolongó por un lapso de tiempo mayor que en el primero.

Hubo constante liberación de virus a partir de las células infectadas a lo largo de todo el experimento. Los títulos de virus extracelular alcanzaron su valor máximo en los momentos en que se manifestó gran ACP, siendo del orden de 10^6 UFP/ml para el primer pico de ACP (3 días p.i.) y 10^5 UFP/ml para el segundo (26 días p.i.). Durante las etapas de regeneración el tejido siguió produciendo virus infectante pero en menor cantidad, del orden de 10^3 UFP/ml.

Para las células Vero infectadas con virus Junín (Figura 7) se observaron tres ciclos de ACP. El primero comenzó al día 3 p.i., alcanzando su grado máximo de ACP al 6º día p.i.; luego disminuyó gradualmente hasta el día 11, en que el tejido estaba completamente recuperado. Sin embargo, en el día 17 se produjo una nueva aparición de ACP con destrucción celular que se prolongó hasta el día 19, seguido por un breve período de recuperación hasta el día 28 en que reapareció la ACP, para iniciar el tercer ciclo. El virus se encontró presente en el sobrenadante durante las sucesivas etapas de lisis y repoblación, produciendo títulos del orden de 10^4 UFP/ml. De igual forma que en el cultivo infectado con virus Tacaribe el primer ciclo de ACP fue de más larga duración que los posteriores.

Los resultados de estas experiencias muestran que el establecimiento de una infección prolongada con períodos cíclicos de lisis y recuperación en cultivos estacionarios de células Vero mantenidos sin repicar es una característica común a estos dos miembros del grupo Arenavirus.

FIGURA 6

Producción de virus y ACP en un cultivo estacionario de células
Vero infectadas con virus Tacaribe.

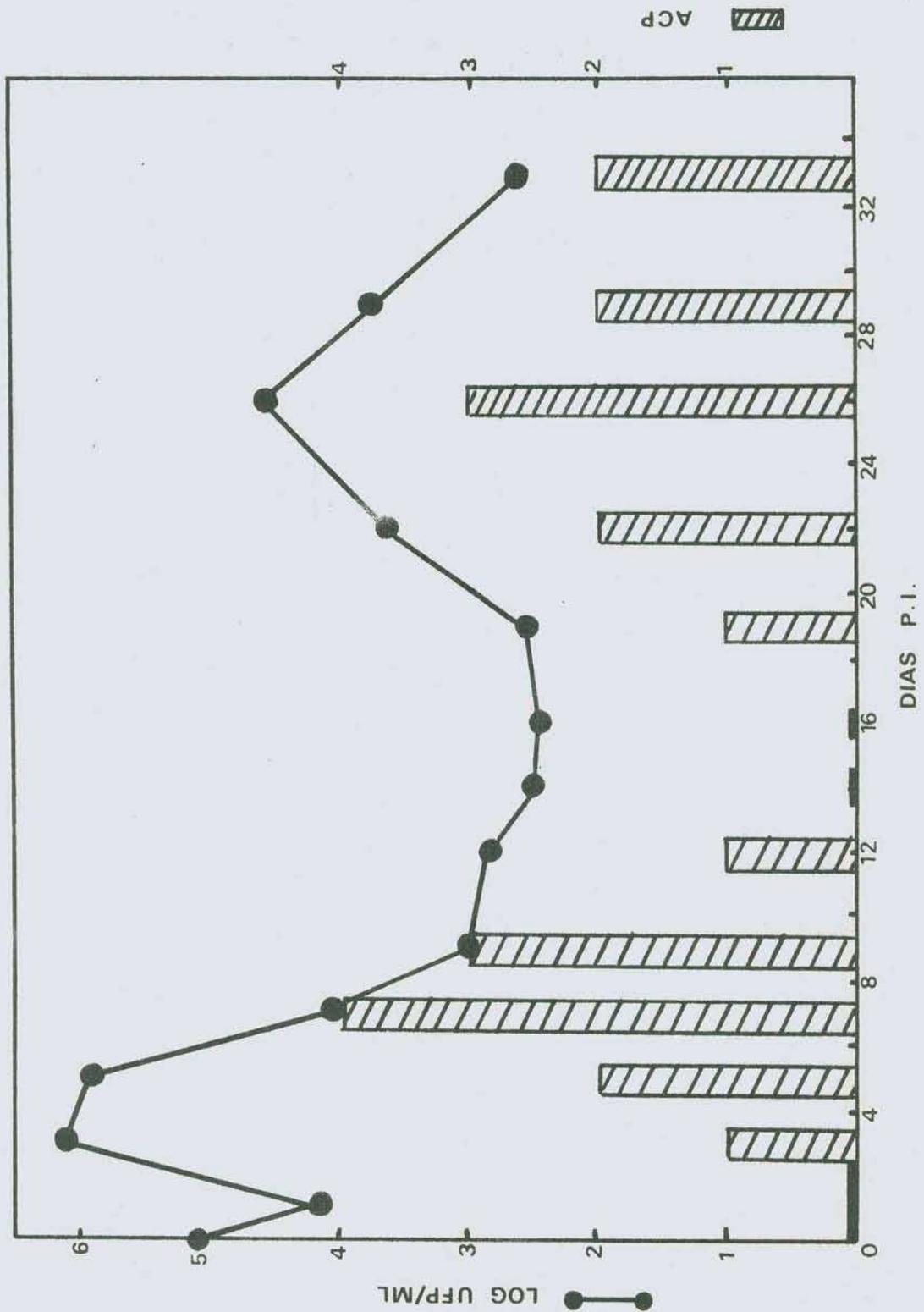
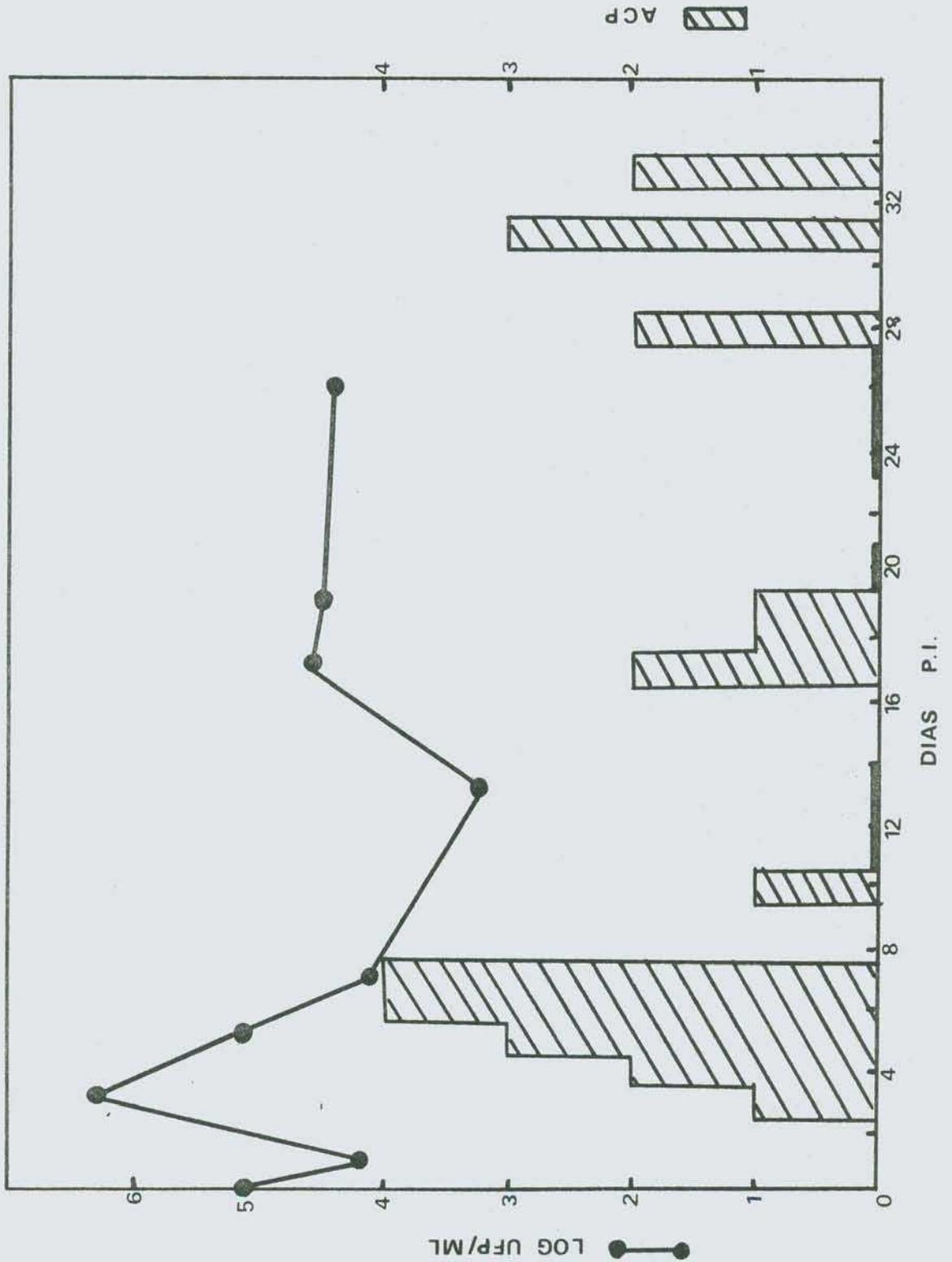


FIGURA 7

Producción de virus y ACP en un cultivo estacionario de células

Vero infectadas con virus Junín (XJCl₃).



II. INICIACION Y MANTENIMIENTO DE SUBLINEAS persistentemente infectadas.

Para analizar los distintos factores que regulan la coexistencia virus célula en la infección persistente, se trató de iniciar sublíneas crónicamente infectadas a partir de células Vero recuperadas de la infección primaria con virus Junín y Tacaribe. Las sublíneas se establecieron repicando cultivos que se encontraban en la etapa de recuperación luego del primer ciclo de ACP, según lo descrito en Materiales y Métodos, y se denominaron Vero-J y Vero-T (Vero recuperadas de la infección con Junín y Tacaribe, respectivamente). Ambas líneas se estudiaron durante 70 pasajes in-vitro.

A.-ALTERACIONES PRODUCIDAS EN LA CELULA POR LA PRESENCIA DEL VIRUS.

Morfología.

En los primeros pasajes las células Vero-J y Vero-T presentaron un aspecto diferente al de las células Vero.

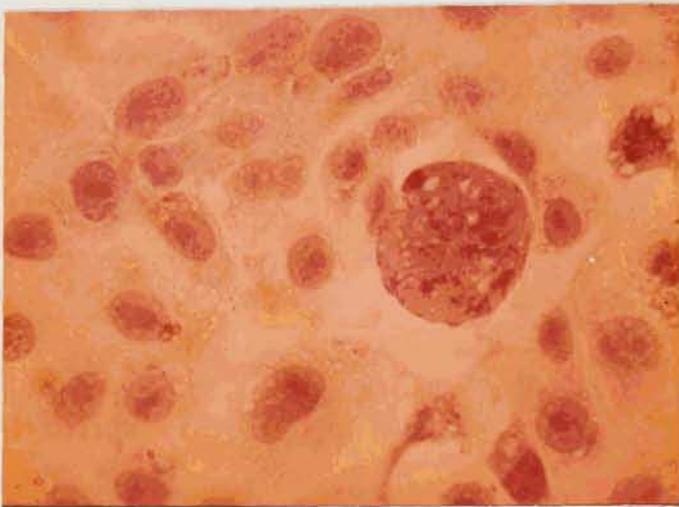
Las células Vero sufren variaciones en su morfología durante las distintas etapas del crecimiento. A las 24-48 horas después de sembradas, presentan una monocapa regular de células poligonales de bordes oscuros, lo que las hace perfectamente diferenciables una de otra. A las 72 horas, las células comienzan a alargarse y se orientan tomando una disposición radial; el tejido evidencia una gran proliferación celular, siendo muy difícil distinguir una célula de otra. Pasadas las 96 horas comienzan a aparecer células necróticas en la monocapa y en el sobrenadante, dependiendo su número de las condiciones de cultivo (cantidad de células sem-

bradas inicialmente, concentración de suero del medio nutritivo, frecuencia de renovación del medio de mantenimiento, etc.). Aproximadamente al 8º día se observan además acúmulos o grupos de células redondas, oscuras. Finalmente (10-11º día), el tejido presenta un aspecto totalmente degenerado, con multicapas, puentes y entrecruzamientos (Fotografías 3, 4 y 5).

Las sublíneas Vero-J y Vero-T presentan, en los primeros pasajes después de la infección, células poligonales, muy contrastadas sobre el vidrio de la botella y granuladas, que no guardan la misma orientación que ofrecen las células normales. A diferencia de éstas, la monocapa es muy irregular, con pequeños acúmulos de células redondeadas ya a las 24 horas después de sembradas, como asimismo un número elevado de células en suspensión. Al ir aumentando el número de repiques, se fueron perdiendo gradualmente estas características diferenciales y, por simple observación al microscopio óptico, las células Vero-J y Vero-T resultaron indistinguibles de las Vero.

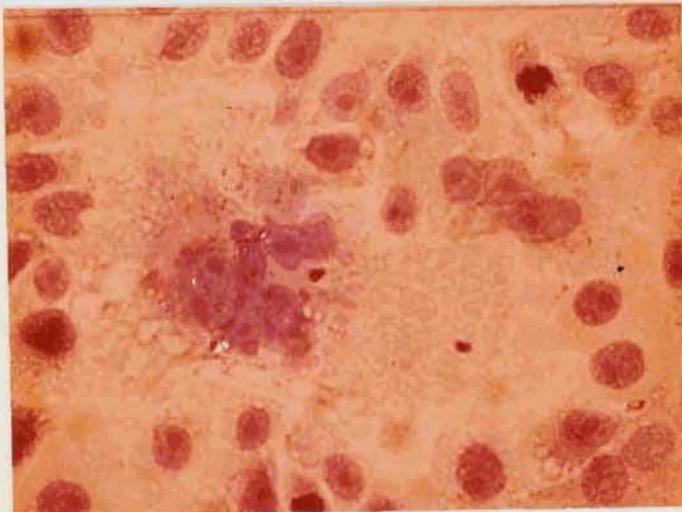
Para visualizar mejor el tipo de alteraciones morfológicas que pudo haber ocasionado la presencia del virus en la célula crónicamente infectada, se empleó la técnica de tinción con May Grünwald-Giemsa sobre células Vero-J y Vero-T, crecidas en tubos Leighton, a las 72 horas después de sembradas. Así se puso en evidencia la aparición de alrededor de un 10% de células gigantes, multinucleadas, que se observan originalmente en los cultivos de Vero pero en más baja proporción (2%). Dichas células contienen numerosos nucleolos, muy basófilos e hipertróficos, de formas anómalas, con citoplasmas tenues y muy finamente vacuolados. Los núcleos se ubican en un polo de la célula, cercanos a la membrana plasmá-

tica. Estas células aparecen rodeadas en algunas ocasiones por células cuyos núcleos tienen aspectos alterados y encogidos, mientras que el resto del tejido presenta un aspecto normal (Fotografías 17, 18, 19 y 20).



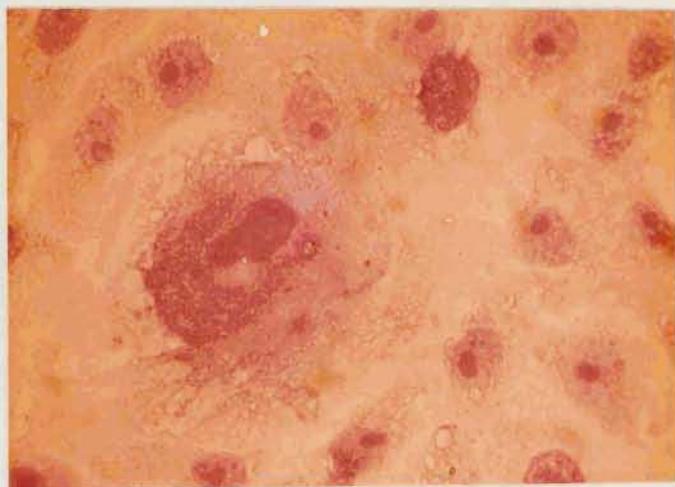
FOTOGRAFIA 17

Célula Vero-J : multinucleada, muy basófila, numerosos micronúcleos, vacuolados (400x).



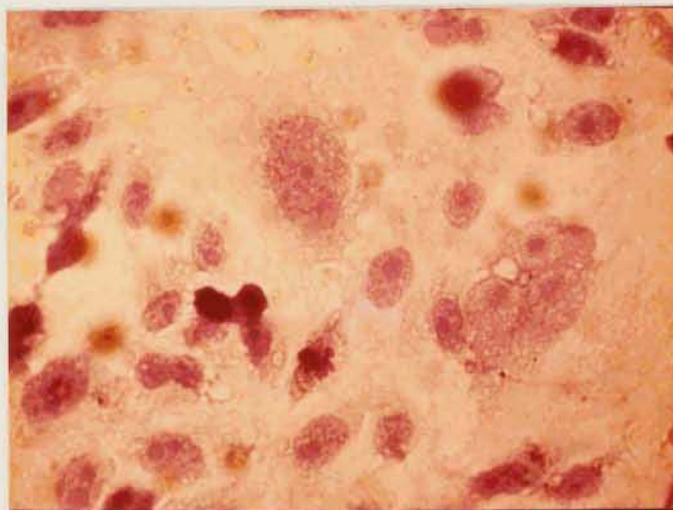
FOTOGRAFIA 18

Células Vero-T (de 72 horas in-vitro) : células con numerosos nucleolos.



FOTOGRAFIA 19

Célula Vero-J gigante, con enorme nucleolo anómalo en su forma y tinción (100x).



FOTOGRAFIA 20

Campo de células Vero-J : una célula multinucleada, otra gigante y cerca una célula en mitosis.

La presencia de esta considerable proporción (10%) de células gigantes, multinucleoladas, se registró en todas las observaciones realizadas en cultivos de Vero-J y Vero-T a lo largo de diferentes pasajes de las dos sublíneas, tanto en la etapa temprana como tardía de la infección crónica.

Condiciones de crecimiento.

Con el fin de determinar si las líneas Vero-J y Vero-T presentaban para su crecimiento un requerimiento nutritivo similar a las células Vero no infectadas, se estudiaron las curvas de multiplicación celular en presencia de diferentes concentraciones de suero.

Para ello, se utilizaron cultivos de células Vero-T en el pasaje 13, Vero-J en el pasaje 20 y células Vero pasaje 109, los que fueron incubados a 37°C en medio 199 conteniendo 10, 15 y 20% de suero inactivado de ternera, respectivamente. Cada 24 horas a partir del momento de siembra se triplicaron dos botellas correspondientes a cada serie, y las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio al cual se añadió 0.1 ml de solución acuosa de azul Tripan. Luego de dejar en contacto con el colorante durante 15 minutos, las células viables fueron contadas en una cámara de Neubauer. Los datos obtenidos para las tres líneas se ven en las Figuras 9, 10 y 11.

Previamente se habían establecido las condiciones óptimas para la preservación de estos cultivos en cuanto a la frecuencia de renovación del medio nutritivo. Esto se determinó comparando las curvas de crecimiento celular de dos series de cultivos de células Vero, para una misma com-

centración de suero (15%); en un caso se renovó el medio de mantenimiento al 4º y 7º día después de la siembra mientras que en el otro no se cambió el medio durante el tiempo que duró el ensayo (Figura 8). Los datos correspondientes demuestran que para la preservación de estos cultivos es un requisito fundamental cambiar el medio de mantenimiento con cierta frecuencia. Al no renovar los nutrientes se produce la muerte celular y destrucción del tejido en un lapso de 10 días.

Como se observa en los gráficos presentados en Figura 9, Figura 10 y Figura 11, las células Vero-J y Vero-T crecen a la misma velocidad independientemente de la concentración de suero del medio de cultivo a diferencia de las células Vero que en presencia de 10% de suero se mantienen prácticamente en estado estacionario.

Esta diferencia en los requerimientos nutritivos de Vero-J, Vero-T y Vero fue atenuándose a medida que aumentó el número de pasajes y especialmente cuando las células controles se sometieron a un ritmo intenso de mitosis por repiques cada 2 ó 3 días. Por encima del pasaje 140 de la línea normal también se observó en las células Vero una independencia del crecimiento con el suero, dentro de los rangos probados (Figura 12). Esto parecería indicar que la presencia del virus acelera un proceso que más tarde ocurre en la célula normal excitada a una constante división.

Es de hacer notar que las células Vero-J y Vero-T se mantuvieron desde los primeros repiques en 199 al 10% de suero, desarrollando óptimas monocapas. Por el contrario, las células Vero debieron ser adaptadas poco a poco a esa disminución de suero en el medio para crecer en buenas condiciones y aún cuando la Figura 12 muestra que por recuento en hemocitómetro la

FIGURA 8

Influencia de la renovación de nutrientes sobre el crecimiento celular.

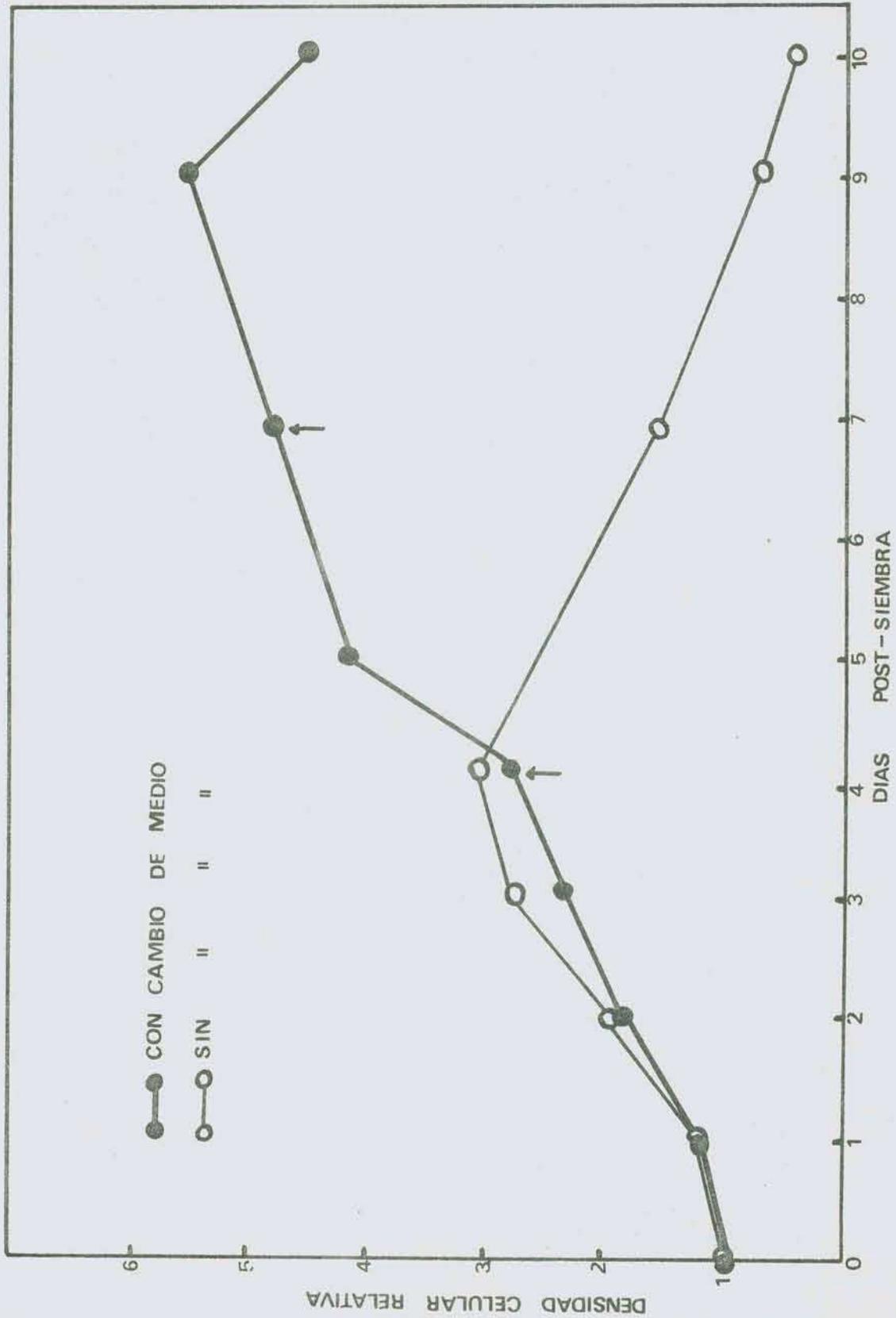


FIGURA 9

Curvas de crecimiento de las células Vero pasaje 109 cultivadas en presencia de distintas concentraciones de suero de ternera.

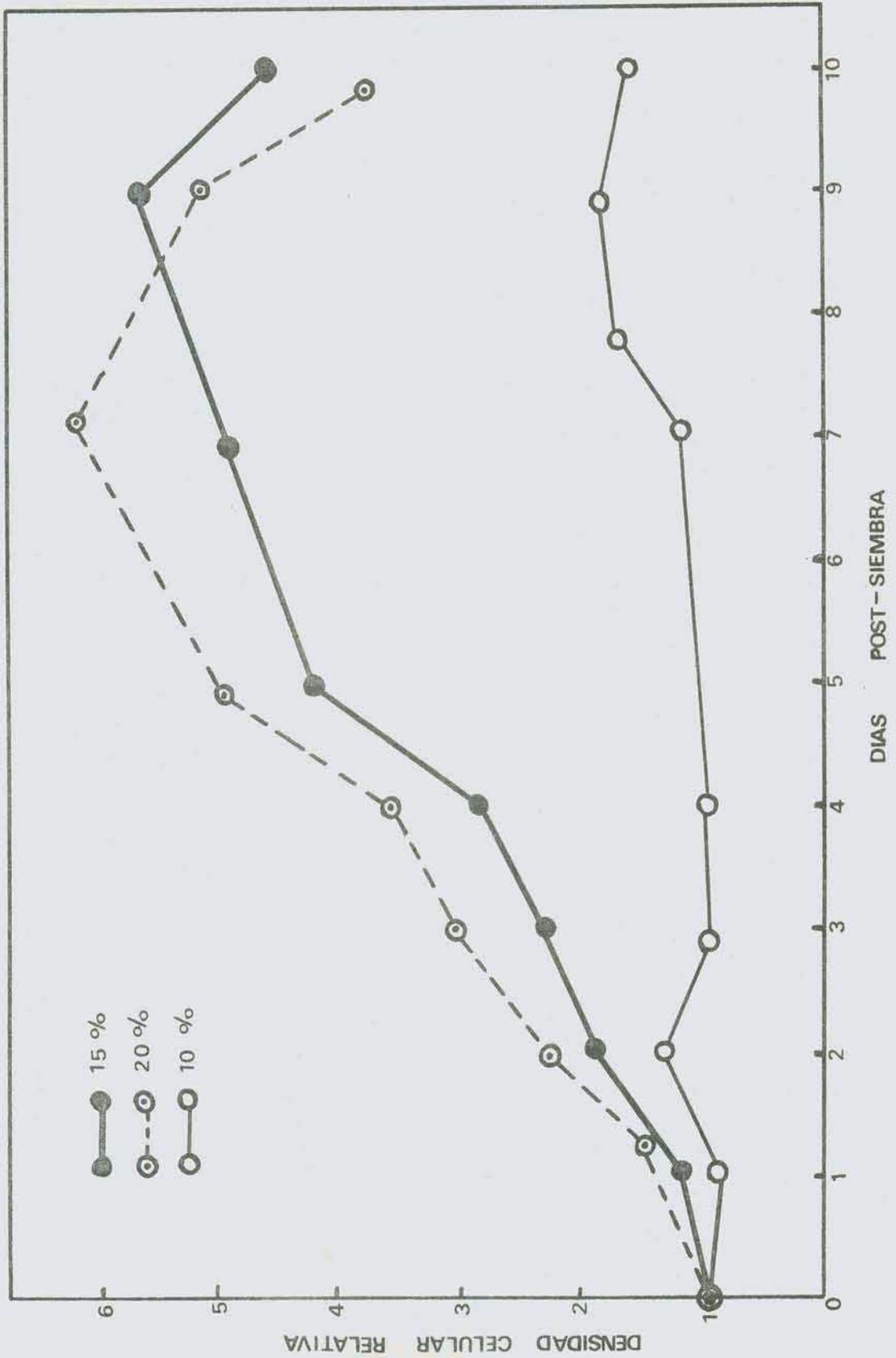


FIGURA 10

Curvas de crecimiento de las células Vero-J pasaje 20 cultivadas en presencia de distintas concentraciones de suero de ternera.

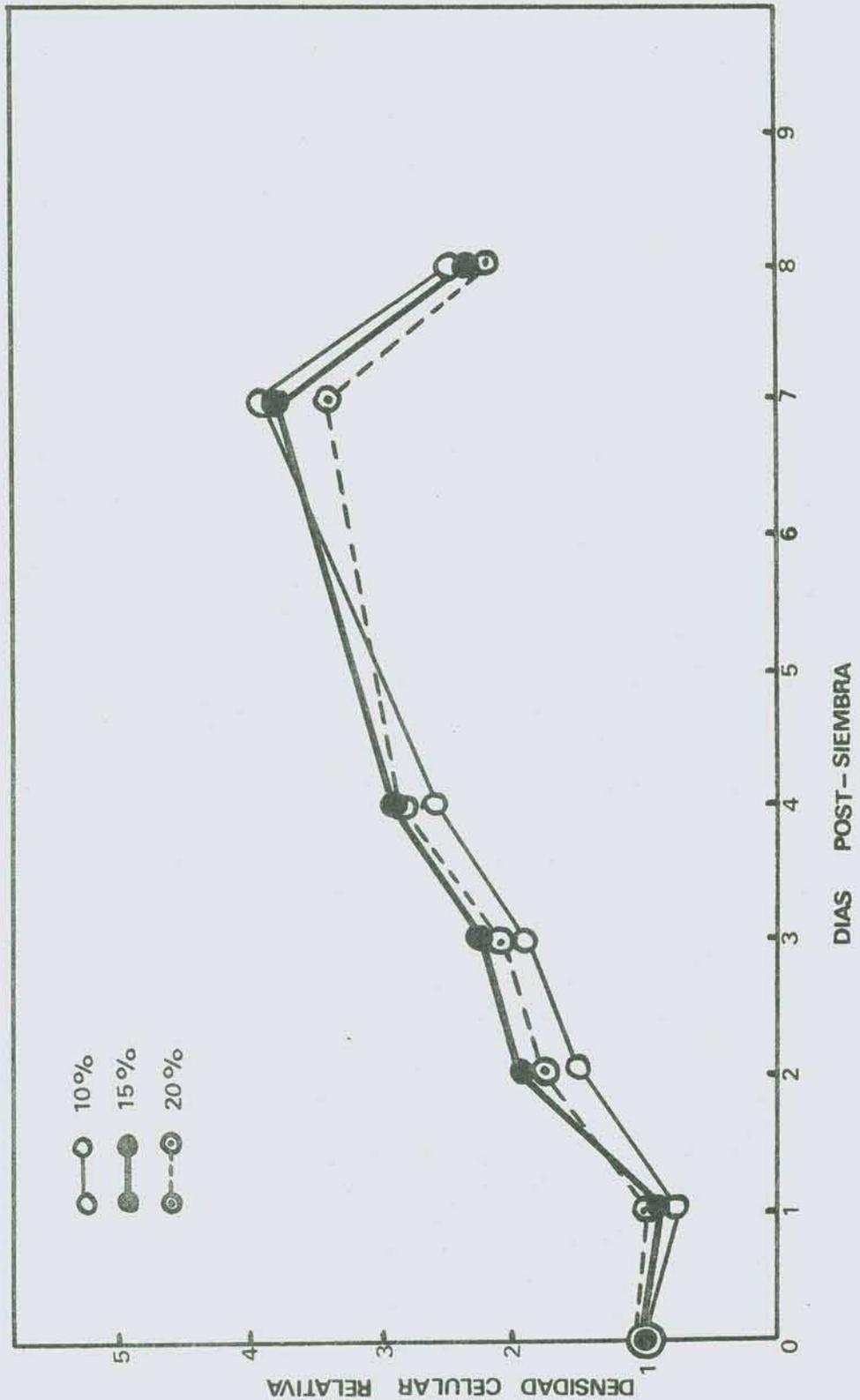
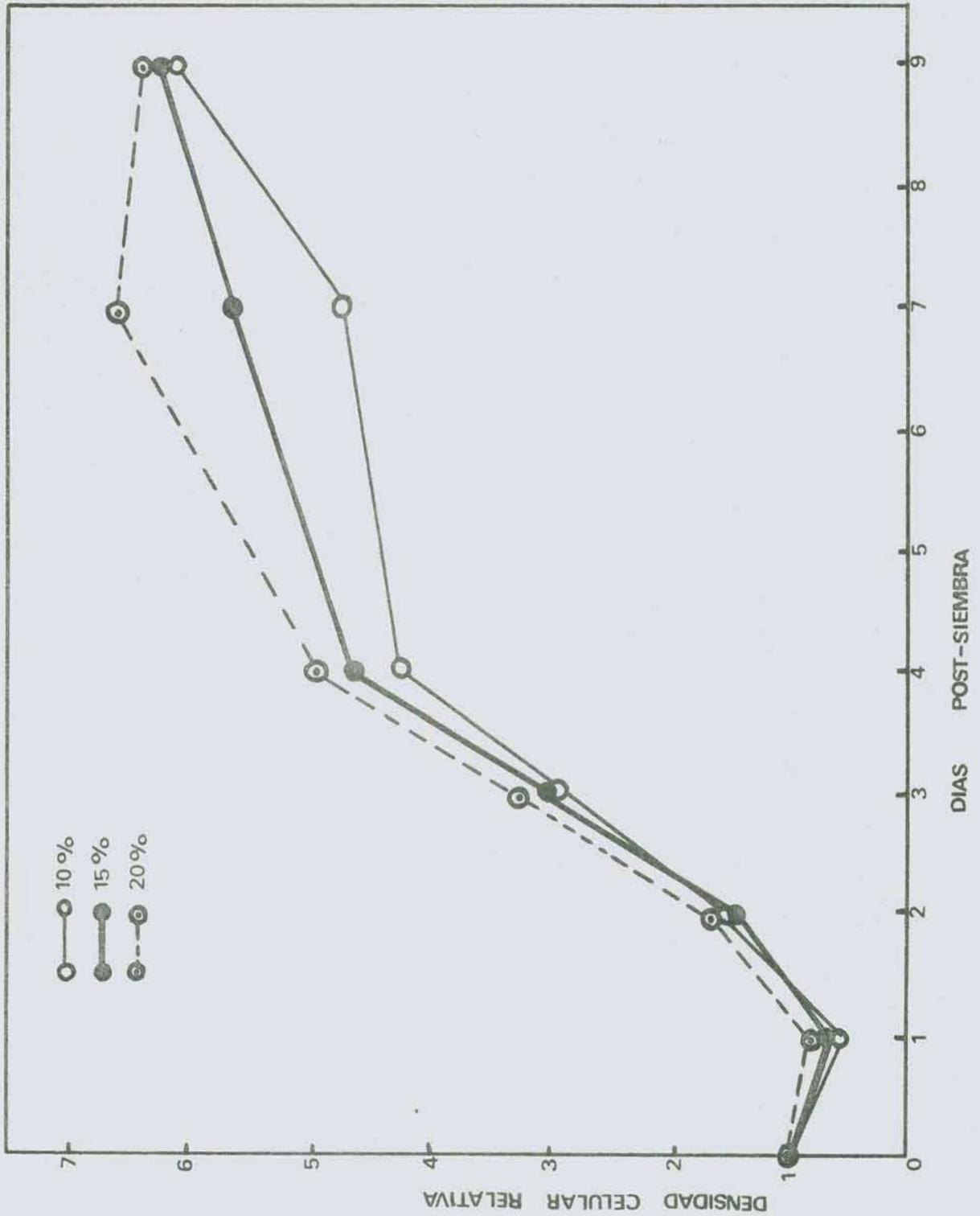
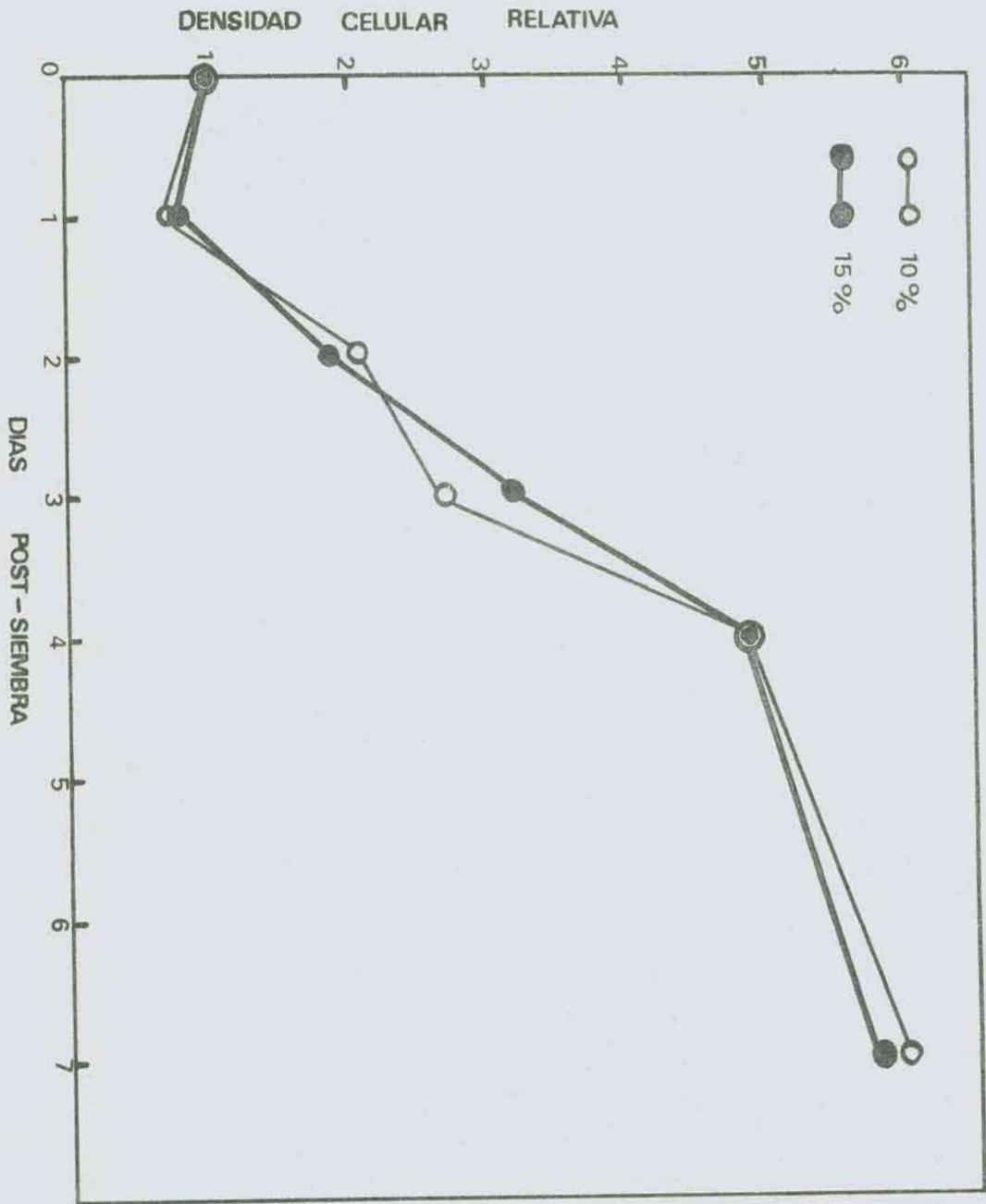


FIGURA 11

Curvas de crecimiento de las células Vero-T pasaje 13 cultivadas en presencia de distintas concentraciones de suero de ternera.





Curvas de crecimiento de las células Vero pesaje 140 cultivadas en presencia de distintas concentraciones de suero de ternera.

FIGURA 12

densidad celular resulta similar, la observación microscópica indicó que en 15% de suero se obtienen mejores monocapas de Vero que con 10%.

Debe destacarse que esta línea normal de células Vero no pudo ser adaptada a crecer con menores concentraciones de suero (del orden del 5%) como sucede con la línea que se usó para las titulaciones rutinarias de virus y las empleadas por otros autores (48)(59).

Estos datos sugieren que de alguna manera la presencia del virus facilita el crecimiento celular aún cuando resulte difícil la explicación de este efecto.

Características citogenéticas.

A fin de establecer si se origina alguna alteración a nivel de los cromosomas celulares como consecuencia de la presencia crónica del genoma viral dentro de la célula, se analizaron las características citogenéticas de la sublínea Vero-T comparativamente con la línea normal Vero.

En primer término, se efectuaron recuentos cromosómicos en 100 células correspondientes a cada línea. El rango de aneuploidía en ambas líneas Vero y Vero-T oscila entre 32 y 105, con un pico difuso de números modales entre 48-54. Sobre 25 cariotipos confeccionados para cada línea celular se encontró que la distribución de cromosomas según Ruzicsa y Hsu (65), quienes los clasifican en metacéntricos, submetacéntricos y subterminales, muestra en ambas líneas diferencias de célula a célula (aún en aquellas metafases con el mismo número de cromosomas) como puede observarse en la Tabla 4 lo que señala la presencia de un gran polimorfismo cariotípico.

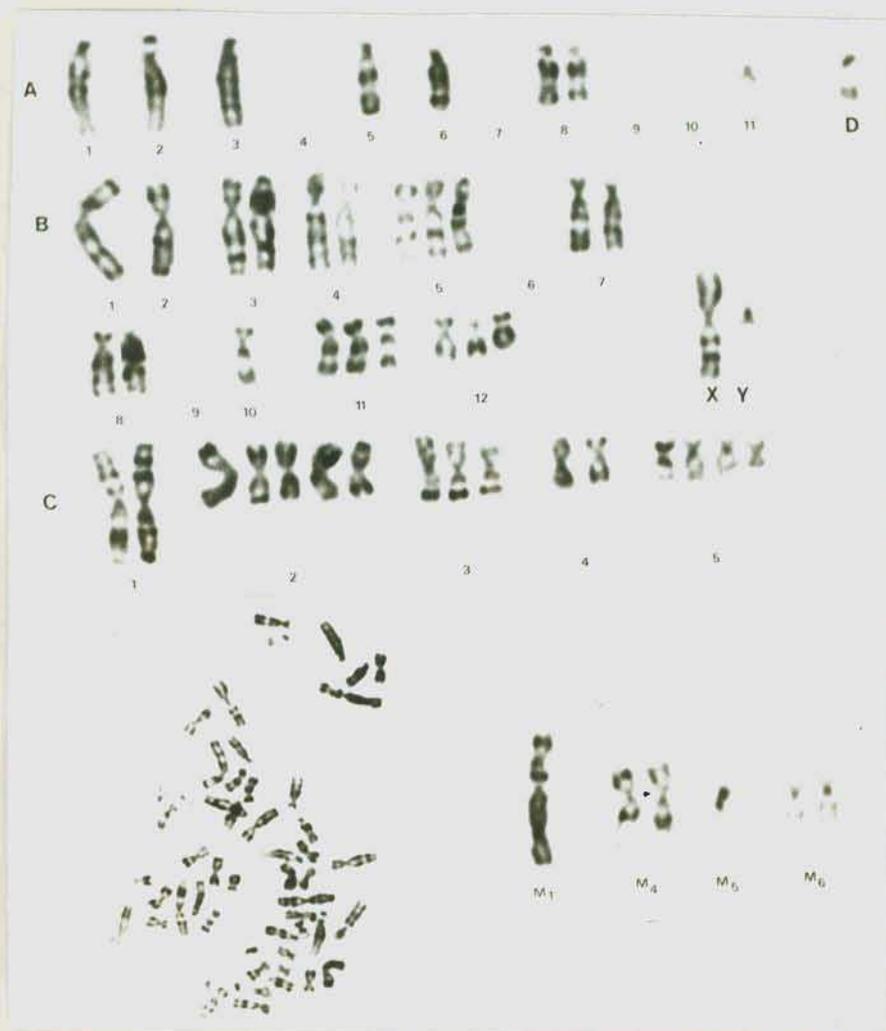
TABLA 4

Cariotipos de 10 células de las líneas Vero y Vero-T : distribución de cromosomas.

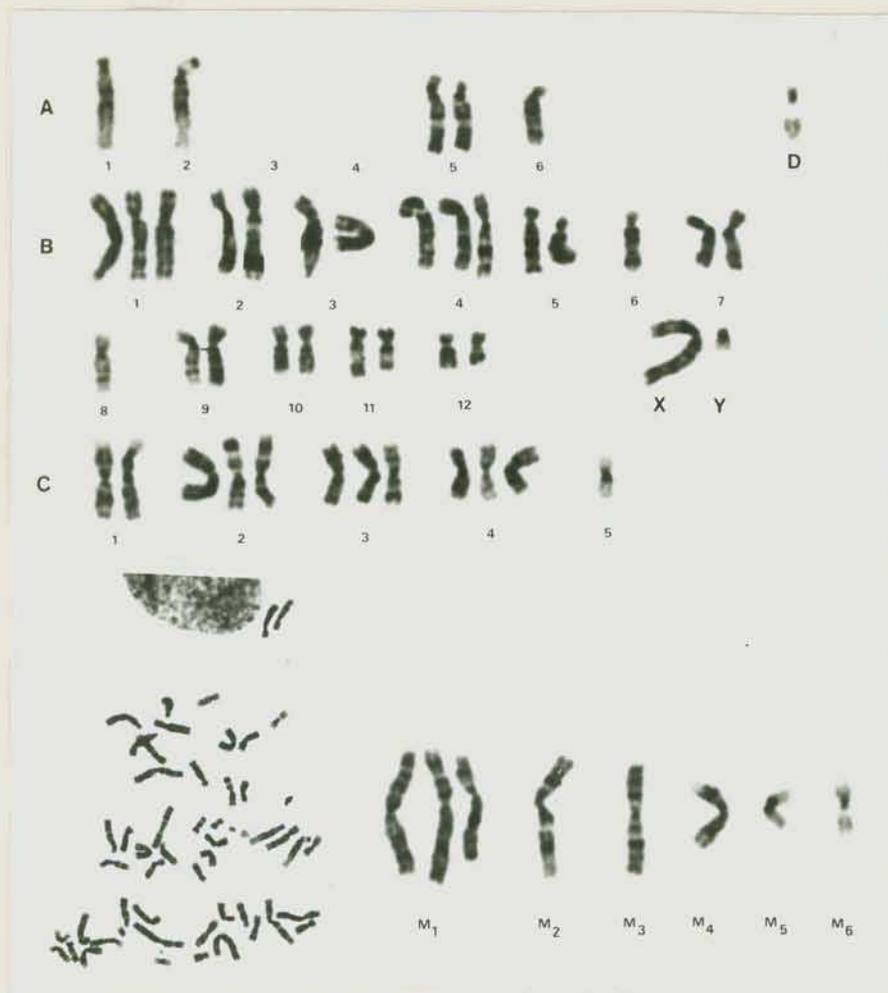
Línea	Nº cromosomas			Nº modal
	M	SM	ST	
Vero	10	27	15	52
	17	16	20	53
	14	39	12	51
	18	20	13	51
	18	15	19	52
	12	15	17	44
	13	17	13	43
	13	16	8	37
	8	19	10	37
	11	14	7	32
Vero-T	23	17	13	53
	24	20	10	54
	14	28	12	54
	13	22	18	53
	10	20	18	48
	12	25	11	48
	15	14	11	40
	11	18	10	39
	9	23	7	39
	12	18	9	39

M : Metacéntrico; SM : Submetacéntrico; ST : Subterminal.

La aplicación de las técnicas de bandeado cromosómico G y C permitió una mejor caracterización de las células Vero normales y crónicamente infectadas. La gran variabilidad de cariotipos presentes tanto en Vero como en Vero-T hizo muy complejo el estudio comparativo por bandeado G. Las fotografías 21 y 22 ilustran un cariotipo bandeado G de una metafase de cada una de las líneas, mostrándose en cuadro separado los marcadores presentes en cada célula.

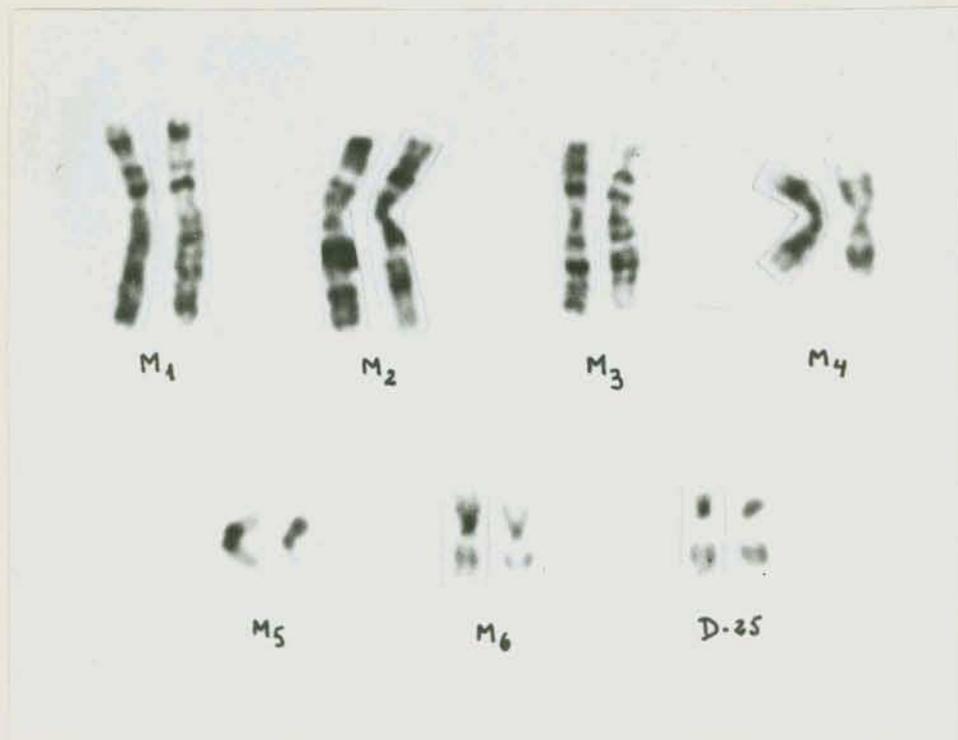


FOTOGRAFIA 21
Cariotipo por bandeado G de una célula Vero normal con sus marcadores.



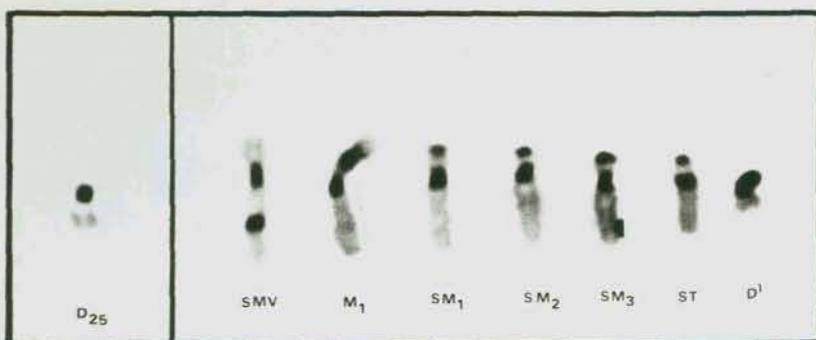
FOTOGRAFIA 22
Cariotipo por bandeo G
de una célula Vero-T
con sus marcadores.

Aunque rara vez se encuentran simultáneamente, todos los cromosomas aparecen con mayor o menor frecuencia en ambas líneas celulares. Tanto la línea Vero como la Vero-T presentan los mismos cromosomas marcadores detectables por bandeo G. Estos marcadores se han denominado M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , M_5 , M_6 y D_{25} . En la Fotografía 23 se muestran apareados el marcador correspondiente a la línea normal y a la línea persistentemente infectada, observándose que presentan idéntico patrón de bandeo.



FOTOGRAFIA 23
Marcadores cromosómicos por bandeo G en células Vero y Vero-T.

Dada la mayor claridad de la técnica de bandeo C que simplifica la observación de los bloques heterocromáticos, se analizaron los cariotipos de Vero y Vero-T por ese método. Se encontró en ambas líneas la mayoría de los marcadores descritos por Bianchi (66), a saber : M_1 , SM_1 , SM_2 , SM_3 , ST_1 y D_{25} . Además de éstos, aparecen dos nuevos marcadores que se denominaron SM_V y D' . Estos 8 marcadores detectados por bandeo C se presentan en la Fotografía 24.



FOTOGRAFIA 24

Marcadores cromosómicos por bandeado C en una célula Vero.



SM_V es un cromosoma submetacéntrico, de tamaño mayor que todos los cromosomas del grupo B de células diploides de mono verde africano (65) mientras que D^1 es un pequeño cromosoma subterminal muy semejante en tamaño a D_{25} pero que no presenta contricción secundaria marcada; se halla presente en el 70% de las metafases analizadas de Vero y Vero-T. La presencia de estos dos nuevos marcadores no descritos anteriormente para la línea Vero puede atribuirse a las diferentes condiciones de cultivo empleadas para mantener las células.

La identidad de marcadores G y C de las líneas Vero y Vero-T registrada a través de este estudio citogenético indica que, a pesar de la presencia crónica del virus, no se producen alteraciones en la cantidad, distribución y morfología de los cromosomas celulares.

Resistencia frente a la reinfección con virus homólogo.

Una propiedad que presentan los cultivos celulares persistentemente infectados con virus Junín (41)(51) u otros miembros del grupo Arenavirus (36)(37) es su resistencia a la sobreinfección con virus homólogo.

Se demostró que esta propiedad también la presentan las células Vero-J y Vero-T. Para ello, cultivos de células Vero-J en distintos pasajes fueron infectados con virus Junín, cepa XJCl₃, a diferentes multiplicidades, a saber: Vero-J pasaje 4 (m: 0.04); Vero-J pasaje 20 (m: 0.2, 20 y 0.002) y Vero-J pasaje 34 (m: 0.2 y 0.02). Estos cultivos se observaron diariamente por un lapso de 20 días. En ningún caso se registró la aparición de ACP típica de Junín, aún cuando los controles correspondientes llevados a cabo en células Vero resultaron positivos. Asimismo, la titulación simultánea por formación de placas de un mismo stock de virus Junín en células Vero-J y Vero, resultó en una eficiencia de plaqueo para la línea crónicamente infectada $< 5 \times 10^{-7}$ (Tabla 5).

Las células Vero-J fueron también totalmente resistentes a la acción del virus Tacaribe, antigénicamente relacionado con Junín (Tabla 5).

El mismo tipo de respuesta frente a la infección con el virus parental produjo la sublínea Vero-T. En los distintos pasajes en que se probó su sensibilidad al virus Tacaribe los resultados obtenidos fueron negativos (Ta-

bla 5).

TABLA 5

Sensibilidad de las líneas Vero-J y Vero-T a la infección con virus exógenos.

Virus	Título en			Eficiencia de plaqueo	
	Vero	Vero-J	Vero-T	Vero-J	Vero-T
Polio	4.5×10^3	5.5×10^3	-	1.22	-
NDV	8.7×10^3	2.8×10^3	-	0.52	-
VSV	1.1×10^7	5.4×10^7	1.7×10^8	4.90	15
Sarampión	6.8×10^3	7.2×10^3	-	1.05	-
Herpes	2.7×10^6	-	1.6×10^7	-	5.90
Sindbis	8.5×10^8	-	8.5×10^7	-	0.1
Tacaribe	1.0×10^8	< 5	< 5	$< 5 \times 10^{-8}$	$< 5 \times 10^{-7}$
Junín	7.5×10^7	< 5	-	$< 6 \times 10^{-8}$	-

Susceptibilidad frente a la infección con virus heterólogos.

Con el objeto de determinar si la resistencia observada a la reinfección con virus homólogo se extendía también a otros virus no pertenecientes al grupo Arena, se tituló simultáneamente una amplia gama de virus a ADN y ARN, cuyo origen se detalla en Materiales y Métodos, en células Vero, Vero-J y Vero-T.

Una vez realizadas las titulaciones de todos los stocks, se calculó la eficiencia de plaqueo relativa para cada uno como el cociente entre los títulos obtenidos en la línea Vero-J o Vero-T y en la línea Vero para un mismo virus. Los resultados de estos experimentos (Tabla 5) muestran que las células persistentemente infectadas son tanto o más susceptibles que las células normales a los virus no relacionados con Junín o Tacaribe.

La eficiencia de plaqueo de los virus Polio y Sarampión es similar en ambas líneas. Con NDV y Sindbis hay una pequeña reducción en los títulos obtenidos en las líneas persistentes respecto de la línea normal, mientras que con Herpes y VSV se nota una mayor sensibilidad en las células previamente infectadas con Junín o Tacaribe.

Asimismo se observaron diferencias en las características de las placas originadas por algunos de estos virus en Vero-J y Vero. El virus de sarampión produjo en las células Vero-J dos tipos de placas: unas líticas, pequeñas y otras de mayor tamaño, con centro lítico y un halo turbio alrededor. En las células Vero solamente se obtuvieron placas líticas, puntuales. Por su parte, el virus de estomatitis vesicular originó en las cé-

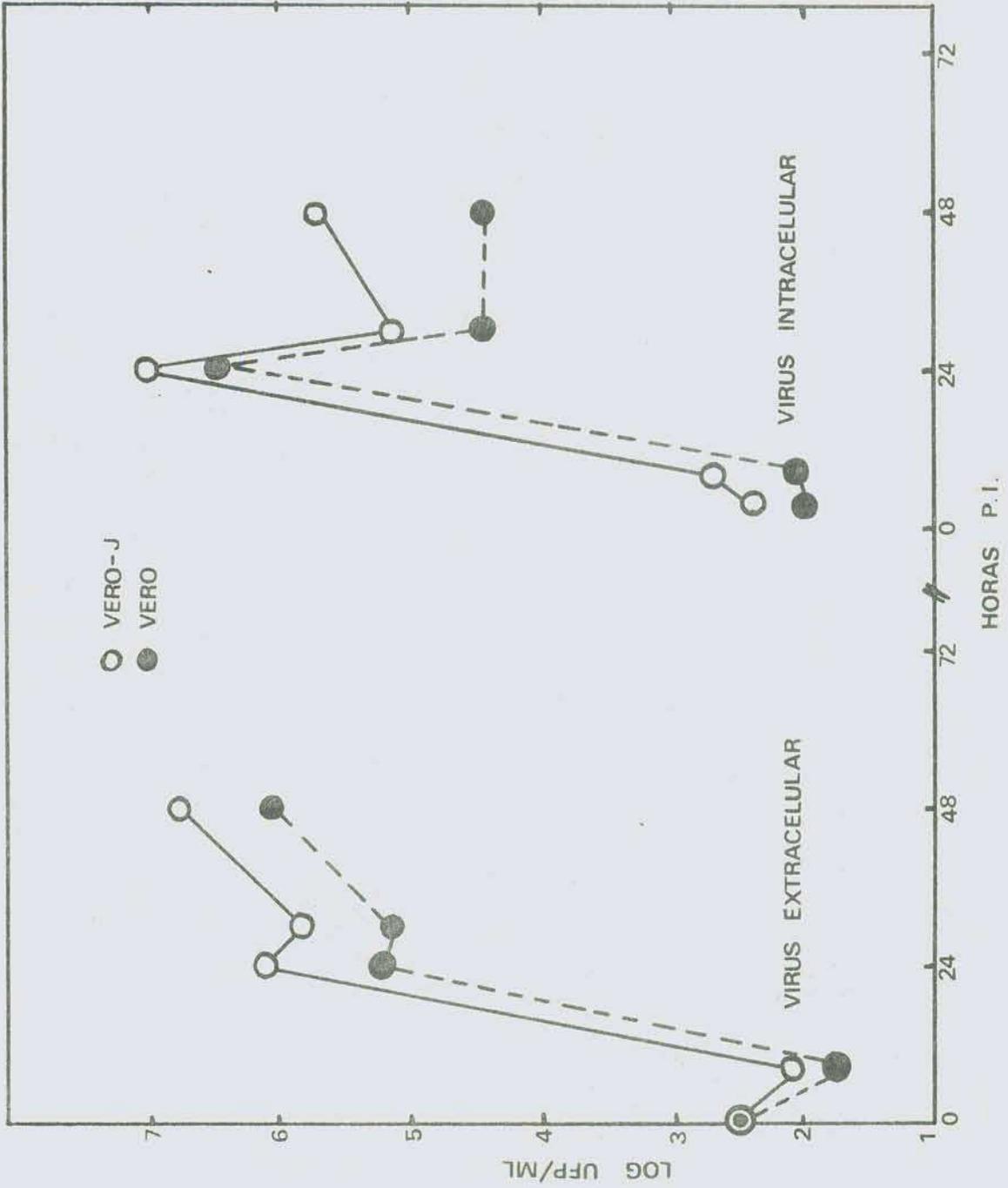
lulas Vero-J placas de mayor tamaño y nitidez que en las células Vero.

El notorio aumento observado en la sensibilidad de las líneas Vero-J y Vero-T frente al virus de estomatitis vesicular indujo a estudiar con mayor detalle la propagación de este virus en las células Vero y Vero-J a fin de establecer si la mayor susceptibilidad se correspondía con una mayor eficiencia de multiplicación. Con ese fin, se determinaron las curvas de crecimiento de VSV en Vero-J y en Vero, tanto de virus extracelular como intracelular. Cultivos de células Vero pasaje 111 y Vero-J pasaje 14 de 72 horas in-vitro se infectaron con VSV a una m de 0.003. Luego de 2 horas de adsorción, se decantó el inóculo, y se lavaron las monocapas con PBS para eliminar el virus no adsorbido. Se agregó medio de mantenimiento y se incubaron los cultivos a 37°C. A distintos intervalos de tiempo se cosecharon los sobrenadantes de 2 botellas infectadas de cada serie y se conservaron a -70°C. Las monocapas celulares se lavaron una vez con PBS, se les agregó 1 ml de medio y se congelaron y descongelaron dos veces con el fin de liberar el virus intracelular. Los sobrenadantes y los extractos intracelulares fueron titulados en células Vero por el método de formación de placas, las que se revelaron a las 72 horas p.i. Las curvas de crecimiento obtenidas se presentan en la Figura 13.

Se observa que no hay diferencias en cuanto a la duración del período de latencia y el momento en que se alcanzan los máximos títulos en Vero y Vero-J. Lo que sí diferencia a la línea persistentemente infectada con Junín de la línea normal es la cantidad de virus producida, pues hay aproximadamente un logaritmo más de virus en el extracelular de Vero-J respecto de Vero.

FIGURA 13

Curvas de crecimiento de VSV en células Vero y Vero-J.



Se ha descrito en infecciones mixtas con diferentes virus que poseen envoltura la formación de mezclas fenotípicas durante el proceso de maduración, en la membrana plasmática de la célula huésped. Estos viriones, llamados "pseudotipos", formados por los antígenos de envoltura de un virus y el genoma del otro, han sido demostrados para SV5 (virus simia- no 5) y VSV (67), para virus tumorales aviarios o murinos a ARN y VSV (68), Herpes simplex y VSV (69) y para el virus Fowl plague y VSV (70), entre otros. Este fenómeno de formación de pseudotipos podría quizás explicar el aumento en la producción de virus que se logra cuando el VSV crece en una célula que está persistentemente infectada con el virus Junín. A fin de probar esta posibilidad se hicieron tratamientos del virus de estomatitis vesicular crecido en células Vero y en células Vero-J (en distintos pasajes de la línea crónica) con suero hiperinmune anti-Junín, llevándose a cabo la reacción de neutralización como se describe en Materiales y Métodos. La observación microscópica de los cultivos infectados en cada reacción se siguió durante 7 días registrándose el porcentaje de neutralización de los efectos citopáticos de VSV por el suero anti-Junín.

El VSV crecido en células Vero-J ofrece la particularidad de ser parcialmente neutralizado por inmunosuero específico anti-virus Junín (Tabla 6). La fracción de la progenie neutralizada varía aparentemente en función de las cantidades relativas de ambos virus presentes al momento de la sobreinfección con VSV. Así vemos que al aumentar la multiplicidad de VSV y el número de pasajes de la línea Vero-J disminuye el porcentaje de virus neutralizado. En coincidencia con estas observaciones, Závada (71)

TABLA 6

Neutralización por inmunosuero anti-Junín de la progenie de VSV
producida en células Vero y Vero-J.

Virus	Suero	Título DICT50/ml	Neutralización %
VSV(Vero) m:3x10 ⁻⁴	Normal	1.6x10 ⁶	
	Anti-Junín	1.6x10 ⁶	0
VSV(Vero-J 6) m:3x10 ⁻⁴	Normal	2.3x10 ⁶	
	Anti-Junín	2.3x10 ⁴	99
VSV(Vero-J65) m:5x10 ⁻³	Normal	8.7x10 ⁷	
	Anti-Junín	8.7x10 ⁷	0
VSV(Vero-J69) m:1x10 ⁻³	Normal	1.5x10 ⁶	
	Anti-Junín	4.2x10 ⁵	72

ha descrito para la infección mixta con otros virus que se requiere una

relación óptima entre las multiplicidades de ambos virus para que se produzca la formación de pseudotipos, siendo siempre necesaria una mayor concentración del virus que va a formar la envoltura de la partícula respecto de aquél que constituye el genoma. En el sistema Vero-J-VSV, al aumentar el número de pasajes de la línea habría una menor disponibilidad en alguna forma de los antígenos del virus Junín, lo que determinaría menor chance de formación de pseudotipos. La detección de este tipo de viriones de VSV con aparente envoltura, parcial o total, de virus Junín explicaría el aumento de susceptibilidad de la línea crónicamente infectada, a través de la formación de una mezcla fenotípica entre ambos virus.

Los experimentos descritos que muestran la alta susceptibilidad de las líneas Vero-F y Vero-J al virus de estomatitis vesicular y otros virus, sumamente sensibles a la acción del interferón, permiten descartar la posibilidad de que la presencia de este agente inhibidor en los sobrenadantes de los cultivos, fuera responsable de la regulación de la infección persistente como ocurre en otros sistemas virus-célula (72)(73). Asimismo, es sabido que la línea Vero es considerada no productora de interferón a consecuencia de la infección viral (74).

Proporción de centros infecciosos .

La proporción de células productoras de virus en cultivos de Vero-J se determinó plaqueando una suspensión de las mismas sobre monocapas de células Vero. Estos ensayos, efectuados en los pasajes 3 y 15 de la línea crónica, indicaron que solamente entre 0.04-0.1% de las células persisten-

temente infectadas estaban efectivamente liberando al medio partículas infectivas de virus Junín. Es decir, se necesita plaquear de 1000 a 4000 células Vero-J para obtener una placa.

Evidentemente es muy bajo el porcentaje de células donde se cumple el ciclo completo de multiplicación viral. En este aspecto la infección persistente no se diferencia mayormente de la infección primaria en la cual se ha encontrado un 3% de centros infecciosos (75), valor más elevado que el que se registra en la línea Vero-J, pero de todos modos bastante bajo e indicativo de una muy pobre eficiencia en las infecciones con virus Junín. En las infecciones persistentes con virus LCM en células BHK, Pfau y col. (37) encuentran valores muy elevados de centros infecciosos al comenzar la infección: 90% a las 2 generaciones p.i.; pero con el transcurso del tiempo no pueden detectar células productoras de virus. Por el contrario, Stanwick y Kirk (38) tienen, para el mismo sistema BHK-LCM un valor de centros infecciosos que oscila entre 6-12% a lo largo de toda la infección persistente, presentando este último caso mayores similitudes con la línea Vero-J.

A pesar de que más del 99.9% de las células Vero-J no están produciendo virus completo en forma activa, los cultivos resultan totalmente refractarios a la reinfección con virus Junín, tal como se describiera anteriormente. Dado que esta resistencia es específica y no se manifiesta contra virus heterólogos puede descartarse que se deba a la presencia de algún agente inhibidor antiviral en el medio. Por lo tanto, es de suponer que, de alguna forma, el genoma viral o parte de él persiste en la célula sin llegar a replicarse eficientemente y originar viriones comple-

tos, pero interfiriendo con la replicación del virus Junín re infectante. De no ser así, las células que no producen virus deberían ser susceptibles a éste y permitirían su replicación con producción de efectos citopáticos.

El 0.1% de la población celular que se comporta como centros infectivos es responsable de la producción del virus que se detecta en el sobrenadante de los cultivos a través de los distintos pasajes.

B.-PROPIEDADES DEL VIRUS RECUPERADO DE LAS CELULAS PERSISTENTEMENTE INFECTADAS.

En diferentes etapas de la infección persistente se probó la liberación espontánea de virus al extracelular a partir de los cultivos crónicamente infectados, para luego comparar las propiedades del virus recuperado con las de la cepa parental. La caracterización del virus persistente se hizo fundamentalmente con la cepa recuperada a partir de la línea Vero-J.

Preparación de stocks en cultivo de tejido del virus recuperado del cultivo persistente.

A fin de caracterizar las propiedades del virus recuperado de la infección persistente y establecer la diferencia que pudiera presentar respecto del XJC1₃ parental se decidió preparar stocks de ambos en forma paralela en cultivos de células Vero.

Para ello, primero se buscó determinar el momento óptimo de cosecha del stock de virus persistente. Se inocularon monocapas de células Vero con sobrenadante concentrado de Vero-J pasaje 3. Luego de la adsorción se agregó medio de mantenimiento y se tomaron alícuotas a distintos días p.i., para

ser tituladas por formación de placas en células Vero. De este modo se estableció que los mayores títulos de virus infeccioso se producen entre el 6º y 8º día p.i. (Tabla 7) y se decidió preparar una buena cantidad de stock de virus en células Vero, recogiendo el sobrenadante al día 6 p.i. y denominándolo VJ-3. En forma similar se preparó un stock con sobrenadante proveniente de Vero-J pasaje 26 (VJ-26) y con virus XJCl₃ estandar.

TABLA 7

Multiplicación en células Vero del virus aislado de Vero-J pasaje 3.

Día p.i.	Título UFP/ml
2	3.5×10^2
4	2.7×10^4
6	2.5×10^5
8	2.7×10^5

Acción sobre cultivo de tejido.

a) Formación de placas : a fin de determinar el grado de producción de

virus infeccioso a partir de las células persistentemente infectadas, se procedió a la titulación de los sobrenadantes de células Vero-J, a medida que éstas eran repicadas; es decir, en el momento de pasar las células, cada 3 ó 4 días, se tomaron alícuotas del extracelular que luego eran tituladas mediante la técnica de formación de placas, descrita en Materiales y Métodos. Los datos que se obtuvieron se presentan en la Figura 14.

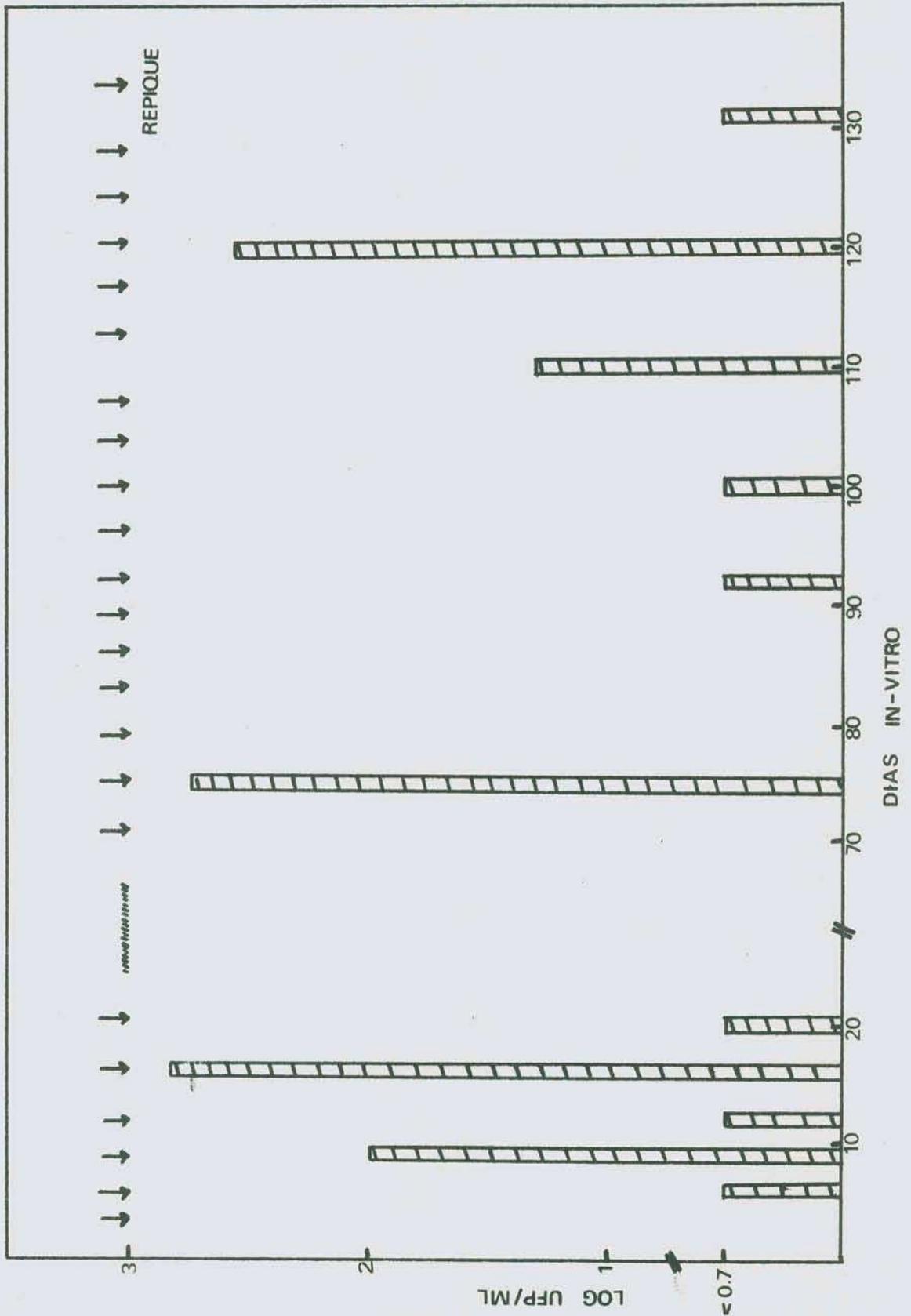
Los resultados mostraron que las células Vero-J son capaces de producir virus aún después de haber sufrido 30 pasajes y más de 100 días de vida post-infección in-vitro, lo que prueba la persistencia productiva de la infección. Esta liberación de virus infectante no es continua sino cíclica, ya que mientras en algunos pasajes no se ha podido detectar virus, en otros se encuentra de 1 a 3 log del mismo. Los rendimientos siempre permanecieron por debajo de los valores alcanzados en la infección primaria citocídica de las células Vero con virus Junín (Figura 4).

Esta característica productiva de la infección persistente diferencia notoriamente a esta línea celular crónicamente infectada con virus Junín de otras similares descritas en la bibliografía en que no puede detectarse virus en sobrenadante mediante ninguna técnica (41) o sólo puede aislarse virus por inoculación in-vivo de ratones lactantes (42). También la línea Vero-J resulta más eficiente productora de virus infeccioso que los cultivos crónicos descritos con virus Parana (39), LCM (36)(37) y Pichinde (40), miembros todos del grupo Arenavirus.

Características similares en cuanto a su capacidad de liberar al extracelular partículas virales infecciosas, detectables por formación de placas, presentó la línea Vero-T, en los pasajes en que fueron titulados

FIGURA 14

Producción de virus a partir de la línea Vero-J.



los sobrenadantes de los cultivos.

En varios sistemas crónicamente infectados el virus que se recupera de la infección persistente presenta variaciones en las características de las placas que produce en cultivo de tejido, respecto de la cepa original. Por lo general, se ha encontrado disminución de tamaño y aumento de la nitidez de las placas (76)(77). Las partículas virales presentes en los sobrenadantes de las líneas Vero-J y Vero-T originaron dos tipos de placas : unas pequeñas (0.2 mm de diámetro) lífticas, y otras de mayor tamaño (0.5-1 mm) y más turbias. En algunas titulaciones sólo había un tipo de placas (las lífticas), pero este hecho no guardó ninguna relación con el número de pasaje celular. En consecuencia, puede afirmarse que no se observa ninguna alteración importante en la morfología de la placa originada por el virus persistente respecto de la cepa parental.

b) Producción de efectos citopáticos : simultáneamente con la titulación por placas, se hizo en algunos pasajes la observación microscópica de aparición de ACP en cultivo. Para ello, se infectaron monocapas de células Vero con 0.2 ml de la muestra a ensayar y luego del período de adsorción de 2 horas se agregó medio líquido de mantenimiento. Los cultivos se incubaron a 37°C y se observaron al microscopio óptico por un lapso de 10 días.

Se encontró (Tabla 8) una correspondencia entre el título obtenido por placas y la observación directa de efectos citopáticos. Estos fueron similares a los producidos por el virus estandar, cepa XJCl₃ : en una primera etapa, la ACP se manifestaba como focos de células necróticas que luego proliferaban y se diseminaban por toda la monocapa, ocurriendo posterior-

mente un notable desprendimiento celular.

TABLA 8

Acción citopatógena en cultivo de tejido del virus liberado de células Vero-J.

Pasaje celular	Multiplicidad de infección	Título UFP/ml	Grado de ACP*
2	$<2 \times 10^{-6}$	<5	0
3	4×10^{-5}	1.55×10^2	2
5	2×10^{-4}	6.70×10^2	2
20	$<2 \times 10^{-5}$	<5	0
26	2×10^{-5}	20	1

* Grado de ACP observado al día 8 p.i.

A pesar de haberse detectado virus en los sobrenadantes de células Vero-J y Vero-T tanto por formación de placas como por observación de ACP y por inoculación intracerebral de ratones lactantes, en ningún momento hubo ACP espontánea en los cultivos que presentaron aspecto similar al de

las células normales. Esto probablemente se debe a que los bajos niveles de virus infectivo producidos en las líneas (2 unidades logarítmicas) no encuentran en el cultivo células susceptibles para propagarse tal como ocurre cuando se reinfectan las monocapas de Vero-J o Vero-T con virus homólogo.

La naturaleza de los efectos citopáticos ocasionados por el virus recuperado de la infección persistente no sufrió alteraciones por pasajes seriados del mismo en células Vero. En la Tabla 9 se presentan los resultados obtenidos durante 5 pasajes sucesivos en células Vero del virus originalmente aislado a partir del sobrenadante de un cultivo de células Vero-J pasaje 3, al 4º día después de sembradas. Dicho sobrenadante tenía un título de 1.55×10^2 UFP/ml (Figura 14) y se inoculó concentrado sobre una monocapa de células Vero, lo que equivale a una multiplicidad de 4×10^{-5} UFP/cél. Al 6º día p.i. se cosechó el sobrenadante del cultivo infectado; una alícuota se tituló por formación de placas, con otra se infectó un nuevo cultivo de Vero (segundo pasaje) y el resto se guardó a -70°C . Así se procedió durante 5 pasajes sucesivos.

La experiencia muestra que a través de los diferentes subcultivos el virus persistente retuvo su capacidad de producir en la célula alteraciones citopáticas típicas del virus Junín original. Además, permite comprobar la influencia que ejerce la multiplicidad de infección inicial sobre la eficiencia de la multiplicación viral, tal como se había descrito en la infección primaria con XJCl₃ estandar. Así se observa que en el primer y tercer pasaje del virus persistente por células Vero a multiplicidades relativamente bajas (del orden de 10^{-5} UFP/cél.) se obtienen rendimientos ma-

yores que cuando se inoculan 7×10^{-2} UFP/cél. (segundo pasaje).

TABLA 9

Pasajes seriados en células Vero del virus recuperado de la línea
Vero-J pasaje 3.

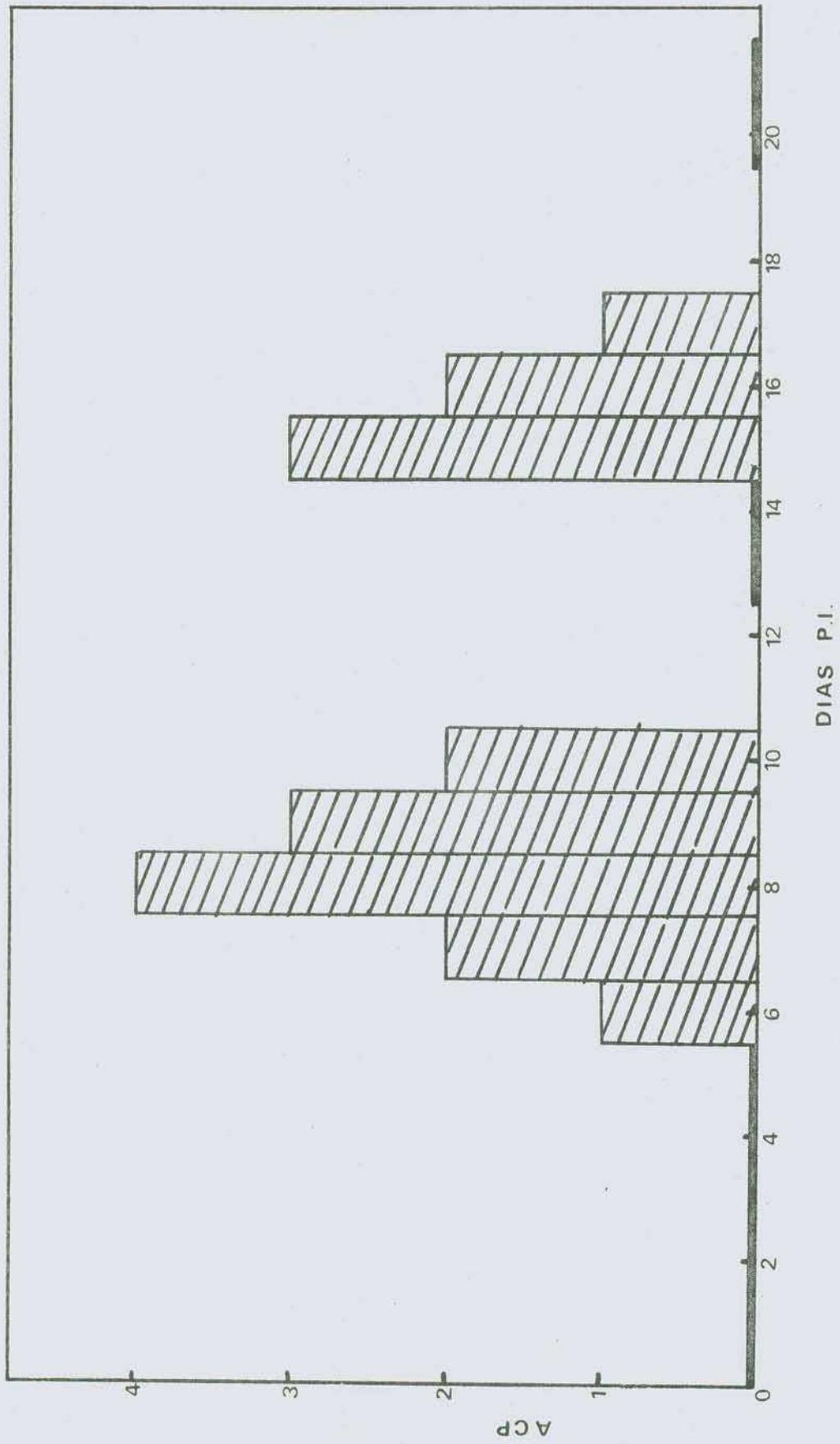
Nº pasaje en cél.Vero	Multiplicidad de infección.	Día de cosecha	ACP al día* de cosecha	Título** UFP/ml
0	-	4	0	1.6×10^2
1	4×10^{-5}	6	1	1.7×10^5
2	7×10^{-2}	6	2	2.8×10^2
3	6×10^{-5}	5	0	2.2×10^3
4	1×10^{-3}	5	2	2.9×10^4
5	1×10^{-3}	5	2	1.7×10^5

* Grado de ACP registrado de acuerdo a la escala descrita anteriormente.

** Título del stock correspondiente al día en que se cosechó para cada caso.

FIGURA 15

Evolución de la ACP producida por virus recuperado a partir de Vero-J
pasaje 3.



c) Infecciones prolongadas : el virus VJ-3 produjo en las células Vero que dieron origen a las líneas crónicas aquí estudiadas infecciones prolongadas con las mismas características que los virus Junín y Tacaribe. A través del estudio de la evolución de la ACP producida por VJ-3 inoculado en Vero a una $m : 0.005$ se observan ciclos alternados de efectos citopáticos y recuperación celular. Como se observa en la Figura 15, durante un lapso de 25 días se desarrollaron dos ciclos de ACP : el primero comenzó al día 6 p.i., extendiéndose hasta el día 10; luego hubo una etapa de regeneración de la monocapa celular hasta el día 15 p.i. en que comenzó el segundo ciclo de ACP, que del mismo modo que en la infección con virus XJCl₃ estandar (Figura 7) fue de menor duración que el primero. A partir del día 20 se registró una nueva recuperación del tejido celular hasta el día 25 en que se dio por terminada la experiencia.

De este modo, se puede concluir que el virus recuperado de la infección persistente mantiene las mismas características de la cepa original en lo referente a su acción sobre cultivos de células Vero. Así, produce las alteraciones citopatológicas típicas de la infección primaria con virus Junín o Tacaribe, incluyendo la formación de placas bajo agar, y es capaz de establecer infecciones prolongadas en cultivos mantenidos en condiciones estacionarias que registran etapas cíclicas de lisis y recuperación celular.

Patogenicidad para ratón lactante.

El estudio de los virus recuperados a partir de infecciones persistentes reveló en muchos casos atenuación en la virulencia de los mismos res-

pecto de la cepa parental inicial. Por ejemplo, en cultivos de células HeLa persistentemente infectados con virus Coxsackie A-9 (78) y en infecciones crónicas con Herpes simplex (79) se ha demostrado que el virus aislado era menos virulento para ratón que la cepa original. A fin de establecer si se daba esa posibilidad en el sistema Vero-J, se estudió la patogenicidad para el ratón lactante del virus recuperado en algunos subcultivos de la línea.

TABLA 10

Patogenicidad para ratón lactante del virus liberado de células Vero-J.

Pasaje celular	Título* UFP/ml	Morbilidad %	Mortalidad %
5	6.7×10^2	100	88
14	N.H.	13	13
20	<5	43	29
43	N.H.	100	78

* Títulos leídos en células Vero al 8º día p.i.
N.H. = No hecho.

Para las experiencias que se muestran en la Tabla 10 se inocularon lo-

tes de 8 ratones de 24-48 horas por vía intracerebral con 0.02 ml c/u de sobrenadante concentrado de células Vero-J de diferentes pasajes. Se observó la sintomatología desarrollada por los animales durante un período de 20 días. En todos los casos se registra concomitancia entre el título obtenido in-vitro por placas y la mortalidad para ratón in-vivo : el sobrenadante de Vero-J pasaje 5 que presenta partículas infectivas detectables por placas, al ser inoculado en ratón produce morbilidad y mortalidad de los animales, mientras que en el sobrenadante de Vero-J pasaje 20 no se detecta virus por ninguno de los dos métodos. En una etapa más avanzada de la infección crónica (pasaje 43, equivalente a 166 días in-vitro p.i.) se mantiene aún la presencia de virus patógeno para ratón lactante.

Neutralización del virus liberado.

La identidad del agente recuperado a partir de la línea Vero-J fue confirmada como virus Junín por neutralización específica con inmunosuero anti-Junín de origen humano, de una capacidad neutralizante mayor de 4 logaritmos. La reacción de neutralización se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, empleando VJ-3. Luego de efectuado el tratamiento con suero normal y suero inmune, se titularon las dos series por ACP en tubos de células Vero. Se hizo la observación microscópica durante 12 días hasta completar la titulación, registrándose neutralización total de los efectos citopáticos típicos de Junín en los tubos inoculados con VJ-3 pretratado con inmunosuero.

Crecimiento del virus VJ-3 en células Vero a diferentes temperaturas.

En algunos sistemas celulares se ha demostrado que la persistencia viral está relacionada con la selección de mutantes del virus parental sensibles a la temperatura (25). Estas mutantes no multiplican a altas temperaturas (38-43°C, según el virus), pero sí lo hacen a temperaturas que oscilan alrededor de 32°C y su selección a través de los repiques en detrimento del virus estandar, permite el mantenimiento de la infección en forma latente sin que haya destrucción celular.

Ante la posibilidad de que en el sistema células Vero-virus Junín ocurriese un fenómeno similar, se decidió estudiar en particular la capacidad del virus recuperado de la sublínea Vero-J de multiplicar a diferentes temperaturas, en comparación con XJCl₃.

Todas las titulaciones que se llevaron a cabo hasta este momento de materiales provenientes de Vero-J o Vero-T se efectuaron a 37°C. Asimismo esa es la temperatura de incubación habitual para crecimiento y mantenimiento de los cultivos crónicamente infectados y normales. Por lo tanto, resultaba evidente que no representaba una temperatura restrictiva para el crecimiento del virus persistente. Esto se comprobó más fehacientemente infectando cuatro cultivos de células Vero con virus VJ-3 e incubando, luego de la adsorción transcurrida a 37°C, la mitad de los cultivos a 37°C y los otros dos a una temperatura menor (33°C), que es la temperatura usualmente óptima para las mutantes ts conocidas de la mayoría de los virus. Al día 6 p.i. se cosechó sobrenadante de ambas series de cultivos y se titularon, encontrándose que el rendimiento a partir de los cul-

tivos incubados a 37°C fue de 4.9×10^5 UFP/ml mientras que los incubados a 33°C produjeron 5.4×10^5 UFP/ml. Estos valores confirmaron que la capacidad de crecimiento de VJ-3 en cultivo a 33 y 37°C era prácticamente similar.

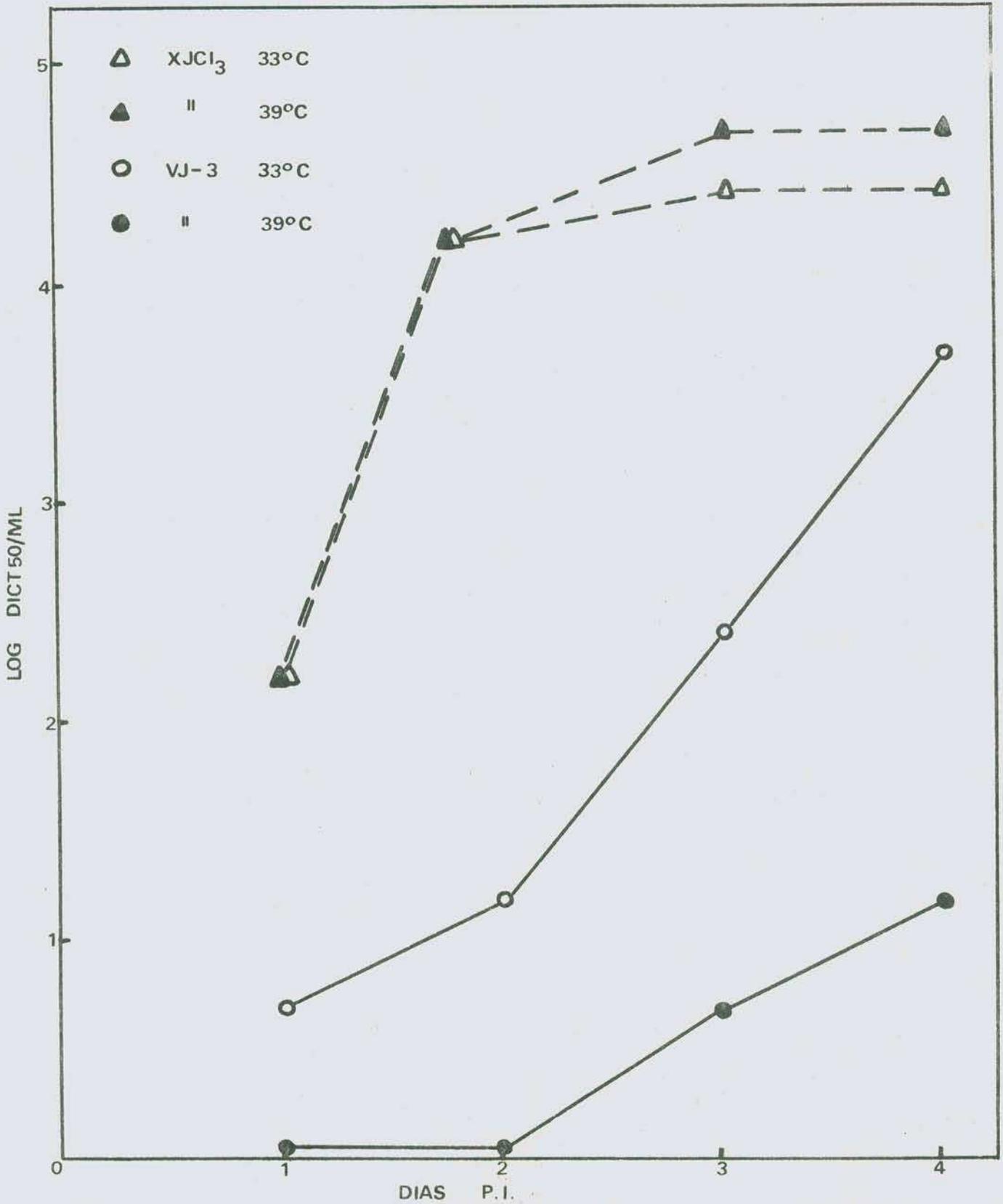
Por lo tanto, se probaron mayores temperaturas para poder visualizar alguna variación entre VJ-3 y XJC1₃. La temperatura más elevada que permitiese multiplicación del virus estandar y un buen mantenimiento de los cultivos de células Vero resultó ser 39°C.

En una primera experiencia, se comparó la cinética de crecimiento de VJ-3 y XJC1₃ estandar a 33 y 39°C. Monocapas de células Vero crecidas en tubos de ensayo se infectaron con VJ-3 ó XJC1₃ a una multiplicidad de infección de 0.006 y 0.02 respectivamente. Después de una hora de adsorción a 37°C, se volcó el inóculo y se lavaron las monocapas con PBS, agregándose luego 1 ml de medio de mantenimiento a cada tubo. La mitad de los cultivos se incubó a 33°C y la otra mitad a 39°C. A distintos tiempos p.i. se determinó la cantidad de virus extracelular en los cultivos de las diferentes series, tomando una alícuota del sobrenadante. Todas las titulaciones se efectuaron a 37°C. Las curvas de crecimiento de ambos virus se presentan en la Figura 16.

La curva de crecimiento del virus estandar XJC1₃ a 33°C fue muy parecida a la obtenida a 39°C, aunque el máximo título a 33°C (5×10^4 DICT50/ml) fue levemente mayor que el correspondiente a 39°C (3.2×10^4 DICT50/ml), pero dicha diferencia de valores cae dentro del error del método de titulación. Para VJ-3, en primer lugar, los rendimientos respecto de XJC1₃ son menores debido a la menor multiplicidad utilizada. Por otra parte, las cur-

FIGURA 16

Curvas de crecimiento a 33 y 39°C del virus Junín estandar XJCl₃ y del virus VJ-3 recuperado de los cultivos crónicamente infectados.



vas de crecimiento de VJ-3 a 33 y 39°C son muy diferentes. A 33°C, la producción de virus aumentó gradualmente a partir de las 24 horas p.i., alcanzando al 4º día un valor de 5×10^3 DICT50/ml. A 39°C, los rendimientos son muy bajos : no se detecta virus hasta el tercer día p.i., momento en que se alcanza el mismo valor que a 33°C se consigue en el primer día p.i. Al día 4 hay una disminución en el rendimiento de virus a 39°C mayor del 99% respecto de 33°C.

Los datos de la Figura 16 sugirieron fuertemente que el virus recuperado de las células persistentemente infectadas era termosensible.

La producción de variantes de virus Junín termosensibles en su capacidad de replicar sobre células cultivadas in-vitro no fue un evento que ocurrió aisladamente en la línea Vero-J. En efecto, como se muestra en la Tabla 11, en diferentes pasajes de la línea crónicamente infectada se probó la multiplicación del virus recuperado a la temperatura permisiva y no permisiva. Monocapas de células Vero fueron infectadas con 0.4 ml c/u de sobrenadantes de la sublínea Vero-J correspondientes a los pasajes 3, 15 y 26, y virus Junín estandar, inoculándose cuatro cultivos con cada material a una multiplicidad aproximada de 3×10^{-4} . Después de una hora de adsorción a 37°C, los cultivos se lavaron, se les agregó medio de mantenimiento y se dividieron en dos series que se incubaron a 33 y 39°C respectivamente. Al 4º día p.i. se cosecharon los sobrenadantes que fueron titulados a fin de determinar el rendimiento de virus en cada caso.

Tanto la observación directa de la ACP producida por cada muestra como la determinación del rendimiento viral obtenido a las 96 horas confirmó

TABLA 11

Eficiencia de replicación a 33 y 39°C de sobrenadantes de cultivos de células Vero-J comparado con XJC1₃.

Inóculo	Temperatura de incubación.	Replicación en células Vero		
		ACP al 6º día	Rendimiento* DICT50/ml	Relación 39/33°C
Vero-J 3	33	+	5.0×10^3	3.2×10^{-3}
	39	-	1.6×10^1	
Vero-J 15	33	+	2.3×10^3	5.0×10^{-3}
	39	-	1.2×10^1	
Vero-J 26	33	-	5.0×10^2	2.2×10^{-2}
	39	-	1.1×10^1	
XJC1 ₃ (est.)	33	+	5.0×10^4	0.46
	39	+	2.3×10^4	

* Rendimientos al 4º día p.i., por titulación en células Vero.

la termosensibilidad del virus persistente (Tabla 11). Todos los sobrenadantes de la línea Vero-J inoculados produjeron efecto citopático detectable solamente a 33°C. Asimismo, la eficiencia de replicación a 39°C (rendimiento al 4º día a 39°C/rendimiento a 33°C) resultó siempre menor de 10^{-2} , mientras que con XJCl₃ estandar la relación 39/33 alcanzó a 0.46.

Estas experiencias indicaron que la selección de variantes termosensibles a consecuencia de la infección persistente no era un evento al azar y resultaba factible asignar a la evolución de este tipo de mutantes un rol importante en el mantenimiento de la infección crónica.

Inactivación térmica.

Además de la capacidad del virus recuperado de la infección persistente de multiplicar a distintas temperaturas, se estudió la inactivación in-vitro del mismo por efecto del calor en comparación con la cepa salvaje XJCl₃. De este modo se buscó establecer si la replicación marcadamente reducida del virus persistente a 39°C estaba relacionada con una menor estabilidad térmica de la partícula viral, provocada por alguna alteración de las proteínas estructurales del virión.

Para determinar la termoestabilidad de ambos virus, se prepararon diluciones 1/10 de los stocks de VJ-3 y XJCl₃ en PBS. Dichas diluciones se fraccionaron en volúmenes de 1 ml en tubos de hemólisis, los que se calentaron en baño de agua termostatzado durante 60 minutos a diversas temperaturas entre 37 y 50°C. Luego de enfriarlas en hielo, las muestras se inocularon para ser tituladas por ACP en tubos de células Vero. Los porcentajes de actividad infecciosa remanente en cada muestra luego del tratamiento

por calor se calcularon en función de los cocientes del título de cada muestra y el título del control que se mantuvo 60 minutos en hielo.

$$\% \text{ actividad remanente} = \frac{\text{título de la muestra calentada}}{\text{título del control}} \times 100$$

Los resultados que se muestran en la Figura 17 evidencian que VJ-3 resulta más lábil al calor que la cepa original de virus Junfín utilizada para iniciar la infección persistente. Así a 37°C, la infectividad de XJC1₃ se mantiene inalterada mientras que VJ-3 pierde un 90% de su capacidad infecciosa; a 43 y 46°C se mantiene esta diferencia entre uno y otro virus ya que VJ-3 retiene 5.5% y 3.2% de su infectividad y XJC1₃, 22 y 9.2%, respectivamente. Después de 60 minutos de calentamiento a 50°C se manifiesta más notoriamente la distinta termolabilidad de ambos virus puesto que mientras XJC1₃ mantiene aún 1% de su infectividad original, el virus persistente ha sido totalmente inactivado no pudiendo detectarse ninguna partícula infecciosa a través de la titulación.

El siguiente experimento consistió en la determinación de la cinética de inactivación térmica a 37°C. Diluciones 1/10 de VJ-3 y XJC1₃ se incubaron a 37°C en baño de agua, tomándose muestras de cada uno a distintos intervalos de tiempo. Cada muestra se tituló por ACP en células Vero y se graficó para cada virus el porcentaje de actividad recuperada (calculado en forma similar que en las experiencias de la Figura 17) en función del tiempo de calentamiento. Como se muestra en la Figura 18, la infectividad de VJ-3 se inactiva más rápidamente que la de XJC1₃ y, al final de la experiencia, luego de 4 horas de calentamiento, XJC1₃ mantiene aún 15% de la infectividad original mientras que VJ-3 sólo retiene el 2%

FIGURA 17

Inactivación de XJCl₃ y VJ-3 a distintas temperaturas.

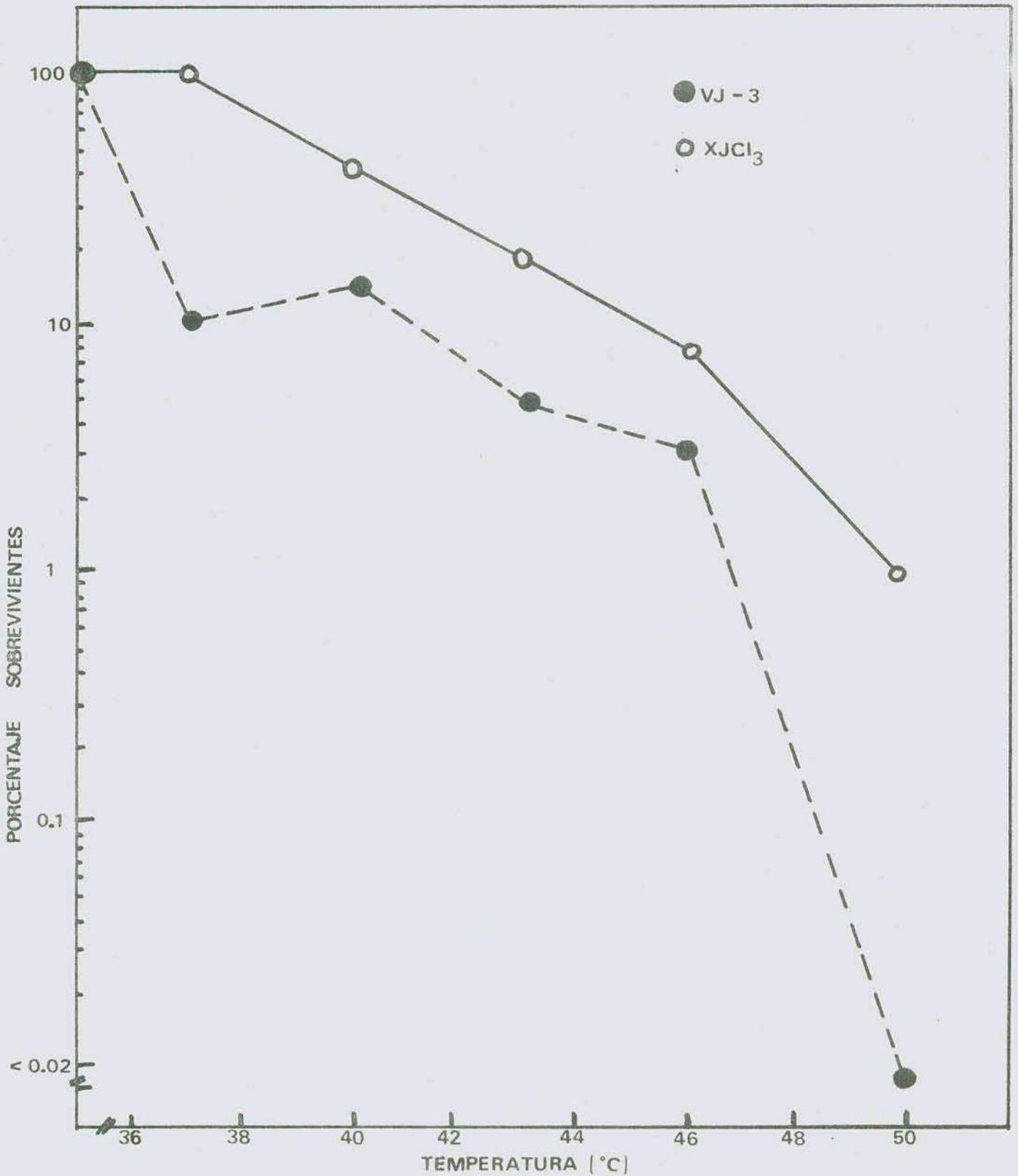
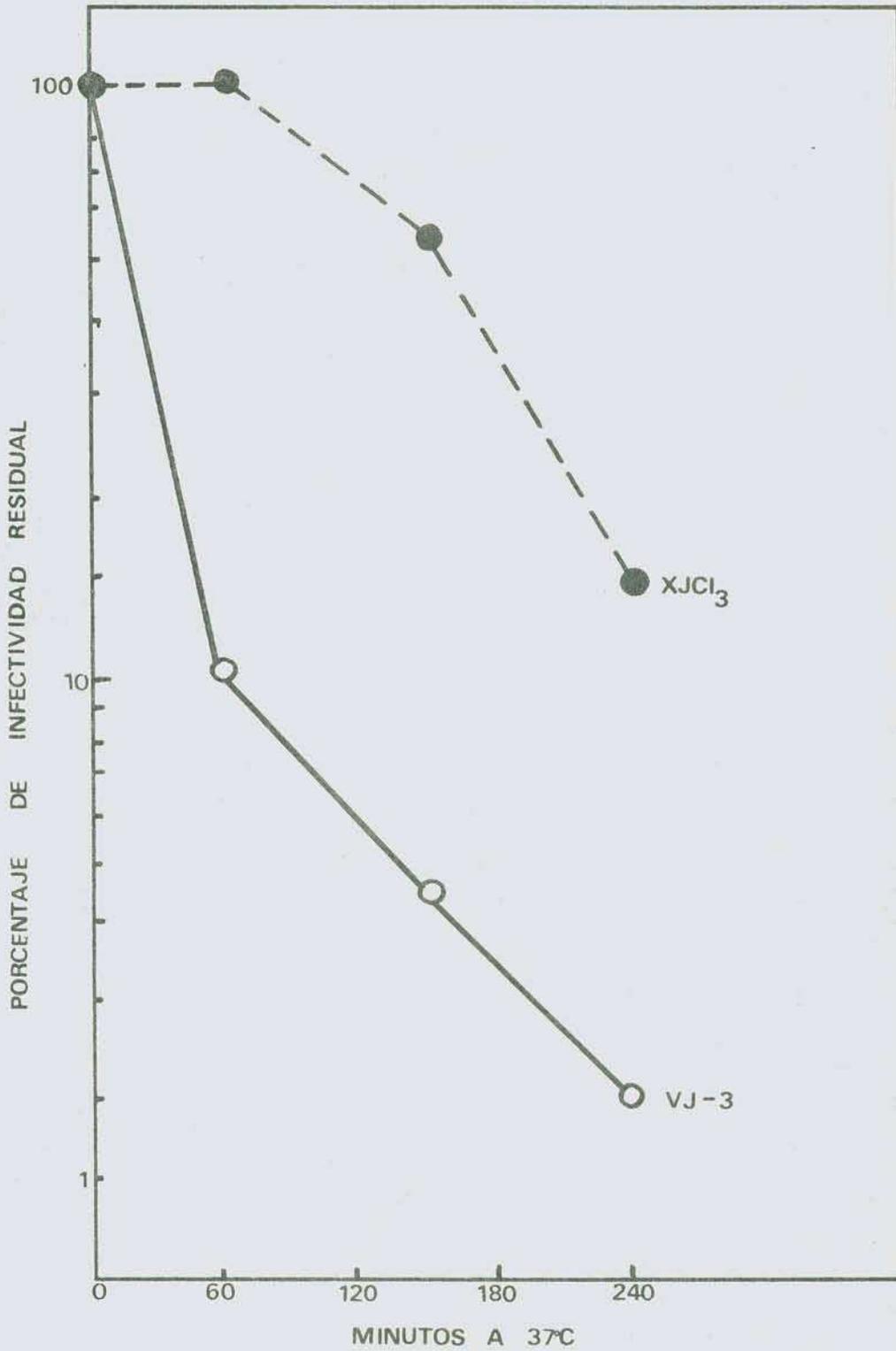


FIGURA 18

Cinética de inactivación de XJCl₃ y VJ-3 a 37°C.



de su capacidad infecciosa.

Los datos de las dos experiencias que se grafican en las Figuras 17 y 18 ponen de manifiesto la mayor inestabilidad térmica del virus que persiste en las células Vero-J respecto de la cepa parental. Esto permite concluir que la termosensibilidad de la variante viral seleccionada durante la infección persistente se debe a la alteración de algún componente estructural del virión.

Interferencia con la replicación del virus estandar.

En numerosas infecciones persistentes establecidas en cultivo de tejido con diferentes virus animales se ha comprobado la presencia de partículas defectivas interferentes (DI), asignándoles a las mismas un rol preponderante en el establecimiento y regulación de la infección crónica (23). El comportamiento de las partículas DI ha sido estudiado a fondo con aquellos virus que mejor fueron caracterizados en su aspecto bioquímico como son VSV (80), Sindbis (81) y Polio (82). La propiedad esencial de estos virus defectivos es su capacidad de interferir específicamente con la replicación intracelular del virus homólogo no defectivo.

Aunque las características de las partículas DI en el grupo Arenavirus no están perfectamente establecidas aún por las dificultades que se presentan para su purificación, los trabajos realizados por Pfau y col. con los virus LCM (37), Parana (39) y Pichinde (40) permiten confirmar su existencia en los sobrenadantes de células persistentemente infectadas con dichos virus. A consecuencia de ello se ha postulado que la regulación de la infección con los Arenavirus se produce por la síntesis de partículas defecti-

vas (83).

También se ha descrito la producción de actividad interferente con las propiedades líticas del virus estandar en sobrenadantes de una sublínea de células Vero crónicamente infectadas con virus Junín (42) mientras que en otra sublínea similar no se ha podido detectar ningún tipo de interferencia con la cepa parental (41). En base a estos resultados se intentó establecer si las partículas DI representaban algún factor determinante de la infección en la sublínea Vero-J.

Monocapas de células Vero normales crecidas en botellas de 30 cc de capacidad se infectaron con 0.2 ml de sobrenadante aislado a partir de los pasajes 3, 4 y 20 de la línea Vero-J. Luego de 1 hora de adsorción a 37°C se retiró el inóculo y las células se lavaron dos veces con PBS. Después del segundo lavado, todos los cultivos previamente infectados con sobrenadante de Vero-J fueron descargados con 0.2 ml de virus Junín, cepa XJCl₃ a una m de l. En forma paralela se infectaron cultivos controles no tratados con sobrenadante de Vero-J. Después de 1 hora de adsorción a 37°C, se lavaron las monocapas y se agregó medio de mantenimiento, incubándose las botellas a 37°C. A las 24 horas p.i. se cosechó sobrenadante de todas las botellas a fin de medir el rendimiento de virus Junín en cada caso (Tabla 12) y se observó la evolución de la ACP durante 16 días (Figura 19).

Se eligió dar el desafío con virus estandar una hora después del tratamiento con el sobrenadante de los cultivos crónicos tomando en cuenta los estudios realizados con Parana y LCM (39) en los que se determinó que la actividad interferente es más pronunciada cuando se da el challenge dentro de las 4 horas de tratamiento con el virus DI.

FIGURA 19

Evolución de la ACP en cultivos previamente inoculados con sobrenadantes de la línea Vero-J y luego descargados con virus XJCl₃ estandar.

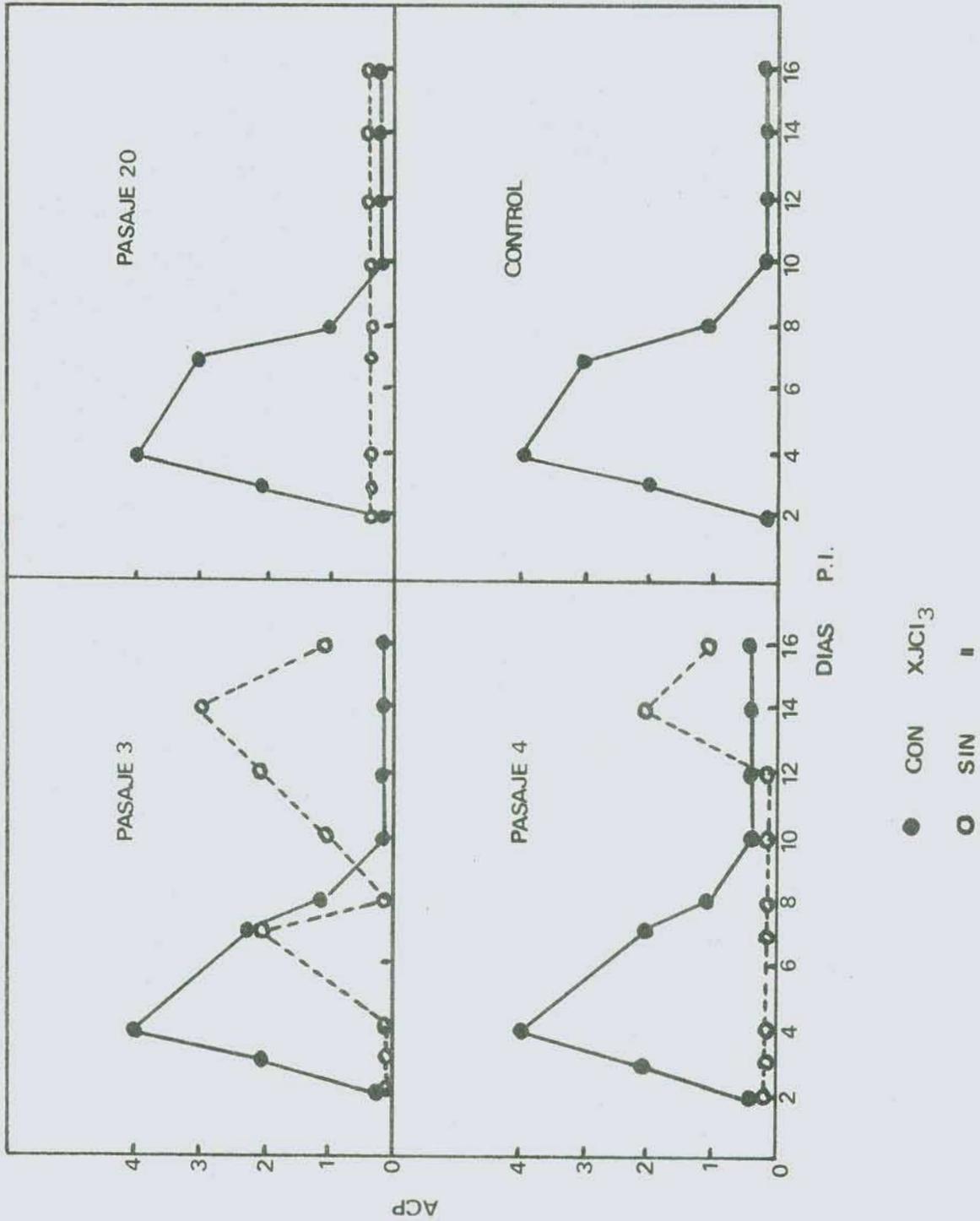


TABLA 12

Determinación de actividad interferente en los sobrenadantes de la
línea Vero-J.

Material preinoculado	Desafío con XJC1 ₃	Rendimiento a las 24 hs UFP/ml
Sobrenadante VJ-3	Sí	6.9×10^3
"	No	10
Sobrenadante VJ-4	Sí	6.6×10^3
"	No	< 5
Sobrenadante VJ-20	Sí	5.5×10^3
"	No	< 5
Medio mantenimiento	Sí	6.1×10^3
"	No	< 5

Los resultados de estas experiencias indican claramente que no se re-

gistra en los sobrenadantes de la línea Vero-J ningún tipo de actividad interferente con el virus estandar, tanto en la producción de ACP como en el grado de multiplicación viral. En efecto, el perfil de ACP que produce el virus Junín en las células Vero pretratadas con sobrenadante de Vero-J es similar al que se desarrolla en células Vero sin pretratar (Figura 19). Este comportamiento del virus Junín se manifiesta tanto si el pretratamiento se realiza con sobrenadantes de Vero-J en los que se detectan UFP como es el correspondiente al pasaje 3 (Figura 14) y que por lo tanto son capaces de producir ACP, como con aquellos pasajes (4 y 20) en los que no se puede detectar virus infeccioso por placas ni originan efectos citopáticos.

El único resultado llamativo que se presenta en la infección mixta es la supresión de los efectos citopáticos de VJ-3, que se manifiestan entre los 10-14 días p.i. Cuando se da la descarga con XJCl₃, a alta m, este virus ejerce su actividad lítica sobre las células en forma similar que en los controles y anula aparentemente los efectos citopáticos de VJ-3.

En la Tabla 12 se observa que tampoco hay ninguna inhibición en los rendimientos de virus estandar por el pretratamiento con los tres sobrenadantes probados, respecto del control hecho con medio de mantenimiento. En todos los casos los títulos a las 24 horas después de la infección con XJCl₃ oscilan entre 5.5 y 6.9×10^3 UFP/ml, cayendo las variaciones dentro del error del método. Nuevamente se observa la falta de actividad interferente con la replicación del virus estandar en aquellos sobrenadantes que producen virus a las 24 horas (pasaje 3 : 10 UFP/ml) como en los que no producen partículas infectivas (pasaje 4 y 20).

Aunque no se han detectado a través de estos ensayos partículas inter-

ferentes, no puede descartarse totalmente su presencia en los cultivos Vero-J, ya que pueden encontrarse en niveles muy bajos que resulten indetectables para la sensibilidad de la técnica empleada. Pero de todos modos, estos resultados sugieren que el rol de las partículas DI en la regulación de la infección persistente de Vero-J es muy poco trascendente, en contraposición a lo que se ha encontrado en otras investigaciones con Arenavirus.

C.-FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN LA RELACION VIRUS-CELULA.

La evolución de una infección viral no depende únicamente de la interacción directa de la partícula de virus con su célula huésped, sino que está condicionada por un gran número de factores ambientales que influyen sobre el sistema. Este concepto es válido tanto para infecciones establecidas en células cultivadas in-vitro como en animales.

En el caso particular de las células Vero crónicamente infectadas con los virus Junín y Tacaribe se estudió la influencia de diferentes condiciones de mantenimiento de los cultivos (temperatura de incubación, frecuencia de subcultivos, adición de células susceptibles, etc) sobre las características de la relación virus-célula establecida.

Efecto de la temperatura de incubación.

Los resultados descritos anteriormente que demostraron la selección de una variante de virus termosensible durante la infección crónica, señalaron la posibilidad de que una variación de la temperatura de incubación de los cultivos alterase las características de las líneas persistentemente

infectadas. En varios ejemplos descritos en la bibliografía ocurre que al incubar las células crónicamente infectadas a la temperatura permisiva para la mutante, se desarrollan notorios efectos citopáticos habiendo mayor producción de virus que a 37°C (30)(31), mientras que a la temperatura restrictiva se registra menor producción de virus, llegando a veces a curarse los cultivos de la infección. En consecuencia, se decidió estudiar el efecto de la temperatura de incubación de los cultivos de células Vero-J sobre la capacidad productora de virus de la sublínea.

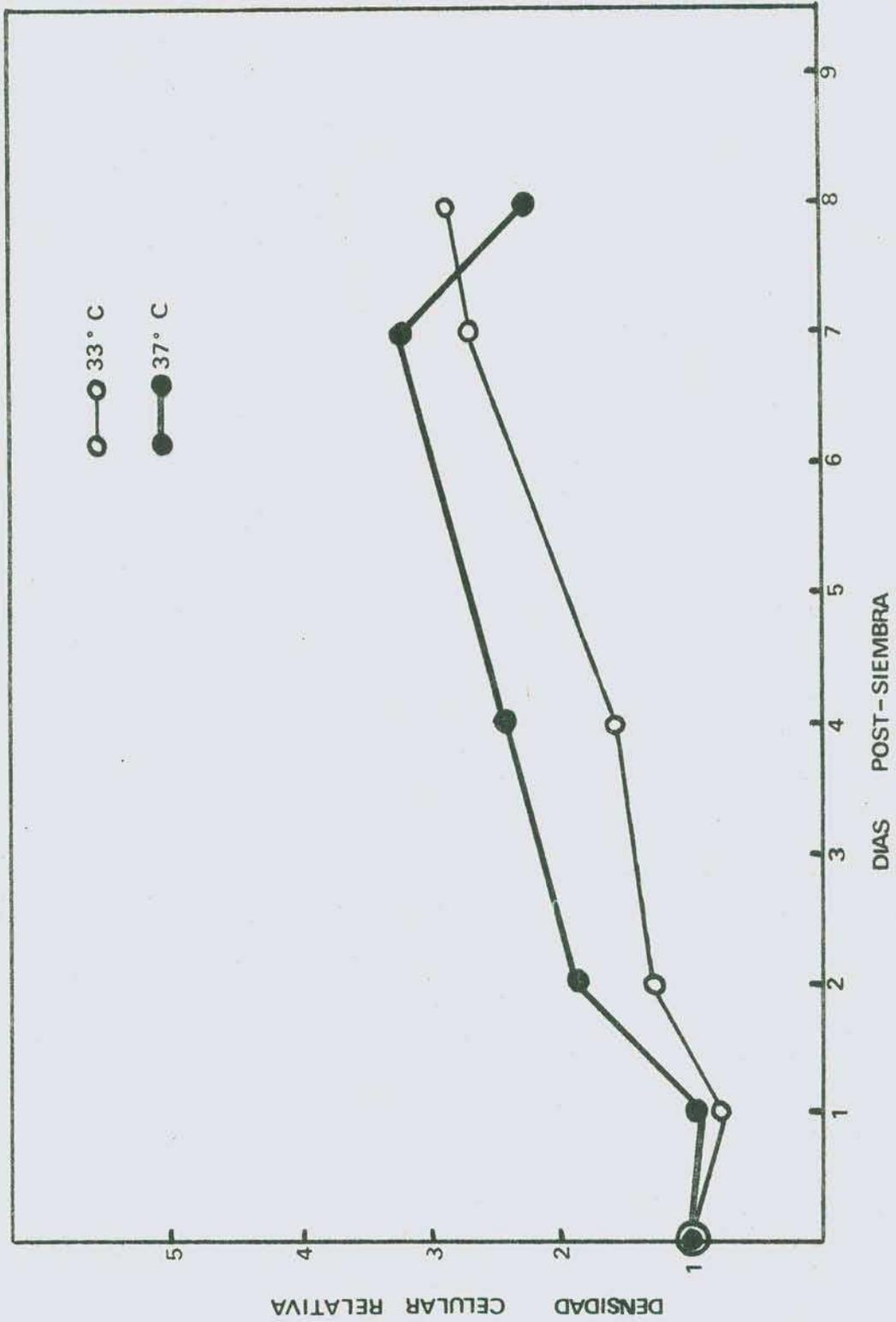
Previamente, se determinó la viabilidad y capacidad de multiplicación de las células Vero-J a temperaturas menores de 37°C. Para ello, se hicieron paralelamente dos curvas de crecimiento celular : a 33°C (temperatura óptima de la variante ts aislada a partir de la línea) y a 37°C. A distintos días después de sembradas se tripsinaron células Vero-J pasaje 20, incubadas a 33 ó 37°C. Se hizo el recuento celular en dos cultivos de cada serie, presentándose los datos obtenidos en la Figura 20.

Las células Vero-J crecen más lentamente a 33°C, hay un retraso en el tiempo de duplicación celular y se requiere más tiempo para formarse la monocapa. Morfológicamente el aspecto de los cultivos es prácticamente similar a 33 y 37°C. Recién después de varios días empieza a haber un mayor agrupamiento en las células mantenidas a menor temperatura, con formación de acúmulos de células redondas y oscuras, fenómeno que también presentan las células Vero normales cuando son mantenidas por mucho tiempo a 33°C.

A fin de observar el efecto de la temperatura de incubación sobre la relación virus-célula se tripsinaron y sembraron células Vero-J 20, pro-

FIGURA 20

Curvas de crecimiento de Vero-J a 33 y 37°C.



cediéndose a incubarlas a 33, 37 ó 39°C desde el momento de la siembra. Cada serie se repicó semanalmente y se observó al microscopio óptico. Después de 3 pasajes continuados a 33°C, no se notaron diferencias entre las células mantenidas a esa temperatura y las incubadas a 37°C : en ningún caso hubo ACP. Lo mismo puede afirmarse respecto de las células Vero-J incubadas a 39°C. Además, se titularon por el método de placas alícuotas de los sobrenadantes cosechados a las 48 horas después del segundo repique a cada temperatura (Tabla 13).

TABLA 13

Efecto de la temperatura de incubación sobre la liberación de virus infeccioso a partir de células Vero-J.

Temperatura de preincubación °C	Título del extracelular a las 48 horas UFP/ml
33	1.28×10^3
37	4.32×10^2
39	3.10×10^2

Hay una mayor producción espontánea de virus infeccioso a partir de las células crónicamente infectadas cuando éstas son incubadas a tempera-

turas más bajas (33°C). A 39°C hay disminución en la producción de virus pero se observa que igualmente, aunque en menor proporción, hay liberación de virus a partir de las células Vero-J. Este comportamiento dual probablemente se deba al hecho de que junto con las partículas que son termosensibles los cultivos persistentemente infectados producen una cierta cantidad de partículas de virus estandar que mantienen las propiedades de la cepa original.

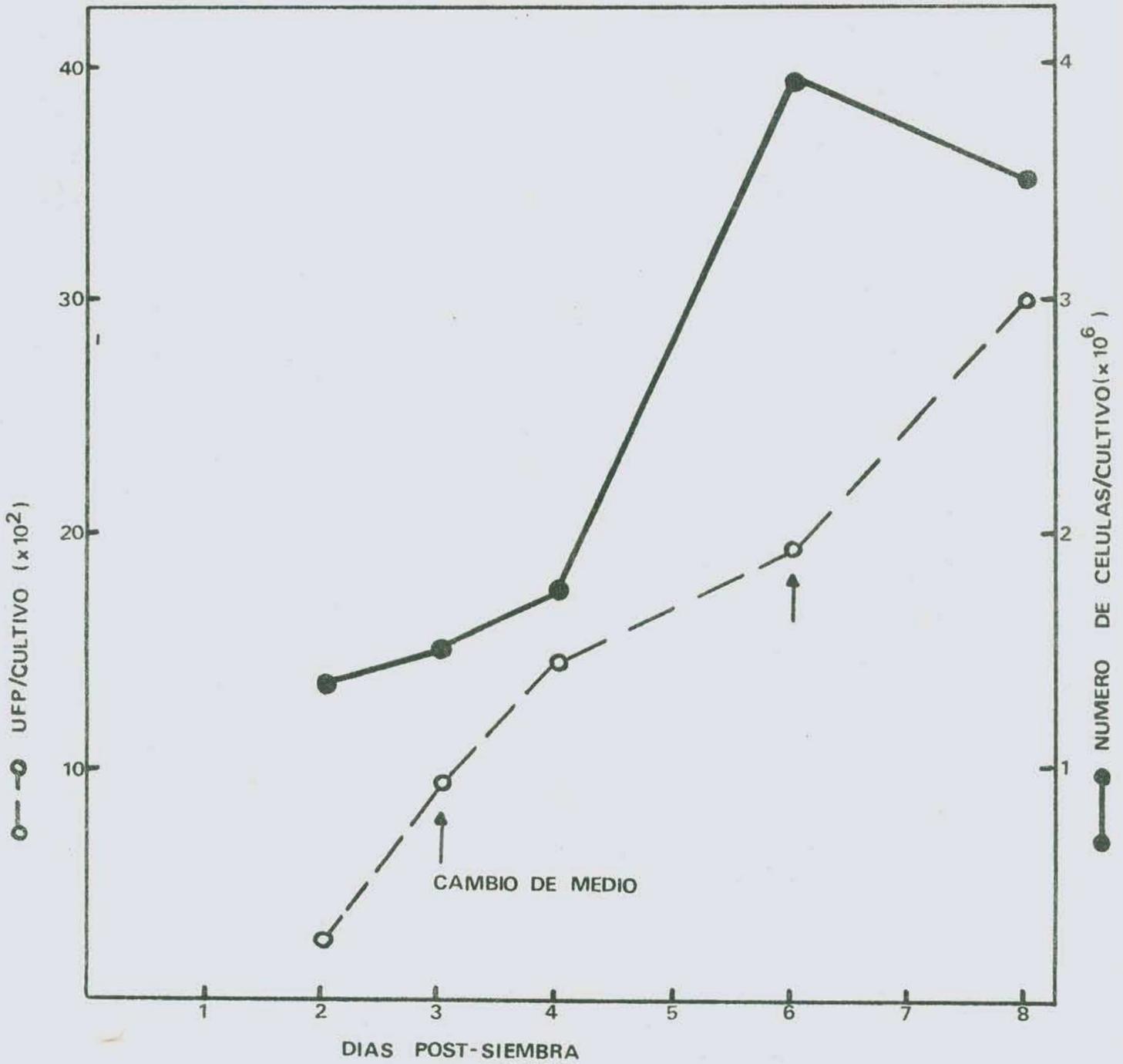
Efecto del metabolismo celular.

La liberación espontánea de virus a partir de la línea Vero-J depende del tiempo transcurrido después del repique, lo que se comprobó mediante el siguiente experimento: células Vero-J pasaje 3 fueron tripsinadas y sembradas en botellas de 90 cc de capacidad con medio 199 de crecimiento conteniendo 10% de suero de ternera inactivado. Los cultivos se incubaron a 37°C por 8 días, renovándoles el medio de mantenimiento al tercer y sexto día post-repique. A los días 2, 3, 4, 6 y 8 posteriores al repique se tomaron alícuotas del sobrenadante de dos botellas, conservándolas a -70°C hasta el momento de su titulación por formación de placas. Simultáneamente, las células de esos dos cultivos fueron tripsinadas, y resuspendidas en 1 ml de medio de mantenimiento al que se añadió una gota de solución acuosa de azul Tripán. Luego de 15 minutos, las células viables se contaron en una cámara de Neubauer, determinando de esa manera el número total de células por cultivo. Los datos obtenidos se presentan en la Figura 21.

El rendimiento de virus infeccioso aumenta a medida que aumenta el número de células, que van formando una monocapa confluyente (72-96 horas).

FIGURA 21

Liberación de virus a partir de cultivos Vero-J a distintos días después de la siembra de células.



Entre los 4-6 días post-siembra hay una fase estacionaria en la producción de virus, mientras que las células se encuentran en plena fase logarítmica de crecimiento. Luego del 6º día, se produce nuevamente un aumento en la producción de virus, que coincide con una renovación de los nutrientes al día 6. Sin embargo, en esa etapa ya las células han comenzado a declinar en su crecimiento. Esto implicaría que no es imprescindible para la producción de virus un estado metabólicamente activo de la célula, ya que la entrada de ésta en la fase estacionaria no disminuye la eficiencia productiva del sistema.

Este fenómeno también se observó en la línea Vero-T. En el pasaje 7 de dicha línea se titularon por formación de placas alícuotas de los sobrenadantes al día 1º, 3º y 7º post-repique, efectuándose simultáneamente el recuento de células. Como se destaca en la Tabla 14 al día 7º post-siembra el nivel de virus en el sobrenadante es sensiblemente mayor (2 logaritmos) que al tercer día.

TABLA 14

Producción de virus a partir de Vero-T7.

Día post-repique	Nº cél./cultivo	Título(UFP/ml)
1	5.6×10^5	5.4×10^2
3	2.5×10^6	2.3×10^3
7	4.7×10^6	3.8×10^5

Si se compara el título que se obtiene al 6º día después del repique de Vero-J pasaje 3 (1.8×10^2 UFP/ml) con el correspondiente al tercer día después del repique de Vero-J 4 (< 5), lo que equivale a cultivos con el mismo número de días in-vitro pero con un repique más en el último caso (pasaje 4) mientras que Vero-J 3 se mantiene sin repicar, nuevamente se pone en evidencia que en condiciones estacionarias de cultivo hay mayor producción continua de virus a partir de las líneas persistentemente infectadas. Esto también se manifestó al iniciar la sublínea Vero-J : al día 18 p.i. comenzó a repicarse como se detalla en Materiales y Métodos un cultivo recuperado de la infección primaria con virus Junín. En el segundo pasaje (24 días p.i.) no se detecta virus, al tercer pasaje (27 días p.i.) se detectan dos logaritmos y nuevamente al cuarto pasaje (30 días p.i.) no hay producción viral, no registrándose en ningún subcultivo ACP espontánea en la línea (Figura 14). Por su parte, el cultivo mantenido en condiciones estacionarias (sin repicar) produce a los 19 y 26 días p.i. 4 unidades logarítmicas de virus Junín y hasta el día 30 manifiesta efectos citopáticos cíclicos (Figura 7). Es decir, el cultivo inoculado que se mantiene sin repicar produce virus en niveles más elevados que la línea crónicamente infectada que se subcultiva cada 3 ó 4 días.

Todos estos resultados señalan que no parece haber una sincronización entre la multiplicación viral y la multiplicación celular ya que aquélla alcanza mayores niveles cuando la célula entra en un estado estacionario de crecimiento.

Efecto del agregado de células sensibles.

El cocultivo de células persistentemente infectadas con células susceptibles al virus que originó la infección persistentes es un método generalmente empleado con éxito para rescatar el virus presente en la infección crónica (84). El agregado de células sensibles brinda un huésped adecuado para la replicación del virus que se libera a partir de la pequeña cantidad de células productoras presentes en el cultivo. En esos casos, como se ha postulado para la infección crónica con virus Junín (42), la mayoría de las células del cultivo que rodean a la productora serían resistentes a la infección y el efecto lítico del virus liberado sólo se observa si se adicionan células normales susceptibles.

El cocultivo de células Vero-J con células Vero normales se realizó, como se describe en Materiales y Métodos, sembrando cantidades iguales de ambos tipos de células. Los cocultivos fueron observados diariamente al microscopio óptico durante 4 días, presentando las monocapas celulares un aspecto totalmente normal respecto de los controles de cultivos simples. No se registró ninguna alteración citopática por el agregado de las células sensibles. A las 24 y 48 horas de sembrados los cocultivos se determinó la cantidad de virus presente en el sobrenadante y el intracelular, en forma paralela con cultivos de células Vero-J del mismo pasaje que las empleadas para el cultivo mixto. A pesar de no haberse manifestado ningún efecto citopático, las células Vero-J cocultivadas con células Vero susceptibles exhibieron una producción significativamente aumentada de virus. Así se observa en la Tabla 15 que el título de virus a las 24 horas en el sobrenadante de los cocultivos supera en 1 log al producido por células Vero-J sin cocultivar, diferencia que se mantuvo a las 48 horas. Por su parte, los extractos celulares de Vero-J registran títulos del orden de 10^2 UFP/ml mientras que

en los cultivos mixtos a las 24 horas hay 1.39×10^4 UFP/ml y a las 48 horas, 4.35×10^4 UFP/ml, es decir un significativo aumento de 2 logaritmos.

TABLA 15

Producción de virus a partir de cocultivos de células Vero y Vero-J.

Cultivos celulares	Material	Infectividad(UFP/ml)	
		24 hs.*	48 hs.*
Cocultivos Vero-Vero-J	sobrenadante	1.54×10^3	5.4×10^3
	extracto celular	1.39×10^4	4.35×10^4
Células Vero-J	sobrenadante	1.10×10^2	4.35×10^2
	extracto celular	N.H.	7.50×10^2

* Horas después de sembrados los cultivos simples de Vero-J y los cultivos mixtos Vero-Vero-J.
N.H. : No hecho.

De esta forma, en la línea Vero-J se comprueba que el agregado de células sensibles activa la replicación del virus liberado a partir del bajo porcentaje de células productoras de partículas virales que se habían manifestado anteriormente como centros infecciosos (0.1%). Mediante el agregado de células Vero se aumenta el número de huéspedes susceptibles al virus espontáneamente producido en la infección persistente.

DISCUSION.

Durante las infecciones de células Vero con los virus Junín y Tacaribe se distinguen dos fases marcadamente diferentes. La etapa inicial virulenta se caracteriza por una notable acción citopatógena, abundante destrucción celular y producción de altos títulos de virus. La aparición, intensidad y duración de esta fase está directamente relacionada con la multiplicidad de infección (Figuras 1, 2 y 3). La aparición de la ACP es más tardía cuando se usan multiplicidades de infección menores, demorando también en igual medida en establecerse la recuperación. Cuando se inocular virus concentrado, el grado de ACP alcanzado no es superior a 2. Este fenómeno evidencia la presencia de partículas interferentes en los stocks de virus usados. La concentración del componente interferente sería menor que la del virus estandar ya que se logra el máximo de ACP diluyendo el stock original. La existencia de partículas interferentes en los stocks de Arenavirus ha sido demostrada in vivo e in vitro y también se las ha relacionado con el fenómeno de persistencia viral (83).

La acción citopática más significativa que se desarrolla en esta etapa virulenta, según lo observado por tinción de las células con May Grünwald-Giemsa, es la lisis cromatínica y la extensa vacuolización del citoplasma en el que también se observan cuerpos basófilos polimorfos. Estas observaciones están de acuerdo con las alteraciones descritas en estudios citoquímicos y morfológicos de la infección primaria de células Vero con virus Junín llevados a cabo anteriormente (85)(86).

En los cultivos de células Vero infectados a una multiplicidad de 0.2

después de la primera semana p.i. se encuentra que coexisten grandes áreas de lisis con zonas donde las células presentan abundantes mitosis. A medida que transcurren los días, la repoblación celular se hace más evidente, disminuyendo gradualmente la producción de virus extracelular. Esta es la segunda etapa de la infección que se caracteriza por la acción moderada del virus sobre las células, estableciéndose una relación no citocídica que lleva a la persistencia viral. La estabilidad de estos cultivos infectados es bastante precaria ya que a partir de la primera recuperación del tejido, se suceden etapas de aparición de nuevas alteraciones citopáticas seguidas de períodos de regeneración celular. La observación por el término de 35 días de cultivos infectados con los virus Junín y Tacaribe permitió registrar la aparición de estos ciclos de lisis y repoblación celular (figuras 6 y 7). A medida que transcurren estos ciclos, el período comprendido entre la destrucción celular y la repoblación se acorta. La actividad metabólica del huésped influye en la aparición de esta forma de infección cíclica ya que cuando se establecieron sublíneas de células persistentemente infectadas (Vero-J y Vero-T) que se subcultivaron cada 3 ó 4 días y, por lo tanto, se mantuvieron en un estado metabólico activo, no se observó lisis celular en ningún momento. Simultáneamente, en los cultivos inoculados que se mantienen sin repicar hay constante liberación de virus al sobrenadante aún en las etapas de regeneración celular, detectándose títulos del orden de 10^3 - 10^4 UFP/ml. En las líneas crónicamente infectadas que se repican en forma periódica se registran niveles sensiblemente menores de producción viral. Esto indicaría que la fase virulenta del virus se manifiesta preferentemente cuando

las células se hallan en estado estacionario. Por el contrario, la persistencia se establecería en células metabólicamente activas.

El estudio de la fase de persistencia de los virus Junín y Tacaribe in-vitro comprende el análisis de las propiedades de las células crónicamente infectadas en relación a las células normales y la caracterización del virus recuperado de la infección persistente respecto de la cepa parental que dió origen a la infección.

Las alteraciones producidas por la presencia crónica del virus en el huésped merecen especial consideración. En general, no se observan alteraciones morfológicas y/o de requerimientos nutritivos en cultivos persistentes originados por distintos virus. Sin embargo, en las células Vero-J y Vero-T se pudo demostrar una independencia del crecimiento con las concentraciones de suero usadas, a diferencia de las células normales que eran dependientes (Figuras 9, 10 y 11). Estas diferencias en el crecimiento entre células infectadas y normales fueron evidentes en los primeros subcultivos, pero luego las tres líneas fueron prácticamente indistinguibles en cuanto a morfología y crecimiento a pesar de que los cultivos de Vero-J y Vero-T liberan al medio virus infectante. Solamente se notó al microscopio óptico una mayor velocidad aparente en la formación de las monocapas con las células crónicamente infectadas, pero estas observaciones no pudieron ser corroboradas por recuento en hemocitómetro. En sistemas persistentemente infectados con Pichinde (40) se describe también un mayor crecimiento aparente al microscopio óptico respecto de la célula normal, junto con una caída más rápida del pH del medio, pero no se detecta alteración en la división celular al hacer

recuento. Los autores postulan en ese caso que la velocidad de división de los cultivos persistentes podría ser mayor pero debido a un balance fortuito en la lisis celular, el número de divisiones resulta similar al de los cultivos controles.

Un hecho llamativo fue la aparición en los cultivos de Vero-J y Vero-T de un 10% de células gigantes multinucleadas con numerosos nucleolos de formas anómalas e hipertróficos. En la bibliografía se ha registrado la aparición frecuente de células gigantes en la infección primaria de células Vero con virus Junín o Tacaribe (85) pero no se ha descrito ninguna alteración morfológica durante la infección persistente in-vitro con Arenavirus. El significado de los acúmulos de RNA observados en las células no ha podido aclararse. Se podría especular que éstas son las células en las que el virus se sintetiza en forma constante; sin embargo, mediante el ensayo de placas se detecta solamente 0.1% de centros infecciosos en la población celular y aunque pueda suponerse que este último ensayo es poco sensible y rinde valores menores que los reales, la diferencia parece demasiado amplia como para equiparar ambos conceptos.

Una importante conclusión establecida a través de esta investigación es la ausencia de alteraciones a nivel cromosómico en las células portadoras de la infección persistente, respecto de las células normales. Este hecho señala que la presencia del genoma viral no deja ninguna secuela o daño cromosómico detectable mediante el análisis citogenético llevado a cabo.

La persistencia de los virus Junín y Tacaribe en los cultivos se refleja fundamentalmente a través de la alterada susceptibilidad que pre-

sentan a la infección con el virus parental. La interferencia homóloga fue completa, no registrándose ningún efecto sobre la célula crónicamente infectada por reinfección con la cepa parental u otro virus antigénicamente relacionado con la misma. Por el contrario, en ningún caso se detectó interferencia heteróloga siendo los cultivos portadores de virus tanto o más susceptibles a la reinfección con una amplia gama de virus a ARN o ADN (Tabla 5). Este hecho descarta totalmente al interferón como agente moderador que jugase algún rol en el control de la infección crónica.

Junto con la señalada resistencia específica frente a la reinfección con Arenavirus, los cultivos crónicamente infectados se caracterizan por una liberación cíclica de virus al sobrenadante, alternándose pasajes en los que no se puede detectar virus por formación de placas con otros en los que se encuentran 1-2 unidades logarítmicas de virus. A pesar de esta producción de virus infectivo que ocurre aún después de los 100 días de vida post-infección in-vitro, en ningún momento se registran en los cultivos de Vero-J o Vero-T efectos citopáticos espontáneos, lo que marca nuevamente la notoria resistencia de la mayoría de las células que forman el cultivo a la multiplicación del virus parental. Esta pronunciada interferencia homóloga es una característica común a todos los sistemas persistentemente infectados con Arenavirus descritos hasta ahora (36) (37)(51)(42).

El virus rescatado de las células Vero-J y Vero-T fue identificado como virus Junín y Tacaribe, respectivamente, mediante la reacción de seroneutralización. El análisis de las propiedades del virus recuperado

de la infección persistente evidenció la selección de una variante viral termosensible que mantiene las mismas propiedades de la cepa parental, a excepción de una mayor inestabilidad térmica y capacidad disminuída de replicar a temperaturas superiores de 37°C. Así, el virus recuperado de la infección crónica es capaz de producir en células Vero los efectos citopáticos característicos de Junín y Tacaribe, incluyendo la formación de placas bajo agar; también se mantiene la patogenicidad para ratón lactante y la capacidad de originar en células Vero infecciones persistentes estacionarias con ciclos de lisis y repoblación celular.

La variación entre el virus persistente y la cepa que dió origen a la infección crónica se registró a nivel de su capacidad de replicar in vitro a temperaturas elevadas. La eficiencia de multiplicación del virus rescatado de Vero-J a 39°C está sensiblemente disminuída respecto de 33°C a diferencia del virus parental que no presenta alteración significativa en su replicación a 39 y 33°C.

Las curvas de crecimiento de ambos virus a las dos temperaturas ilustran claramente la variación registrada en el virus que ha evolucionado durante la infección persistente (Figura 16). Este tipo de variantes se encontraron consistentemente en todos los pasajes de la sublínea Vero-J en que se intentó su aislamiento (Tabla 11), lo que señala que su selección no es un evento al azar ocurrido durante el proceso infeccioso sino por el contrario representaría un hecho peculiar de la infección crónica íntimamente relacionado con la evolución de la misma.

La termolabilidad de la variante viral persistente, medida a través de cinéticas de inactivación térmica realizadas a diferentes temperaturas,

resultó mucho mayor que la del virus Junín estandar. Dado que las variaciones en labilidad térmica pueden considerarse como indicadores de alteraciones a nivel de proteínas virales estructurales, la termosensibilidad de la variante VJ-3 se debería fundamentalmente a la alteración de algún componente proteico estructural del virión. Con el virus de Newcastle también ocurre selección de mutantes ts a consecuencia de la infección crónica en diferentes sistemas celulares, habiéndose demostrado en ese caso que la actividad de ARN polimerasa asociada al virus seleccionado en los cultivos de células L persistentemente infectados era más lábil al calor que la del NDV parental (87). En el caso particular del virus Junín, se ha detectado actividad de polimerasa en el virus estandar (88), siendo ya de por sí algo termolábil puesto que sólo se pone de manifiesto dicha actividad in-vitro cuando la reacción enzimática se efectúa a 32°C y no a 37°C o mayor temperatura. Por lo tanto, no puede realizarse un estudio comparativo con la variante persistente, concluyéndose únicamente que en la variante viral seleccionada durante la infección crónica se ha producido la alteración de algún componente estructural del virión.

En los sobrenadantes de cultivos celulares persistentemente infectados con virus relacionado a los virus Junín y Tacaribe, como son LCM (37), Parana (39) y Pichinde (40) se ha comprobado la presencia de partículas virales defectivas que poseen capacidad de interferir con la replicación del virus estandar, habiéndosele asignado a las mismas un rol preponderante en la regulación de la infección. También se ha detectado actividad interferente en sobrenadantes de cultivos crónicamente infectados con virus Junín (42) mientras que en otro sistema similar originado en las mis-

mas condiciones no pudo ponerse en evidencia dicha propiedad (41). Aunque no se conocen en ningún caso detalladamente los mecanismos moleculares responsables, las partículas defectivas tienen por lo general un cierto efecto interferente sobre el crecimiento de la partícula infecciosa homóloga y, por lo tanto, resulta fácil deducir la forma en que las mismas podrían regular la producción de virus en las células, estableciendo un equilibrio que permite el mantenimiento del estado "carrier". Sin embargo, en la infección persistente de células Vero con virus Junín analizada en este estudio no pudo demostrarse la presencia de partículas interferentes por determinación de la capacidad de los sobrenadantes de los cultivos de inhibir la replicación del virus estandar, ya sea midiendo los efectos citopáticos que se producen sobre la célula como consecuencia de la infección mixta en relación a la infección con virus estandar XJC1₃ (Figura 19) o comparando los rendimientos virales en ambos casos (Tabla 12).

Los indicios de la probable presencia de partículas interferentes en los cultivos de Vero-J son indirectos y se basan en dos observaciones :

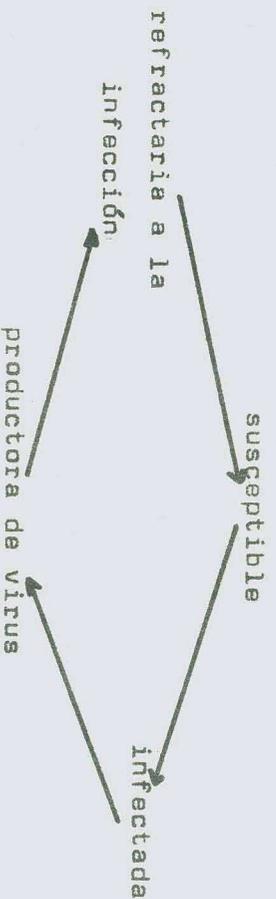
- 1) la infección de células Vero con el virus recuperado de la infección persistente a menor m produce mayores rendimientos y efectos citopáticos más intensos que si se inoculan los sobrenadantes concentrados; esto señala la probabilidad de que el sobrenadante de las células crónicamente infectadas contenga partículas autointerferentes, como sucede con los stocks de virus estandar;
- 2) los ciclos de producción de virus detectados en los sobrenadantes de Vero-J y Vero-T por la técnica de placas muestran que en algunos pasajes el virus infeccioso desaparece, para luego reaparecer en cantidades que oscilan de 1-2 log. En la mayoría de los sistemas virus-célula

estudiados, este fenómeno de producción cíclica siempre está asociado a la presencia de partículas defectivas interferentes. Por lo general la disminución en síntesis de virus estandar está precedida por una alta producción de partículas DI (89). A pesar de que estas dos circunstancias podrían indicar la presencia de formas virales no infectivas en los sobrenadantes de los cultivos persistentes Vero-J, los mismos no mostraron interferencia con la replicación del virus estandar, tanto en los pasajes en que se detectó virus por UFP como en aquéllos en que aparentemente no había liberación de viriones infecciosos. Esto sugiere que el rol de las partículas interferentes en la regulación del sistema Vero-J es poco importante a diferencia de lo que se ha postulado con otros Arenavirus, pero no puede descartarse totalmente su participación en la misma.

En los estudios realizados por diferentes investigadores sobre el fenómeno de persistencia de Arenavirus in-vitro se han encontrado considerables variaciones en la relación virus-célula establecida, habiendo aparentemente un gran número de factores implicados en la regulación de la infección. Ya se han mencionado las conclusiones elaboradas por Pfau y col. quienes ubican a la partícula DI como el agente encargado de establecer el balance entre producción de virus infeccioso y la multiplicación celular que conduce a un sistema estable de persistencia viral.

Según J. Hotchin, las partículas defectivas no replicativas, indudablemente presentes en algunos stocks de LCM, no son el principal factor responsable de la persistencia (90). En cultivos de células L persistentemente infectadas con LCM, Hotchin y col. revelan la presencia de bajos niveles de una variante de LCM de crecimiento lento, no formadora de placas,

no patógena para ratón y difícil de detectar. Esta variante se halló consistentemente como producto final de la infección persistente de LCM en cultivos positivos por inmunofluorescencia y sin virus detectable por placas (91). A través del concepto de infección cíclica transiente se postula una explicación del fenómeno de persistencia en Arenavirus. Según esta hipótesis cada célula pasaría por distintos estadios durante el proceso infeccioso :



Esta producción de virus intermitente o temporaria puede asociarse con la variación cíclica de título de virus en los cultivos persistentes con Arenavirus (90).

Las observaciones de Hotchin fueron confirmadas y ampliadas a través de los estudios llevados a cabo por Lehmann-Grube, quien también concluye que las partículas VI no juegan un rol fundamental en el mantenimiento de la infección con LCM aunque su presencia no puede ser totalmente excluida. Se postula que el virus cosechado de los cultivos carrier es una variante atenuada cuyos efectos citopáticos sobre la célula son muy difíciles de detectar. Como estas variantes atenuadas interferirían con la replicación del virus citotóxico, pueden ser tomadas erróneamente como partículas VI, pero son en realidad virus estándar con capacidad reducida de destruir las células cultivadas in-vitro aunque a veces patógenas para ra-

tón (92). La gran variabilidad genética del virus LCM demostrada a través de las distintas subcepas aisladas de un mismo stock explicaría la evolución de este tipo de partículas.

Como puede observarse el fenómeno de persistencia viral es sumamente complejo y se encuentra en la bibliografía que para un mismo virus han sido propuestos independientemente diferentes mecanismos a fin de explicar cómo se mantiene la infección crónica. Esto sucede tanto dentro de los Arenavirus como con diferentes miembros de otras familias de virus. El análisis de los sistemas Vero-J y Vero-T llevado a cabo durante estas investigaciones brinda nuevos aportes que contribuirán al esclarecimiento del mecanismo que regula este tipo de infección crónica. Entre el virus temporariamente producido por dichos cultivos y la célula huésped que es parasitada se establece un estado de coexistencia equilibrada cuyo mantenimiento parece implicar una compleja relación entre factores específicos del virus y factores específicos del huésped. Como se ha visto, el equilibrio virus-célula se alcanza, sin afectar notablemente a la célula, a partir de la fracción celular sobreviviente a la primoinfección, mientras que la población viral producida en las etapas tempranas y tardías de la infección crónica estaría formada preponderantemente por variantes termosensibles de la cepa original acompañadas de una mínima cantidad de virus estandar, no siendo aparentemente trascendental la influencia de las partículas defectivas interferentes, cuya presencia es evidente en los stocks de virus Junín.

En la mayoría de los casos donde se ha demostrado selección de variantes a consecuencia de una infección crónica no resulta claro cuáles son

las presiones selectivas que producen la evolución de este tipo de variantes virales ni tampoco si las mismas son suficientes para mantener el estado "carrier" o si es necesaria además la presencia de partículas defectivas que ejerzan un cierto control de la producción de virus. De todos modos, la selección de mutantes virales ts y la producción cíclica de partículas DI no tienen porqué ser mecanismos excluyentes. Por el contrario, aparentemente los sistemas persistentemente infectados están regulados por una serie de factores a través de cuya interrelación se controla el proceso. Estos factores moduladores pueden ser las partículas defectivas interferentes, las mutantes virales termosensibles y, probablemente, también la célula huésped a través de la codificación de alguna proteína específica. Por lo tanto, un leve cambio en las condiciones de cultivo o pasaje puede ser suficiente para desnivelar el balance hacia el enriquecimiento de mutantes, selección de revertantes o síntesis de partículas defectivas interferentes, explicándose así la gran variabilidad en los resultados que se obtienen al trabajar con sistemas que en apariencia resultan similares pero cuyo estudio arroja conclusiones disímiles.

Los resultados de la presente investigación muestran un nuevo enfoque del estudio de la persistencia in-vitro de los Arenavirus y en particular de los virus Junín y Tacaribe. Junto con la clara evidencia de la falta de efectos malignos producidos por el virus sobre la célula portadora del genoma viral, se demuestra la producción a partir de dicha célula de una variante viral termosensible que se selecciona inmediatamente después del establecimiento de las sublíneas crónicamente infectadas. Al prevalecer en los cultivos es-

te tipo de partícula viral de pronunciada inestabilidad térmica y cuya temperatura óptima de replicación es inferior a 37°C (quizás asimilable a la partícula de crecimiento lento, SG, descrita por Hotchin para LCM) se facilitaría el mantenimiento de una infección persistente productiva de virus que no provoca daño a la célula infectada.

W. Hobbs de Harland

W. Hobbs de Harland

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Mims C.A.
Progr.med.Virol. 18 : 1 (1974).
- 2.-Fenner F. and White D.O.
Medical Virology, 2nd.Ed.Academic Press (1976).
- 3.-Rowe W.P.; Murphy F.A.; Bergold G.H.; Casals J.; Hotchin J.; Johnson K.M.; Lehmann Grube F.; Mims C.A.; Traub E. and Webb P.A.
J.Virol. 5 : 651 (1970).
- 4.-Traub E.
Science 81 : 298 (1935).
- 5.-Buckley S.M. and Casals J.
Amer.J.trop.Med.Hyg. 19 : 680 (1970).
- 6.-Jonson K.M.; Webb P.A. and Justines G.
LCM and other arenaviruses,Lehmann Grube Ed.Berlin,Springer,251(1973).
- 7.-Parodi A.S.;Greenway D.J.; Ruggiero H.R.; Rivero E.; Frigerio M.J.; Mettler N.E.; Garzón F.; Guerrero L.B. y Nota N.R.
Día méd. 30 : 2300 (1958).
- 8.-Downs W.G.; Anderson C.R.; Spence L.; Aitkin T.H. and Greenhall A.H.
Amer.J.trop.Med.Hyg. 12 : 640 (1963).
- 9.-Coto C.E.; Weissenbacher M.C. y Calello M.A.
Medicina (Bs.As.) 36 : 9 (1976).
- 10.-Hotchin J.
Viruses affecting man and animals.Ed.by Sanders, U.S.A. (1971).

11.-Hotchin J.

Cold Spr.Harb.Symp.quant.Biol. 27 : 479 (1962).

12.-Oldstone M.B.A. and Dixon F.J.

J.exp.Med. 129 : 483 (1969).

13.-Garay R.P.

Medicina (Bs.As.) 31 : 381 (1971).

14.-Schmuñis G.A.; Weissenbacher M.C. and Parodi A.S.

Arch.ges.Virusforsch. 21 : 200 (1967).

15.-Weissenbacher M.C.; Schmuñis G.A. and Parodi A.S.

Arch.ges.Virusforsch. 26 : 63 (1969).

16.-Nota N.R.; Nejamkis M.R.; Frigerio M.J. y Guerrero L.B.

Medicina (Bs.As.) 33 : 398 (1973).

17.-Besuschio S.C.; Weissenbacher M.C. and Schmuñis G.A.

Arch.ges.Virusforsch. 40 : 21 (1973).

18.-Taratuto A.L.; Tkaczewski L.Z.; Nota N.R.; Nejamkis M.R. and Giovanniello O.

Arch.ges.Virusforsch. 43 : 173 (1973).

19.-Boxaca M.; Guerrero L.B. and Savy V.L.

Arch.ges.Virusforsch. 40 : 10 (1973).

20.-Sabattini M.S. y Maiztegui J.

Medicina (Bs.As.) 30 : 8 (1970).

21.-Weissenbacher M.C.; Grela M.E.; Sabattini M.S.; Maiztegui J.; Coto C.; Frigerio M.J. y Barrera Oro J.G.

Resúmenes Ier.Congreso y IVas.Jornadas Argentinas de Microbiología, Bs. As. (1976).

22.-Walker D.L.

Progr.med.Virol. 6 : 111 (1964).

23.-Huang A.S. and Baltimore D.

Nature 226 : 325 (1970).

24.-Holland J.J. and Villareal L.P.

P.N.A.S. 71 : 2956 (1974).

25.-Preble O.T. and Youngner J.S.

J.Inf.Dis. 131 : 467 (1975).

26.-Preble O.T. and Youngner J.S.

J.Virol. 12 : 481 (1973).

27.-Youngner J.S. and Quagliana D.O.

J.Virol. 16 : 1332 (1975).

28.-Youngner J.S.; Dubovi E.J.; Quagliana D.O.; Kelly M. and Preble O.T.

J.Virol. 19 : 90 (1976).

29.-Shenk T.E.; Koshelnyk A. and Stollar V.

J.Virol. 13 : 439 (1974).

30.-Haspel M.V.; Knight P.; Duff R. and Rapp F.

J.Virol. 12 : 690 (1973).

31.-Kimura Y.; Ito Y.; Shimokata K.; Nishiyama Y.; Nagata I. and Kitch I.

J.Virol. 15 : 55 (1975).

32.-Simizu H. and Takayama N.

J.Virol. 4 : 799 (1969).

33.-Nishiyama Y.

J.Gen.Virol. 35 : 265 (1977).

34.-Simpson R.W. and Iinuma M.

P.N.A.S. 72 : 3230 (1975).

- 35.-Zhdanov V.M.
Nature 256 : 471 (1975).
- 36.-Lehmann Grube F.; Slenczka W. and Tees R.
J.Gen.Virol. 5 : 63 (1969).
- 37.-Staneck L.D.; Trowbridge R.S.; Welsh R.M.; Wright E.A. and Pfau C.J.
Inf.and Imm. 6 : 444 (1972).
- 38.-Stanwick T.L. and Kirk B.E.
J.Gen.Virol. 32 : 361 (1976).
- 39.-Staneck L.D. and Pfau C.J.
J.Gen Virol. 22 : 437 (1974).
- 40.-Dutko F.J.; Wright E.A. and Pfau C.J.
J.Gen.Virol. 31 : 417 (1976).
- 41.-Boxaca M.
Medicina (Bs.As.) 30 : 50 (1970).
- 42.-Help G.I.; León M.E. y Coto C.E.
Rev.Asoc.Arg.Microbiol. 8 : 45 (1976).
- 43.-Welsh R.M.; O'Connell C.M. and Pfau C.J.
J.Gen.Virol. 17 : 355 (1972).
- 44.-Hotchin J.
Progr.med.Virol. 18 : 81 (1974).
- 45.-Martínez Zegovia Z.M.; Holstein B.A. y Grazioli F.
Ciencia e Investigación 23 : 35 (1967).
- 46.-Boxaca M. y Savy V.
Medicina (Bs.As.) 32 : 260 (1972).
- 47.-Mettler N.E.; Buckley S.M. and Casals J.

- Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 107 : 684 (1961).
- 48.-Rhim J.S.; Simizu B. and Wiebenga N.H.
Arch.ges.Virusforsch. 21 : 243 (1967).
- 49.-Holstein B.A.; Gutman Frugone L. y Teyssie A.R.
Medicina (Bs.As.) 31 : 215 (1971).
- 50.-Rhim J.S.; Schell K.; Creasy B. and Case W.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 132 : 670 (1969).
- 51.-Boxaca M.C.; Savy V.L. y Giovanniello O.A.
Medicina (Bs.As.) 32 : 269 (1972).
- 52.-Guerrero L.B.; Weissenbacher M.C. y Parodi A.S.
Medicina(Bs.As.) 29 : 1 (1969).
- 53.-Coto C.E. and de Vombergar M.D.
Arch.ges.Virusforsch. 27 : 307 (1969).
- 54.-Simizu B.; Rhim J.S. and Wiebenga N.H.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 125 : 119 (1967).
- 55.-Reed L.J. and Muench H.A.
Am.J.Hyg. 27 : 493 (1938).
- 56.-Takemoto K.K. and Liebhaber V.
Virology 14 : 456 (1961).
- 57.-Barteling S.I.
Chemical Chem. 15 No 10 (1969).
- 58.-Hickson T.G.L.
Proc.Soc.Exp.Biol. (NY) 139 : 1337 (1972).
- 59.-Damonte E.B. y Coto C.E.
Rev.Asoc.Arg.Microbiol. 6 : 15 (1974).

- 60.-Seabright M.
Lancet ii : 971 (1971).
- 61.-Arrighi F.E. and Hsu T.C.
Cytogenetics 10 : 81 (1971).
- 62.-Walsh R.M. and Pfau C.J.
J.Gen.Virol. 14 : 177 (1972).
- 63.-Mettler N. and Casals J.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 134 : 1051 (1970).
- 64.-Coto C.E.; León M.E. y Help G.I.
Acta bioquímica clínica latinoamericana 9 : 247 (1975).
- 65.-Ruzicsa P. and Hsu T.C.
Texas rept.biol.med. 25 : 151 (1967).
- 66.-Bianchi N.O. and Ayres J.
Exp.cell.Res. 68 : 253 (1971).
- 67.-Choppin P.W. and Compans R.W.
J.Virol. 5 : 609 (1970).
- 68.-Huang A.S.; Besmer P.; Chu L. and Baltimore D.
J.Virol. 12 : 659 (1973).
- 69.-Huang A.S.; Palma E.L.; Hewlett N. and Roizman B.
Nature 252 : 743 (1974).
- 70.-Závada J. and Rosenbergova M.
Acta virol. 16 : 103 (1972).
- 71.-Závada J.
Arch.virol. 50 : 1 (1976).
- 72.-Maasab H.F. and Veronelli J.A.
J.Bacteriol. 91 : 436 (1966).

- 73.-Inglot A.D.; Albin M. and Chudzio T.
J.Gen.Virol. 20 : 105 (1973).
- 74.-Desmyter J.; Melnick J.L.; Rawls W.E.
J.Virol. 2 : 955 (1968).
- 75.-Coto C.E.; Vombergar M.D. y Tkaczewski L.Z.
Medicina (Bs.As.) 30 : 38 (1970).
- 76.-Thacore H. and Youngner J.
J.Virol. 4 : 244 (1969).
- 77.-Kawai A.; Matsumoto S. and Tanabe K.
Virology 67 : 520 (1975).
- 78.-Takemoto K.K. and Habel K.
Virology 7 : 28 (1959).
- 79.-Hinze H.C. and Walker D.L.
J.Bacteriol. 82 : 498 (1961).
- 80.-Huang A.S.; Greenwalt J.W. and Wagner R.R.
Virology 30 : 161 (1966).
- 81.-Shenk T.E. and Stollar V.
Virology 53 : 162 (1973).
- 82.-Cole C.N. and Baltimore D.
J.Mol.Biol. 76 : 325 (1973).
- 83.-Pfau C.J.; Welsh R.M. and Trowbridge R.S.
LCM and other arenaviruses. Lehmann Grube Ed. Berlin, Springer (1973).
- 84.-Knight P.; Duff R.; Glaser R. and Rapp F.
Intervirology 2 : 287 (1973/74).
- 85.-Tkaczewski L.Z. y Boxaca M.C.

Medicina (Bs.As.) 30 : 28 (1970).

86.-Tkaczewski L.Z. and Correa J.

Medicina (Bs.As.) 32 : 293 (1972).

87.-Stanwick T.L. and Hallum J.V.

J.Virol. 17 : 68 (1976).

88.-Mersich S.; Damonte E.B. y Coto C.E.

Resúmenes Ier. Congreso y IVas. Jornadas Argentinas de Microbiología, Bs.
As. (1976).

89.-Palma E.L. and Huang A.S.

J.Inf.Dis. 129 : 402 (1974).

90.-Hotchin J.

Progr.med.Virol. 18 : 81 (1974).

91.-Hotchin J. and Sikora E.

Inf.and Imm. 7 : 825 (1973).

92.-Lehmann Grube F.; Popescu M.; Schaefer H. and Gschwender H.H.

Bull.WHO 52 : 443 (1975).