

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DEL VIRUS DEL GRUPO LEUCOSIS - SARCOMA

I. *Aislamiento y mantenimiento de células L-R (*)*

Por Alejandro A. Schudel (1) y B. R. Burmester (2)

R E S U M E N

Se describe el aislamiento y mantenimiento de células L-R.

Las células L-R resultan de la infección solitaria de una partícula viral de virus de Sarcoma de Rous, parcialmente defectiva, a una célula susceptible, en ausencia de infección simultáneamente por un virus ayudante o asociado.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LEUCOSIS/SARCOMA GROUP OF VIRUSES

I. *Isolation and maintenance of L-R cells*

S U M M A R Y

The isolation and maintenance of the L-R cells was described.

L-R cells are the result of a solitary infection of a single Rous Sarcoma partially defective particle, to a susceptible cell in the absence of a simultaneous infection by an helper virus.

(*) Trabajo realizado como Becario Externo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina; en el Regional Poultry Research Laboratory U. S. D. A. East Lansing Michigan U. S. A. Parte del trabajo de Tesis para optar al título de Magister Scientiae en Patología Animal. Presentado en las V Jornadas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata.

(1) Médico Veterinario, Magister Scientiae en Patología Animal. Jefe de Trabajos Prácticos Interino de la Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

(2) Director del Regional Poultry Research Laboratory. Agricultural Research Service, U. S. D. A. East Lansing, Michigan U. S. A.

A N T E C E D E N T E S

Virus Tumorales Aviares Defectivos

H. Temin en 1963 (20) y Hanafusa en 1963 (5), demostraron las características defectivas de la cepa Bryan High Titer de Virus de Sarcoma de Rous. Entiéndase por defectividad la pérdida de alguna de las funciones vitales que impiden la producción de partículas virales completas.

Cuando un fibroblasto de embrión de pollo es infectado con una sola partícula viral defectiva de virus de Sarcoma de Rous, se transforma y comienza a dividirse, formando focos de células redondeadas y retráctiles. Sin embargo, no se registra producción de virus infeccioso similar al virus infectante. Por esta razón, en ausencia de producción de virus detectable, fueron llamadas *non producer cells*, células no productoras o simplemente NP.

La sobreinfección de estas células NP con cualquiera de los virus del grupo Leucosis/Sarcoma, da lugar a la producción de partículas virales infecciosas, correspondientes a la multiplicación del virus de leucosis, llamado en este caso ayudante, por la síntesis de su envoltura externa.

La propiedad atribuida al virus ayudante, es la habilidad de proveer durante la infección a la célula NP, de la cubierta externa al virus de Sarcoma de Rous defectivo, produciéndose la salida de ambos; pero el virus de Sarcoma de Rous defectivo poseerá ahora las mismas características antigénicas que su virus ayudante, pues de él tomará su cubierta externa y, por lo tanto, sus características antigénicas de tipo.

La actividad del virus ayudante en la síntesis de virus completo de Sarcoma de Rous defectivo, es la base del test de células NP o L-R descriptas en este manuscrito.

La presencia de Virus de Rous Asociado (RAV) (Rous Associated Virus) en los stocks de Virus de Sarcoma de Rous, explica la necesidad de las par-

tículas defectivas de Virus de Sarcoma de Rous, de proveerse de la ayuda necesaria para la multiplicación completa de la partícula viral.

El virus ayudante es necesario en los periodos finales de la síntesis viral, Hanafusa 1964 (6) y Vogt 1964 (83). Las células no productoras (L-R) no contienen antígenos de tipo, pero sí se transforman. Cuando el virus ayudante es adicionado a la preparación, aparecen los antígenos de tipo, del virus ayudante a nivel de la membrana celular. Los virus de Sarcoma de Rous que adquieren sus antígenos específicos de tipo, de su virus ayudante, son conocidos como Pseudotipos. Este antígeno de tipo, es adquirido por el pseudotipo de RSV, no por la síntesis de su genome sino obedeciendo a la síntesis del genome del virus ayudante e integrado a su cubierta externa, por mezcla fenotípica.

La ausencia de producción de virus infeccioso por parte de las células NP, ha sido recientemente sujeta a una extensiva reevaluación.

Por estudios de microscopía electrónica, se observa la presencia de partículas virales semejantes a la del grupo Leucosis/Sarcoma (Duogherty y Di Stéfano, 1965 (3), Courington y Vogt, 1967 (1)).

Estas partículas son capaces de infectar activamente células susceptibles, Weiss 1967 (25), Vogt 1967 (24), y se las llama RSV (0) por su inusual susceptibilidad de hospedador.

Los virus RSV (0), tienen una muy limitada especificidad de hospedador y no poseen relación antigénica con ninguno de los cuatro subgrupos de virus del grupo Leucosis/Sarcoma. Los distintos clones de células denominadas ahora L-R pueden producir dos tipos de RSV (0) llamados alfa y beta. El primero no posee hospedador susceptible y el segundo es fácilmente identificable por su capacidad de producir efectos citopatológicos en fibroblastos de embrión de perdis y

producir interferencia con los miembros del subgrupo B.

El descubrimiento de RSV (0) demuestra por lo tanto que el Virus de Sarcoma de Rous, no es completamente defectivo.

Replicación de virus de Sarcoma de Rous no defectivo en células L-R

En una revisión extensiva de la ultraestructura de células (fibroblastos de embrión de pollo) infectadas con una partícula defectiva de Virus de Sarcoma de Rous, células conocidas como NP Dougherty y Di Stéfano en 1965 (3), demostraron la existencia de partículas virales similares a las partículas del tipo C de los virus del grupo Leucosis/Sarcoma.

El número de partículas virales en células NP es significativamente menor en células infectadas con multiplicación activa de virus, Courrington y Vogt 1967 (1), confirmado luego por Hagueneau y Hanafusa en 1968 (4).

Empleando métodos químicos, Robinson 1965 (15), demuestra la presencia de partículas virales en cultivo de tejido. Células NP en su fase activa de desarrollo, crecían en un medio con Timidina tritiada (3H) y el virus eliminado, presentaba una constante de sedimentación, similar a la del virus de Sarcoma de Rous infeccioso.

El RNA extraído de esta preparación sedimentaba al mismo gradiente que el virus de Sarcoma de Rous infeccioso. La cuantificación confirmó los resultados de Dougherty 1965 (3) y Courrington y Vogt 1967 (1), ya que la síntesis viral correspondía al 50 % del que una célula normalmente infecciosa produciría.

Las partículas recogidas del fluido sobrenadante, concentradas, produjeron formación de focos característicos en cultivo de tejido, Weiss 1967 (25), demostración que finalmente confirmó que el virus de Sarcoma de Rous no es defectivo.

Vogt en 1967 (24) aclara la confusión creada entre las propiedades defectivas del virus de Sarcoma de Rous.

Las partículas virales producidas por las células NP son llamadas RSV (0) para demostrar su independencia de virus Helper y poseen además una especificidad de hospedador muy particular y, al contrario de los demás subgrupos virales, la producción de focos en células C/O es altamente ineficiente. No es infeccioso para C/B y C/AB. Sin embargo, es infeccioso en C/A y escasas C/O. El hospedador de elección es el cultivo de fibroblastos de embrión de perdiz (Japanese Quail).

Por todas estas características RSV (0) no pertenece a ninguno de los cuatro subgrupos anteriormente descritos, ya que es infeccioso en C/A y C/O (escaso), mientras que los demás subgrupos virales poseen una eficiencia considerablemente mayor en C/O. Esta última característica, la de infectar sólo una pequeña proporción de C/O en cultivo de embriones individuales sugeriría una cierta selectividad dentro de las células C/O, ya que es lógico deducir que todas las células de un mismo embrión poseerán el mismo fenotipo celular.

La cantidad de RSV (0) producido por las células NP, es muy pequeña, del orden de 10^4 a 10^5 por cada 10^6 células NP. Sin embargo, son permeables al tratamiento con policaciones (DEAE-dextran), Hanafusa y Hanafusa 1968 (7).

La descripción de Virus de Sarcoma de Rous como defectivo, fue elaborada en conocimiento de su incapacidad de formar su cubierta externa al infectar una célula susceptible, siendo entonces necesaria la presencia de un virus ayudante para su salida. Si el virus de Sarcoma de Rous produce un virus de características antigénicas diferentes, pero que es infeccioso para un tipo celular distinto al de su progenitor y se multiplica sin la ayuda de un virus ayudante, no ha perdido ninguna función vital y no es defectivo.

El rol del virus Helper sería el de extender la susceptibilidad de hospedador del virus de Sarcoma de Rous

agregándole algunos determinantes a la estructura externa del mismo.

Resulta pues incorrecto utilizar el término defectivo para el virus de Sarcoma de Rous. Es inapropiado además, calificar de No Productoras a células que evidentemente producen virus infeccioso.

Hanafusa y Hanafusa sugieren en 1968 (7), cambiar la nomenclatura para las células NP y utilizando como modelo la terminología de bacteriófago, las denominan L-R (Leucosis negative Rous Cell).

No hay mayores diferencias entre las distintas variantes de virus de Sarcoma de Rous, en cuanto a su defectividad y parecería recomendable considerar a este virus como representado por una serie de variantes con diferentes susceptibilidades de hospedador.

Variantes

La mayor parte de las L-R producen virus infeccioso para C/A o células de embrión de perdiz, el resto no produce efecto citopatológico visible, Hanafusa y Hanafusa 1968 (7) y 1969 (8); Weiss 1969 (26-27).

Entre un cierto número de clones aislados de C/O infectados con BH-RSV-RAV-1, el 90 % de los clones producidos elabora RSV (0), con una susceptibilidad de hospedador similar a la descrita anteriormente. Sin embargo, un 10 % de los clones restantes no produce RSV (0) detectable por infectividad en ningún medio de todos los testados (aves, células, membrana corioalantoidea) aun en presencia de agentes que facilitan la penetración celular (policationes). Cuando estos clones crecen en presencia de Timidina tritiada (3H), las partículas virales eliminadas poseen

un coeficiente de sedimentación en sacarosa, similar al virus de Sarcoma de Rous infeccioso.

Estas características establecen una clara diferenciación entre estas dos variantes, a la primera de las cuales, infecciosa para perdiz y C/A, se la denomina RSV (0) beta, y L-R beta las células L-R de donde provienen. En el segundo caso, al RSV (0) producido por clones que no manifiestan efecto citopatológico, se lo denomina RSV (0) alfa y los clones L-R de donde proviene L-R alfa.

Cada uno de los clones de L-R produce virus con las mismas características durante todo el período en que son testados, aun con la superinfección de estos clones con RAV-1, el pseudotipo viral producido será BH-RSV-RAV-1, si este virus es inoculado en C/O, y reaislado en clones de L-R, éstos serán 100 % productores de RSV (0) beta si el clon original era L-R beta; pero si el clon de L-R activado poseía características de L-R alfa, los clones reaislados luego de la activación con RAV 1 y clonado serán 80 % L-R alfa y 20 % beta.

El primer ejemplo es una clara indicación de la dependencia viral de la célula, como determinante del tipo viral producido, no así en el segundo caso, en el que RAV 1 interaccionaría con el genome celular, favoreciendo la aparición de una nueva variante viral.

Recientemente Hanafusa 1970 (8), demuestra la influencia celular en producción de variantes virales, considerándose nuevamente al hospedador como elemento importante en los mecanismos de multiplicación viral y no sólo el medio en el cual el virus puede replicarse y expresarse.

MATERIAL Y METODO

Origen del stock de virus

BH-RSV-RAV-1, obtenido por clonación de material tumoral inoculado en monocapa de fibroblastos de embrión de pollo de características fenotípicas C/O, propagado en mono-

capa de fibroblastos de embrión de pollo C/B, reclonado y propagado por pasaje de células en C/O, colectando el fluido sobrenadante a los 3-5-7 días postinfección.

La purificación del material viral se realizó de acuerdo a la técnica Moloney 1960 (11).

Titulado por la formación de focos de monocapas de fibroblastos de embrión de pollo C/O, el título del material viral es de 1×10^6 FFU (Unidad Formadora de Foco) por ml., Purchase y Okazaki 1964 (13). En el caso de aislamiento de NP se utilizaron diluciones logarítmicas de base 2 a partir de una concentración de 100 FFU por placa.

Las aves utilizadas para la producción de tumores, en el material original, provenían del programa SPF (grupo de aves mantenidas en condiciones de aislamiento), a fin de evitar contaminación con otros subgrupos de virus durante el período experimental (6 semanas).

Suero Hiperinmune

Obtenido por inoculación de BH-RSV-RAV-1, (400-4000 FFU) en el tejido subcutáneo del ala, en aves de 16 semanas de edad de línea 15 I.

Reinoculadas 3 semanas después con BH-RSV-RAV-1 (4000-40000 FFU) por vía endovenosa. Sangrados 7 días más tarde y titulados por el método de neutralización en placa.

Las aves utilizadas provienen del grupo SPF y se mantienen durante el término de la experiencia en estrictas condiciones de aislamiento, para evitar contaminaciones con otros virus y contar así con un suero monovalente altamente específico.

Inoculación en membrana corioalantoidea

En embriones de 7 días de edad, se practicó inoculación en membrana corioalantoidea (CAM), según la técnica descrita por Keogh 1938 (10).

La cantidad y calidad del inóculo, fue variable, de acuerdo al diseño experimental.

Se utilizaron embriones de 4 días de desarrollo de Línea 6, C/O, Línea 7 C/AB, Línea 1900, C/O, Línea 100, C/A, C/B y C/AB y embriones de perdiz (Japanese Quail).

Luego de inoculados, se mantienen en incubación por 13 días y se efectúa

la lectura de los pocks en membrana corioalantoidea, a los 18-20 días.

Inoculación en Perdiz (Japanese Quail)

Perdices (Japanese Quail) obtenidas, por gentileza del Poultry Department, Michigan State University, provenientes de una población heterogénea pero de buenas condiciones sanitarias.

Se inoculan en el ala con suspensiones virales a los dos días de edad.

Durante todo el período experimental (4 semanas) se mantienen en aisladores de tipo Horsfall.

Los embriones que se utilizan en cultivo de tejidos, son procesados entre 7-9 días de vida embrionaria.

Cultivo de células

Embriones de 10 días de edad, provenientes de las líneas del programa SPF, (RIF-COFAL-NP), de las distintas líneas de pollos mantenidas en este laboratorio y de acuerdo al fenotipo utilizado.

Para el aislamiento de células NP se utilizaron cultivos de fibroblastos de embrión de pollo de fenotipo C/O.

Los cultivos de fibroblastos de embrión de pato, fueron procesados a los 11 días de vida embrionaria y provienen de parvadas comerciales.

Todas las células primarias, se plantean en placas de 150 x 25 mm, de donde se originan las secundarias que se utilizaron a lo largo de todos los modelos experimentales.

Medios de Cultivo

Solución Stock

Medio 199; Morgan 10x, con 1-glutamina, sin NaHCO_3 .

Mezcla Nutriente F10, 10x (Hanks) con 1-glutamina, sin NaHCO_3 .

Caldo Triptosa Fosfato, (TPB) 29.5 gm de TPB deshidratada (Difco) en c.s.p. 1.000 cc de agua destilada, esterilizada en autoclave.

Penicilina/Estreptomocina; 1.000.000 unidades por mililitro.

Micostatin; 50 unidades por mililitro.

Aislamiento, Propagación y Preservación de las células L-R

Aislamiento:

Co-cultivos de fibroblastos de embrión de pollo secundarios y fibroblastos de embrión de pato secundarios, en una proporción de 1/100 a 1/300, se siembran en placa de petri de 60 x 15 mm, en una concentración de 1.2×10^6 células por placa; son infectadas con 0.2 ml de BH-RSV-RAV-1 en diluciones logarítmicas de base 2 a fin de obtener de 1-50 focos por placa.

Se mantienen en incubación en cámara húmeda a 37°C o 40°C con 5 por ciento de CO₂. Luego de 16 horas el medio de crecimiento es reemplazado por una monocapa de agar con antisuero específico. A los 4 días post-inoculación se cubren con una nueva monocapa de agar.

En el periodo transcurrido entre el primer día post-infección y la segunda monocapa de agar, puede adicionarse 1cc de una dilución 1/10 de suero específico anti-BH-RSV-RAV-1.

Selección

A los 6 días post-infección, los focos aparecen característicos al microscopio y comienzan a ser macroscópicamente visibles a los 9 días.

La primera selección se realiza en base a la cantidad de focos por placa, de preferencia las que poseen de 1-10 focos por placa, seleccionando los que muestran mejor desarrollo, con centros no degenerados, bordes netos y sin focos satélites.

Clonado

Empleando un sacabocado estéril (uno por cada clon) se corta el agar y se circunscribe el foco a clonar. Con una pipeta Pasteur y vacío se elimina el agar por succión. Si el foco es firme, permanecerá adherido a la placa; en caso que quede adherido al agar se pone directamente este agar con las células del foco en un tubo con 0.5 de suero de ternero.

Para remover el foco de la placa, se deja caer una gota de tripsina 1 % diluida 1/20 o 1/50, cuidadosamente y usando una pipeta por cada orificio. Este procedimiento puede obviarse y remover las células directamente por raspado con una pipeta y la ayuda de PBS. En caso de utilizar tripsina, las placas se mantienen en incubador a 37° hasta observar que las células comienzan a redondearse. Entonces, con una pipeta Pasteur y con la ayuda de una pipeta de goma, se succiona y expelle cuidadosamente tratando de levantar la mayor cantidad de células posibles y el contenido de la pipeta se vierte en tubos conteniendo suero de ternero (0.5 cc) refrigerados en baño de hielo.

Propagación

Las células clonadas en la forma anterior se co-cultivan con fibroblastos de embrión de pato secundarios en placas de 60 x 15 mm, una placa para cada uno de los focos clonados. Se emplea medio de crecimiento. A las 24 horas se cambia el medio de crecimiento por medio de mantenimiento.

Los cultivos se mantienen bajo control constante, cambiando el medio de mantenimiento cada 48 horas, y controlando el crecimiento de las células clonadas.

Los clones que manifiestan un crecimiento rápido, son replatedos en co-cultivos con fibroblastos de embrión de pato secundario a una placa de 20 x 100 mm (3×10^6 fibroblastos frescos secundarios de pato), si el crecimiento es bueno; en caso contrario el cultivo mixto se hace en una placa de 60 x 15 mm con 1×10^6 fibroblastos de embrión de pato secundarios.

Las placas que no muestran buen crecimiento, que demuestran crecimientos aberrantes, se descartan inmediatamente. En cada pasaje se toma muestra del cultivo de tejido sobrenadante, para testar por producción de virus infeccioso. El test puede realizarse en CAM o en fibroblastos de embrión de pollo secundarios C/O.

Los pasajes se realizan cada tres o cuatro días, adicionando una porción de fibroblastos de pato secundarios en cada pasaje, e incrementando el número de placas sembradas.

Luego de 4 pasajes, los que muestran mejores características de crecimiento, pureza, velocidad de multiplicación y no son productores de RSV infeccioso y detectable por CAM o fibroblastos de embrión de pollo, se seleccionan definitivamente como L-R stock.

Preservación

Los clones así seleccionados, pueden usarse inmediatamente o bien preservarse, por congelación en Nitrógeno líquido.

Se tripsinizan con Tripsina 0.025 %, se centrifugan y resuspenden en me-

dio de crecimiento, se cuentan y se diluyen con medio de congelamiento a una concentración del doble de la final, bajo agitación permanente y en baño de hielo. La concentración final se mantiene en 5×10^6 a 1×10^7 .

Como el DMSO es muy tóxico para las células, las ampollas deben ser cerradas inmediatamente para no perder viabilidad celular, y se congelan a 1°C por minuto, hasta alcanzar -70°C; luego se transfiere a Nitrógeno líquido. En el proceso de congelamiento, se utilizó el Linde BF-4 Biological Freezing Equipment que produce un descenso controlado electrónicamente de 1°C por minuto, o recipientes metálicos con interior de asbesto en refrigeradoras de -70°C y luego de 16 horas se efectúa la transferencia a Nitrógeno líquido.

RESULTADOS

Aislamiento de Células L-R:

Fibroblastos de embrión de pollo de características fenotípicas C/O y fibroblastos de embrión de pato, en proporción de 1/100, procesados como células secundarias, tal como se detalla en Material y Método, fueron plateados en placas de Petri de 60 x 15 mm (Falcon) en número de 1.2×10^6 células por placa, se mantuvieron por 24 horas con 4 cc de medio de crecimiento para CEF en incubación a 37°C en atmósfera de CO₂ controlada. Pasadas 24 horas, al obtenerse un buen cultivo en monocapa, se seleccionaron las mejores placas y se inocularon con BH-RSV-RAV-1, en diluciones de base 2, a fin de obtener aproximadamente 50, o menos Unidades Formadoras de Focos por placa. El inoculum se mantiene por 45', se lavan las células de la monocapa con PBS y se adiciona una capa de agar con antisuero. La segunda capa de agar se aplicó a los 4 días post-inoculación. Se controlaron las placas diariamente a fin de observar el desarrollo de los focos y su selección. A diez días se procedió al clonado de las células transformadas, y se cocultivaron con fibro-

blastos de embrión de pato en placas de 60 x 15 mm (1×10^6 por placas). Se mantuvieron en este primer pasaje hasta tanto las células L-R representaron un 10 % del cultivo total. Luego de lo cual se pasaron en un segundo pasaje a un cultivo mixto de fibroblastos de embrión de pollo C/O y fibroblastos de embrión de pato en placas medianas, con una cantidad total de 5×10^6 células por placas. El sobrenadante obtenido del primer pasaje se testó por inoculación en membrana corioalantoidea de embrión de pollo C/O y por inoculación en fibroblastos de embrión de pollo C/O.

Los sucesivos pasajes se realizaron en la forma descripta para el segundo, analizando luego de cada pasaje el líquido sobrenadante de los clones en forma individual en CAM y en fibroblastos de embrión de pollo C/O. Los resultados se tabulan en Tabla Nº 1.

El análisis del fluido sobrenadante resultó positivo desde el primer pasaje, en ambos sistemas de test.

Resultó ligeramente más susceptible membrana corioalantoidea que Fibroblastos de embrión de pollo, esto ya

ha sido publicado anteriormente, Crittenden, Reamer y Okazaki 1967 (2), pero en el segundo pasaje ya no hubo distinción en la susceptibilidad entre los dos sistemas debido a un incremento en la producción de RSV-RAV-1.

El paso siguiente consistió en determinar el origen de la contaminación con Virus Asociado de Rous, que produjo la activación del virus defectivo. Dos hipótesis se testaron: la primera, la posibilidad de que las células empleadas para el clonado estuvieran contaminadas con RAV (o LL) que como se sabe se transmite en forma congénita a través del embrión, y la segunda, una falla en la actividad del suero neutralizante.

Para testar la primera de las hipótesis se tomó una muestra de fibroblastos de embrión de pollo del mismo origen (preparado a partir del mismo cultivo original y congelado en Nitrógeno como control y se propagó por tres pasajes sucesivos; se congeló con CO₂ y acetona y descongeló tres veces, para romper las membranas celulares y dejar en libertad las posibles partículas virales; se centrifugó a 2.000 g por 18 minutos para eliminar restos celulares y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a

4°C por 45 minutos a 45.000 g; se resuspendió el pellet en citrato de potasio 0.05 M, y se inocularon células L-R (línea 25) de características de activación específica y ya controlada. El resultado fue negativo, como era de presumir, pues los embriones provienen del grupo SPF son testados dos veces al año, por la existencia de anticuerpos o virus de LL, a los que resultaron negativos. Por lo tanto, no es posible la transmisión vertical de la enfermedad.

La segunda hipótesis parecía más factible, pues es muy raro que una contaminación con Virus Asociado de Rous durante la propagación pudiera ocurrir en todas las placas al mismo tiempo cuando, como en estos casos se extreman las medidas para evitar contaminación con virus del grupo Leucosis Sarcoma. Retestadas las propiedades neutralizantes, lo que se supone como causa del efecto anteriormente mencionado) se observó una pérdida de título. Además el pseudotipo BH-RSV producido por todos los clones correspondió al subgrupo A, por inoculación en fibroblastos de pollo de distintas características fenotípicas, tal como se detalla en tabla 1 (última columna, RSV pseudotipo).

TABLA Nº 1

PRIMER AISLAMIENTO DE L-R

Scores de 1-20 % de acuerdo al crecimiento de L-R)

Nº de Clon	Dilución de virus	Primer pasaje			Segundo pasaje			Tercer pasaje			RSV Pseudotipo
		L-R	CAM	CEF	L-R	CAM	CEF	L-R	CAM	CEF	
1	1/2×10 ⁻⁵	10	+	+	20	+	+	20	+	+	A
2	1/2×10 ⁻⁵	10	+	+	20	+	+	20	+	+	A
3	1/2×10 ⁻⁵	10	+	+	20	+	+	20	+	+	A
4	1/2×10 ⁻⁴	10	+	--	20	+	+	20	+	+	A
5	1/8×10 ⁻⁵	10	+	+	20	+	--	20	+	+	A
6	1/8×10 ⁻⁵	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A
7	1/8×10 ⁻⁵	10	+	--	20	+	+	20	+	+	A
8	10 ⁻⁶	10	+	--	20	+	+	20	+	+	A
9	10 ⁻⁶	10	+	--	20	+	+	20	+	+	A
10	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A
11	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A
12	10 ⁻⁶	5	+	--	20	+	+	20	+	+	A
13	10 ⁻⁶	5	+	--	20	+	+	20	+	+	A
14	10 ⁻⁶	5	+	--	20	+	+	20	+	+	A
15	10 ⁻⁶	5	+	--	20	+	+	20	+	+	A
16	10 ⁻⁶	0	+	--	20	+	+	20	+	+	A
17	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A
18	10 ⁻⁶	10	+	--	20	+	+	20	+	+	A
19	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A
20	10 ⁻⁶	5	+	--	20	+	+	20	+	+	A
21	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A
22	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	--	20	+	+	A
23	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A
24	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A
25	10 ⁻⁶	5	+	+	20	+	+	20	+	+	A

L-R — Células de Rous Leucosis negativa.

CAM — Membrana Corioalantoidea.

CEF — Cultivo de fibroblastos de embrión de pollo.

Un segundo intento de clonado fue realizado en forma periódica, partiendo de placas inoculadas en la misma forma que en el experimento anterior, pero colectando los focos a distintos tiempos a razón de 5 clonados semanales.

En este segundo intento se utilizó un suero de probada efectividad neutralizante (10³ unidades neutralizantes contra 4x10² FFU). En total se aislaron 25 clones a partir de distintas placas, de los cuales, luego de cuatro pasajes, se seleccionaron dos

por su capacidad de propagación y multiplicación en cocultivo. Los resultados se detallan en Tabla Nº 2. Fotografía Nº 1.

Tal como se observa en Tabla Nº 2, la mayoría de los focos resultó no productor de virus identificable en el sistema testado, 20/25, tres resultaron contaminados en el transcurso de los pasajes y se seleccionó finalmente a los clones Nº 14 y Nº 23 para proseguir la fase de activación. Los demás fueron congelados y posteriormente descartados pues el grado de

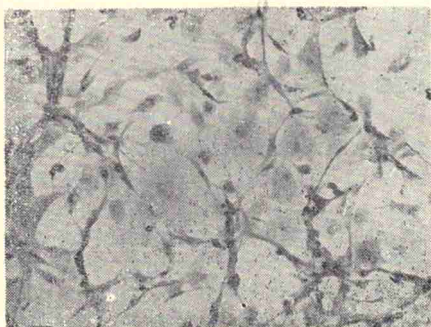


Foto N° 1

propagación disminuyó luego de cuatro pasajes, presumiblemente por la pérdida de la capacidad de reproducción luego del congelamiento. Fotografía N° 2.



Foto N° 2

Los cuatro clones que resultaron productores, fueron testados para identificar el pseudotipo al que res-

pondían luego de la producción de virus completo e infeccioso: todos, sin excepción, correspondían al subgrupo A.

En este caso, es muy difícil identificar si se debió a un contaminante o a una infección simultánea a las células susceptibles por parte del virus ayudante y el virus defectivo de Sarcoma de Rous. Los sucesivos pasajes de los clones N° 14 y N° 23 a fin de incrementar su cantidad, se realizaron en placas de 150 x 25 mm. sembradas en cultivos mixtos con fibroblastos de embrión de pato frescos en cada pasaje. El 7° pasaje del clon 23 resultó infeccioso en condiciones de cultivo, ya que producía focos en fibroblastos de embrión de pollo C/O, no se llevó a cabo ninguna prueba de identificación de pseudotipo viral involucrado, aunque parece deducible la producción de RSV (0) beta por estas células, ya que no activaba células L-R de características Standar (L-25) y no infectaba fibroblastos C/B, aunque todas estas pruebas resultan inconclusivas, ya que no puede excluirse la presencia de un contaminante del subgrupo B. Los resultados que se reportan en este manuscrito con el clon N° 23, corresponden a los obtenidos previo al comienzo de su actividad productora, o presumiblemente productora, es decir entre el cuarto y sexto pasaje.

TABLA N° 2

SEGUNDO INTENTO DE AISLAMIENTO DE L-R

Clon N°	Primer pasaje			Segundo pasaje			Tercer pasaje			Cuarto pasaje		
	%	L-R	CAM CEF	%	L-R	CAM CEF	%	L-R	CAM CEF	%	L-R	CAM CEF
1	0	—	No test	10	—	—	Contaminado					
2	0	No test	No test	10	—	—	20	—	—	Lento — —		
3	0	No test	No test	10	—	—	20	—	—	Lento — —		
4	10	—	—	10	—	—	10	—	—	Confl. — —		
5	10	—	—	10	—	—	20	—	—	Lento — —		
6	0	—	—	0	—	—	20	—	—	Confl. — —		
7	10	—	—	10	—	—	20	—	—	Confl. — —		
8	10	—	—	10	—	—	20	—	—	Lento — —		
9	20	—	—	10	—	—	10	—	—	20 — —		
10	20	—	—	10	—	—	20	—	—	20 — —		
11	0	—	—	10	—	—	20	—	—	20 — —		
12	10	—	—	20	+	±	Descartado por prod. de RSV-RAV-A					
13	10	—	—	10	—	—	Confl.	—	—	20 — —		
14	10	—	—	10	—	—	Confl.	—	—	Confl. — —		
15	10	—	—	10	—	—	Contaminado con E. coli					
16	10	—	—	10	—	—	Contaminado con E. coli					
17	10	—	—	10	—	—	Confl.	—	—	Confl. — —		
18	10	—	—	10	—	—	20	—	—	Lento — —		
19	10	+	—	10	+	+	Confl. Desc. por prod. de RSV-A					
20	10	—	—	10	—	—	20	—	—	Lento — —		
21	0	+	+	10	+	+	Desc. por productor de RSV-A					
22	10	—	—	10	—	—	Confl.	—	—	Confl. — —		
23	10	—	—	10	—	—	Lento — —					
24	10	—	—	10	+	—	20	+	+	Desc. por p. RSV-A		
25	0	—	—	Confl.	+	—	Confl.	+	+	Desc. por p. RSV-A		

No test: No testado.

Confl.: Confluente.

L-R: Célula de Rous, Leucosis negativa.

CAM: Membrana Corioalantoidea.

CEF: Cultivo de Fibroblastos de embrión de pollo.

Antes de someter los clones aislados a pruebas experimentales se los sometió a una última experiencia en la que se trató de determinar las características celulares, con respecto a la producción de virus no infeccioso, RSV (0). Para ello se utilizaron fibroblastos de embrión de pollo de características fenotípicas conocidas, C/AB, C/A y C/B y fibroblastos de embrión de perdiz (Japanese). Todos

se procesaron en la forma standard y se platearon en placas de 60 x 15 mm. en forma individual. A las 24 horas luego de la siembra, fueron infectadas por 45', con fluido sobrenadante del cultivo de clon N° 14 y N° 23, previamente centrifugado a 40.000 g. por 1 hs. y resuspendido el pellet en citrato de potasio 0.05 M. Los resultados se tabulan en la Tabla N° 3 (A).

Simultáneamente se inocularon con el mismo material que en el experimento anterior, embriones de pollo y embriones de perdiz de 7 días, en membrana coriolantoidea. Tabla número 3 (B).

La inoculación se repitió en perdiz de 2 días de edad mantenida en estricto aislamiento. Tabla número 3 (C).

Ninguno de los clones testados demostró bajos condiciones experimentales empleadas, la producción de focos o tumores, luego de inocu-

lados en fibroblastos, embriones de perdiz, esto significa que si bien estas células pueden producir virus, no es infeccioso en las condiciones rutinarias de test. Además, el RVS (0) testado, recibido por cortesía del doctor Vogt, probablemente corresponda al variante Beta del virus Sarcoma de Rous, aunque sería necesario hacer más pruebas experimentales a fin de comprobar las características antigénicas, relacionadas con su envoltura externa.

TABLA Nº 3

CARACTERIZACION DEL VIRUS NO DEFECTIVO DE SARCOMA DE ROUS

A—

Cultivo de tejidos celulares (formación de focos)

Muestra	Fonotipo celular				
	C/O	C/AB	C/A	C/B	Quail
Nº 14	—	--	--	--	--
Nº 23	—	--	--	--	--
BH-RSV-RAV-1	X	--	--	X	X
RSV (0)	—	--	X	—	X

B

Inoculación en membrana corioalantoidea (cuenta de pocks)

Muestra	C/O	C/AB	C/A	C/B
Nº 14	0/5	0/5	0/5	0/5
Nº 23	0/5	0/5	0/5	0/5
RSV (0)	0/5	0/3	1/4	NT
BH-RSV-RAV-1	5/5	0/3	0/1	4/5
BH-RSV-RAV-2	3/3	0/2	3/3	NT

C—

Inoculación de perdiz (respuesta tumoral)

Muestra	Tumor/Inoculados
BH-RSV-RAV-1	2/2
RSV (0)	2/2
Nº 14	0/2
Nº 23	0/2

DISCUSION

Por los resultados obtenidos es fácil observar que no existen dificultades en el aislamiento de clones de células L-R (llamadas formalmente NP, non producers) resultado de la inoculación de un virus defectivo de Sarcoma de Rous, con diluciones cercanas al punto final (cuando la eficiencia del planteo casi es mínima). En el segundo experimento de aislamiento se observa que resultaron productores 5/25 clones aislados. La selección posterior se efectuó en base a la capacidad de propagación de las células L-R.

El significado funcional de las células L-R, es motivo del más intensivo estudio, no sólo en el sistema de virus del grupo Leucosis/Sarcoma, sino en los tumores a partículas virales de tipo C, en laucha y gato, donde la defectividad de las capas virales y la producción de células no productoras del tipo L-R ha sido recientemente reportado, O'Connor (sin publicar). En este sistema, el virus de leucemia felina (FLV) actúa como ayudante del virus de Sarcoma de laucha (MSV). Este fenómeno es tan interesante como el de formación de agregados virales físicos entre el virus de Sarcoma de laucha MSV y FLV, luego de ultracentrifugación, es decir en forma de agregados físicos, probablemente obedeciendo a las leyes generales de coloides.

La necesidad de una intensa síntesis de DNA celular inmediatamente después de la infección por parte de estos virus, y su mantenimiento por lo menos por las primeras 8 horas luego de la infección y los resultados de Payne en 1968 (12) de la existencia de un antígeno que reacciona en el test de COFAL, en una línea de pollos susceptible y su ausencia en una línea resistente y su segregación en forma de alelo mendeliano autosómico dominante complican la interpretación de los mecanismos de multiplicación viral y el significado de la presencia de un antígeno viral específico de grupo.

Si sumamos a ello la determinación de la importancia del material celular en la síntesis viral, determinada por Hanafusa 1969 (8), en el cual la célula juega un papel importante en la interrelación virus-célula, no sólo el lugar donde el virus utiliza la maquinaria necesaria para su síntesis. Recientemente una nueva hipótesis sobre carcinogénesis viral, ha sido propuesta por Huebner 1970 (9) en la cual una parte del material genético viral, el oncogene, actuaría reprimiendo la célula en su transformación oncogénica, la infección viral activaría la desrepresión del oncogene y la transformación celular. Si relacionamos todos estos conocimientos con la teoría propuesta por Temin en 1966

(21) sobre la existencia de provirus de Sarcoma de Rous, que podría ser una forma replicativa intermedia, una proteína, una enzima o material existente, faltando sólo determinar, cuál es la forma replicativa, si existe, dónde y cómo actúa, y las interrelaciones virus-células al nivel molecular.

¿Cómo se relacionan estos conocimientos con las células LR, y qué tienen que ver estas células con el mecanismo de carcinogénesis?

Dijimos en la revisión de literatura, que una característica importante de estas células es que producen virus de características diferentes al virus infectante. ¿Cómo se produce esta transformación viral? Indudablemente la única posibilidad factible es la influencia del genotipo celular, ya que el virus infectante no puede ser pues es defectivo y pese a multiplicarse no es eliminado y no hay cambios antigénicos a nivel de la membrana celular. Además, el RSV (0) producido no es detectado previo a la infección. Es indudable que las células, con su material genético aporten mucho más a la naturaleza del nuevo virus, que la maquinaria de síntesis.

Es posible pues, que la existencia o la ausencia de esta forma replicativa (si existe), juegue un papel im-

portante en la síntesis del fenotipo no defectivo del virus de Sarcoma de Rous.

El segundo interrogante depara aún más preguntas que las que admite responder. El mecanismo de carcinogénesis es prácticamente desconocido, pero hay una serie de características celulares que indican la aparición de cambios relacionados con carcinogénesis, luego de la infección viral, ya sea cambios enzimáticos, síntesis de nuevas proteínas o enzimas y, transformación. La síntesis de antígeno Gs. luego de la infección y su presencia en líneas de pollos normales, en las células L-R y en el genome de los virus defectivos y no defectivos de Sarcoma de Rous, es otra indicación de interrelación entre el genome celular y el mecanismo de carcinogénesis. Qué papel podría asignarse a la presencia de antígeno Gs. en células normales Payne 1968 (12) sino el de desrepressor del genome viral integrado (oncogene), por supuesto que esta suposición es de tipo hipotético. Es posible que en un futuro no muy lejano, el desrepressor la forma replicativa, o el provirus enunciado por Temin en 1966 (21) será hallado y tendremos entonces más argumentos para analizar el mecanismo de carcinogénesis y sus implicancias.

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

1. *Courrington, C. and Vogt, P. K.* Electron microscopy of chick fibroblast infected by defective RSV and its Helper. *J. Virology* Nº 1, 400-414. 1967.
2. *Crittenden, L.; Reamer, R. and Okazaki, W.* Two loci controlling Cellular resistance to Avian Leucosis/Sarcoma Viruses. *Virology* 5, 898-904. 1967.
3. *Dougherty, R. M. and Di Stefano, H. S.* Virus particles associated with nonproducers Rous Sarcoma cells. *Virology*, 27-451. 1965.
4. *Hagueneau, F. and Hanafusa, H. A.* Quantitative Electron Microscope study of the virus released from a cells infected with RSV. *Virology*, 34-275. 1969.
5. *Hanafusa, H.; Hanafusa, T. and Rubin, H.* The defectiveness of RSV Proc. Nat. Acad. Sci. US 49, 572-580. 1963.
6. *Hanafusa, H.* Analisis of the defectiveness of RSV 1-Characterization of the helper virus. *Virology* 22, 591-601. 1964.
7. *Hanafusa, H. and Hanafusa, T.* Further studies of RSV production from transformed cells. *Virology* 34. 1968.
8. *Hanafusa, T.; Miyamoto T. and Hanafusa, H.* Type of chick embryo cell that fails to support formation of infections RSV. *Virology* 40, 55-64. 1969.
9. *Huebner, R. J. and Todaro, G.* Tumor Viruses as Determinants of cancer. *P. N. Acad. Science US* 64, Nº 3. 1969.
10. *Keogh, E. V.* Ectodermal Lesions Produced by the virus of Sarcoma de Rous. *Brith. J. Exptl. Path.* 19, 1-8. 1938.
11. *Moloney, J. B.* Biological studies on a lymphoid leukemia virus extracted from sarcoma 32. 1-Rigen and introductory investigations *J. Nat. Cam. Inst. Vol.* 24, Nº 4, 933-951. 1960.
12. *Payne, L. N. and Chubb, R. C.* Studies on the nature and genetic control of an antigen

- in normal chick embryos with resalts in the COFAL test, *J. Gen Virol* 3, 379-389. 1963.
13. *Purchase, G., Okazaki, W.* Morphology of foci produced by Standard preparations of RSV *J. nat. Can. Inst. Vol. 32, N° 2, 579-591. 1964.*
 14. *Rispens, B.; Long, P. L. and Okazaki, W. and Burmester B. R.* The NP activation test for assay of Avian Leukosis/Sarcoma viruses *Avian Diseases Vol. XIV N° 4, 1970.*
 15. *Robinson, W. S.; Pitkanen, A. and Rubin, N.* The nucleic acid of the Bryan strain of Rous Sarcoma Virus Purification of the virus and isolation of the nucleic acid. *Proc. Nat. Acad. Science U. S., 54, 137-144. 1965.*
 16. *Rubin, H.* A virus in chick embryo wich induces resistance in vitro to infection with RSV *Proc. Natl. Acad. Sci. US 46, 1105-1119. 1960.*
 17. *Rubin, H. Vogt, P. K.* An Avian Leucosis Virus Associated with Stocks of RSV. *Virology* 17, 184-194. 1962.
 18. *Sarma, P.; Tuerner, H. and Huebner, R. J.* An Avian Leucosis group specific complement fixation reaction. Application for the detection and Assay of non-cytopathogenic Leucosis virus. *Virology* 23, 313-321. 1964.
 19. *Sarma, P.; Vess, W.; Huebner, R. J.* Evidence for the invitro transfer of defective RSV fenome from Hamster tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Science U. S. Vol. 55, N° 6, pp. 1435-1442. 1966.*
 20. *Temin, H.* Further evidence for a converted, non virus producing state of RSV infected cells. *Virology* 20, 235-245. 1963.
 21. *Temin, H.* Nature of the provirus of Rous Sarcoma Virus. 1966.
 22. *Vogt, P. K.; Rubin, H.* Localization of infections virus and viral antigens in chick fibroblasts during succesive Stages of infection with RSV. *Virology* 13, 528-544. 1961.
 23. *Vogt, P. K.* Flourescent microscopic observations on the defeveness of RSV *J. N. Cancer Inst. Monograph* 17, 527-541. 1964.
 24. *Vogt, P. K.* A virus released by non producing RS cells. *Proc. Nat. A a. S. i. U. S. A. 58, 101. 1967.*
 25. *Weiss, R. A.* Spontaneous virus production from non-virus produceing RS cell. *Virology* 32, 719. 1967.
 26. *Weiss, R. A.* The host range of Bryan Strain RSV synthetized in absence of helper virus. *J. Gen. Virology* 5, 511-528. 1969.
 27. *Weiss, R. A.* Interference and Neutralization Studies with Bryan Strain Rous Sarcoma Virus in the absence of helper virus. *J. Gen. Vir. 5, 529-539. 1969.*