

## Tesis de Posgrado

# Inmunoprevención de leucemia murina

Mayer, Alejandro Miguel Santiago

1978

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

**Cita tipo APA:**

Mayer, Alejandro Miguel Santiago. (1978). Inmunoprevención de leucemia murina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1568\\_Mayer.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1568_Mayer.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Mayer, Alejandro Miguel Santiago. "Inmunoprevención de leucemia murina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1978.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1568\\_Mayer.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1568_Mayer.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

# **INMUNOPREVENCIÓN DE LEUCEMIA MURINA**

Autor: **ALEJANDRO MIGUEL SANTIAGO MAYER**

Director: **Dr. MIGUEL ANGEL BASOMBRIO**

Lugar de Trabajo: SECCION LEUCEMIA EXPERIMENTAL,  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLOGICAS,  
ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA.

Tesis presentada para optar al título de  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

BUENOS AIRES, 1978

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

# **INMUNOPREVENCIÓN DE LEUCEMIA MURINA**

Autor: **ALEJANDRO MIGUEL SANTIAGO MAYER**

Director: **Dr. MIGUEL ANGEL BASOMBRIO**

Lugar de Trabajo: SECCION LEUCEMIA EXPERIMENTAL,  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES HEMATOLOGICAS,  
ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA.

Tesis presentada para optar al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BUENOS AIRES, 1978

PADRINO DE TESIS

Dr. Miguel Angel BASOMBRIO

Investigador. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Sección Leucemia Experimental. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.

CONSEJERO DE ESTUDIOS

Dr. Jorge DE CARLO

Profesor Titular de Histología Animal Comparada. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Buenos Aires. Buenos Aires.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo, realizado en la Sección Leucemia Experimental del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, se hizo posible gracias al apoyo de un número de personas e instituciones a quienes deseo expresar mi agradecimiento.

- \* al Dr. Miguel Angel Basombrío, por su participación activa en carácter de director de tesis en la elaboración del plan, por el permanente estímulo a través de los 4 años que demandó este trabajo, y por todo lo que me fue brindando desde que lo conocí en 1972 para mi formación como investigador.
- \* a la Dra. Christiane Dosne de Pasqualini, jefe de la Sección Leucemia Experimental, por su permanente estímulo y apoyo, y por haberme transmitido trabajando a su lado su vasta experiencia en investigación.
- \* al Dr. Sol L. Rabasa, asesor Científico de la Sección Leucemia Experimental, por sus críticas constructivas en el análisis de los resultados obtenidos.
- \* al Dr. Rubén P. Laguens, por haberme ayudado en la interpretación histológica de los resultados.
- \* a mis compañeros, Dra. Elizabeth Colmerauer, Dr. Julio E. Correa y Lic. Isabel Piazzón de Berger, que me supieron estimular constantemente.
- \* a la Srta. Beatriz Basombrío, Sr. Alberto Bellouard, Sr. Juan Portaluppi, Sr. Antonio Morales, Sr. Jose Chicolonea, sin cuya infatigable dedicación y constancia no habría sido posible efectuar los experimentos prolongados que demandó este trabajo.
- \* Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas ( C.O.N.I.C.E.T. ) y FUNDALEU ( Fundación contra la Leucemia ), instituciones cuyo apoyo económico, a través de las becas con que me distinguieron, hizo posible este trabajo.

- \* Al arquitecto Jorge Muchico, por ayudarme en la confección del material ilustrativo de este trabajo.
- \* A mi esposa, Marta Beatriz, por su infatigable estímulo y ayuda en la preparación de todos los detalles de este manuscrito.
- \* ... a todos aquellos que de una u otra manera me guiaron en mi formación como investigador y cuyos consejos permitieron realizar esta tesis.

Para bien de toda la humanidad ....

# PLAN DE TESIS

## A) INTRODUCCION

### 1) ANTECEDENTES

- a) Etiología del cáncer ..... 1
- b) Los virus como factor etiológico del cáncer ..... 2

### 2) LA LEUCEMIA: Un tipo de cáncer

- a) La leucemia humana y murina: sus patologías ..... 6
- b) Desarrollo de las cepas endocriadas: su necesidad ..... 8
- c) Etiología de la leucemia murina ..... 13
- d) Probable etiología de la leucemia en el hombre ..... 15
- e) Factores que influyen en el desarrollo de la leucemia murina.. 19

### 3) LOS VIRUS DE LEUCEMIA MURINA

- a) Características principales ..... 21
- b) Ciclo de vida ..... 25
- c) Mecanismos de tumorigénesis y transmisión ..... 27
- d) Relaciones entre los virus leucémicos ..... 30

### 4) INMUNOLOGIA DE LAS LEUCEMIAS MURINAS

- a) Antígenos de trasplante y antígenos tumorales específicos .. 34
- b) Antígenos asociados a leucemias murinas ..... 37
- c) Respuestas inmunológicas a la leucemia murina ..... 40

### 5) INMUNOPREVENCIÓN DE LA LEUCEMIA MURINA

- a) El primer período ( circa 1900 - 1951 )..... 41
- b) La etapa actual ( 1951 - 1977 ) ..... 42
  - ( i ) Los primeros protocolos de vacunación ..... 44
  - ( ii ) Protocolos recientes de vacunación ..... 55

6) <u>EL VIRUS DE SARCOMA MURINO</u>	
a) Sus características principales .....	61
b) Patología de los tumores inducidos por VSM-M.....	62
c) La inmunología de los tumores inducidos por VSM-M ....	65
B) <u>PARTE EXPERIMENTAL</u>	
1) <u>INTRODUCCION</u>	
Propósito de nuestro trabajo .....	70
2) <u>MATERIALES Y METODOS</u>	
a) Ratones .....	72
b) Virus leucémicos .....	73
c) Leucemias trasplantables .....	75
d) Leucemia espontánea .....	77
e) Preparación y titulación del VSM-M .....	77
f) Preparación y titulación de virus de leucemia murina..	79
g) Preparación y titulación de leucemias trasplantables..	80
h) Determinación del protocolo de vacunación .....	81
i) El protocolo experimental de inmunoprevención .....	82
j) Evaluación .....	83
3) <u>RESULTADOS</u>	
(i) <u>Experimentos preliminares</u>	
a) Titulación del virus de sarcoma de Moloney ( VSM-M) ..	84
b) Titulación de los virus de leucemia murina .....	85
c) Titulación de las leucemias trasplantables .....	86
d) Experimentos para determinar el protocolo experimental	86
(ii) <u>Inmunoprevención de leucemias murinas primarias</u>	
a) Inmunoprevención de la leucemia primaria de Moloney ..	87
b) Inmunoprevención de la leucemia primaria de Rauscher..	88

c)	Inmunoprevención de la leucemia primaria de Friend ...	89
d)	Inmunoprevención de la leucemia primaria de Gross ....	90
e)	Inmunoprevención de la leucemia primaria de PLLV/T2 ..	91
f)	Inmunoprevención de la leucemia primaria de H 179A ...	92
(iii)	<u>Inmunoprevención de leucemias murinas trasplantables</u>	
a)	Inmunoprevención de la leucemia trasplantable H 110...	93
b)	Inmunoprevención de la leucemia trasplantable R 14 ...	94
c)	Inmunoprevención de la leucemia trasplantable P 277 ..	94
(iv)	<u>Inmunoprevención de leucemias espontáneas</u>	
a)	Efecto de la primoinoculación de VSM-M sobre la incidencia de la leucemia espontánea en la cepa BaLB/c.....	95
b)	Efecto de la primoinoculación de VSM-M sobre la incidencia de la leucemia espontánea en el híbrido Swiss x AkR.	97
4)	<u>DISCUSION Y CONCLUSIONES</u> .....	99
5)	<u>RESUMEN</u> .....	108

## TABLAS

<u>Tabla 1</u>	: Virus oncogénicos detectados en animales .....	4
<u>Tabla 2</u>	: Cepas murinas endocriadas más frecuentemente utilizadas en investigaciones oncológicas .....	12
<u>Tabla 3</u>	: Virus aislados de leucemia murina .....	16
<u>Tabla 4</u>	: Propiedades de las proteínas del virus de la leucemia murina de Friend .....	24
<u>Tabla 5</u>	: Inmunoprevención de la leucemia murina. Principales protocolos utilizados .....	43
<u>Tabla 6</u>	: Inmunoprevención de la leucemia murina. Desarrollo histórico .....	45
<u>Tabla 7</u>	: Titulación del VSM-M " in vivo " en ratones BaLB/c recién nacidos y adultos de 2 meses .....	111
<u>Tabla 8</u>	: Titulación del VSM-M " in vivo " en ratones BaLB/c. Método de gradación .....	113

<u>Tabla 9</u> :	Titulación del virus de leucemia murina PLLV/T2 en ratones BaLB/c de 3 meses de edad .....	113
<u>Tabla 10</u> :	Títulos de otros virus de leucemia murina .....	114
<u>Tabla 11</u> :	Titulación de la leucemia de trasplante P 277 .....	115
<u>Tabla 12</u> :	Titulación de las leucemias trasplantables .....	115
<u>Tabla 13</u> :	Respuesta tumoral de ratones BaLB/c inoculados con VSM-M por vías sc. e im. ....	116
<u>Tabla 14</u> :	Sobrevida de ratones BaLB/c inoculados con VSM-M por vía sc. e im. ....	116
<u>Tabla 15</u> :	Desafío de ratones BaLB/c inmunizados con VSM-M por vía sc. e im. ....	117
<u>Tabla 16</u> :	Observaciones sobre la sobrevida de ratones BaLB/c inmunizados con VSM-M y desafiados con VLM-R .....	117
<u>Tabla 17</u> :	Esplenomegalia palpable en ratones BaLB/c inmunizados con VSM-M y desafiados con VLM-R.....	118
<u>Tabla 18</u> :	Observaciones sobre la sobrevida de ratones BaLB/c inmunizados con VSM-M y desafiados con VLM-F.....	118
<u>Tabla 19</u> :	Peso y latencia de bazos en ratones Swiss inmunizados con VSM-M y desafiados con VLM-G.....	119
<u>Tabla 20</u> :	Observaciones sobre la sobrevida de ratones Swiss inmunizados con VSM-M y desafiados con VLM-G.....	119
<u>Tabla 21</u> :	Observaciones sobre la sobrevida de ratones BaLB/c inmunizados con VSM-M y desafiados con PLLV-T2.....	120
<u>Tabla 22</u> :	Observaciones sobre la sobrevida de ratones BaLB/c inmunizados con VSM-M y desafiados con VLM-H179A ..	120
<u>Tabla 23</u> :	Observaciones sobre la sobrevida de ratones BaLB/c inmunizados con VSM-M y desafiados con leucemia de pasaje H 110 .....	121
<u>Tabla 24</u> :	Observaciones sobre la sobrevida de ratones BaLB/c inmunizados con VSM-M y desafiados con leucemia de pasaje R 14 .....	121
<u>Tabla 25</u> :	Observación de sobrevida de ratones BaLB/c inmunizados con VSM-M y desafiados con leucemia de pasaje P 277 .....	122
<u>Tabla 26</u> :	Observación de la incidencia de leucemia espontánea en ratones BaLB/c inmunizados con VSM-M .....	122
<u>Tabla 27</u> :	Observación de la incidencia de leucemia espontánea en ratones Swiss x AKR inmunizados con VSM-M .....	123

## GRAFICOS

<u>Gráfico 1</u> : Protocolo para la inmunoprevención de leucemias murinas .....	124
<u>Gráfico 2</u> : Titulación del virus de sarcoma de Moloney en ratones BaLB/c de dos meses .....	125
<u>Gráfico 3</u> : Crecimiento del sarcoma de Moloney en ratones BaLB/c adultos inoculados por vías sc. e im. ....	126
<u>Gráfico 4</u> : Inmunoprevención de la leucemia primaria de Moloney .....	127
<u>Gráfico 5</u> : Inmunoprevención de la leucemia primaria de Rauscher .....	128
<u>Gráfico 6</u> : Inmunoprevención de la leucemia primaria de Friend .....	129
<u>Gráfico 7</u> : Inmunoprevención de la leucemia primaria de Gross .....	130
<u>Gráfico 8</u> : Inmunoprevención de la leucemia primaria de PLLV/T2 .....	131
<u>Gráfico 9</u> : Inmunoprevención de la leucemia primaria de H 179 A .....	132
<u>Gráfico 10</u> : Inmunoprevención de la leucemia de pasaje H 110 .	133
<u>Gráfico 11</u> : Inmunoprevención de la leucemia de pasaje R 14 ..	134
<u>Gráfico 12</u> : Inmunoprevención de la leucemia espontánea en ratones BaLB/c .....	135
<u>Gráfico 13</u> : Inmunoprevención de la leucemia espontánea en ratones Swiss x AkR .....	136
<u>Gráfico 14</u> : Inmunoprevención de la leucemia espontánea en ratones Swiss x AkR ( N°de leucemias ) .....	137

## C) BIBLIOGRAFIA

A- INTRODUCCION: Antecedentes, actualización bibliográfica

## 1. ANTECEDENTES

### a) Etiología del cáncer

El cáncer ha estado con el hombre desde tiempos lejanos. Ya desde la antigüedad se asoció la presencia de tumores con enfermedad y muerte. ¿ Pero qué es un tumor ? No podemos empezar este trabajo sin antes tratar de aclarar de la mejor forma posible, lo que entendemos por ello.

La hiperplasia, se define como cualquier aumento anormal del número de células de un tejido o parte del mismo, que resulta en el incremento de la masa del mismo. Existen dos tipos de hiperplasia: la denominada fisiológica y la neoplásica. La primera es debida a un estímulo externo y desaparece cuando el estímulo cesa. La segunda, hiperplasia neoplásica, o neoplasia, puede ser definida como aquella forma de hiperplasia debida, por lo menos en parte a una anomalía heredable en las células involucradas. No es inusual la presencia de ambos tipos de hiperplasia en un mismo tejido ( 287 ). Por otra parte, los tumores o neoplasmas se dividen en dos categorías mal definidas y que se sobreponen: benignos y malignos; los benignos están asociados en general a una buena prognosis, los malignos a una mala prognosis. Son estos últimos los que se denominan cáncer, y sobre ellos en general, y en particular sobre uno de ellos, la leucemia, es que versará este trabajo.

No entraremos en la clasificación de tumores, tema aún en discusión. A los efectos de un conocimiento general se debe aclarar, que los tumores son clasificados aún hoy en día de acuerdo a su aspecto, comportamiento y localización, muy similarmente como se ha hecho en los últimos 2000 a 3000 años. Con el desarrollo de la microscopía se los describió de acuerdo a su aspecto microscópico determinado principalmente por el tejido de origen de la neoplasia ( 261 ).

Una vez definido el cáncer como un verdadero conjunto de enfermedades con características definidas, la primera pregunta que surge es: ¿ cuál es el origen del cáncer ? No podemos abarcar la etiología de mejor manera

que diciendo que la neoplasia es en muchos casos la resultante de un fenómeno multifactorial ( 287, 289 ). Tres tipos de agentes se han individualizado como los principales responsables de esta alteración celular : la radiación, algunos compuestos químicos y los virus oncogénicos. No está aún bien definido como es el proceso íntimo de esta transformación. Luego de una alteración inicial pueden ser requeridos otros factores para que ocurra la progresión tumoral.

Estos factores externos, que pueden determinar si una célula transformada se volverá o no un tumor clínicamente detectable son de gran importancia. La manipulación de estos factores puede permitir que a pesar que aún se desconozca el proceso íntimo del desarreglo que lleva a la transformación de una célula, se pueda evitar que esa célula se transforme en un tumor. Este planteo es la base de nuestro trabajo experimental. Es por ello, que la inmunidad, uno de esos factores externos, posible de ser manejada por el investigador en contra del proceso neoplásico haya despertado en los últimos años tanto interés.

En este trabajo, nos hemos de referir a los virus como los inductores de diversos tipos de neoplasias, haciendo hincapié en aquellos virus oncogénicos responsables de leucemias y linfomas.

#### b) Los virus como factor etiológico del cáncer

Podemos dividir la historia de los descubrimientos de los virus oncogénicos en tres partes ( 102). La primera, anterior a 1898, se caracterizó por una oposición rotunda a la teoría de un origen infeccioso del cáncer. Todo trabajo sugiriendo un origen viral de los tumores era totalmente ignorado o relegado por la crítica. Grandes investigadores del siglo pasado como Virchow y Ehrlich estaban convencidos que no podía haber ningún agente transmisible involucrado en la etiología del cáncer. La segunda época, si bien de progreso lento, ya que se extiende desde 1898 hasta 1950, marca sin embargo la definitiva demostración de que algunos tumores si podían atribuirse a una etiología viral (tabla 1).

Es importante aclarar aquí, que para poder atribuir la etiología infecciosa de una enfermedad a un agente aislado, se deben cumplir los postulados de Koch o sus equivalente virológicos ( 289 ). Se prepara un filtrado del tumor y el supuesto virus se replica en cultivo de tejido. Luego se lo inocular en un animal de la misma especie donde se observó el tumor inicialmente. La posterior recuperación del virus de un tumor inducido experimentalmente de esta manera, resulta en el cumplimiento de los postulados de Koch. Como es fácil advertir, es éticamente imposible cumplir con estos requisitos para el cáncer humano. Es importante indicar que, para que haya una prueba clara de etiología viral, no debe haber ningún segundo virus presente en los cultivos celulares o en los tejidos tumorales.

El primer descubrimiento de importancia fue realizado en Montevideo ( República Oriental del Uruguay ) por Sanarelli ( 312 ), quien reconoció la naturaleza viral de la mixomatosis en el conejo en 1898. Años más tarde, dos científicos daneses, Ellerman y Bang ( 80 ) publicaron un trabajo donde hallaron leucemia en el pollo causada por un agente filtrable. En esa época, estos descubrimientos recibieron poca atención, debido a que la leucemia no se consideraba una enfermedad neoplásica. Tres años más tarde - 1911 - Rous, describió un sarcoma maligno en el pollo causado por otro " agente filtrable " ( 304 ). Esta publicación, que es un clásico en la literatura de virus oncogénicos, fue recibida con tanta incredulidad, que tuvieron que pasar 55 años hasta que el autor, por encima de los 90 años, recibiera el premio Nobel por sus trabajos pioneros.

Luego de un paréntesis de 20 años, comenzaron una serie de descubrimientos encabezados por el de Shope, quien publicó un hallazgo con el fibroma del conejo ( 328 ). Finalizó el primer período ( tabla 1 ) - 1898 a 1950 - con una decena de hallazgos en diferentes especies de vertebrados ( pollo, perro, ratón, conejo, vaca, sapo ). A ese progreso lento, si bien con contribuciones importantes, podemos en parte atribuirlo a la falta de comprensión de las propiedades generales de los virus, como así también a las técnicas de laboratorio no muy avanzadas de aquella época. Con la llegada del antibiótico y técnicas refinadas de cultivo de tejido, en el comienzo de la década del 50, se inició un resurgimiento de la investigación en la virología en general, y de la virología asociada a los tumores en particular ( 289 ).

En 1951, con el descubrimiento por Gross ( 135 ) del virus de la leucemia del ratón ocurrió lo que Charlotte Friend expresó como " ... luego de años de ( esfuerzo ) futil, pareció como si alguna enorme bacteria hubiera reventado, liberando muchísimos virus con potencial oncogénico para casi cualquier especie de animal ..." ( 102 ). Observando la tabla 1 se verá como el espectro de especies que abarcan los virus oncogénicos se ha ensanchado, como así también el número de los mismos por especie.

TABLA 1: Virus oncogénicos detectados en animales

<u>Período 1898 - 1950</u>			
<u>Virus ARN</u>		<u>Virus ADN</u>	
1898	Leucemia del pollo ( 80 )	1893	Mixomatosis del conejo ( 312 )
1911	Sarcoma del pollo ( 304 )	1907	Verruga humana ( 51 )
1933	Linfomatosis del pollo ( 104 )	1920	Papiloma bovino ( 241 )
1934	Linfosarcoma canino ( 68 )	1932	Fibroma del conejo ( 328 )
1936	Carcinoma mamario del ratón ( 31 )	1932	Papiloma oral canino ( 69 )
1946	Tumores linfoideos del pollo ( 47 )	1933	Papiloma del conejo ( 329 )
		1936	Papiloma oral del conejo ( 268 )
		1938	Carcinoma renal del sapo ( 238 )
<u>Período 1950 - 1977</u>			
<u>Virus ARN</u>		<u>Virus ADN</u>	
1951	Leucemia del ratón ( 135 )	1951	Papiloma cutáneo equino ( 61 )
1956	Leucemia del ratón ( 131 )	1953	Tumor de parótida murino ( 136 )
1956	Leucemia del ratón ( 100 )	1953	Fibroma de la ardilla ( 198 )
1959	Leucemia del ratón ( 229 )	1955	Fibroma del ciervo ( 330 )
1960	Leucemia del ratón ( 259a )	1956	Carcinoma renal del sapo ( 76 )
1962	Leucemia del ratón ( 293 )	1957	Polioma del ratón ( 348 )
1963	Leucemia del ratón ( 298 )	1962	SV 40 de primates ( 78 )

1964	Leucemia felina	( 86 )	1964	Linfoma humano de Burkitt	( 83 )
1964	Sarcoma del ratón	( 151 )	1967	Enfermedad de Marek del pollo	( 58 )
1966	Sarcoma del ratón	( 259c )	1969	Herpesvirus saimiri del mono ardilla	( 255 )
1966	Osteosarcoma del ratón	( 96 )	1972	Herpesvirus ateles del mono araña	( 256 )
1967	Sarcoma del ratón	( 203 )	1972	Leucoencefalopatía humana	( 267 )
1969	Tumor de ofidio	( 377 )			
1969	Fibrosarcoma felino	( 341 )			
1971	Fibrosarcoma del mono lanudo	( 361 )			
1972	Linfosarcoma del mono lanudo	( 196 )			
1974	Leucemia porcina	( 353 )			
1974	Leucemia humana	( 199 )			
1974	Leucemia humana	( 114 )			
1975	Virus tipo C humano	( 364b )			
1975	Virus tipo C humano	( 379 )			
1975	Tumor epitelial humano	( 12 )			

-----

## 2. LEUCEMIA : Un tipo de cáncer

### a) Leucemia humana y murina: sus patologías

La hemopoyesis normal es un proceso bien controlado que provee células sanguíneas maduras con vidas limitadas, originadas a partir de " stem cells " o células progenitoras. La capacidad proliferativa de las células precursoras de la sangre y su posterior maduración progresiva en células más especializadas son dos mecanismos bien diferentes que caracterizan a la diferenciación normal. Si estos mecanismos fallan y dejan de responder al control que ejerce el organismo, sea por reguladores humorales o celulares, puede desarrollarse la leucemia ( 339 ).

La leucemia ha sido definida como una " ... proliferación anormal, neoplásica, autoperpetuante ( rápida o lenta ) de uno de los tejidos leucocitarios, generalmente asociada con un número anormal de glóbulos blancos sanguíneos, eventualmente llevando a la anemia, la trombocitopenia y la muerte " ( 64 ). Esta definición, que es aceptada corrientemente, pone en claro que el concepto de leucemia es asociado generalmente con la existencia de clones de células patológicas caracterizadas por una capacidad autónoma e ilimitada de proliferación.

Los criterios clínicos han llevado a la distinción entre las leucemias agudas y las crónicas. En la leucemia aguda, las células normales hematopoyéticas son gradualmente reemplazadas por una población de precursores inmaduros, y diferentes formas de leucemias agudas se han descrito de acuerdo a su similitud morfológica con células hematopoyéticas blásticas normales : linfoide, mielóide, monocitoide y mielomonocitoide. Estos desórdenes agudos parecen estar caracterizados por una maduración defectiva de las células patológicas, y su evolución espontánea resulta rápidamente en la muerte.

Por lo contrario, las leucemias crónicas se caracterizan por una sobreproducción de células diferenciadas que no son muy diferente morfológicamente de las células normales, a pesar que se han descrito en ellas anormalidades funcionales y cromosómicas ( 339 ). Las leucemias crónicas tienen una evolución clínica más lenta que las leucemias agudas; algunas de ellas principalmente la leucemia granulocítica y a veces policitemia vera terminan con una crisis blástica seguida por una muerte rápida.

La clasificación actual de las leucemias es sumamente extensa y abarca diversas enfermedades neoplásicas de los tejidos hematopoyéticos y linfoides.

La leucemia murina o leucemia del ratón abarca una gran variedad de formas de esta enfermedad, que puede desarrollarse espontáneamente, especialmente en ciertas cepas endócriadas, o puede ser inducida por radiaciones ( 190, 191, 192 ), carcinógenos químicos ( 48, 109, 291 ) u hormonas ( 215, 116, 117 ). Ha despertado mucho más interés como análoga de la enfermedad que se produce en el hombre, que la correspondiente enfermedad de las aves, donde fue primeramente hallado un agente filtrable, responsable de la etiología de la enfermedad ( 80 ).

La presencia de un agente filtrable responsable de la enfermedad en las aves, fue considerado en ese momento como una particularidad de esta especie, ya que no se encontraron hasta mucho más tarde ( tabla 1 ) agentes responsables de neoplasias linfoides en otros animales. En el ratón, como en otros mamíferos, nada hacía pensar que la leucemia fuera de origen viral, ya que intentos realizados con las técnicas de aquella época, arrojaban resultados negativos ( 300, 106, 81 ).

Sin embargo el interés en la leucemia murina se mantuvo por varias razones. En primer lugar, la anatomía y la fisiología humana se hallan más estrechamente vinculadas con la del ratón que con la de las aves ( 107 ). En segundo lugar, el pollo no presenta hipertrofia del tejido linfoideo periférico en grados avanzados de leucemia linfocítica, mientras que dicha hipertrofia es característica de la leucemia linfática humana y murina. En tercer lugar, el timo, de fundamental importancia en el desarrollo de la leucemia linfocítica se halla en el mediastino tanto en el hombre como en el ratón. Ambos, hombre y ratón, desarrollan tumores tímicos en algunos tipos de leucemia. En el pollo es alargado y estrecho y se localiza a lo largo de las venas profundas del cuello y no parece tener un papel importante en la leucemia aviaria. Por último, los elementos formes de la sangre normal del pollo difieren con los del hombre y ratón, ya que los eritrocitos del pollo no tienen núcleo. Esto podría tener alguna relación con algunas formas de leucemia, como la eritroleucemia del pollo, rara en el hombre y el ratón ( 142 ).

En 1935, Furth y colaboradores publicaron fotomicrografías en donde compararon lado a lado la morfología de los tejidos leucémicos, como así también extendidos de sangre periférica del humano y el ratón. La conclusión fue, que la leucemia del hombre es esencialmente la misma enfermedad que la leucemia del ratón. Esto se refería tanto a las formas agudas, como crónicas de la enfermedad ( 107 ).

El término leucemia murina, muy empleado, no es preciso y solo puede ser empleado en su sentido amplio ( 75 ). Como en el caso de la leucemia humana, significa una alteración de la sangre caracterizada por producir un aumento del número de glóbulos blancos circulantes. Sin embargo en la mayoría de los casos, la sangre no está significativamente afectada, excepto por la presencia ocasional de células blancas anormales, generalmente de las serie linfocítica y por una anemia progresiva. Según Gross, el término correcto que define la leucemia del ratón debería ser el de linfosarcomatosis diseminada ( 141 ).

La característica sobresaliente de esta enfermedad en los ratones es un gran linfoma tímico o mesentérico con agrandamiento concomitante del bazo debido a la infiltración linfoide tumoral que afecta frecuentemente al hígado. En la enfermedad desarrollada los ganglios mesentéricos, cervicales, axilares e inguinales son reemplazados por tumores linfoideos múltiples. En algunos casos, sin embargo, la enfermedad también compromete a la sangre, presentando esta un número aumentado de glóbulos blancos y células anormales de la serie linfocítica, mieloide o sus precursores. Las diversas formas de leucemia murina son similares a las halladas en el hombre, siendo la linfocítica la más frecuente, leucemia indiferenciadas y leucemia mieloide en segundo término, y menos frecuentemente la leucemia monocítica, cloroleucemia y la eritroleucemia.

#### b) El desarrollo de las cepas murinas endocriadas: su necesidad

El Mus musculus Linn. ( el ratón de casa común ), ha sido un miembro del ambiente que rodea al hombre desde hace muchos siglos. Su conversión de peste a un elemento productivo de la comunidad científica ocurrió lentamente. Durante el siglo XIX, los zoólogos europeos criaban ratones para investigar

caracteres principalmente relacionados con el color del pelo. La valiosa información recopilada no fue correctamente interpretada hasta que se redescubrieron las leyes de Mendel hacia principios de siglo ( 28 ).

Recién a fines de la primera guerra mundial, un grupo de genetistas norteamericanos, comprendió la necesidad de desarrollar cepas de ratones uniformemente susceptibles a ciertos estudios biológicos. Los trabajos realizados hasta entonces con trasplantes de tumores espontáneos, o tumores inducidos por la acción de ciertos carcinógenos químicos, resultaron infructuosos por la carencia de animales genéticamente uniformes. Un grupo de animales obtenidos de igual fuente, tratados en condiciones experimentales aparentemente idénticas, mostraban grandes diferencias en las respuestas individuales aún cuando los animales eran del mismo sexo y edad ( 142 ).

Es sabido ahora que, animales genéticamente diferentes, tratados en las mismas condiciones y con dosis iguales de carcinógenos químicos pueden desarrollar tumores, mientras que otros muestran una resistencia parcial o completa ( 335 ). También los tumores trasplantados, pueden desarrollarse progresivamente en algunos animales, crecer temporariamente en otros, y eventualmente regresar o no crecer.

Cuando se realizaron estudios con animales homocigotas, es decir, endocriados, ya fuera con carcinógenos químicos o con tumores espontáneos trasplantables, los resultados fueron mucho más uniformes : los carcinógenos inducían o no tumores; los trasplantes tumorales se desarrollaban, o el animal quedaba con buena salud. Esto ilustra acerca de la importancia de usar grupos de ratones de constitución genética similar en la investigación oncológica experimental, como también en otros estudios que requieran animales, a fin de asegurar una susceptibilidad uniforme, bajo idénticas condiciones experimentales ( 142 ).

El desarrollo de cepas de ratones endocriadas, en las cuales el grado de variables biológicas puede ser cuidadosamente controlado, fue iniciado por C.C. Little y otros genetistas ( 11, 354, 355, 74 ).

Con ese fin se iniciaron progenies endogámicas a partir de varios lotes de ratones. A cada uno le fue dado un número de identificación a edad temprana, y de esa forma, el ciclo vital de cada animal pudo ser controlado en forma permanente. Como regla, en las generaciones sucesivas, el apareamiento se realizaba por cruce de hermano con hermana. Después de 15 a 20 generaciones, con el uso constante de este tipo de apareamiento, se pudo obtener un alto grado de uniformidad genética en todos los animales de una línea particular. Estos animales reaccionaban como gemelos idénticos, ya que mostraban igual susceptibilidad o igual resistencia a la implantación de ciertos tumores. Así, los resultados arrojados con cada modelo experimental utilizado, eliminaban las variables genéticas, ya estables e idénticas, y se limitaban a las variables introducidas por las condiciones del experimento ( 142 ).

Aproximadamente por esta época, Maud Slye comunicó en una serie de publicaciones, que entre los ratones criados en su laboratorio, aparecían tumores con mayor frecuencia en las generaciones sucesivas de ciertas familias de ratones que en otras. Actualmente es sabido que pueden segregarse familias de ratones que presentan una alta incidencia de tumores o leucemias dentro de una población murina dada. Algunos genetistas demostraron que usando técnicas de endocría selectiva, era posible controlar el grado de incidencia espontánea de tumores o leucemias desarrollados en ciertas familias murinas ( 337, 338 ).

Los primeros trabajos en ratones empleando el método de la endocría selectiva pertenecen al Dr. Furth y datan de 1930 ( 103, 105, 110 ). Hasta entonces el ratón no había sido realmente adoptado como animal de laboratorio en el campo de la leucemia experimental. La similitud clínica y morfológica entre la leucemia murina y humana, lo decidió a desarrollar su propia cepa leucémica endocriada ( 107 ). El punto de partida de la endocría selectiva fue un plantel de ratones albino, designado arbitrariamente por el símbolo A. Se trataba de una partida de ratones no relacionado con ninguna de las cepas existentes en ese momento. Estos animales fueron endocriados en los laboratorios del Dr. Furth, seleccionando estrechamente los ratones leucémicos y eliminando de la descendencia los que permanecían libres de la enfermedad. Las familias endocriadas

fueron designadas con una letra minúscula agregada al símbolo A; Aa; Ab; Ac; etc. Se continuó la endocría de numerosas familias y la incidencia de leucemia espontánea fue aumentando en cada grupo. Después de 25 generaciones la familia endocriada Ak, mostró tener una alta incidencia de leucemia, llegando al 70% en los animales de más de 1 año de edad. Esta valiosa cepa, Ak, fue ofrecida por el Dr. Fürth a todo investigador interesado en la leucemia murina. La cepa Ak ha sido mantenida en varios laboratorios. El plantel mantenido en el Instituto Rockefeller en U.S.A. se llamó AkR. La incidencia de leucemia espontánea de este plantel varía entre el 85% y el 90%, siendo generalmente mayor la incidencia en las hembras que en los machos ( 142 ). Esta cepa, cuya endocría se continúa en la Sección Leucemia Experimental, del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina, es una de las cepas utilizadas en nuestro trabajo experimental.

Resumiendo, por lo tanto, una de las mayores contribuciones logradas por medio de la endocría de cepas murinas, fue el desarrollo de familias de ratones tanto con baja como con alta incidencia de tumores espontáneos, como carcinoma mamario o leucemia. El desarrollo de cepas murinas, selectivamente puras, fue un proceso tedioso que requirió muchos años de paciente endocría, sin embargo gracias a ello, fue posible arribar a ciertos hechos valiosos como el descubrimiento del virus del carcinoma mamario del ratón transmitido a través de la leche ( 31, 32, 33 ) o que el virus de la leucemia murina espontánea se transmite directamente de una generación a otra ( 321, 276 ) a través del embrión. Estas observaciones no se hubieran podido verificar de otro modo. Por otro lado, la existencia de cepas de ratones endocriados demostró ser útil, no solo en el campo de la investigación oncológica, sino también en diversos estudios biológicos que requieren el uso de animales genéticamente uniformes.

La tabla 2 resume las principales cepas murinas endocriadas y recalca sus caracteres determinantes ( 161, 342 ).

TABLA 2 : Cepas murinas endocriadas más frecuentemente utilizadas en investigaciones oncológicas.

Cepa	Color	Incidencia tumor <sup>1</sup> mamario %	Incidencia <sup>1</sup> leucemia %	Desarrollada por
A	albino	90	1	Strong
Ak	albino	1	85	Furth
BaLB	albino	2	15	Bagg
CBA	aguti	3	1	Strong
C3H	aguti	90	1	Strong
C57 Br	marrón	4	5	Little
C57 B1	negro	1	5	Little
C58	negro	1	85	MacDowell
DBA/2	marrón claro	60	30	Little
R III	albino	75	5	D. Zavadskaia
Swiss	albino	15-20	5-11	Lynch

Nota: 1) Estos porcentajes son aproximados. Los datos pueden variar según los diferentes laboratorios y particularmente en ciertas subcepas en un 25% o más. Por ejemplo, en algunos laboratorios la cepa BaLB/c muestra una baja incidencia de leucemia espontánea, menor del 5%, mientras que en otros laboratorios se han informado incidencias de un 35%. La incidencia de otros tumores espontáneos no se indica en esta tabla ( 142 ).-

### c) Etiología de la leucemia murina

El hecho que la leucemia humana tuviera tantos elementos en común con la leucemia murina, conjuntamente con las evidencias de una etiología viral de la leucemia, de las aves (tabla 1) hallada tempranamente en los estudios de cáncer en animales ( 80 ), hizo pensar que sería de sumo interés saber si en los ratones, ésta podía tener igual etiología. Ello tendría notables implicancias para la etiología de la leucemia en el hombre. Por ello, el estudio de la leucemia en el ratón, atrajo el estudio e interés de muchos investigadores. Como también sucedía en el campo del estudio del rechazo de injertos y tumores se carecía en aquellos momentos de suficiente cantidad de ratones leucémicos para la investigación. El desarrollo de las cepas endocriadas permitió el despegue de esta línea de investigación y hoy se cuenta con cepas cuya incidencia de leucemia espontánea varía del 0 al 100%.

La búsqueda de un agente etiológico para la leucemia murina fue largo e infructuoso en un principio ( 300, 106, 81, 82). Los intentos de transmitir la enfermedad con filtrados fracasaron antes de 1951. La trasmisión de la leucemia sólo parecía posible cuando células vivas y no dañadas eran trasplantadas ( 301 ). Algunos experimentos que en un primer momento parecieron indicar una trasmisión de la enfermedad por un extracto acelular, resultaron luego estar contaminados por células, por el uso de técnicas no apropiadas para la preparación del material (82 ). Es interesante comentar, en relación a estos trabajos precursores que se ha demostrado que una célula leucémica inoculada por vía intravenosa es capaz de provocar la enfermedad ( 108).

Quedaba claro que solo la trasmisión de la leucemia del ratón con un filtrado acelular, en condiciones experimentales estrictamente controladas, podría demostrar de manera convincente la trasmisión de un agente acelular.

Finalmente Gross en 1951, demostró la trasmisión de leucemia a ratones por inoculación de filtrados acelulares preparados con tejidos leucémicos murinos ( 135). Este descubrimiento marcó el comienzo de una serie de hallazgos de otros virus también responsables etiológicos de la enfermedad.

Es interesante destacar que en un principio este descubrimiento fue recibido con bastante escepticismo ( 111, 112 ) y en más de una oportunidad con considerable reserva ( 193, 200, 20 ). También se informaron resultados negativos al quererse confirmar la observación realizada por Gross ( 221, 346, 170). Sin embargo gradualmente, con la superación de las dificultades de índole técnica, la transmisión de la leucemia murina con filtrados acelulares se transformó en un procedimiento rutinario de laboratorio ( 376, 112, 73, 153, 347 ).

De gran importancia fue el desarrollo efectuado por Gross ( 137 ) de un filtrado de virus leucémico activo y estable, el pasaje A , ya que la potencia leucemógena de los extractos libres de células preparados de leucemias murinas espontáneas eran muy variables. Este filtrado - pasaje A - inoculado en ratones menores de 7 días de edad de la cepa C3H, induce leucemia linfocítica en 21/2 a 3 1/2 meses en el 95% de los animales ( 138 ).

En los experimentos iniciales, cuando se utilizaron filtrados de baja potencia preparados de leucemia espontánea del ratón, se observó que el virus provocaba leucemia en solo algunas cepas de ratones. Al utilizarse posteriormente el pasaje A, se vio que el virus tenía 100% de positividad y latencia breve en todas las cepas ensayadas ( 140 ). También, el virus del pasaje A, podía superar la barrera de la especie y originar igual enfermedad en ratas endocriadas ( 139 ). Experimentos similares para estudiar la oncogenicidad del pasaje A en hamsters y pollos, fueron sin embargo negativos ( 142 ).

El éxito de la transmisión acelular de la leucemia espontánea del ratón, basada en el uso de ratones recién nacidos para bioensayo de filtrados preparados de tejidos leucémicos, permitió aislar rutinariamente virus con potencial leucemógeno de distintos tejidos murinos.

Numerosas publicaciones individuales de diferentes laboratorios comunicaron el aislamiento de distintos virus responsables de variadas formas de leucemia ( tabla 3 ) . No hay nombres específicos para dichos agentes. En general se los designa con el nombre de los autores que primero los aislaron.

Como indicáramos en el capítulo 2a, era conocido que la leucemia podía producirse espontáneamente, además de ser posible su inducción por radiaciones, carcinógenos químicos y las hormonas. En todos los casos fue posible mediante reiterados esfuerzos aislar un agente filtrable, responsable etiológico de la enfermedad.

Así en la leucemia inducida por radiación en ratones C 57, Kaplan aisló un virus ( 229 ). En el caso de las leucemias inducidas por carcinógenos químicos, varias publicaciones informaron acerca del hallazgo de virus ( 185, 366, 378, 295, 146 ). Así mismo en las leucemias inducidas por hormonas, se han hallado agentes leucemógenos filtrables ( 214 ).

d) Probable etiología de la leucemia en el hombre

No es el objetivo de este trabajo tratar la leucemia en el hombre. Sin embargo, el objetivo final de los estudios de la leucemia murina, es la prevención de esta enfermedad en el hombre. Por ello se consideró necesario hacer una breve revisión del estado actual de los estudios de la etiología de la leucemia humana.

Las dificultades que se encontraron al tratar de aislar virus leucémicos en el ratón y otros animales, han sido mayores en el caso del hombre. Los postulados de Koch, son éticamente imposibles de cumplir, ya que de hallarse un supuesto virus leucémico éste no podría ser inoculado en un ser humano , para demostrar efectivamente el rol del mismo como inductor de la enfermedad.

El avance de la metodología experimental y las técnicas de laboratorio han desdoblado los estudios de la etiología de la leucemia humana en varias áreas: a) epidemiología, b) transmisión experimental en animales, c) cultivo de tejido, d) microscopía electrónica, biología molecular y f) inmunología. Cada metodología empleada ha tenido sus problemas y sus limitaciones.

La epidemiología ha señalado que en algunos casos la leucemia en los hermanos puede aparecer más frecuentemente en ciertas familias que en la población total. Existen varios trabajos donde se han señalado incidencias de leucemia en familias durante varias generaciones superior al promedio de la población.

TABLA 3 : Virus aislados de leucemia murina

Año	Autor del descubrimiento	Referencia
1951	Gross	135
1955	Graffi	131
1956	Friend	100
1957	Schoolman	323
1959	Lieberman & Kaplan	229
1959	Moloney	259 a
1959	Franks	98
1961	Bather	18
1961	Pasqualini-Holmberg	269, 270
1962	Rauscher	293
1962	Pope	284
1962	Mazurenko	251
1962	Tennant	360 a
1963	Rich	298
1963	Rask - Nielsen	292
1963	Upton	188
1963	Rudali	308
1963	Manaker	243
1963	Precerutti- Law	285
1964	Buffet	43
1967	Kirsten	203

ción ( 371, 344, 362, 145, 49, 134, 179, 67, 4, 374, 363, 235 ). Sin embargo hasta el presente ha sido difícil evaluar la posibilidad de transmisión de la leucemia en los humanos. Parece muy improbable que la leucemia sea transmitida de un huésped a otro " horizontalmente " en la misma generación por contacto o de alguna otra manera similar a las otras enfermedades infecciosas.

Intentos de transmitir experimentalmente el cáncer del hombre a los animales por inoculación de extractos de tumores - incluyendo a las leucemias - han sido informados por numerosos investigadores ( 260, 123, 72, 194, 322 ). Subyacente a este planteo experimental ha estado la hipótesis que un mismo agente responsable de la enfermedad en el hombre, podría inducirla en otros animales. Han habido resultados alentadores, pero los mismos en general no han producido hasta el presente evidencias reproducibles y concluyentes. En los casos donde se ha observado la aparición de leucemias, por ejemplo en el ratón, es difícil poder demostrar si se está en presencia de un virus del ratón activado por los extractos inoculados ( 162 ) o de un virus humano propiamente dicho. Ultimamente el descubrimiento de los virus xenotrópicos ( 364 a ) que pueden cruzar la barrera de la especie, ha vuelto a dar ímpetu a estudios de esta índole.

La utilización del cultivo de tejido permitió un progreso notable a la virología. Como lo exige el postulado de Koch, es necesario replicar al supuesto agente etiológico de una enfermedad en células mantenidas en cultivo ( 331 ). Esto se intentó repetidamente con extractos de leucemias humanas siendo esencialmente negativos los resultados obtenidos durante la década del 60. Algunos resultados positivos no pudieron ser confirmados ( 142 ).

La microscopía electrónica permitió observar partículas virales en los tumores de muchas especies animales. Era de esperarse que como se habían observado partículas virales en leucemias murinas ( 71, 23, 24 ), se hallarían partículas semejantes en leucemias humanas. Se han realizado numerosos intentos con secciones ultradelgadas de nódulos linfáticos, pellets de sangre periférica y fragmentos de médula ósea de pacientes con leucemia y linfosarcomas, observándose resultados positivos y otros esencialmente negativos ( 142 ). Pero en general, los trabajos publicados no han sido totalmente convincentes.

La validez de las observaciones iniciales informando de la presencia de partículas virales en leucemias humanas ha sido aún más dudosa debido al hallazgo de partículas similares en sangre y tejidos normales. También la presencia de micoplasma, componentes celulares normales o en estado de desintegración pueden en algunos casos semejar partículas virales ( 142 ).

Han sido realmente la bioquímica, la inmunología y la biología molecular con técnicas diseñadas para el estudio de los ácidos nucleicos y sus productos, como también los progresos en el conocimiento de las propiedades biofísicas y estructurales de los virus leucémicos, los que han permitido un sostenido avance en la búsqueda de la etiología de la leucemia humana ( 288 ). En general, son cuatro los tipos de moléculas o estructuras relacionadas con virus leucémicos que se han hallado en células leucémicas humanas.

El descubrimiento de la enzima transcriptasa inversa en los oncornavirus ( 356 a ) ha motivado a muchos investigadores a buscar evidencias de su presencia en tumores humanos. Los resultados hasta el presente momento han demostrado la presencia de una enzima con propiedades de transcriptasa inversa, relacionada antigénicamente con la de otro primate: el mono lanudo ( 36, 115 ), pero bien diferente de la hallada en oncornavirus de felinos o aves.

Otro enfoque experimental posibilitado por el hallazgo de la enzima transcriptas ha sido el uso de la técnica de hibridización molecular. Por medio de la misma ha sido posible comparar la composición del ácido nucleico de las células leucémicas humanas con el ácido nucleico de varios oncornavirus animales. Se han hallado ARN relacionados con el ARN de los virus leucémicos ( 36, 115 ). Aparentemente algunas secuencias de ácido nucleico en células leucémicas humanas estarían relacionadas con los genomas del virus del sarcoma del mono lanudo y con el virus del sarcoma murino ( 36 ).

Por último, se ha estudiado la presencia de una proteína de peso molecular 30.000, denominada p30, constituyente estructural de los oncornavirus, en el citoplasma de células leucémicas humanas ( 36 ), mediante el uso de la técnica ultrasensible del radioinmunoensayo.

Podríamos concluir esta sección indicando que si bien parece claro que la mayoría de los cánceres humanos no son causados por un virus por la vía clásica, es enteramente posible que alguna información viral está involucrada en mucho o en todos los tumores de una manera compleja y poco comprendida en la actualidad.

#### e) Factores que influyen en el desarrollo de la leucemia

Es interesante observar, como en el curso de 60 años y luego de innumerables descubrimientos, se ha vuelto a un viejo concepto que sostenía que el cáncer y las enfermedades relacionadas eran causadas por factores internos y mayormente hereditarios ( 144 ). En aquellas épocas, como ya lo hemos señalado, sólo unos pocos tumores se habían logrado transmitir con virus. La teoría viral del cáncer y la leucemia no tenían mayor apoyo. Pero con el correr de los años, el avance de los métodos y tecnologías permitieron demostrar que en muchos animales la leucemia tenía etiología viral. A pesar de ello era difícil hallar partículas virales en algunas especies, como en los linfosarcomas de ratas o perros. Estos hallazgos indujeron a los investigadores a pensar, que había razones biológicas aún desconocidas responsables de estos hechos.

En primer lugar ha sido evidente que la constitución genética del individuo es fundamental para determinar la susceptibilidad a la enfermedad. La naturaleza de los factores hereditarios relacionados con la leucemia es aún hoy compleja, pero el reciente avance en el conocimiento de los oncornavirus, sugiere claramente que la sensibilidad o la resistencia a las leucemias puede interpretarse en términos de sensibilidad a la acción de estos virus ( 227 ). El riesgo de un individuo de volverse leucémico estará determinado por la interacción entre el genotipo y los factores ambientales sobre la acción de los oncornavirus leucémicos.

El control por un gen ha sido descrito y estudiado para varias infecciones virales murinas clásicas incluyendo a la fiebre amarilla, el arbovirus B, la ectromelia, la hepatitis viral, la influenza A y otras. El control por un número pequeño de genes se ha observado con el virus del poliovirus del ratón ( 231 ). Sin embargo la infección con virus oncogénicos es compleja, y la malignidad no es el

resultado inevitable de la infección con un virus tumoral. Esto se ha visto muy bien en la compleja interacción entre el virus, las hormonas y la constitución genética del huésped en la expresión del cáncer mamario en los ratones. Los estudios genéticos relacionados con la leucemogénesis son hoy muy profundos y detallados. Ciertos estadios de la interacción entre los virus leucémicos y las células están siendo objeto de mucho estudio, y ciertos estadios de este proceso parecen estar controlados por un gen particular. Los genes identificados en las células murinas pueden actuar en tres niveles sobre los oncornavirus leucémicos: a) sobre la expresión del virus, b) sobre su replicación, y sobre c) la respuesta inmunológica antitumoral.

Los genes denominados H-2, T1a y  $G_{IX}$  que están involucrados en la determinación de antígenos de la superficie celular influyen decisivamente en la expresión del virus endógeno leucémico y particularmente el desarrollo de las leucemias ( 37 ). Existen dos genes principales, Fv-1 y Fv-2 que determinan si las células permitirán o no la multiplicación viral ( 231 ). El locus  $G_{IX}$  es de particular interés en el ratón, ya que lleva los genes activadores para el genoma viral, que se halla integrado en el ADN celular. Los genes AKv-1 y AKv-2 necesarios para la completa producción de la partícula viral, son el material genético viral, el genoma, integrado como un gen estructural dentro del ADN de la célula huésped ( 306 ). Se han realizado estudios sobre la herencia del genoma viral, utilizando cruces entre cepas de alta producción viral con cepas murinas de baja producción viral ( 102 ). Se ha concluido que la capacidad de producir virus segrega de acuerdo con la predicción Mendeliana y que el número de loci de virus infectivo varía en las cepas de ratones de acuerdo a que sean altos o bajos productores de virus.

Por último, si bien los virus son los factores principales en la etiología de la leucemia murina, los tumores que aparecen son el resultado de la interacción de estos agentes a nivel celular, con un determinado genotipo del huésped, más una serie de factores endógenos ( como hormonas, inmunidad ) y otros exógenos ( agentes químicos, radiaciones, etc. ) que interactuando todos entre sí determinarán el resultado final del proceso neoplásico. Como se comprende el estudio de esta enfermedad, implica un análisis de carácter multifactorial ( 288 ).

### 3. LOS VIRUS DE LEUCEMIA MURINA

#### a) Características principales

Para la mejor comprensión de las características de los virus leucémicos haremos una breve referencia acerca del estado actual de los conocimientos de sus propiedades generales.

Los virus responsables de la etiología de la leucemia murina, están comprendidos dentro de los virus, cuyo material genético está constituido por ARN ( 65 ). Suelen ser llamados oncornavirus o leucovirus según los diferentes autores.

La morfología de los virus leucémicos se comenzó a estudiar al microscopio electrónico al desarrollarse la técnica de los cortes ultrafinos ( 70, 22 ). Estos estudios llevaron a la división del grupo en dos subgrupos en base a la arquitectura fina de la partícula viral y el modo de brotación de la membrana celular. Así se distinguen la partícula C, asociada a las leucemias y sarcomas, y la partícula B hallada principalmente en carcinomas mamarios. El tercer tipo de entidad morfológica está representado por la partícula A, intracitoplasmática o intracisternal.

Las propiedades biofísicas y bioquímicas de estos virus son sumamente complejas ( 29, 35, 232, 228, 10, 313 ). La estructura observada al microscopio electrónico ha revelado que los oncornavirus están formados por tres esfera concéntricas: una externa y lipoproteica que constituye la envoltura, una zona electrondensa, a veces conocida como capa intermedia, o membrana intermedia y un nucleoide central que contiene el ARN.

La composición química exacta de los oncornavirus, no puede ser descripta con precisión, ya que los viriones desprovistos de constituyentes celulares han sido pocas veces aislados ( 10 ). En general, los viriones están compuestos de un 30% de lípidos, 62% de proteína, 6% de hexosa y un 2% o menos de ácido ribonucleico.

El genoma de los oncornavirus consiste en un ARN de peso molecular alrededor de  $8 - 13 \times 10^6$  Daltons, coeficiente de sedimentación de 60 - 70 S, de una sola cadena, conteniendo un trozo de poli A muy extenso ( 10 ). La desnaturalización con calor o dimetilsulfóxido para romper puentes de hidrógeno, hace caer el peso molecular a  $3 \times 10^6$  Daltons, sugiriendo que el genoma se halla fragmentado en 2 a 4 subunidades ( 288 ). Si el genoma de los oncornavirus es haploide ( cada unidad siendo única ) o poliploide ( ensamblaje de unidades idénticas ) es aún un problema no resuelto ( 288 ).

Los componentes estructurales de la partícula viral son muy importantes ya que ellos están estrechamente relacionados con su inmunogenicidad.

Los lípidos forman aproximadamente el 30% del virión, y se encuentran exclusivamente en la envoltura viral. La composición lipídica de los viriones es generalmente cualitativa y cuantitativamente similar a la composición lipídica de la membrana celular de la célula huésped ( 10 ).

Las proteínas de los oncornavirus, pertenecen a un terreno de la bioquímica actualmente en gran evolución, y cambio constante. Debido a las diferentes nomenclaturas existentes para los mismos constituyentes virales de los oncornavirus los científicos que han trabajado en el tema se han reunido en 1973, decidiendo estandarizar todos los conocimientos referidos a proteínas virales y componentes de estos viriones ( 7 ). Así las proteínas se designaron con la letra p, y las glicoproteínas con la letra gp, seguidas en cada caso por un número que indicaba el peso molecular multiplicado por  $10^3$  .

En base a esta estandarización, en los oncornavirus murinos, se describen actualmente 4 proteínas : p10, p12, p15 y p30. También existen 3 glicoproteínas : gp45, gp69/71, y la recientemente descubierta gp15 o p15 (E) (178) .

Es importante considerar para nuestro trabajo, las propiedades antigénicas y biológicas de las proteínas estructurales ( 318 ). En general, se han estudiado las propiedades antigénicas por métodos serológicos " in vitro " .

Principalmente las especificidades serológicas se pueden dividir en tres categorías: 1) una especificidad de tipo que solo se encuentra en virus de un único serotipo, 2) una especificidad de grupo que se encuentra compartida por varios serotipos virales dentro de una misma especie y 3) una especificidad interespecífica que es compartida por oncornavirus originados en diferentes especies ( ratón, gato, mono ).

Se ha visto que las proteínas de menor peso molecular están relacionadas con propiedades serológicas únicas. La proteína p10 posee actividad específica de grupo y se halla asociada con la ribonucleoproteína en el nucleóide viral. La proteína p12 posee actividad específica de tipo y una leve actividad de grupo ( 368 ). La proteína p15 (E) presenta actividad interespecífica. Los determinantes antigénicos sobre esta molécula actuarían operativamente como específicos de grupo en el sistema murino ( 318 ).

La proteína p30 forma un 30% del total del virión. Es una proteína altamente inmunogénica en huéspedes no murinos, pero los ratones no responden bien a la misma. Posee múltiples determinantes antigénicos detectables " in vitro " incluyendo principalmente especificidad de grupo, alguna actividad interespecífica y poca especificidad de tipo ( 351 ). Anteriormente eran conocidos estos antígenos por las letras gs1 o gs3 ( respectivamente los determinantes de tipo e interespecífico ). La actividad gs1 ( de tipo ) y por lo tanto la presencia de p30, se halla muy distribuida en los tejidos reticulares del ratón ( 122 ), habiéndose observado una correlación entre la presencia de este determinante y la de virus leucémicos infecciosos.

La glicoproteína gp 69/71, ha sido desdoblada por análisis bioquímico en dos moléculas de 69.000 y 71.000 daltons respectivamente. Constituyen el 5-10% del total de la proteína viral encontrándose ubicadas en la envoltura del virión ( 122 ). Esta molécula posee también múltiples determinantes antigénicos. En contraste con p30, el principal determinante es específico de tipo, existiendo cantidades menores de los determinantes de grupo e interespecífico.

TABLA 4: Propiedades de las proteínas del virus de la leucemia murina de Friend

Proteína	Hemaglutinación	Interferencia	Anticuerpo neutralizante	Antigenicidad		
				Tipo	Grupo	Interespecífico
p10	-	-	-	-	+	-
p12	-	-	-	+	-+	-
p 15 (E)	-	-	-+	-	-	+
p30	-	-	-	-+	+	+
gp71	+	+	+	+	+	+

Por último, nos referiremos a la transcriptasa inversa. Esta proteína constituyente de todos los oncornavirus tiene un peso molecular de 70.000 daltons y se halla presente en muy pequeñas cantidades en el virión. Se ha demostrado serológicamente que posee determinantes de grupo e interespecíficos ( 122 ). Es interesante mencionar el hecho que el determinante interespecífico de la transcriptasa inversa está relacionado con el de oncornavirus de otros mamíferos (gato, rata, hamster ), pero no está relacionado con el de los otros primates o aves.

Una de las propiedades importantes de la proteína gp 71 de los oncornavirus, es su capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes ( 168 ). Estos anticuerpos pueden neutralizar el virus en ausencia de complemento. El suero anti gp71 inactivado por calor tiene alto título neutralizante contra virus de leucemia murina homólogos ( virus de leucemia murina de Friend y virus de leucemia murina de Rauscher ) y además tiene un menor título neutralizante contra el virus de leucemia murina de Gross, un virus heterólogo ( 318 ). Por otra parte en presencia de complemento se ha detectado actividad debida probablemente a determinantes interespecíficos en los sueros anti gp71 y anti p15 (E).

Se han resumido las propiedades principales de las proteínas de los virus leucémicos tomando como ejemplo el virus de la leucemia de Friend ( VLM-F ) en la tabla 4 ( 318 ).

#### b) Ciclo de vida

El ciclo de vida de los oncornavirus se ha estudiado con los llamados virus leucémicos que si bien no transforman fibroblastos " in vitro ", pueden replicarse e inducir leucemias al ser inoculados " in vivo " ( 288 ). Los virus sarcomagénicos en cambio, siguen el mismo esquema de replicación que los virus leucémicos, pero por ser defectivos, necesitan la presencia de los virus leucémicos que actúan como " helper " brindándoles su envoltura formándose entonces mezclas fenotípicas o seudotipos.

Dos características diferencian a los virus leucémicos de otros virus ARN conocidos. Primeramente la interacción no citocídica entre el virus y las células del huésped, y en segundo lugar, el establecimiento de una relación estable entre el virus y las células resultando eventualmente en la transformación maligna. No entraremos por la naturaleza de nuestro trabajo en la biología molecular de la replicación de los oncornavirus, existiendo excelentes revisiones ( 10, 29 ). Si nos detendremos en los pasos principales de este proceso.

Se ha visto que la infección por oncornavirus requiere la interacción entre un componente específico de la envoltura viral y un receptor específico de la célula ( 10 ). No se ha podido hallar correlación alguna entre la antigenicidad de los virus leucémicos murinos infectantes y la susceptibilidad o resistencia de la células huésped. Sin embargo, se ha podido clasificar a estos virus en tres categorías según el tipo de célula que infectan: N trópicos, B trópicos y NB trópicos. Esta división es utilizada para indicar la relativa facilidad de infectar células de ratones de la cepa NIH-Swiss ( N ) o BaLB/c ( B ) o ambas a la vez ( NB ) respectivamente ( 149 ). Como ya hemos visto el gen Fv-1 parece dominar la susceptibilidad a un tipo de célula en particular ( 10 ).

El proceso que descubre el ARN viral de los oncornavirus para luego permitir la síntesis del ADN no está aún completamente conocido. Se han propuesto varios mecanismos pero ninguno se ha demostrado fehacientemente ( 10 ). Cualquiera sea el mecanismo, la pérdida de la envoltura y la cápside viral es rápido. La síntesis de ADN viral comienza una hora postinfección ( 236 ). Copias del ADN viral se hacen por medio de la enzima transcriptasa inversa ( 356 a ) y estas copias migran rápidamente al núcleo donde se integran de una manera estable en el ADN celular ( 365, 357, 358 ). Luego la información viral está bajo estricto control y regulación de la célula, como otros genes celulares en los cromosomas. Estos controles para los sucesos transcripcionales y traslacionales son poco conocidos en células normales, infectadas y transformadas.

Las proteínas y las glicoproteínas son sintetizadas de una manera coordinada en las células infectadas resultando en el ensamblaje de virus completo e infeccioso ( 19 ).

Puede ocurrir también transformación celular y entonces la expresión de varios antígenos: antígenos específicos virales, antígenos específicos de trasplante , antígenos asociados a la replicación viral pero no estructurales, glicoproteínas virales y otros polipéptidos, de una manera poco coordinada o asociados a la producción de partículas virales infecciosas ( 19, 121, 252 ).

### c) Mecanismos de tumorigénesis y transmisión

Se postulan actualmente dos mecanismos para explicar las propiedades transformantes o tumorigénicas de los oncornavirus. No son mecanismos mutuamente excluyentes y los argumentos experimentales dan apoyo a ambas posibilidades.

La primera teoría, la hipótesis del provirus de Temin, sostiene que la oncogénesis viral se realiza por la introducción de nuevos conjuntos de información genética en la célula ( 359 ). La segunda hipótesis, la del virogen de Huebner y Todaro, postula que los genes virales residen en los cromosomas de toda célula normal ( 364a ). Estos genes estarían normalmente reprimidos pero cuando se activan, su potencial oncogénico es a veces expresado ( oncogén ) o el virus es producido ( virogen ). Se propone este mecanismo como el más común mediante el cual los oncornavirus producirían cáncer natural. Debe ser remarcado que en relación a la distribución de información genética viral en células normales, el nivel al cual se ejerce control de la expresión fenotípica aún se desconoce. Experimentos recientes sugieren que existe un control a nivel de transcripción tanto celular y/o viral.

La hipótesis del protovirus de Temin supone un flujo continuo de información del ADN al ARN y nuevamente al ADN por transcripción reversa ( 359, 256b ).

Este mecanismo es quizás necesario para amplificación genética, duplicación, modificación, mutación genética o recombinación. Si en algún momento de estos ciclos, un conjunto específico de genes relacionados a mecanismos de control celular o información viral se hace diferente del ADN cromosómico correspondiente, el resultado aparecería a veces como transformación neoplásica.

Los mecanismos que se postulan para la tumorigénesis tienen su contrapartida en los modos de transmisión conocidos para el grupo de oncornavirus ( 288 ). Básicamente se distinguirían una transmisión horizontal, de un huésped a otro por contacto a proximidad y una transmisión vertical con dos modalidades, que implican mecanismos moleculares y controles biológicos muy diferentes como lo son la infección congénita ( el virus liberado por la madre infecta al recién nacido ) y la transmisión genética, ( las secuencias de ácido nucleico viral se integran al ADN cromosómico en las células germinales).

La transmisión horizontal puede ocurrir a niveles de organización diferentes: en el animal como un todo, o a nivel celular ( 115 ). Al nivel del animal, la transmisión de un virus leucémico se denomina infección, y puede ocurrir por la saliva, la orina, la sangre, etc. Esto se ha observado con varios oncornavirus como el virus leucémico del gato ( 302, 187, 147 ), el virus de leucemia de un tipo de mono ( 196 ), probablemente el virus de leucemia bovina ( 195, 266 ) y en raras ocasiones el virus de leucemia aviaria ( 307 ). También se hace referencia a la transmisión horizontal a nivel celular, cuando luego de la infección de una célula, el oncornavirus es liberado e infecta otra célula del mismo organismo.

Con respecto a la transmisión vertical, también se ha hecho una distinción ( 115 ). La transmisión genética de padres a hijos, más que la infección de animal a animal se ha postulado como el mecanismo más probable e importante por el cual los genes virales se han mantenido en las poblaciones animales ( 364a ). Mucha experimentación apoya esta hipótesis, sobre todo el hecho que los cultivos celulares de pollo, ratones, ratas, chanchos, gatos, monos, pueden empezar a liberar oncornavirus espontáneamente o luego del pretratamiento con ciertas drogas ( 10 ).

Esta transmisión de padre a hijo de ADN conteniendo las secuencias correspondientes al virus ARN oncogénico, en la forma de provirus, es el tipo de transmisión vertical a nivel del animal como un todo. Pero también se ha observado transmisión vertical al nivel celular, cuando la célula que contiene información viral integrada la transmite a las células de la progenie durante cada división celular.'

Los oncornavirus pueden transmitirse también durante el desarrollo del embrión. En ese caso se habla de transmisión congénita. Al nivel animal se trata de una transmisión vertical, pues ocurre de padre a hijo. Sin embargo a nivel celular, es de tipo horizontal, pues requiere infección del embrión, penetración de la membrana celular embrionaria por el virus y la síntesis de ADN viral. Este tipo de transmisión se ve más frecuentemente con los oncornavirus aviarios ( 115 ).

El terreno actualmente más polémico se refiere a la transmisión de oncornavirus entre especies que se hallan remotamente relacionadas filogenéticamente. Se ha observado que los oncornavirus transmitidos horizontalmente de una especie a otra se encuentran relacionados ( 115 ). Para estudiarlos se han utilizado varios criterios como las secuencias homólogas de los ácidos nucleicos, la inhibición de la actividad de las polimerasas con anticuerpos específicos, la antigenicidad de la proteína p30 de los viriones, la interferencia viral y la neutralización ( 115 ).

Se han postulado infecciones transespecíficas en los siguientes casos ( 115 ) : 1) el grupo de virus endógenos felinos RD-114/CCC que habría sido transmitido de los primates a los ancestros del gato doméstico ( 20c, 364c ); 2) el virus de la leucemia felina adquirido por los antepasados de los gatos domésticos de un antepasado de la rata ( 20b ) y 3) un virus endógeno del chancho doméstico cuyos antepasados lo adquirieron de un antepasado del ratón ( 20a ).

Si los genes virales pueden adquirirse de esta manera, es posible que los oncornavirus hayan servido para introducir otros genes de una especie a otra y puedan proveer otro mecanismo para que una especie adquiera nueva información genética ( 115 ).

#### d) Relaciones entre los virus leucémicos

Ha sido frecuentemente un punto de discusión si las leucemias son causadas por un único virus o varios virus relacionados entre sí ( 275 ). Generalmente las especulaciones se han originado del hecho que agentes estructuralmente idénticos aislados por diversos investigadores produjeron diversas formas morfológicas y patológicas de leucemia, probablemente dependiendo de las diferentes fuentes de material viral.

La transformación maligna de una determinada célula hematopoyética parece estar determinada no sólo por el virus sino también por el huésped. Bajo ciertas condiciones, la mayoría de los virus leucémicos conocidos al presente pueden inducir más de un tipo hematológico de leucemia. Por ello que la diferenciación basada en la histología o el tipo hematológico de la enfermedad inducida resultó imposible.

La comparación de los virus leucémicos basada en su sensibilidad al tratamiento por agentes químicos y físicos indicaban propiedades comunes.

Las primeras diferencias se detectaron inmunológicamente por neutralizaciones cruzadas de la actividad leucémica , utilizando sueros heterólogos de conejo y de rata ( 275 ). Sin embargo, la clasificación de los virus de leucemia murina en subgrupos serológicos aún no se ha completado satisfactoriamente pues no están estudiados completamente los antígenos de la envoltura viral ( 313 ). Hasta muy recientemente la clasificación se basaba en la identificación de antígenos de la superficie celular inducidos por el virus leucémico, dividiendo a los mismos en cepas Gross positivas ( G + ) y Gross negativas ( G - ), según las células presentaran o no éste antígeno asociado al virus de leucemia de Gross ( 264, 226a ).

Más recientemente la clasificación de los oncornavirus leucémicos en dos subgrupos llamados Gross ( G + ) y Friend-Moloney-Rauscher ( FMR) se ha basado en la neutralización de los virus de leucemia murina con suero antiviral preparado en ratas ( 73 ). Los sueros en estos estudios fueron preparados en ratas portadoras de leucemias transplantables inducidas por el virus de

Gross " Pasaje A ", y ratas portadoras de sarcomas trasplantables inducidos por el virus de sarcoma de Moloney ( VSM-M ).

El uso de suero de ratas portadoras de tumores trasplantables inducidos por el virus de Gross " pasaje A " o por virus de ratones AKR permitió la demostración de diferencias antigénicas dentro de un subgrupo. Así los virus del grupo Gross-AKR podían ser divididos en el tipo Gross y el tipo AKR ( 313 ).

Recientemente se ha propuesto una clasificación de los virus de leucemia murina en dos subgrupos, Gross y Friend-Moloney-Rauscher (FMR ), basado en la neutralización de seudotipos del virus formador de focos esplénicos de Friend con sueros murinos específicos de tipo ( 77 ).

Un estudio reciente de los antígenos de envoltura de los oncornavirus por el ensayo de neutralización viral ( 128 ) encontró que el antisuero de rata contra diversos seudotipos de virus de sarcoma de Moloney ( VSM - M ) identificaba dos subgrupos, principalmente el de Gross y el de FMR, confirmando los trabajos anteriores ( 128, 149 ).

Por otra parte, antisuero preparado en ratón contra 15 diferentes cepas de virus de leucemia murina y sus seudotipos con el virus de sarcoma, pudo distinguir 4 subgrupos de virus por el ensayo de neutralización del efecto sarcomagénico de los seudotipos en los ratones. Estos subgrupos eran:

- 1) Moloney, Rich, Buffet, Rauscher, Friend y virus de leucemia linfática ( 230 ) y sus seudotipos con virus de sarcoma murino.
- 2) Graffi-Mazurenko, Stephine-Zilber y sus seudotipos con virus de sarcoma murino.
- 3) Gross-AKR, Kaplan y su seudotipo con virus de sarcoma murino.
- 4) Virus Tennant y su seudotipo con virus de sarcoma murino.

Los primeros dos grupos inducían el antígeno de superficie celular Friend-Moloney-Rauscher (FMR ), mientras que los virus del tercer grupo eran poco inmunogénicos en los ratones e inducían el antígeno superficial de Gross.

La relación entre los virus de leucemia murina ha sido estudiada por otros métodos inmunológicos, basados en los estudios " in vivo " de resistencia al trasplante ( 275 ). El problema que ha surgido es la relación entre los antígenos detectados por otras técnicas inmunológicas como inmunofluorescencia, citotoxicidad, neutralización, con los antígenos detectados por las técnicas de trasplante. En muchos casos relaciones entre virus de leucemia por métodos serológicos " in vitro ", no correspondieron con los resultados de experimentos de trasplante " in vivo ". Sin embargo, los resultados negativos no permiten concluir la falta de relación con los antígenos de trasplante.

Otro tipo de estudios de interrelación entre los oncornavirus murinos es el que ha brindado el desarrollo de las técnicas de la biología molecular ( hibridización de ácidos nucleicos, inhibición de la actividad de la transcriptasa inversa, antigenicidad de la proteína p30, estudios de estructura primaria de las proteínas estructurales del virión ) ( 122 ).

El estudio de los componentes estructurales de los oncornavirus se ha centrado principalmente en la proteína p30 que constituye como ya hemos visto el 30% del total de la proteína del virión. Numerosos estudios han demostrado que es un carácter genético estable de una determinada especie de oncornavirus y por lo tanto muy útil para estudiar relaciones intervirales ( 122 ).

Las otras proteínas virales han dado alguna información pero que no es ampliamente aplicable al estudio de estas relaciones. Los estudios serológicos efectuados demuestran que las p30 de los virus leucémicos murinos están relacionadas en un 95-98%. Las diferencias entre las cepas de virus de leucemia murina, que determinan los antígenos específicos de tipo, corresponderían a menos de un 5% de la estructura primaria de la proteína p30.

Se debe tener en claro, que la principal suposición al usar los métodos inmunológicos para detectar interrelaciones virales es la correspondencia directa entre estos y la secuencia primaria y por ende con la secuencia de genes. Recientemente la correspondencia entre la estructura primaria y la reacti-

vidad cruzada inmunológica ha sido estudiada con precisión y es notable el alto grado de correlación que se observa. Ya que ambas técnicas se correlacionan bien con la historia filogenética, se hacen muy aplicables al estudio de las relaciones intervirales ( 122 ).

Los estudios de secuencias de la región amino terminal de las proteínas p30 de varios leucovirus murinos muestran que en los primeros 25 aminoácidos existe sólo uno diferente en la misma posición, la cuarta. Faltan todavía completar los estudios del resto de la molécula pero si se repitiera este esquema, ello indicaría una relación del 96%, lo que se correlaciona muy bien con los ensayos inmunológicos. Esta región hipervariable entre el aminoácido 4 y 10 de la proteína p30, sería el candidato obvio para la reactividad específica de tipo ( 122 ).

Con el descubrimiento de la transcriptasa inversa ( 356a ) fue posible realizar estudios de las relaciones intervirales utilizando la técnica de la hibridización molecular, ya que se ha podido sintetizar el ADN complementario al ARN del oncornavirus. Este ADN complementario se purifica y luego se usa para hibridizar con ARN virales. Un hecho sorprendente de estos estudios es la facilidad de distinguir mediante dicha técnica entre los diferentes virus leucémicos murinos. Por ejemplo, se ha visto que la relación entre el virus de Rauscher y el virus AKR endógeno es de un 50% aproximadamente. También se ha observado que cuando los virus están relacionados por neutralización, como el virus de Gross y el virus AKR, el grado de hibridización es casi completo. La conclusión más importante de estos estudios es que la discriminación entre los oncornavirus leucémicos por técnicas de hibridización molecular es más sensible que las estimaciones por métodos inmunológicos .

No se debe olvidar, al considerar las relaciones intervirales que una larga historia de pasajes de estos virus leucémicos, sea " in vivo " o " in vitro " pueden hacer ganar o perder o modificar secuencias genéticas lo cual puede influenciar el grado final de hibridización molecular. Sin embargo se ha visto, que es posible especificar la especie de origen de los oncornavirus, al hibridizar con el ADN celular. Así se ha comprobado que todos los ADN complementarios al ARN de los leucovirus murinos hibridizan con el ADN celular de *Mus Musculus*, y no con el ADN de otros roedores ( 122 ).

Del estado actual de las investigaciones resulta difícil poder formular una teoría ordenada de las relaciones intervirales entre los oncornavirus leucémicos murinos. Quizás la mejor síntesis frente al estado actual de los conocimientos sea concluir como Gross que los oncornavirus leucémicos provendrían todos de un vector común del pasado reciente ( 143 ).

#### 4. INMUNOLOGIA DE LAS LEUCEMIAS MURINAS

##### a) Antígenos de trasplante y antígenos tumorales específicos

Una de las ideas más persistentes en relación a la naturaleza del cáncer ha sido que, en la transición hacia el estado de malignidad las células pueden sufrir cambios estructurales posibles de ser revelados por métodos inmunológicos.

A fines del siglo pasado y principios del actual se comprobó que a veces era posible trasplantar de un animal a otro tumores espontáneos, por injerto de células enteras ( 142 ). Era evidente que los tumores de rata y ratón podían ser trasplantados de huésped a huésped, siempre y cuando se transfirieran células no dañadas de un animal portador de tumor a otro animal de la misma raza y especie. Sin embargo trasplantes de tumores de ratones a chanchitos de la India, o a conejos fallaron, y se reconoció que en general los tumores podían ser transferidos sólo dentro de la misma especie. Luego de un trasplante exitoso, un tumor crecía en el nuevo huésped, y en muchos casos, mataba al animal. Muchas veces, sin embargo, el trasplante no tenía éxito: aún grandes cantidades del tejido tumoral implantado bajo la piel o en los músculos del nuevo huésped, no proliferaba, y no aparecía nuevo crecimiento. En otros casos, un tumor implantado, crecía temporariamente y luego gradualmente regresaba. Poco después se vio, que se podía proteger a los animales receptores, contra estos injertos tumorales, si se los trataba previamente con células tumorales rotas o alteradas, o incluso si eran tratados con células tumorales viables en pequeño número, las cuales no llegaban a " prender ". Este hallazgo hizo concebir esperanzas de encontrar rápidamente una solución inmunológica para el problema del cáncer.

Fue el desarrollo de las cepas endocriadas de ratones, lo que permitió un estudio más detenido del problema del trasplante de tumores. Así se observó que cuando el animal donante y el receptor no eran genéticamente idénticos, los trasplantes de tumor, como también el trasplante de tejidos normales era rechazado como resultado de una respuesta inmune ( 129 ).

Los tejidos de diferentes miembros de una misma especie, con excepción de los mellizos idénticos y de animales endocriados, portan genéticamente, determinantes antigénicos de diferente especificidad, llamados iso-antígenos ( 3, 130 ). El sistema de endocría permitió demostrar así que los trasplantes de tumores se rigen por las mismas leyes que los trasplantes de piel u otros tejidos normales, y que estas leyes son de carácter inmunogénico y dependen de la segregación de factores genéticos múltiples que determinan la especificidad antigénica de un gran número de componentes celulares ( 13a, 234 ).

Estos componentes celulares se denominan antígenos de trasplante o antígenos de histocompatibilidad ( 207, 340 ).

Por otra parte se comprobó, que las viejas estirpes tumorales que proseguían su crecimiento a pesar de las barreras antigénicas, lo hacían no porque carecieran de efecto antigénico, sino porque lograban superar las reacciones creadas por el homoinjerto, reacciones reales aunque subliminares. Preinmunización contra los antígenos de histocompatibilidad, revelaba claramente el rechazo de estos tumores. Era este tipo de evidencia que llevó a la creencia que todas las respuestas de rechazo de tumores, eran probablemente en el fondo un simple rechazo de un tejido histoincompatible ( 208b ).

La década de 1950 hizo notar que la conclusión del párrafo anterior era quizás algo prematura. Una nueva etapa comenzó con los experimentos de Gross ( 133 ) y Foley ( 97 ). Este último, ligó sarcomas inducidos por metilcolantreno y trasplantados a ratones C3H singeneicos, para inducir la necrosis de los mismos. El subsecuente desafío de los huéspedes con fragmentos del mismo sarcoma, frecuentemente llevaban al rechazo, mientras que los controles no inoculados aceptaban el trasplante. La posibilidad de que esto fuese debido a una heterocigosis residual dentro de la cepa era poco probable, pues carcinomas mamarios de origen espontáneo, derivados de una misma cepa

isogénica, no demostraban una diferencia similar entre el grupo ligado y el control. Prehn y Main , confirmaron los trabajos de Foley, y demostraron que injertos de piel podían ser intercambiados entre los diferentes miembros de la cepa endocriada utilizada mientras que los sarcomas de metilcolantreno eran rechazados en los huéspedes con tumores ligados ( 286 ). La prueba final fue obtenida cuando se pudo demostrar el rechazo de tumores inducidos por metilcolantreno en el huésped autóctono ( 204 ).

Los antígenos tumorales específicos de trasplante ( ATET ), esto es, los antígenos capaces de inducir el rechazo tumoral en huéspedes genéticamente compatibles ( singeneicos ) han sido demostrados en gran número de tumores. Estos incluyen los tumores inducidos por carcinógenos químicos como el metilcolantreno, dibenzantraceno, benzopireno, varios colorantes azo; los tumores inducidos por agentes físicos, como la radiación ionizante o la implantación de películas de plástico o Millipore; y los tumores inducidos por virus oncogénico ADN, como el poliovirus del ratón, el SV40, adenovirus humanos, y también los virus ARN y numerosos agentes de leucemia murina ( 208b ) .

Como la palabra trasplante lo indica, estos antígenos ( ATET ) se demuestran por medio de experimentos " in vivo " que involucran el trasplante de células tumorales en huéspedes singeneicos, es decir, animales sanos que súbitamente son enfrentados con una línea tumoral establecida. Esto no es la misma situación que el desarrollo de un tumor primario, donde el huésped se enfrenta con sus propias células tumorales de una manera que difiere según varios parámetros ( localización tumoral, tipo de crecimiento del tumor, liberación de antígeno por el tumor, etc. ).

Es importante hacer esta distinción pues veremos más adelante al estudiar el desarrollo del conocimiento de los antígenos de trasplante inducidos por los virus leucémicos, que han habido estudios con tumores autóctonos o primarios y estudios con leucemias trasplantables.

La evidencia de que estos antígenos tumorales en el huésped autóctono existen, es la espontánea regresión de ciertos tumores autóctonos. Existen

algunos ejemplos, como el papiloma de Shope del conejo ( 85 ), y el sarcoma inducido por el virus del sarcoma de Moloney en el ratón ( 90 ). En el hombre las raras regresiones espontáneas de coriocarcinoma y de linfoma de Burkitt probablemente pertenecen a esta categoría ( 189, 46 ).

Estos descubrimientos permiten concluir, contrariamente a lo pensado anteriormente, que el organismo recibe células cancerosas y no necesariamente las acepta como suyas .

#### b) Antígenos asociados a leucemias murinas

El concepto de que las células cancerosas poseen antígenos diferentes que las células normales es el corolario de años de esfuerzos en descubrir dichos antígenos específicos en tumores y leucemias. En el caso particular de las leucemias murinas, el hecho de haberse demostrado su etiología viral, ha hecho que actualmente los estudios se dirijan a delucidar las características antigénicas, moleculares y biológicas de los diferentes tipos de antígenos asociados a las mismas.

El estudio de los antígenos inducidos por los virus leucémicos es actualmente sumamente polémico. El avance en el conocimiento estructural y bioquímico de los oncornavirus ha permitido caracterizar bioquímicamente algunos de los antígenos determinados por diferentes metodologías serológicas.

En general pueden dividirse a los antígenos en tres categorías principales: 1) los antígenos del virión formados por las proteínas estructurales del mismo. Estos fueron descritos en el capítulo 3.

2) los antígenos de membrana celular asociados a la infección con oncornavirus, pero que no forman parte de los mismos.

3) antígenos solubles asociados a los oncornavirus pero que tampoco forman parte estructural del virión ( 313 ).

Los antígenos de membrana en células infectadas por virus leucémicos, fueron primeramente demostrados en estudios de trasplante con tumores inducidos por estos virus ( 205, 311, 273 ). Los ratones que rechazaban los

trasplantes tumorales poseían anticuerpos citotóxicos en la presencia de complemento a células del mismo tumor y otros tumores inducidos por la misma cepa de virus. En la mayoría de los casos estos sueros demostraron también poseer actividad neutralizante. La posibilidad que estas dos actividades fueran debidas a la misma población de anticuerpos fue descartada al observarse que las partículas virales intactas absorbían la actividad neutralizante del suero y dejaban sin disminuir la actividad citotóxica ( 232 ). Estos experimentos demostraron que los antígenos de membrana que inducían los anticuerpos citotóxicos no estaban presentes en la superficie de los viriones intactos.

El estudio de los anticuerpos citotóxicos preparados contra leucemias inducidas por varias cepas de virus de leucemia murina permitieron distinguir dos tipos de antígenos celulares: el antígeno de Gross y el antígeno FMR.

El antígeno de Gross: Este antígeno induce anticuerpos al inmunizar ratones con tumores inducidos por el virus de leucemia de Gross ( 336, 264 ). También se ha encontrado anticuerpos contra este antígeno en sueros de ratón normal. Estos anticuerpos son citotóxicos contra las leucemias inducidas por el virus de Gross y por el virus de leucemia de radiación ( 232 ). Ratones de la cepa AKR, preleucémicos, absorben anticuerpos anti-Gross( G ), y este carácter segrega de una manera mendeliana en cruza con cepas Gross negativas. Estudios con inmunomicroscopía electrónica han confirmado que el antígeno de Gross está ampliamente distribuido en las membranas de células infectadas por este virus, pero que aparentemente no se encuentra en las envolturas de los viriones brotantes o maduros ( 6 ). El antígeno se ha podido solubilizar de membranas de células leucémicas y cromatográficamente se ha revelado como presente en dos moléculas de diferente tamaño ( 232 ).

Otro antígeno muy estudiado en relación con el antígeno de Gross, es el antígeno G<sub>IX</sub>. Este antígeno ha sido identificado con anticuerpos citotóxicos de ratas inmunizadas con tumores inducidos por el virus de Gross ( 177 ). Está presente no sólo sobre las leucemias inducidas por el virus de Gross y linfocitos de ratones AKR leucémicos y normales, sino que también en timocitos de ratones de la cepa 129 y otras cepas de baja incidencia de leucemia.

El control genético de la expresión de este determinante es complejo. La relación estrecha entre los antígenos de Gross y  $G_{IX}$  fue demostrada por la cruce entre los ratones AKR ( G y  $G_{IX}$  positivos ) con ratones C57 B1 ( G y  $G_{IX}$  negativo ). Ambos genes están ligados ( 177 ). Esto podría indicar que los dos determinantes se encontrarían en la misma molécula. Recientemente se ha obtenido fuerte evidencia experimental que  $G_{IX}$  y el componente gp71 de la envoltura viral son una misma entidad bioquímica ( 318 ).

El antígeno FMR: Las leucemias inducidas por varias cepas de virus de leucemia murina inducen anticuerpos citotóxicos a sus células tumorales homólogas : Friend ( 263 ), Moloney ( 206 ), Rauscher ( 264 ) y Graffi ( 232 ). Estos anticuerpos y las células tumorales dan reactividad cruzada en mayor o menor grado entre ellas, y este hecho llevó al concepto del grupo Friend-Moloney-Rauscher ( FMR ) de leucemias virales ( 264 ). En contraste con el antígeno de Gross, el de FMR no es expresado en las células normales de ninguna cepa murina conocida. Estudios recientes han demostrado que el antígeno FMR corresponde a un antígeno específico de tipo del virión y que se halla localizado entre la envoltura viral y el nucleóide. Todas las propiedades de este antígeno coinciden con la de la proteína p12 de los oncornavirus ( 318 ).

Por último, una reflexión acerca de la diversidad de antígenos encontrados asociados a los oncornavirus leucémicos y las leucemias. Los antígenos que más interesan desde el punto de vista de la prevención de las leucemias son los antígenos tumorales específicos de trasplante ( ATET ). Se han definido serológicamente antígenos del virión y antígenos de la membrana celular. Lo que aún no está claro a pesar de la enorme cantidad de investigación realizada es cuál es la relación que existe entre los antígenos de trasplante y los antígenos detectados serológicamente. Recientemente se han iniciado investigaciones para delucidar la naturaleza molecular de los antígenos de trasplante ( 405 ) para así poder trazar un cuadro más coherente de lo que actualmente es un área de investigación sumamente complicado. Estos resultados permitirán mejorar los protocolos de inmunoprevención de leucemias, ya que se podrá contar con los antígenos tumorales específicos para fabricar vacunas puras sin contaminantes de ninguna especie.

c) Respuestas inmunológicas a la leucemia murina

El estudio de las respuestas inmunológicas a la leucemia murina está íntimamente ligado con el estudio de los antígenos de las células infectadas por oncornavirus.

La comprensión de los mecanismos de las respuestas inmunológicas es de importancia pues aporta los conocimientos racionales necesarios para preparar protocolos para estudios " in vivo " de protección y control del crecimiento tumoral. Se dejará así de determinar intuitivamente regímenes de inmunización mediante la realización de estudios empíricos, dónde sólo se utiliza como indicación de eficacia el hecho que no haya crecimiento tumoral detectable o una sobrevida prolongada ( 154 ).

Se ha visto claramente que la respuesta inmune a las leucemias inducidas por el trasplante de células leucémicas o las leucemias primarias varía según un número de parámetros como lo son la cepa de ratones utilizada, su edad, la vía de inoculación, el ensayo " in vitro " o " in vivo " que se ha utilizado, etc. ( 84 ).

Desde el inicio de los estudios inmunológicos quedó claro que la respuesta inmunológica tenía dos vías efectoras: una celular y otra humoral ( 276 ). Se han estudiado algunas leucemias muy intensamente. La leucemia de Rauscher tanto primaria como trasplantable, muestra una respuesta celular que se hace inefectiva " in vivo " en el momento de la máxima progresión tumoral. También ha sido muy estudiada la leucemia trasplantable de Gross, observándose anticuerpos citotóxicos y células inmunes a la semana de haberse inoculado las células, manteniéndose estos parámetros elevados por varias semanas ( 84 ).

Lo que ha tomado mucho más tiempo aclarar es cuál es el blanco antigénico de la respuesta inmune " in vivo ". Ya hemos visto la diversidad de antígenos que existen en este sistema, tanto en la partícula viral, como en la membrana de células infectadas por virus leucémicos. Aparentemente, la respuesta contra los antígenos específicos de trasplante sería para algunos investigadores contra los antígenos virales estructurales presentes en la membrana celular, mientras que para otros sería contra antígenos inducidos por los

virus pero diferentes de las proteínas estructurales del virión ( 307 ). Este punto, sumamente complejo está aún en discusión.

Es importante aclarar, que si bien por mucho tiempo se creyó que los ratones eran tolerantes a los virus endógenos, los trabajos de investigación de los años recientes por medio de radioinmunoensayo y otras técnicas han demostrado que los ratones pueden montar una respuesta inmune efectiva contra esos virus ( 318, 265, 1, 262 ). Se ha estudiado esta respuesta detectándose la especificidad de la respuesta para determinados componentes estructurales de los oncornavirus leucémicos ( 174, 173 ). Así se ha visto que el suero de ratones AKR reacciona con los componentes gp71, gp43 y p15 (E) de los oncornavirus leucémicos.

#### 5) INMUNOPREVENCIÓN DE LA LEUCEMIA MURINA

El objetivo de la presente sección es hacer una revisión del curso que llevaron las investigaciones en la prevención de la leucemia murina. En principio es posible observar la existencia de dos grandes etapas. Una primera que se remonta a los primeros trabajos de inmunización contra el cáncer a principio del siglo, y que se extiende hasta la década del 50, y la segunda que se inicia con el descubrimiento por Gross ( 136 ) del agente responsable de la leucemia murina en 1951 y que continúa hasta nuestros días.

##### a) El primer período ( circa 1900 - 1951 )

Los primeros trabajos de inmunización contra el cáncer se remontan a la época de los primeros trasplantes de tejido tumoral. En 1907 Ehrlich observó que ratones que habían recibido tumores de baja " virulencia " eran inmunes al pasaje de tumores " más virulentos " ( 79 ). Estas observaciones fueron confirmadas en laboratorios de otros países ( 16, 38 ). Pero el análisis más detallado de estos resultados demostró que no solo los tejidos neoplásicos sino que también los tejidos normales podían inmunizar contra los trasplantes tumorales ( 38 ).

El descubrimiento de los antígenos de histocompatibilidad en la década de 1930, permitió entender porqué fue posible inmunizar contra los tumores trasplantados. Se vio que los antígenos responsables del fenómeno no eran particulares del tumor trasplantado sino de todos los tejidos y el mecanismo del rechazo era el del homoinjerto ( 28 ). El descubrimiento de los genes de histocompatibilidad permitió el desarrollo de los ratones endocriados y con ellos quedó realmente claro que todas las experiencias hasta el momento de rechazo de tumores no diferían en cuanto al mecanismo y su causa del rechazo de cualquier otro tejido.

b) La etapa actual ( 1951 - 1977 )

Es en la segunda etapa, en que una vez aislado el agente viral responsable etiológico de la leucemia murina, y su posterior confirmación por otros investigadores ( capítulo 2 ) , las investigaciones comienzan a dar sus frutos a medida que por otra parte se refinan los métodos experimentales.

A partir de la publicación de Charlotte Friend ( 101 ) comienza una gran concentración de esfuerzos con un objetivo único : lograr prevenir la leucemia murina. Es importante tener presente que a pesar de la gran diversidad de trabajos realizados bajo el rótulo de prevención de leucemias murinas surge claramente que se ha tratado de prevenir a la leucemia murina considerando principalmente el modo de transmisión de la enfermedad ( capítulo 3 ).

Los virus leucémicos pueden transmitirse horizontalmente o verticalmente; la posible trasmisión horizontal a inspirado trabajos con formas exógenas de la enfermedad, ya sea con los virus o con las células leucémicas. La trasmisión vertical del oncornavirus leucemógeno ha estimulado, por otra parte, investigaciones con la intención de prevenir la activación del virogen endógeno.

Las estrategias de vacunación han sido diversas. Hemos preparado una tabla ( ver tabla 5 ) donde se enuncian los principales protocolos de inmunización. Del estudio de los trabajos, se hace difícil poder compararlos to -

TABLA 5: INMUNOPREVENCIÓN DE LA LEUCEMIA MURINA

Principales protocolos utilizados

<u>INMUNOGENO</u>	<u>INMUNOPREVENCIÓN DE</u>	<u>CITA</u>
<u>Activa</u>		
Leucemias singeneicas de trasplante en dosis subumbrales	leucemia trasplantable	273, 206, 205, 9.
Leucemia singeneica de trasplante irradiada	leucemia trasplantable y primaria	273, 206, 125, 252, 126, 26.
Leucemia alogeneica de trasplante	leucemia trasplantable	273, 206, 252, 205.
Células de cultivo de de tejido crónicamente infectadas con virus	leucemia trasplantable y primaria	14, 250.
Virus de leucemia infeccioso	leucemia trasplantable y primaria	126, 336, 26, 311, 206, 125, 249, 252, 253.
Virus de leucemia atenuado ( formol o radiación )	leucemia trasplantable, primaria y espontánea	101, 95, 248, 249, 252, 369, 166, 197
Virus de sarcoma murino infeccioso	leucemia trasplantable, primaria y espontánea	88, 166
Componentes virales purificados	leucemia trasplantable, primaria y espontánea	169, 175, 176a, 176b
<u>Pasiva</u>		
Suero inmune ( singeneico, alogeneico y xenogeneico )	leucemia trasplantable, primaria y espontánea	258, 373, 372, 245, 182, 183, 278, 45, 169, 167, 317, 326, 119.

dos entre sí, cuando son tantas las variables en juego y tan veloz la evolución de las técnicas empleadas. Principalmente se ha comparado la cepa de ratones, el tipo de vacuna preparada, el tipo de leucemia que se trató de prevenir ( exógena o endógena ), el tiempo de observación del experimento, y finalmente el resultado. Las situaciones experimentales presentan una complejidad mayor, hallándose una gran variación en cuanto a la cantidad de dosis de vacuna empleada, la edad de los ratones, la vía de inoculación, el tiempo del desafío con leucemias y la medición de los resultados.

Con el objeto de hacer una revisión histórica de los principales trabajos de vacunación, hemos preparado la tabla 6. En ella se expresa sucintamente el año de la publicación del trabajo consultado, el tipo de vacuna empleada y la leucemia - trasplantable o primaria - que fue prevenida. A continuación haremos un estudio más detallado de los trabajos citados.

( i ) Los primeros protocolos de vacunación

Los experimentos de Charlotte Friend ( 101 ) con filtrados acelulares de leucemias inducidas por el virus de Friend formolizado fueron los primeros trabajos de vacunación contra un agente leucemógeno exógeno. Ella observó protección en ratones de la cepa Swiss al desafiarlos con filtrados o células leucémicas que resultaban letales en ratones controles. No logró sin embargo proteger contra otras leucemias trasplantables o el virus de la leucemia de Gross ( VLM-G ).

Pocos años más tarde, Leo Sachs ( 311 ) observó resultados positivos al inmunizar ratones de la cepa C57 B1/6 con el virus de la leucemia de Moloney ( VLM-M ) infeccioso. Al desafiar con la leucemia de Moloney trasplantable encontró fuertes indicios de protección. Los experimentos tuvieron una duración de 38 días. Interesaba en ese momento demostrar la antigenicidad de los tumores inducidos por virus leucémicos, más que plantearse la factibilidad de una vacuna. Por otra parte, Sachs, no observó protección con filtrados

TABLA 6: INMUNOPREVENCIÓN DE LA LEUCEMIA MURINA :DESARROLLO HISTÓRICO

NOTA: VLM: virus de leucemia murina; VSM: virus de sarcoma murino;  
R: Rauscher; G: Gross; M: Moloney; Gi: Graffi; F: Friend.

<u>AÑO</u>	<u>INMUNOGENO</u>	<u>INMUNOPREVENCIÓN DE</u>	<u>CITA</u>
1959	VLM-F formolizado	leucemia de F primaria y trasplantable	101
1962	VLM-M infeccioso	leucemia de M trasplantable	311
1962	leucemia singeneica de G en dosis subumbral y leucemia alogeneica de G	leucemia de G trasplantable	205,336
1963	VLM-G y leucemia singeneica de G en dosis subumbral	leucemia de G trasplantable	9
1963	leucemia singeneica de Gi en dosis subumbral o irradiada y leucemia alogeneica de Gi	leucemia de Gi trasplantable	273
1964	VLM-M infeccioso y leucemia de M singeneica irradiada	leucemia de M trasplantable	125
1964	VLM-R formolizado	leucemia de R primaria	95
1964	VLM-M infeccioso, leucemia de M en dosis subumbrales y leucemia alogeneica de M	leucemia de M trasplantable	206
1965	VLM-R formolizado	leucemia de R primaria	248
1965	células de cultivo infectadas con VLM-R	leucemia de R primaria	14, 15
1966	VLM-R infeccioso y leucemia de R singeneica irradiada	leucemia de R primaria y trasplantable	26
1966	VLM-F infeccioso y formolizado	leucemia de F primaria	258
1967	VSM-M infeccioso	leucemias de F, M y R trasplantables	88
1967	VLM-M y VLM-R infeccioso y formolizado	leucemia de M trasplantable	249
1967	leucemia de F, M y R singeneica irradiada y VLM-F, VLM-R y VLM-M infeccioso	leucemia de F, M y R trasplantable	253

<u>AÑO</u>	<u>INMUNOGENO</u>	<u>INMUNOPREVENCIÓN DE</u>	<u>CITA</u>
1967	VLM-F infeccioso y leucemia de F irradiada	leucemia de F trasplantable	252
1967	VLM-R formolizado	leucemia de trasplante	369
1968	leucemia de F alogeneica y VLM-F formolizado	leucemia de F primaria	373
1968	suero inmune contra VLM-F	leucemia de F primaria	372
1968	leucemia de F alogeneica	leucemia de F primaria	245
1968	leucemia de F, M, R y G singeneica trasplantable irradiada y VLM-F, M, R y G	leucemia de F, M, R y G trasplantable	126
1968	células de cultivo infectadas con VLM-R	leucemia de R primaria	250
1970	VLM-G infeccioso ( en ratas )	leucemia de G primaria	182
1972	células infectadas con VSM-M y VLM-M infecciosos y VLM-R irradiado	células de cultivo infectadas con VSM-M y VLM-M	345
1973	suero inmune contra VSM-M	leucemia de M trasplantable	278
1973	VLM-G formolizado ( en ratas )	leucemia de G primaria	183
1974	VLM-334c formolizado	leucemia de 334c primaria	45
1975	gp71 de VLM-F y suero inmune contra gp71 de VLM-F	leucemia de F primaria	169
1976	VLM-G formolizado y VSM-G infeccioso	leucemia AKR espontánea	166
1976	suero inmune contra VLM-G + VLM-G irradiado y VSM-G infeccioso	leucemia AKR espontánea	167
1976	VLM-R y VLM-G formolizado	leucemia de R primaria	197
1976	gp71 de VLM-F	leucemia de radiación y espontánea	175, 176a 176b
1976	suero inmune contra gp71 de VLM-F	leucemia de F, y R primaria	316
1977	suero inmune contra gp71 de VLM-F; VLM salvaje	leucemia AKR espontánea y salvaje espontánea	326 119

de leucemia inducida por radiación contra leucemias de radiación trasplantables. Pareció claro que se estaba en presencia de antígenos distintos en leucemias de diferente origen.

Estudiando la antigenicidad de leucemias singeneicas inducidas por el virus de leucemia de Gross ( VLM-G ) en ratones C3H , Klein y colaboradores ( 205 ) descubrieron que era posible inmunizar contra las leucemias trasplantables inducidas por el virus de Gross. Utilizaron células vivas en dos métodos para crear resistencia: pequeñas dosis de células de leucemias singeneicas y posterior desafío de estos animales con dosis crecientes de células, como así también el pretratamiento con células alogeneicas de leucemia de Gross. Se trabajó con ratones de la cepa C3H/K1, DBA/2/K1, C57 B1, y ASW/SnK1 observándose no sólo falta de crecimiento de leucemias de pasaje, como también prolongación del período de latencia en los casos que el proceso leucémico no era frenado. Consideraron que el tipo de resistencia creada era débil. Por otra parte encontraron reactividad cruzada entre las diferentes leucemias inducidas por el agente leucemógeno de Gross ( VLM-G ). Estos extensos trabajos fueron confirmados por Slettenmark ( 205 ) y Axelrad ( 9 ).

Axelrad vacunó ratones C3H con dosis subletales repetidas de células leucémicas de Gross y con virus de la leucemia de Gross ( VLM-G ) infeccioso . Utilizando un nuevo método para medir resistencia al crecimiento tumoral, el ensayo de foco esplénicos, encontró una fuerte evidencia del rechazo de un inóculo de células de leucemia trasplantable de Gross( 9 ).

En una línea parecida se ubicaron los trabajos de Pasternak ( 273 ). Investigó en las cepas de ratones CBA, C57 B1, XIII y AKR, el efecto de células como inmunógenos contra leucemias singeneicas de trasplante. Utilizó dosis subumbrales, células irradiadas y células de leucemias alogeneicas para inmunizar ratones. Observó que sólo las células de leucemias inducidas por el virus de Graffi, inmunizaban contra leucemias de trasplante inducidas por el mismo virus. Las células de leucemias espontáneas no inmunizaban contra si mismas ni contra la leucemia de Graffi de trasplante.

Las investigaciones de Glynn ( 125 ) en busca de antigenicidad común en diferentes leucemias inducidas por el virus de leucemia de Moloney permitieron observar en ratones CDBA, que el pretratamiento con células de leucemia de Moloney irradiadas protegía contra el desafío con dosis letales de igual leucemia, confirmando observaciones como las de Pasternak ( 273 ) en sistemas parecidos. Sin embargo, a diferencia de lo observado por Sachs ( 311 ) no pudo inducir protección con el virus de la leucemia de Moloney infeccioso o inactivado con formol, en una concentración aproximadamente igual a la presente en suspensiones celulares del tumor, contra la leucemia de Moloney trasplantable. Tampoco la leucemia de Moloney singeneica irradiada protegía contra el desafío de leucemia de Rauscher trasplantable.

Este experimento, como los anteriores, no permitieron aclarar si la antigenicidad de las leucemias inducidas por virus de leucemia murina, era debida a los antígenos virales per se, o a nuevos antígenos celulares inducidos por la infección viral.

A pesar de los resultados alentadores con los métodos descriptos, otros investigadores insistieron en estudiar el poder inmunogénico de las vacunas virales. Fink ( 95 ) vacunó a ratones de la cepa BaLB/c AnN con virus de la leucemia de Rauscher inactivado con formol o calor . En el primer caso, obtuvo completa protección contra la inducción de leucemia primaria de Rauscher si se usaba la vacuna conjuntamente con adyuvante de Freund; pero poca protección si se usaba la vacuna inactivada con calor. Se concluyó que el anticuerpo neutralizante era el responsable de la protección observada.

En un trabajo posterior, Klein ( 206 ) estudió la inducción de resistencia a leucemias de trasplante inducidas por el virus de Moloney. Se inmunizó a ratones de las cepas A/Sr, C57L/K1, C3H/K1, DBA/2/K1, ASN/Sn/K1, C57B1/K1 y sus híbridos con diversos tratamientos: homogenados de leucemias de Moloney; células alogeneicas de leucemias de Moloney; dosis subumbrales de leucemia singeneica de trasplante de Moloney , observando relativa resistencia a la inoculación subsecuente de la leucemia de Moloney. No se pudo observar

sin embargo, protección cruzada contra sacomas inducidos por metilcolantreno, dos leucemias de Gross trasplantables, y seis leucemias largamente trasplantadas de diversos orígenes.

La resistencia a la leucemia murina era inducida tanto por los antígenos virales o por los antígenos celulares de los tejidos infectados. Hasta ese momento, las purificaciones de virus no eran aún lo suficientemente buenas como para garantizar una preparación viral sin contaminación con restos celulares y poder así aclarar cuál de los dos, virus o antígenos celulares, era necesario como inmunógeno para inducir la resistencia a la leucemia.

Con el objeto de trabajar con virus de leucemia murina más purificados, Mayyasi ( 248 ) utilizó virus de leucemia de Moloney y de Rauscher aislado de cultivo de tejido. En general, estas preparaciones tenían menor contaminación con restos celulares, que las preparadas de tejidos animales infectados. Estos dos virus fueron inactivados con formol y adsorbidos con adyuvante. Ratones de la cepa BaLB/c inmunizados con esta vacuna mostraron una fuerte resistencia a la inducción de leucemia primaria de Rauscher, siendo mayor la resistencia observada luego de varias dosis inmunizantes de virus formolizado. Estos resultados mostraron similitud con los de Fink ( 95 ) y como en ellos, hubo correlación entre el nivel de anticuerpos circulantes y el grado de resistencia al desafío viral.

En otro trabajo del mismo autor ( 379 ), se estudió la inmunidad en ratones de las cepas BaLB/c, BDF1 y C57 B1 al virus de la leucemia linfocítica de Moloney activo y formolizado, obtenido de células de cultivo infectadas crónicamente o de plasma de ratón infectado. Se observó que el virus inactivado no indujo resistencia contra la leucemia de trasplante de Moloney en ratones BaLB/c, mientras que en las cepas C57 B1 y BDF1 ( cepas alogeneicas ), como también en el conejo ( animal xenogeneico ) hubo respuesta positiva de anticuerpos. El virus de leucemia de Moloney infeccioso sin embargo, indujo anticuerpos en las tres cepas. También se observó que ratones BaLB/c inmunizados con virus de leucemia de Rauscher activo y atenuado en cultivo de tejido rechazaban leucemia de Moloney, demostrando reacción cruzada entre estos dos virus y sus leucemias.

Otra posible estrategia para inmunizar ratones contra la leucemia murina fue desarrollada por Barski ( 14, 15 ). En un trabajo preliminar utilizó cultivos de células linfoides murinas crónicamente infectadas con virus de leucemia de Rauscher, que demostraron poseer una capacidad atenuada de producir leucemia. Los sobrenadantes de estos cultivos si bien producían leucemias en alguna proporción, protegían a los ratones BaLB/c contra la inducción de leucemia primaria de Rauscher. Sin embargo, la más fuerte protección fue observada en el grupo de animales que recibió la fracción celular de los cultivos crónicamente infectados, siendo del 100% y con largos períodos de sobrevida, sugiriendo estos trabajos que la capacidad inmunizante esencial de los cultivos se hallaba en las células y no sólo en el virus aislado.

Posteriormente el mismo autor intentó confirmar estos resultados y extenderlos a otras cepas murinas ( 15 ). Obtuvo resultados positivos no sólo con ratones BaLB/c, sino con ratones Swiss y los F1 ( C58 x BaLB/c). Utilizando sobrenadantes, células tanto vivas como irradiadas o congeladas, podía obtener resultados positivos. La inmunidad era persistente, durando más de tres meses.

La posibilidad de inmunizar ratones de la cepa BaLB/c, muy sensibles a la oncogenesis por el virus de la leucemia de Rauscher, fue estudiada por Bianco ( 26 ). Ratones de la cepa BaLB/c e híbridos BaLB/c x DBA/2 que fueron inmunizados con células de leucemia de Rauscher de trasplante irradiadas rechazaron la leucemia singeneica de Rauscher de trasplante. Por otra parte en el mismo trabajo se observó que fue imposible inducir resistencia a la leucemia singeneica de Rauscher de trasplante inmunizando a ratones con virus de leucemia de Rauscher infeccioso. Sólo en algunos casos se observó resistencia parcial. En algunos experimentos se observó protección cruzada al inmunizar con leucemia singeneica de Rauscher de trasplante irradiada y desafiar con leucemia singeneica de Moloney de trasplante.

En 1966, Mirand y colaboradores sugirieron un protocolo de inmunización contra la infección con virus de leucemia murina en edad temprana en el ratón ( 258 ). Para ello inmunizaron ratones hembra de las cepas HA/ICR Swiss y DBA/1 repetidamente con virus de leucemia de Friend activo, y luego con virus

de leucemia de Friend inactivado con formol o calor. Esta vacunación efectuada en hembras al segundo día de preñez indujo en las crías una fuerte protección al desafiarlas con virus de leucemia de Friend infeccioso entre los 1 y 15 días de edad; poca protección entre los 20 y 40 días y luego nuevamente un incremento en la protección entre los 45 o más días. Si la inmunización de las madres se hacía al día doce de preñez, las crías recién mostraban protección luego de los 30 días de edad. La vacuna formolizada sólo otorgaba protección durante los primeros 28 días de edad, mientras que la vacuna inactivada por calor no protegía en absoluto.

Dentro de esta línea de investigación se encuentran los trabajos de Wahren ( 372,373 ). Ratonas hembra de las cepas C3H/BI, C57 B1 y C3H x DBA/2 fueron inmunizadas con células leucémicas de Friend alogeneicas. Las crías demostraron estar protegidas contra la inducción de leucemia primaria de Friend durante las primeras tres semanas de vida. Luego, entre las 4 y 10 semanas la resistencia desaparecía, para luego retornar. Se postuló que habría pasaje de virus leucémico de la madre a las crías, contra el cual éstas últimas desarrollarían inmunidad activa. Esta hipótesis recibió confirmación al inmunizarse ratonas hembra con virus de leucemia de Friend inactivado con formol y observarse resistencia temprana a la inducción de leucemia primaria de Friend.

Posteriormente se demostró que el efecto protector sobre las crías se podía aumentar inoculando a las mismas con suero inmune al virus de leucemia de Friend poco después del nacimiento ( 372 ). También en este trabajo se observó que el suero de ratones inmunes a leucemia de Gross no inhibía la infectividad del virus de Friend en los ratones recién nacidos.

El grupo de Mathot investigó si los anticuerpos inducidos por el virus de leucemia de Friend en hembras de las cepas C57 y NCS vacunadas con células de leucemia de Friend alogeneica pasaban a la progenie por la vía placentaria o por la leche. Confirmaron los trabajos de Mirand ( 258 ), Wahren ( 372, 373 ) y otros ( 369 ), observando que la principal ruta para la transmisión de los anticuerpos era la leche materna.

Tanto en las ratas como en los ratones se ha visto que la infección con virus de leucemia murina es un hecho que depende de la edad, siendo el virus de leucemia de Gross sólo leucemogénico antes y poco después del nacimiento. Un cambio de completa susceptibilidad a resistencia total ocurre alrededor de las dos semanas de edad ( 8, 43, 132, 135, 181, 180, 213, 258, 299 ).

Con el objeto de transmitir resistencia a la inducción de leucemia primaria de Gross, Ioachim ( 182 ) inoculó a ratas hembras de las cepas Wistar/Furth, Sprague-Dawley y Long Evans con virus de leucemia de Gross infeccioso antes o durante la preñez. Las crías de estas ratas y otras controles se desafiaron con virus de leucemia de Gross entre el primer y cuarto día de edad. Se observó protección total en las ratas inmunizadas. Estos experimentos confirmaron en otros roedores resultados ya hallados en ratones ( 372, 373, 258, 44 ).

Para evitar el uso del virus de leucemia de Gross infeccioso, se efectuaron estudios con una vacuna inactivada con formol ( 183 ). Se inocularon ratas de las mismas cepas utilizadas en el trabajo anterior ( 182 ), observándose completa protección en las crías al ser desafiadas con el virus de leucemia de Gross infeccioso. Este resultado demostró claramente que el formol podía producir una vacuna efectiva sin alterar las propiedades antigénicas del virus, como ya se había logrado con el virus de leucemia de Friend ( 101 ) y el virus de leucemia de Rauscher ( 95 ). La gran ventaja era, que con el virus inactivado se eliminaba el peligro de una inducción ocasional de leucemia en la madre y el pasaje de virus infeccioso a la progenie ( 258 ).

Posteriores estudios sobre el mecanismo de transmisión de la inmunidad demostraron que las gamaglobulinas eran las moléculas responsables de este fenómeno, y las que prenatalmente a través de la placenta transmitían la inmunidad, como así también postnatalmente por medio de la leche materna ( 184 ).

Estos experimentos fueron confirmados y extendidos al modelo murino por Buffet y colaboradores ( 45 ). Se definió un período crítico en la vida del ratón HA/ICR Swiss neonato cuando la inhibición de la infección viral podía in-

fluenciar la enfermedad en la vida adulta. Se observó protección en los ratones amamantados por madres inmunizadas con virus de leucemia murina 334C infeccioso o por virus perteneciente al grupo serológico Friend-Moloney-Rauscher de leucemia murina.

El descubrimiento del virus de sarcoma de Moloney ( 259 ), permitió desarrollar una estrategia diferente de inmunización de ratones. Este virus es un pseudotipo producto de mezcla fenotípica entre virus de leucemia y de sarcoma, y será estudiado más detenidamente en el capítulo 6. Los trabajos de Fefer ( 88 ) con ratones de las cepas BaLB/c, C57 Bl/6 y CBF ( BaLB/c x C57 BL/6 ) permitieron demostrar que las células de sarcomas inducidos por el virus de sarcoma de Moloney ( VSM-M ) eran antigénicas en huéspedes histoincompatibles. El VSM-M, las células de sarcoma de Moloney, como así también las células de sarcoma irradiadas inducen resistencia al trasplante de un inóculo de sarcoma de Moloney singeneico. La inmunización con VSM-M infeccioso indujo resistencia contra leucemias de Friend, Moloney y Rauscher de trasplante, pero no contra dos leucemias largamente trasplantadas de otros orígenes ( agentes químicos y radiación ).

Un intento de ampliar y generalizar los resultados hallados hasta 1967 es el aporte de McCoy ( 253 ), quién estudió la inmunización de ratones BaLB/c y C57 con diversos pretratamientos : células leucémicas singeneicas de Friend, Moloney y Rauscher irradiadas, células leucémicas alogeneicas de Friend, Moloney y Rauscher o virus de leucemia de Rauscher infeccioso. Como ya se había observado en la cepa BaLB/c ( 26, 125, 249 ) se indujo una débil resistencia a las leucemias de pasaje Friend, Moloney y Rauscher, mientras que una fuerte resistencia en los ratones C57 Bl. Todas las leucemias utilizadas liberaban virus infeccioso, observándose que las que liberaban menor cantidad de virus eran las que eran mejores inmunógenos en la cepa BaLB/c.

El hecho de que hasta 1967 no había sido posible obtener líneas tumorales libres de virus leucémico infeccioso hacía difícil diferenciar el papel que jugaban los antígenos celulares y virales en la inducción de resistencia al trasplante. McCoy y colaboradores trataron de abordar el problema

observando si la presencia de virus infeccioso era necesaria para la inducción de resistencia al trasplante ( 252 ). Obtuvieron resistencia al trasplante de leucemia de Friend de pasaje pretratando ratones C57 BL/6 con virus de leucemia de Friend infeccioso ( 126 ) o con células de leucemia de Friend irradiadas que liberaban virus ( 253 ). Estos experimentos dejaron en claro que el virus infeccioso inducía resistencia en ratones C57 BL/6 al trasplante de leucemia de Friend mientras que el virus inactivado con formol y adyuvante no, a pesar que había trabajos que indicaban que inducía inmunidad serológica demostrada por ensayos de neutralización " in vivo " e " in vitro " ( 95, 101, 259b, 299 ) y por inmunofluorescencia ( 94, 274 ). Según estos investigadores los resultados serían explicables si la resistencia al trasplante fuera mediada por antígenos de trasplante inducidos en las células infectadas por el virus activo. Aparente confirmación aportaron los resultados con células de leucemia de Friend irradiada, donde sólo las que liberaban virus infeccioso indujeron una buena inmunidad.

En 1968, estaba bastante claro que las leucemias primarias o trasplantables inducidas por los virus de Friend, Moloney y Rauscher eran antigénicas en ratones, y que era posible prevenirlas por una serie de métodos ( 26, 125, 206, 253, 252, 264 ). No quedaba claro si el inmunógeno responsable de la inducción de la inmunidad era viral o celular, ya que todas las células de leucemias de FMR liberan virus infeccioso ( 252 ). Por otra parte, estudios serológicos habían demostrado que las leucemias inducidas por un dado virus del grupo FMR poseían antígenos comunes ( 206, 264 ). Sin embargo no se sabía si los antígenos responsables de la inmunidad serológica eran los mismos que operaban en la inducción de la resistencia al trasplante de leucemias.

El primer estudio completo de protección cruzada que involucraba la inmunización con los virus F, M y R y de Gross y sus respectivas leucemias contra el trasplante de leucemias de FMR y Gross fue el realizado por Glynn y colaboradores ( 126 ). Los trabajos anteriores habían sido incompletos ya que no abarcaban un estudio de protección cruzada entre leucemias ( 88, 26, 206, 253, 249 ). En estos experimentos se utilizaron ratones C57 BL/6 adultos y se los inmunizó con células de leucemias trasplantables singeneicas de FMR y de Gross irradiadas o con virus de leucemia F, M o R. En todos los casos se desafió a los

ratones inmunizados con células leucémicas de F, M, R o Gross singeneicas. Se observó una dada leucemia trasplantable FMR era capaz de inducir inmunidad contra si mismo y contra otras leucemias inducidas por los mismos virus, pero no contra leucemias trasplantables de Gross o inducidas químicamente. La inmunización con los virus de leucemia F,M y R demostró proteger contra el trasplante de leucemias de FMR pero no contra la leucemia de Gross de trasplante. Por otra parte el pretratamiento con células de leucemia de Gross no indujo resistencia al trasplante de leucemias FMR o Gross. En este trabajo no se realizaron estudios sobre la prevención de leucemias primarias por estos virus. Es importante aclarar que la cepa C57 BL/6 permitía la inducción de una fuerte respuesta inmune, lo que no es el caso de las cepas BalB/c y CDF1 tal como se había visto en trabajos previos de inmunización cruzada ( 26, 125, 253 ).

Los estudios sobre antígenos asociados con la replicación de los leucovirus, y los antígenos de trasplante no virales pero si codificados por el virus fueron muy difíciles de hacer, hasta que se obtuvieron líneas celulares infectadas solamente con virus de sarcoma murino. Estas líneas celulares no expresan virus infeccioso, ya que el virus de sarcoma que las infecta necesita de la presencia del virus de leucemia murina para completar su replicación. Experimentos rigurosos realizados por Stephenson y colaboradores ( 345 ) demostraron que inmunizando con células transformadas con virus de sarcoma de Moloney y simultáneamente infectadas con virus de leucemia de Rauscher era posible inmunizar a ratones BalB/c. Las células infectadas con virus de sarcoma de Moloney (VSM-M) no eran efectivos inmunógenos confirmando la necesidad del virus de leucemia para inducir inmunidad. En otros experimentos se utilizó virus de leucemia de Rauscher atenuado por radiación ultravioleta para vacunar ratones. Los ratones pudieron rechazar sólo células de cultivo de tejido infectadas con VSM-M si simultáneamente estaban infectadas con virus de leucemia de Rauscher. En base a estas observaciones se postuló que el antígeno de trasplante que inducía el rechazo estaba constituido probablemente por proteínas virales estructurales de alguna manera presentes en la superficie de las células infectadas.

#### ( ii ) Protocolos recientes de vacunación

A partir de 1972 se inicia una nueva etapa en la investigación de la prevención de la leucemia murina. Hasta ese momento la utilización de

células vivas o virus en diferentes preparaciones habían conseguido prevenir leucemias de pasaje y leucemias primarias, inclusive en ratas ( 211 ). Con el trabajo de Stephenson y colaboradores ( 345 ) quedó aclarado que era el virus de leucemia murina y no otros componentes de las células infectadas por el virus, el que inducía inmunidad a la leucemia en el ratón. Esta conclusión recibió confirmaciones por otros investigadores ( 360b, 327, 371a, 2 ).

A partir de 1973 se realizaron intensos estudios bioquímicos de los oncornavirus y se purificaron sus componentes principales. Como consecuencia de estos trabajos se publicaron una serie de experimentos donde se trató de prevenir leucemias murinas con partículas virales purificadas o subcomponentes virales.

El grupo de Schafer y colaboradores ( 169 ) purificó la glicoproteína gp71 de la envoltura del virus de leucemia de Friend y la utilizaron luego par vacunar ratones de la cepa endocriada STU, conjuntamente con adyuvante completo de Freund. Estos ratones pudieron resistir la inducción de leucemia primaria de Friend. Por falta de cantidad suficiente de glicoproteína gp71, no pudieron inmunizar una cantidad suficiente de ratones pero los resultados preliminares indicaban una fuerte protección.

Para experimentos de inmunización pasiva utilizaron antisueros monoespecíficos preparados en conejo o cabra ( heterólogos ), observándose que el antisuero gp71 podía prevenir el desarrollo de leucemia primaria de Friend, aún cuando se inoculaba una semana postinfección con virus de leucemia de Friend. De estos resultados se pudo concluir que la inmunización contra leucemia inducida por un leucovirus podía ser lograda por un componente viral único y bien definido.

Es importante destacar que a pesar de realizarse numerosos intentos de prevenir leucemias primarias y trasplantables no fue posible obtener resultados positivos en prevenir la leucemia espontánea del ratón. El concepto que el ratón era tolerante a sus virus endógenos cambió al descubrirse que existían respuestas humorales y celulares a los mismos ( ver capítulo 4 y 171, 155, 172, 163, 244 )

Huebner y colaboradores intentaron protocolos de vacunación que aumentaran la actividad inmunológica natural en los ratones contra sus virus endógenos ( 166 ). Con ese objetivo se vacunaron ratones hembra de las cepas NIH Swiss, C57 L, BaLB/c y SWR de baja expresión de virus endógeno con virus de leucemia de Gross inactivado con formol y radiaciones . Luego estas hembras vacuandas fueron cruzadas con machos de la cepa AkR, de alta incidencia de leucemia espontánea para hacer posible la transferencia de inmunidad específica de tipo materna a la prole F1 y ver si había inhibición de la expresión del virus endógeno. Se estudió la presencia de virus leucémico en las crías a los 40 días de edad, observándose fuerte supresión de la expresión de los virus endógenos en todos los ratones F1 estudiados. No se observaron los efectos de este protocolo sobre la incidencia final de leucemias espontáneas en los híbridos F1. Estudios previos por otros autores , claramente indicaban el rol oncogénico de virus de leucemia murina endógeno ecotrópico ( 254, 233, 156 ). Se observó una directa correlación entre los títulos de virus endógeno en edad temprana, detectado en los tejidos del huésped todavía normal, y la incidencia de leucemias y otros tumores más tarde en la vida.

En otro trabajo, Huebner obtuvo éxito en proteger ratones de la cepa AkR/J inoculándolos poco después de nacer con antisuero específico contra el virus de leucemia AkR endógeno preparado en cabras - suero heterólogo - ( 167 ). Con este protocolo usándose IgG inmune al virus de leucemia endógena de ratón AkR hubo un total de 20% de casos de leucemia en los ratones inmunizados, contra un 83,3 % en los controles luego de 365 días de observación. En otro protocolo además del suero inmune se vacunó a los ratones AkR con virus de leucemia de Gross inactivado por radiación y posteriormente con una vacuna de virus de sarcoma de Gross infeccioso. Esta inmunización combinada produjo significativa supresión de virus hasta los 288 días de vida. A los 300 días de vida, un 60% de los ratones controles había muerto, mientras que sólo un 4,2 % de los ratones inmunes desarrollaron leucemia fatal. Estos experimentos demostraron de una manera clásica, por medio de inmunosupresión específica de tipo, el rol determinante de los virus endógenos en la leucemogénesis, y al mismo tiempo demostraron la posibilidad de la total prevención de la leucemia en los ratones AkR.

Otros investigadores del grupo de Huebner, realizaron un estudio muy minucioso sobre la vacunación contra tumores espontáneos en el ratón (197 ). Para ello utilizaron las cepas BaLB/c y NIH Swiss, de baja incidencia de leucemia espontánea. En estos ratones se ha detectado la expresión de antígenos de oncornavirus leucémicos, pero muy poca expresión de virus infeccioso, y si no se poseyera los reactivos o medios para detectar expresiones virales subinfecciosas o parciales, estos modelos se asemejarían muchísimo a la neoplasia espontánea del hombre. Antes de intentar vacunar contra la leucemia espontánea, desarrollaron métodos para poder seguir las respuestas humorales y celulares y poder "a posteriori" correlacionar un posible efecto antileucémico con algún parámetro inmunológico.

Se prepararon vacunas con virus de leucemia de Rauscher ( VLM-R ) y con virus de leucemia de Gross ( VLM-G ) inactivados con formol, y se estudió su efectividad contra la inducción de leucemia primaria como ensayo previo al uso de estas vacunas contra la leucemia espontánea. Observaron fuerte protección en ratones BaLB/C inmunizados con VLM-R formolizado al desafío con VLM-R infeccioso y un virus de BaLB/c de ocurrencia natural en la cepa. Estos autores hicieron un análisis acerca del tipo de vacuna viral que sería el más útil y práctico en estudios de prevención de leucemias espontáneas que necesariamente son de larga duración. Consideran que el trabajo realizado con las vacunas inactivadas parece satisfactorio, pero sin embargo las ventajas potenciales de una vacuna viva, como lo son su costo y posible potencia deben ser considerados. Estas ventajas, resultan para estos investigadores, ser superadas por la inseguridad acerca de la oncogenicidad y propiedades inmunosupresoras informadas para los leucovirus ( 260 a ). Sin embargo llaman la atención al peligro de hacer demasiadas generalizaciones, ya que estas afirmaciones en su mayoría se han hecho basado en cepas virales de laboratorio, que en general son mucho más oncogénicas que las cepas naturales.

La posibilidad de utilizar la glicoproteína gp71 aislada de viriones de leucemia murina, y sus antisueros específicos como medio para inmunoprevenir la leucemia ( 169 ), fue estudiado más detenidamente por Ihle y sus colaboradores ( 175, 176a, 176B ). Estos investigadores estudiaron la respuesta inmune en ratones BaLB/c, C57 B1/6 y AkR para correlacionar esos parámetros con el desarrollo

de protección a una variedad de leucemias, incluyendo aquellas inducidas por virus, irradiación, agentes químicos y las espontáneas.

Se observó que el protocolo de inmunización jugaba un rol importante en determinar la naturaleza de la respuesta inmune. En ratones BaLB/c inmunizados con gp71 no se observó protección contra la inducción de leucemia de Moloney de trasplante. Se supuso que la dosis de gp71 utilizada para inmunizar no había sido suficiente, como además el hecho que estos ratones tienen en general una respuesta inmune más débil. Tanto en ratones BaLB/c, como en los C57 BL/6 la gp71 indujo una fuerte respuesta específica de tipo. En los ratones c57 Bl/6 la respuesta inmune a la gp71 indujo secundariamente la expresión de los antígenos del virus endógeno. El mecanismo responsable para esta activación no fue establecido. Se estudió el efecto de la inmunización con gp71 en un sistema de máxima expresión de virus endógeno, como lo es el ratón AkR. Los controles no inmunizados o los ratones inmunizados solamente con adyuvante completo de Freund empezaron a morir de leucemias alrededor de los 6-7 meses de edad. A los 10 meses aproximadamente el 50% de cada grupo estaba muerto por leucemia espontánea. Similarmente, los ratones inmunizados con gp71 de VLM-F empezaron a morir a los 6 meses, pero en contraste con los controles a un ritmo significativamente mayor, tal que a los 7-8 meses el 50% estaba muerto y a los 10 meses el 90%. Estos resultados demostraron que la inmunización con gp71 de VLM-F no afectaba el tiempo de aparición de las leucemias, pero si el ritmo de mortalidad. En conclusión, la inmunización activa con gp71 no era efectiva para prevenir la leucemia espontánea en el ratón AkR o la leucemia inducible por radiación en el ratón C57 Bl/6.

Otro protocolo muy estudiado, fue el sugerido por los trabajos de Hunsmann y colaboradores en 1975 ( 169 ). Schafer y colaboradores estudiaron la efectividad de antisuero heterólogo contra las gp71, p12 y p15 del virus de leucemia de Friend ( VLM-F ) sobre la inducción de leucemias primarias por VLM-F y VLM-R ( Rauscher ) en ratones de la cepa STU ( 316 ). Sólo observaron que el antisuero anti gp71 era efectivo. Probablemente la efectividad fuera mayor porque el suero actuaría sobre el virus y la célula infectada, en cambio el antisuero anti p15 actuaría sólo sobre el virus, mientras que el anti p12 lo haría exclusivamente sobre la célula infectada. Se observó protección a largo plazo con este

tratamiento y falta de efectos patológicos sobre el ratón como consecuencia del tratamiento con anticuerpos.

El éxito obtenido con el protocolo que empleaba anticuerpos heterólogos anti-gp71 de VLM-F contra virus leucémogenos exógenos inspiró otros experimentos contra la leucemia murina endógena en ratones AkR ( 326 ). En ellos se observó protección efectiva contra la aparición de leucemias espontáneas en ratones AkR inoculados con antisuero entre los 3 y 45 días de edad. Quedó bien establecido que el tiempo en que se efectuaba el tratamiento era la variable de máxima importancia para el éxito de la prevención. Si se aplicaba el suero por encima de los dos meses ya no existía protección significativa. En estos experimentos no se efectuaron estudios de sobrevida completos. Schafer ha hecho recientemente una excelente revisión de todos estos trabajos ( 317 ).

Una extensión de esta línea de investigación es el trabajo de Gardner y colaboradores ( 119 ). Ellos trataron de aplicar los resultados hallados con los sueros heterólogos en ensayos con cepas murinas de laboratorio, a la leucemia murina del ratón salvaje ( Mus Musculus ). En estos ratones el virus de leucemia murina se trasmite primariamente de una manera vertical trasplacentariamente o por la leche y replica a alto título en las vísceras y el suero al tener los ratones dos semanas de edad ( 118, 210 ). La población de virus de leucemia murina en estos ratones consiste de una mezcla de dos clases diferentes de virus: ecotrópicos ( con tropismo por células murinas ) y positivos en el ensayo XC " in vitro ", y anfotrópicos ( con tropismos para muchas células en cultivo de tejido ) y negativos en el test XC ( 290, 150, 39 ). Un ensayo de vacunación activa de ratones adultos salvajes contra esa población viral falló probablemente por ser ineficiente la respuesta humoral a estos virus ( 210 ).

En otro experimento se preparó un antisuero heterólogo en cabras contra estos virus inoculándose ratones salvajes adultos con el suero entero o con la fracción IgG sóloamente. Se observó una marcada reducción del título de virus en el suero de ratones tratados de esta manera, siendo levemente más efectivo el tratamiento con IgG sóloa. Pasados los 5 meses, sin embargo, se perdió

el 50% de esta protección, sugiriendo los datos una necesidad de antisuero por períodos más prolongados para hacer efectivo el tratamiento.

Con esta revisión queda actualizado hasta fines de 1977 el progreso en el campo de la prevención de la leucemia murina por medio de técnicas inmunológicas. Nuestro trabajo de investigación se inició en 1975, cuando muchos de los últimos resultados, verdaderamente auspiciosos, aún eran desconocidos.

## 6) EL VIRUS DE SARCOMA MURINO

### a) Sus características principales

El virus de sarcoma murino ( VSM ), es un oncornavirus que induce tumores sólidos en una variedad de huéspedes mamíferos y puede transformar células normales de muchas especies " in vitro ". No es una entidad única, pues depende de la presencia de un virus de leucemia murina o " helper " para su replicación, su antigenicidad y su tropismo. Por esa razón, se lo ha llamado complejo viral murino sarcoma-leucemia. A pesar de existir tres tipos principales de virus de sarcoma murino, el virus de sarcoma de Harvey ( 151 ), el de Kirsten y Mayer ( 203 ) y el de Moloney ( ( 259c ), el más estudiado es el aislado por Moloney.

El origen de este virus está poco documentado. Aprentemente el virus de sarcoma de Moloney ( VSM-M ) derivó de " ... sarcomas que aparecieron en ratones BalB/c inoculados con altas dosis de virus de leucemia de Moloney ... " ( 259c ). Luego de pasaje continuado el virus indujo sarcomas en el sitio de inoculación en un 100% de los ratones receptores en un lapso de 35 días.

Se han determinado las propiedades físicas del VSM-M. Es inactivado por calor a 56°C y en 30 minutos , por eter y cloroformo, siendo estable a - 70°C. Es un virus ARN ( 333, 30 ) con el mismo tamaño ( 242 ) e igual densidad ( 1,16 g/ml ) que otros oncornavirus del grupo de leucemia murina. Los estudios serológicos confirman que este virus posee antígenos internos ( llamados gs ) en común con los que definen específicamente a todo el grupo de virus de leucemia

murina ( 165, 209 ). Es neutralizado por antisueros producidos contra los virus individuales de leucemia murina de Moloney, Friend y Rauscher, indicando identidad entre los antígenos específicos de grupo de las envolturas virales ( 259c, 165, 148, 88, 223 ). A pesar que Fefer y colaboradores ( 89 ) encontraron que la oncogenicidad de VSM-M era efectivamente neutralizada por antisuero de rata anti-Gross, existe alguna duda sobre la especificidad de ese suero ( 226b ).

#### b) Patología de los tumores inducidos por VSM-M

Los sarcomas son la lesión que tipifica la infección "in vivo" por VSM-M. Aparecen rápidamente en ratones recién nacidos ( 3 a 4 días ) los cuales mueren de 2 a 4 semanas más tarde. En adultos regresan espontáneamente en aproximadamente 23 a 28 días dejando a los ratones sin lesiones tumorales macroscópicas.

El VSM-M tiene un tropismo por el tejido muscular, provocando tumores locales masivos si se lo inoculara neonatalmente en el músculo de la pata del ratón. Inoculado intraperitonealmente el virus actúa más lentamente y la aparición de tumores se restringe a tejido muscular. Diluyendo al virus, o usando huéspedes mayores se reduce la incidencia de tumores, los cuales se desarrollan en forma más circunscripta. Los tumores inducidos en ratones muestran cierta resistencia al trasplante en huéspedes singeneicos, lo que ha llevado a algunos autores a cuestionar la naturaleza neoplásica de estos tumores.

Debido a que los tumores inducidos por VSM-M inoculado intramuscularmente crecen tan rápidamente aparecen frecuentemente localizados, a pesar de alcanzar un enorme tamaño. Si el virus es diluido o inoculado en ratones por la vía subcutánea-intramuscular, los tumores pueden extenderse a los músculos de la cabeza, cuello, tórax, y el diafragma ( 279, 334 ).

Moloney ( 259c ) y Perk ( 279 ) clasificaron histológicamente a estos tumores murinos como rabdomiosarcomas, dominados por células parecidas a mioblastos algunas con estriaciones distintivas. Otros autores, sin embargo

ponen mucho menos énfasis en su origen de músculo estriado, describiendo hemangiosarcomas y sarcomas de células mesenquimáticas en las cuales predominan células indiferenciadas, fusiformes ( 343, 21, 332 ).

La respuesta inmediata a la infección es una reacción inflamatoria en el punto de inoculación con neutrófilos, linfocitos y tejido granulomatoso permeando las capas subcutáneas y el músculo. La lesión luego se hace una masa organizada de tejido irregular granulomatoso conteniendo histiocitos, fibroblastos y células mesenquimáticas atípicas grandes con varios núcleos y citoplasma poligonal. En esta etapa del desarrollo las lesiones han sido denominadas " granulomas atípicos " ( 334, 343 ). Existe sobre este tema una discusión considerándose la lesión descrita que representa un aspecto del proceso secuencial neoplásico ( 65 ). Otros investigadores han afirmado que la mayoría de tumores inducidos por VSM-M son de este tipo y han sugerido que su presencia adicional en lugares distantes como el bazo, nódulos linfáticos, hígado y órganos reproductores indica diseminación del virus más que distribución de células neoplásicas ( 343 ). La utilización de una línea de sarcoma de Moloney trasplantable que posee un juego de cromosomas " marker " ha permitido observar que muchas de las diseminaciones " in vivo " del sarcoma son verdaderas metástasis, mientras que en muy pocos casos estos nuevos sarcomas son producto de infección viral ( 309 ).

Los ratones de la mayoría de las cepas de laboratorio son susceptibles al VSM-M y desarrollan tumores progresivos y letales . Excepcionalmente en algunas cepas, notablemente la cepa C57 B1 ( 88, 86, 223 ) o con bajas dosis de virus ( 296, 34, 297 ) una gran proporción de estos tumores puede regresar. Por contraste, la mayoría de los tumores inducidos en ratones adultos jóvenes regresan completamente ( 296, 86, 90, 223, 92, 297, 120 ). Algunos pueden reaparecer más tarde desarrollándose en sitios diferentes a los del tumor primario ( 296, 297, 120 ).

Una esplenomegalia suave a moderada es asociada a la infección por VSM-M de ratones recién nacidos o destetados. Esta se debe a hiperplasia generalizada del bazo con preservación de la arquitectura normal ( 279, 21 ) o a hiperpla-

sia reactiva de las células reticulares con invasión de un tejido de granulación infiltrado con leucocitos y células mesenquimáticas atípicas desparramadas ( 343 ). El peso de los bazo calculado relativo al peso del cuerpo muestra una curva bimodal similar a la de ratones destetados controles entre los 12 y 28 días postinfección ( 34 ). También ocurre una hepatomegalia de etiología indeterminada en ratones infectados por VSM- M ( 280 ).

A pesar del hecho que el VSM-M deriva originalmente de ratones infectados con virus de leucemia murina, no hay mucha información acerca de animales leucémicos en observaciones prolongadas ( 152 ). Se ha publicado la observación que ningún ratón infectado al nacer con VSM-M o inoculado con células tumorales al destete se hacía leucémico ( 279, 259c, 281 ). Sin embargo en un experimento dos ratones BaLB/c se observaron con leucemia linfocítica, 8 meses después de la infección con VSM-M ( 281 ). Más aún una proporción de ratones adultos tratados con rayos X antes del trasplante tumoral, o tratados con suero antilinfocítico antes de la infección, desarrollaron neoplasias linfoides ( 223 ).

La microscopía electrónica ha permitido una mayor caracterización de este virus y a su patología. La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que las partículas identificadas por el microscopio electrónico se asemejan a los leucovirus característicos y responsables de la leucemia murina, tal como los definiera Bernhard ( 25, 23 ). Tienen aproximadamente 100 nm de diámetro y consisten de una membrana externa y un nucleoide central que mide aproximadamente de 50 a 60 nm. Se han descrito pequeñas espículas sobre la superficie de la envoltura del virión. El virus se replica brotando de las superficies celulares. Por lo tanto el VSM y los Virus de leucemia murina ( VLM ) conocidos son visualmente casi idénticos, y como VSM y VLM están asociados " in vivo ", es imposible decidir morfológicamente si una partícula lleva el genoma sarcomagénico o no.

Se han visto partículas C en los tumores diafragnáticos, subcutáneos y de la pata de los ratones ( 63, 225, 99 ). Se las encuentra en los intersticios entre las células tumorales, en sus membranas plasmáticas y a veces en las vacuolas citoplasmáticas. No se pudieron hallar partículas en los megacariocitos esplénicos o nódulos linfáticos de ratones con tumores primarios inducidos por preparaciones convencionales conteniendo VSM-M a pesar que el virus pudo recuperarse por bioensayo del bazo ( 63, 225 ).

Partículas mucho menores, similares al virus de láctico dehidrogenasa han aparecido ocasionalmente en los sarcomas primarios de VSM-M ( 63 ) y en los bazos de algunos ratones con trasplantes tumorales ( 281 ). Tienen aproximadamente 50 nm de diámetro teniendo un nucleoide de 30 nm y se acumulan en las cisternas de las células, que contienen muchas vesículas de doble membrana.

En la mayoría de los estudios ultraestructurales de tumores inducidos por el VSM-M, se describen dos tipos de células ( 63, 225, 281, 99 ). Una es ovoide o elongada con un núcleo excéntrico generalmente reflejando la forma de la célula y con profundas indentaciones. La otra es mucho mayor, conteniendo muchos núcleos con perfiles circulares- probablemente la célula multinucleada gigante observada con el microscopio óptico. El citoplasma de ambas posee numerosas mitocondrias, ribosomas y fibrillas. El complejo de Golgi puede estar más o menos desarrollado.

El diagnóstico histológico de rhabdomyosarcoma para estos tumores es apoyado por otros investigadores ( 63, 22 ) en base a la evidencia al microscopio óptico de periodicidad y bandas Z de las fibrillas citoplasmáticas .

### c) La inmunología de los tumores inducidos por VSM-M

La evidencia patológica descrita ha demostrado que la edad y la cepa de ratones receptora, como también la dosis viral usada, determina el tipo de infección que produce el VSM-M. El hecho que los tumores crezcan progresivamente en ratones infectados al nacer ( 86, 223 ), pero que regresen en ratones adultos ha indicado la presencia de factores probablemente inmunológicos. Hay muchas evidencias de una participación del sistema inmune: los efectos de la inmunosupresión por radiación ( 87 ), el efecto de la cortisona ( 314 ), la ciclofosfamida ( 91 ), el suero antilinfocítico ( 222 ), o la timectomía ( 223 ), que han aumentado la frecuencia de tumores de crecimiento progresivo.

La caracterización de la respuesta inmunológica del sistema VSM-M en el ratón ha abarcado varias líneas de investigación, siendo actualmente el sistema

tumoral más estudiado. Se ha demostrado que los tumores inducidos por VSM-M son antigénicos en ratones singeneicos. Se ha inmunizado a ratones con células de sarcoma de Moloney alogeneicas , sarcomas singeneicos irradiados o directamente con el VSM-M. Estos ratones han podido resistir el pasaje de sarcomas de Moloney trasplantables y leucemias trasplantables inducidas por virus de la leucemia murina de Friend, Moloney y Rauscher ( 88, 223, 57, 212, 224 ).

Por otra parte, se ha demostrado que existen antígenos de trasplante específicos en las células de sarcoma de Moloney y que estos antígenos dan reacción cruzada con los antígenos celulares inducidos por otros virus de leucemia murina. Estos datos fueron confirmados por experimentos serológicos ( 57 ). Sin embargo, en la mayoría de estos experimentos la inmunización fue realizada con virus o con células que liberaban virus infeccioso, por lo que fue imposible decidir si la respuesta inmune observada era dirigida contra el antígeno del virión o contra un antígeno celular inducido por el virus. Este problema ha sido resuelto experimentalmente ( 345 ).

El sistema del VSM-M ha sido sumamente valioso para los estudios sobre el rol de los factores inmunológicos en el control del crecimiento tumoral. A pesar de que el mecanismo intrínseco responsable de la regresión tumoral en este sistema no ha sido definido todavía ( 40 ), la experimentación " in vitro " e " in vivo " ha demostrado la presencia de un número de factores inmunológicos.

Se ha estudiado la respuesta humoral de ratones inoculados con células de sarcoma de Moloney irradiado o con VSM-M. Los sueros demostraron reacción específica con células viables de sarcoma de Moloney y con células leucémicas inducidas por virus de leucemia murina ( 40, 88, 86, 87, 370, 57, 159 ).

En general, la producción de anticuerpos, detectada " in vitro " por inmunofluorescencia se ha observado asociada a la regresión de tumores primarios o a la resistencia de células tumorales trasplantadas. Sin embargo, está ausente o es mínima en ratones adultos irradiados, cuyos tumores crecen progresivamente ( 87, 86 ). Las diferentes cepas murinas, la carga antigénica ( dosis

de virus o células ) y el período de observación, pueden confundir tanto la situación que ha sido difícil relacionar correctamente la producción de anticuerpos con la presencia o ausencia de tumores o la regresión tumoral ( 86 ).

El pasaje de anticuerpos por inoculación de suero inmune " in vivo " previene la inducción de tumor o suprime parcial o totalmente el crecimiento de de sarcomas primarios de Moloney ( 40, 157, 223, 42, 91, 278b ). Esto ha indicado que el anticuerpo humoral tendría alguna significación " in vivo " con respecto a la regresión tumoral espontánea. También se ha observado que el crecimiento de células tumorales incubadas con suero inmune antes del trasplante puede ser demorado, inhibido, no afectado o aún exacerbado ( 87, 41, 42 ).

En un estudio reciente se ha seguido la respuesta de anticuerpos en ratones BaLB/c luego de la inoculación de VSM-M ( 218 ). Se observó que la respuesta era bifásica. El primer pico de respuesta ocurría alrededor de los 10 días posteriores a la infección viral y se extendía hasta los 15 días coincidiendo con el pico de crecimiento tumoral. Veinte días después de la primoinoculación en el suero regresor temprano el título de anticuerpos bajaba al correspondiente a un suero normal, seguido por un progresivo aumento que persistía en los ratones regresores viejos durante más de 6 meses. Se observó actividad en las fracciones 7 S y 19 S en sueros de los días 10, 15 y 30 y en los regresores tardíos ( 218 ).

Los anticuerpos de los ratones regresores pudieron proteger contra células tumorales singeneicas trasplantables ( 278b ) como también inducir la regresión de tumores primarios ( 91 ). El mecanismo de acción de los anticuerpos " in vivo " aún se desconoce. Sin embargo el análisis que más ha progresado es el " in vitro ", y en éste y otros sistemas se han definido varios mecanismos que pueden actuar conjuntamente para producir la observada alta incidencia de regresión espontánea de estos tumores.

Por un lado, los anticuerpos neutralizantes de virus ( 90, 278b, 218 ) pueden evitar que los viriones liberados por las células tumorales infecten y transformen nuevas células y permitiendo al mismo tiempo, que los mecanismos

celulares destruyan el tumor. En segundo lugar, la citólisis dependiente de complemento sérico, puede jugar un rol directo en disminuir la masa tumoral. También el complemento activado puede servir para reclutar a células linfoides efectoras al sitio del tumor via sus receptores de complemento ( 375 ). Otro mecanismo es que los anticuerpos unidos al tumor puedan reclutar células efectoras por los receptores Fc ( 282, 240, 164 ). Por último, los linfocitos de un ratón normal pueden ser activos contra células de sarcoma de Moloney " in vitro " en presencia de suero inmune anti- VSM-M ( 283 ).

También se ha estudiado la respuesta inmune celular en ratones infectados con VSM-M. Los primeros experimentos de transferencia de células linfoides sensibilizadas determinaron que las células inmunes jugaban un rol " in vivo " en la patogénesis que inducía el VSM-M. Células de bazo o ganglio linfático de ratones BalB/c portadores de tumores regresores o inmunizados con suspensiones de sarcoma de Moloney, prevenían la inducción de tumor ( 370 ), o causaban que los tumores primarios regresaran en un número variable de receptores singeneicos ( 91, 92, 159, 157 ). Inóculos conteniendo  $1 \times 10^7$  a  $2,8 \times 10^8$  células inmunes eran efectivos, pero el tamaño de la masa tumoral primaria tratada era el factor crítico. Además se ha observado que células de sarcoma de Moloney preincubadas con células esplénicas inmunes no crecían cuando eran subsecuentemente trasplantadas, aún en huéspedes muy susceptibles por la radiación ( 87 ).

Utilizando un ensayo de inhibición de colonias modificado " in vitro " se encontró que las células de los ganglios linfáticos de los ratones dadores con tumores regresores específicamente inhibían el recimiento de células de sarcoma de Moloney cultivadas " in vitro " ( 157, 159 ). Pero curiosamente los linfocitos de ratones portadores de tumores primarios progresores eran también inhibitorios. Por lo tanto, paradójicamente, los tumores pueden aparentemente continuar creciendo a pesar que sus huéspedes pueden reaccionar inmunológicamente contra ellos. En experimentos posteriores, se ha demostrado que el suero de ratones con tumores progresores aparentemente protege las células de sarcoma del ataque de linfocitos sensibilizados ( 158, 160 ).

Se ha estudiado "in vitro" la respuesta de los linfocitos de ratones

BaLB/c durante todo el curso del crecimiento y regresión de un sarcoma inducido por VSM-M ( 216 ). Se observó que la citotoxicidad de los linfocitos aparecía a los dos días post infección con VSM-M aún cuando el tumor no era clínicamente detectable. Los animales portadores de tumor tenían linfocitos muy poco activos. No hay aún explicación para la falta de reactividad de los linfocitos de huéspedes portadores de tumor, pero para explicar este fenómeno se han sugerido dos posibilidades. Una es que todos los linfocitos reactivos estén agregados en el tumor ( 257 ). La segunda, es que los linfocitos estén inactivados por una sobrecarga antigénica pues estos tumores liberan virus ( 90 ).

En un trabajo reciente, se han caracterizado las subpoblaciones de células linfoides para estudiar más específicamente su actividad en la respuesta inmune a sarcoma de Moloney ( 217 ). Se observó que los linfocitos B y T tenían muy poca actividad si se tomaban del animal infectado con VSM-M en el momento del pico del crecimiento del sarcoma primario. Nuevamente surgió como explicación de este fenómeno las posibilidades mencionadas en el párrafo anterior.

La población de linfocitos T pareció tener un pico de actividad antes del desarrollo tumoral y luego de la regresión del mismo. Luego decaía rápidamente al finalizar la regresión tumoral. El hecho de que las células T fueran activas células efectoras citotóxicas no es sorprendente, ya que han sido demostradas en sistemas de trasplante donde la inmunización se ha hecho a través de barrera de histocompatibilidad mayor ( 50, 127 ). La respuesta de los linfocitos B también comenzaba temprano luego de la infección con VSM-M y se encontraba deprimida al pico del crecimiento tumoral, como la actividad de los linfocitos T, y luego aumentaba con la regresión tumoral, permaneciendo alta durante largo tiempo. Estudios de ratones regresores demostraron que la actividad de los linfocitos inmunes " in vitro " contra células portadoras de antígeno de virus de leucemia murina era dependiente de los linfocitos B que interactuaban con anticuerpo para efectuar la lisis de las células tumorales ( 219 ).

Experimentos recientes en ratones " nude " que son naturalmente atímicos han demostrado que no hay respuesta contra tumores inducidos por VSM-M ( 66 ) en estos animales. Estos datos demuestran que son necesarias las células T que provee el timo, para una efectiva respuesta antitumoral.

B- PARTE EXPERIMENTAL

## 1. INTRODUCCION

### Propósito de nuestro trabajo

El propósito de nuestro trabajo de experimentación fue doble. Por una parte se intentó crear un modelo de vacunación contra leucemias murinas tanto en sus formas exógenas ( leucemias trasplantables y primarias ) como endógenas ( leucemias espontáneas ). En segundo lugar, se deseaba llegar a un concepto unificador acerca de los diferentes leucovirus que inducen la enfermedad en el ratón.

Como ya lo hemos mencionado, no existía un modelo de referencia para todos los trabajos de inmunoprevención realizados ( ver capítulo 5 de la parte A de este trabajo ). El modelo que se propuso con nuestro trabajo era utilizar el virus de sarcoma de Moloney ( VSM-M ), como inmunógeno activo y ensayar su efectividad contra una serie de leucemias exógenas ( trasplantables y primarias ) y luego contra leucemias endógenas ( espontáneas ) pertenecientes a la Sección Leucemia Experimental de la Academia Nacional de Medicina .

El virus del sarcoma de Moloney ( VSM-M ) ha sido bien caracterizado, y se ha realizado una descripción minuciosa de sus propiedades más importantes ( ver capítulo 6 de la parte A de este trabajo ). Lo que claramente se observa es que si bien no es posible diferenciar este virus morfológicamente de un virus leucémico, presenta propiedades definidas que lo diferencian.

Patológicamente es un virus que muestra un tropismo diferente que los virus leucémicos, ya que afecta preferentemente al músculo y no a los tejidos hematopoyéticos. Esta diferencia es de suma importancia ya que usando virus leucémicos infecciosos o atenuados existe la posibilidad al menos teórica que la vacuna desencadene la enfermedad.

Antigénicamente se ha observado que el VSM-N pertenece al grupo de virus de leucemia murina Friend, Moloney y Rauscher, ya que induce los antígenos de este grupo ( FMR ) en las membranas celulares de células infectadas. También

serológicamente se ha observado que existe gran similitud entre los antígenos de la envoltura y otros componentes estructurales del VSM-M y los virus leucémicos. Esto es comprensible pues, como se ha explicado, el virus de sarcoma es un virus defectivo, que no puede replicarse por sí sólo, y necesita de la presencia de un virus leucémico para formar pseudotipos, con las envolturas que estos últimos aportan a los primeros. Se forman verdaderas mezclas fenotípicas presentando el virus de sarcoma la antigenicidad que corresponde al virus de leucemia que replica con éste.

Estudios serológicos del virus de sarcoma de Moloney, demostraron la presencia de antígeno de Gross en el virión ( 89 ). La posibilidad que este antígeno se exprese también en células infectadas por VSM-M y forme parte del antígeno de trasplante permitiría el uso del VSM-M como inmunógeno no sólo contra leucemias pertenecientes al grupo Friend-Moloney -Rauscher, sino también contra leucemias del grupo Gross. Esto se consideró un dato de sumo interés ya que las leucemias endógenas son Gross positivas y sería teóricamente factible inmunizar a ratones contra las mismas utilizando el VSM-M.

Los tumores inducidos por VSM-M son sarcomas de tejido muscular que en ratones adultos crecen hasta alcanzar un tamaño considerable y luego regresan completamente hasta dejar el animal sin signo de enfermedad y tumor alguno. Es decir, es un tumor que desaparece espontáneamente. Como ya hemos visto en el capítulo 6 de la parte A de este trabajo, el sarcoma de Moloney es un tumor muy estudiado tanto patológica como inmunológicamente.

Estas características tanto del VSM-M como de los sarcomas inducidos por este virus, hicieron pensar que se tenía un sistema bastante definido respecto de varios parámetros, que podía ser utilizado como modelo para estudios extensos en inmunidad contra leucemias murinas.

Por otra parte ya hemos visto en el capítulo 3 de la parte A de este trabajo, que los oncornavirus presentan una variabilidad grande inter e intraespecífica. Esta variabilidad que se expresa molecularmente en diferentes aminoácidos en las proteínas estructurales de los viriones y antigénicamente

en los grupos serológicos ya definidos, nos hizo pensar que si bien pudiera haber existido un antecesor viral único, la evolución ha hecho diferenciar subgrupos. Sin embargo estos subgrupos, diferenciables por medio de técnicas serológicas sofisticadas en algunos casos, podrían no reflejar antígenos de grupo comunes en todos los leucovirus murinos, relacionados de alguna manera aún desconocida con el antígeno tumoral específico de trasplante. Si esto fuera así sería teóricamente posible proteger contra todas las leucemias tanto exógenas y endógenas con una vacuna única.

Nuestro trabajo ha buscado por medio de la técnica de trasplante " in vivo " contestar a este interrogante, de tanta importancia para la inmunoprevención de la leucemia murina.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### a) Ratones

El estudio de vacunación contra leucemias trasplantables y primarias se realizó con ratones de la cepa endocriada BaLB y Swiss provenientes de las colonias de producción de la Sección Leucemia Experimental de la Academia Nacional de Medicina, donde se efectuaron estos experimentos.

Para el estudio de inmunización contra leucemias espontáneas se utilizaron ratones de las cepas AkR, Swiss e híbridos F1 ( Swiss x AkR ).

Todos los animales tenían aproximadamente dos meses de edad al ser vacunados, utilizándose ratones de ambos sexos indistintamente, siempre que fuera posible su obtención de las colonias de producción. Cada ratón fue individualizado por las técnicas habituales para hacer posible su seguimiento en los estudios de larga duración.

## b) Virus leucémicos

Se describirán brevemente los diferentes virus utilizados.

Virus de leucemia de Friend ( VLM-F ) : Este virus fue originalmente aislado por Charlotte Friend ( 100 ). El sobrenadante de un centrifugado de carcinoma de Ehrlich, inoculado en ratones recién nacidos de la cepa Swiss llevó al desarrollo de una marcada esplenomegalia en el lapso de dos semanas. Aproximadamente el 85% de los ratones inoculados enfermaron en un período de 15 a 100 días. Inicialmente se mantuvo a esta leucemia por pasajes celulares pero se observó que filtrados esplénicos de los animales leucémicos resultaban igualmente activos. El tipo de neoplasia producida por el virus de leucemia de Friend es una leucemia eritroblástica o eritroleucemia. Macroscópicamente los animales leucémicos presentan una gran esplenomegalia con escaso o ningún compromiso de los ganglios linfáticos.

Aparentemente las preparaciones comunmente denominadas como virus de leucemia de Friend, están constituidas por dos componentes: el virus formador de focos esplénicos ( spleen focus forming virus: SFFV ) y el virus de leucemia linfática ( lymphatic leukemia virus : LLV ). El SFFV es un virus defectivo que no puede completar su replicación sin la presencia de LLV, sirviendo este último como helper (230 ).

El VLM-F utilizado en este trabajo se obtuvo de la American Type Culture Collection, Rockville, Md. U.S.A. , perteneciendo al lote 245 N°5.

Virus de leucemia de Rauscher (VLM-R ): Este virus leucémico fue aislado por el Dr. Rauscher en 1962 ( 293 ) de ratones BalB/c tratados con un tumor ascítico, obtenido de la cepa murina Swiss. La enfermedad inducida por el virus de Rauscher tiene dos características principales: puede inducir en ratones susceptibles una eritroblastosis, o en otras condiciones leucemia linfática, incluyendo linfosarcomas tímicos y generalizados. Es notable la gran hepatoesplenomegalia que se observa durante el desarrollo de la enfermedad ( 142 ).

El VLM-R utilizado en este trabajo también provino de la American

Type Culture Collection, Rockville, Md. U.S.A., perteneciendo al lote N°1.

Virus de leucemia de Moloney ( VLM-M ): Este virus leucémico fue aislado por Moloney en 1959 ( 259a ) de un tumor anaplásico conocido, el sarcoma 37, originado en ratones endocriados de la cepa A/LN y mantenido por pasajes sucesivos en ratones de la línea BaLB/c. Es necesario hacer resaltar que el virus de Moloney no estaba relacionado etiológicamente con el sarcoma 37, sino que se propagaba con este tumor como un virus " pasajero ", sirviendo la neoplasia como medio favorable para su replicación.

Extractos acelulares del sarcoma 37, preparados por centrifugación diferencial, sola o combinada con filtración, indujeron leucemia linfática generalizada en el 100% de los animales de la cepa BaLB/c. Estudios posteriores tendientes a investigar la especificidad del virus en relación a la edad, cepa y especie del huésped, demostraron que el virus es altamente patógeno para ratones tanto recién nacidos como adultos y que no presenta especificidad de cepa, habiéndose probado su patogenicidad en otras cepas murinas con resultados positivos.

El VLM-M utilizado en este trabajo se obtuvo de sobrenadantes de cultivo de tejido de células 3T3 infectadas con VLM-M, provistas por la Dra. Fortuna Saal, Centre Hayem, Hopital Saint Louis, Paris, Francia.

Virus de leucemia de Precerutti-Law ( VLM-PLLV/T2 ): Este virus fue descubierto por el Dr. Precerutti en 1963. Inicialmente era un virus de latencia larga, pero repiques sucesivos en ratones BaLB/c han producido una variante PLLV/T2 ( trasplante 2 ) caracterizada por producir esplenomegalia masiva de corta latencia, aproximadamente 30 días. En la mayoría de los ratones inoculados se observa un linfoma esplénico, sin compromiso neoplásico del timo o ganglios. Se lo ha definido recientemente como un linfoma inmunoblástico, siendo actualmente objeto de intenso estudio en la Sección Leucemia Experimental, por el Dr. Julio Correa. (62).

El VLM-M utilizado en este trabajo se obtuvo de un preparado realizado por el Dr. Julio Correa, quien originalmente recibió la leucemia PLLV/T2 de manos del Dr. Precerutti.

Virus de la leucemia H179 A ( VLM-H179 A ): Este virus fue aislado por medio de extractos acelulares de una leucemia aparecida en una hembra BaLB/c de dos meses de edad, 17 días luego de haber sido inoculada con material leucémico de ratón AkR ( 272 ). Esta leucemia es de corta latencia, aproximadamente 30 días, y se mantiene por pasaje acelular en la Sección Leucemia Experimental.

Virus de la leucemia de Gross ( VLM-G ): Este virus fue el primer virus de leucemia murina aislado. Originalmente el descubrimiento fue hecho por Gross ( 135 ), inoculando ratones de la cepa C3H con filtrados de leucemias de ratones AkR. Muy importante resultó el desarrollo por Gross ( 137 ) de un filtrado de virus leucémico activo y estable, el pasaje A, ya que filtrados de diferentes leucemias murinas presentaban potencia variable. Este filtrado, al ser inoculado en ratones C3H de menos de 7 días de edad induce leucemia linfocítica en el 95 % de los ratones, con una latencia de 2 a 3 meses ( 138 ).

Se ha efectuado una descripción minuciosa del pasaje A en el capítulo 2 de la parte A de este trabajo.

El VLM-G utilizado en este trabajo se obtuvo de la American Type Culture Collection, Rockville, Md. U.S.A. perteneciendo al lote 2 D.

### c) Leucemias trasplantables

En el laboratorio de la Sección de Leucemia Experimental se originaron con el curso de los años numerosas leucemias a partir de los más diversos estímulos en ratones de la cepa BaLB/c ( 271 ). Así en el banco de leucemias se poseen aquellas inducidas por radiación, células de tumor de Burkitt, material neoplásico humano, material leucémico AkR, metilcolantreno y leucemias espontáneas.

De algunas de estas leucemias se han podido aislar filtrados con actividad viral, por medio del uso del ensayo de oncogenicidad " in vivo ", que emplea ratones recién nacidos como bioensayo sumamente sensible para la presencia de virus oncogénico.

Así de la leucemia PLLV, originalmente cedida por el Dr Precerutti, a la Sección Leucemia Experimental, se ha aislado un filtrado con actividad viral que se denominó PLLV/T2. También de la leucemia denominada H 179 se ha aislado un virus.

Sin embargo existen algunas leucemias trasplantables donde el resultado en el ensayo de oncogenicidad " in vivo " era invariablemente negativo ( 17 ). Estas leucemias eran sumamente interesantes pues poseían el caracter maligno sin la aparente expresión de partículas virales infecciosas. Resultaba interesante estudiar la posibilidad de que el antígeno de trasplante de las mismas fuera susceptible a un protocolo de protección que empleara el VSM-M. Esto permitiría distinguir si el mismo estaría constituido por proteínas virales estructurales. Este punto está siendo actualmente estudiado por otros investigadores ( 303 ) en modelos diferentes.

Leucemia H 110: Esta leucemia fue inducida como resultado de trabajos iniciados en la Sección Leucemia Experimental en busca de un factor etiológico de las leucemias humanas ( 271 ). El material humano fue inoculado en ratones por la vía intraesplénica. Una hembra BaLB/c de tres meses de edad inoculada con material humano, desarrolló leucemia de corta latencia a los 37 días de inoculada. El material humano provenía de la biopsia ganglionar de un caso de hemocitoblastoma.

Leucemia R 14 : Con el fin de comparar el efecto leucemógeno del P<sup>32</sup> con el de la irradiación en la cepa BaLB/c, un número de ratones fue sometido a los efectos de diferentes dosis de rayos X. La irradiación se llevó a cabo en el Departamento de Radiobiología de la Comisión Nacional de Energía Atómica. Las leucemias que se obtuvieron fueron de larga latencia. En el caso de la denominada R 14, esta apareció en una hembra BaLB/c a los 10 meses de haber recibido 3 dosis semanales de 150 R iniciadas a los 2 meses de edad. Se caracterizaba por un gran timoma además de una intensa infiltración de los órganos abdominales (271).

Leucemia P 277: Esta leucemia de trasplante celular fue cedida por el Dr Precerutti a la Sección Leucemia Experimental. Originalmente fue inducida en ratones inoculados con virus de la leucemia de Moloney ( 271 ).

d) Leucemia espontánea

El interés de tener modelos de leucemia espontánea de alta y baja incidencia en el ratón, nos llevó a utilizar las cepas AkR y BaLB/c, respectivamente.

La cepa AkR, como ya se ha indicado en el capítulo 2 de la parte A de este trabajo, presenta una incidencia del 85% de leucemia espontánea al año de edad. Este valor no es siempre constante hallándose variaciones en los diferentes laboratorios. Sin embargo, el trabajo con esta cepa es sumamente dificultoso, debido a la baja fecundidad que presentan estos ratones en nuestro laboratorio. Por ello debimos recurrir al cruzamiento con ratones Swiss, para producir un ratón F1 ( Swissx AkR ), mucho más vigoroso y fácil de criar. Estos ratones presentan una incidencia aproximada del 30% de leucemia espontánea al año de edad ( 246 ), dato que se confirmó en nuestro trabajo.

La cepa BaLB/c , ha sido empleada por otros investigadores por considerarse que representa un modelo excelente de neoplasia espontánea como la que debe ocurrir en el hombre. Presenta bajos niveles de expresión de virus tipo C y antígenos virales, y una incidencia de leucemia espontánea alrededor del 15 al 22%, también variable según los laboratorios ( 197 ). Evidentemente que el poder proteger contra esta leucemia espontánea tendría proyecciones muy importantes en el desarrollo de protocolos de protección contra la leucemia humana.

e) Preparación y titulación del virus de sarcoma de Moloney

Para la preparación de un stock de virus de sarcoma de Moloney se procedió según una modificación de la técnica de Moloney ( 279 ). Una partida de VSM-M de pasaje, originada en el lote SVR-P166 ( cedida gentilmente por el Dr. K.E. Hellstrom, University of Washington, Seattle, U.S.A. ) se inoculó en ratones BaLB/c recién nacidos. Los sarcomas originados a partir de este inóculo se procesaron de la siguiente manera. Se extirparon del ratón esterilmente, cortándose el tumor en pequeños trozos en una caja de Petri. Posteriormente se agregó una solución de PBS conteniendo los antiibióticos estreptomycinina y penicilina.

Se agregó la misma hasta una cantidad aproximadamente de 1:10 peso / volumen. Luego se homogeneizó todo el material en un homogenizador marca " Virtis " modelo S 23.

Este homogenado se centrifugó en una centrífuga marca "Sorvall " modelo RC2-B centrifugada; la primera centrifugación a 5000 RPM y la segunda a 10.000 RPM , durante 15 y 20 minutos respectivamente. Luego cuidadosamente los sobrenadantes fueron transferidos a ampollas de vidrio, en un volumen de 1,5 ml por ampolla, y las mismas selladas herméticamente. Este sobrenadante acelular fue guardado en un banco de nitrógeno líquido a  $-179^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización posterior, constituyendo el " stock " experimental.

La titulación del virus de sarcoma de Moloney se realizó mediante una técnica " in vivo " calculándose el título de la preparación por la técnica del punto final, aplicando el método de Reed y Muench ( 294 ). Se hicieron también ensayos para titular a la partida de virus de sarcoma de Moloney por el método de gradación ( 34 ). Para la titulación de punto final se utilizaron ratones BaLB/c de dos meses de edad, machos y hembras, como así también ratones recién nacidos. El objeto era observar si había diferencias en el título debido a las diferentes edades de los ratones receptores. Se realizaron diluciones seriadas del material congelado perteneciente al " stock ", considerando como dilución  $10^{-1}$  al material de las ampollas. Se efectuó la dilución con PBS frío más estreptomicina y penicilina. Los ratones fueron inoculados por la vía intramuscular, recibiendo los recién nacidos 0,05 ml cada uno, y los ratones adultos 0,2 ml. El período de observación fue de 35 días, luego de lo cual se dio por terminado el experimento. El título se expresó como dosis tumoral 50 % por ml (  $DT_{50}/\text{ml}$  ).

La titulación del virus de sarcoma de Moloney por el método de gradación, se basa en el uso del tiempo de latencia hasta la aparición de los sarcomas inducidos por este virus, como parámetro para comparar las diferentes preparaciones virales. Se toma como presencia de tumor la aparición de tumores que arbitrariamente llamamos de grado 1: es una tumefacción en el lugar de la primoinoculación. Se grafica la inversa del tiempo que tarda en aparecer un tumor de grado 1 (  $1/T$  ) en función de las diluciones de virus realizadas.

f) Preparación y titulación de virus de leucemia murina

Las diferentes partidas de virus de leucemia murina utilizadas durante el desarrollo de los experimentos fueron procesadas y tituladas de manera similar.

Bazos de leucemias trasplantables inducidas con estos virus eran homogeneizadas por medio de homogenizadores de vidrio con el agregado de PBS frío y estreptomycin y penicilina. Luego el homogenado era centrifugado como se hizo con el homogenado de sarcomas inducidos por el virus de Moloney. El filtrado acelular era cuidadosamente fraccionado en ampollas de vidrio y guardado en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización para la titulación y los experimentos.

La titulación de los virus de leucemia murina se puede efectuar " in vitro " o " in vivo ". Para la titulación " in vitro " existe un ensayo sumamente sensible denominado " test XC ", que permite cuantificar los virus de leucemia murina por su capacidad de formar sincicios a una línea de células de rata ( 305 ). Sin embargo, si bien estos ensayos son sumamente sensibles y permiten obtener un alto grado de precisión cuantitativa, se estimó necesario utilizar un ensayo " in vivo ", ya que interesaba saber con la mejor precisión posible el poder leucemógeno de las preparaciones, no necesariamente reflejado por los ensayos XC. Estos ensayos " in vivo " necesitan de un período algo prolongado de observación. Se efectuó la titulación de las preparaciones de virus de leucemia murina por la técnica del punto final, calculándose el título por el método de Reed y Muench ( 294 ).

Se utilizaron ratones BaLB/c adultos, de la edad que tendrían en los experimentos, aproximadamente 3 meses, y de ambos sexos. Se realizaron diluciones seriadas del material congelado, considerando como  $10^{-1}$  el material del banco. Los ratones fueron inoculados con 0,1 ml intraperitonealmente. El lapso de observación fue de 50 días en general. Se expresó el título obtenido en dosis letales 50 % por ml (  $DL_{50} / ml$  ).

g) Preparación y titulación de leucemias trasplantables

Las leucemias de trasplante se mantienen " in vivo ", realizando pasaje de células leucémicas cada 7 a 14 días aproximadamente. De esta manera se han podido mantener líneas celulares durante años. Actualmente es posible congelar dichas células leucémicas mediante una técnica sencilla, en uso en el laboratorio de la Sección de Leucemia Experimental. Esta técnica permite guardar células leucémicas viables en ampollas herméticas en nitrógeno líquido.

Para nuestro trabajo se descongelaron las leucemias R 14, H 110 y P 277. Una vez demostrada la actividad leucemógena de las células descongeladas, mediante pasaje de las mismas a ratones adultos, se estableció una línea trasplantable para el uso en estos experimentos. Estas líneas se mantuvieron por pasaje semanal.

Para titular a estas leucemias se utilizó un método " in vivo " de uso rutinario en el laboratorio. Para ello se tomó un bazo de un ratón leucémico, que se extirpó esterilmente y se cortó en pequeños trozos sobre una gaza estéril apoyada sobre un pequeño vaso de precipitados. Luego se bañó a los trocitos con solución de PBS con estreptomomicina y penicilina fría, hasta lograr el pasaje de la mayor cantidad de material. Este se recogió esterilmente y se procedió al cálculo del número de células de la suspensión celular obtenida.

Se tomó una alícuota de 0,1 ml de la suspensión celular y se mezcló con 0,9 ml de un colorante vital ( trypan blue ). Esta mezcla se agitó bien y luego se colocó una gota de la suspensión en una cámara Neubauer cuentaglóbulos. Se contaron la cantidad de células viables ( no teñidas ). Si existían más de un 10 % de células teñidas, se repetía la operación. Así aplicando una fórmula sencilla se calculaba la cantidad de células viables por ml de suspensión original.

$$\text{Número de células} = y \times 10^5 \text{ células/ml}$$

dónde y es el número promedio de varios campos contados al microscopio. Esta técnica debe repetirse varias veces con la misma suspensión celular, para disminuirse los errores al mínimo.

Una vez hallada la cantidad de células de una suspensión de leucemia murina se procedía a titularla, ya que interesaba ello para los trabajos de inmunoprevención. Se hacían diluciones seriadas de la suspensión original con una solución de PBS más penicilina y estreptomycin frío. Estas diluciones se debían hacer con el máximo de cuidado cambiando cada vez de pipeta y agitando bien los tubos. Luego se tomaba la dilución apropiada y se inculaba 0,2 ml en cada ratón. Se fijaba un período de observación de 25 días. Se computaban las muertes por leucemia durante ese período. El título expresado en dosis letales 50 por ml (  $DL_{50}/ml$  ), no era más que la cantidad de células que mataban un 50% de ratones dentro del plazo considerado.

Aquí debe aclararse, que las leucemias celulares son sumamente letales en brevísimo tiempo, con cantidades bajas de células inculadas. Esto constituye una gran complicación, ya que este método como todo método que necesita una gran dilución de partículas, presenta un error elevado. Por ello las titulaciones deben repetirse varias veces y se deben utilizar varios animales por dilución.

#### h) Determinación del protocolo de vacunación

Experimentos preliminares habían demostrado que el virus de sarcoma de Moloney cuando era inculado por la vía intramuscular, inducía tumores que alcanzaban un gran crecimiento, pero que luego regresaban dejando inmune al ratón. Sin embargo, en un porcentaje variable según la potencia del inóculo utilizado, se producían recurrencias que mataban a los ratones 2 a 3 meses luego de la primoinoculación ( 247 ).

Con el objeto de estudiar una vía alternativa de inoculación que atenuara el efecto a largo plazo del virus de sarcoma de Moloney, se efectuaron posteriormente a la titulación de la partida de virus de sarcoma de Moloney unos experimentos donde comparativamente se estudió una serie de parámetros experimentales. Para ello se inocularon un número considerable de ratones BaLB/c con dosis seriadas de virus de sarcoma de Moloney estudiándose el efecto del porcentaje de

toma, latencia, sobrevida y tamaño del tumor primario, tanto en los ratones inoculados subcutáneamente como intramuscularmente.

Estos resultados permitieron concluir cual era la vía y dosis más adecuada para los experimentos de inmunoprevención.

i) El protocolo experimental de inmunoprevención

Tanto para los estudios con leucemias trasplantables y primarias, como para con las leucemias espontáneas se trabajó con un mismo protocolo ( gráfico 1 ).

Se tomaron lotes de 40 ratones BaLB/c, de ambos sexos, de 1 a 2 meses de edad. Es importante la edad de los ratones, ya que se ha observado que la sensibilidad a la infección con virus de sarcoma de Moloney declina rápidamente entre el nacimiento y las 4 semanas de vida del ratón ( 34, 86, 90, 277 ). Estos ratones se asignaron al azar a los grupos experimental y control.

El lote de ratones del grupo experimental fue vacunado con 0,2 ml de virus de sarcoma de Moloney por vía subcutánea en el dorso del animal. No se utilizó por los resultados hallados al comparar esta vía con la vía subcutánea, la vía intramuscular. La inoculación por vía subcutánea inducía el crecimiento de sarcoma localizados, que no alcanzaban tanto tamaño como en el músculo de la pata y que regresaban en poco días.

El lote de ratones del grupo control fue inoculado con 0,2 ml de una preparación efectuada a partir de músculo de ratones BaLB/c normales. Este material se procesó simultáneamente con la preparación de los filtrados de virus de sarcoma de Moloney. Este control permitió poder descartar como inespecífica la inmunización del animal por virus de sarcoma de Moloney.

Los ratones eran observados un mes y todo aquel que presentaba tumores que no regresaban era eliminado del experimento. Debe agregarse que la cantidad de ratones con tumores progresores observados al inocular por vía

subcutánea era mínima.

Como ya se ha descrito en el capítulo 6 de la parte A de este trabajo, está bastante bien definida la respuesta inmunológica del ratón BaLB/c luego de la inoculación de virus de sarcoma de Moloney infeccioso. Se ha visto que dicha respuesta tiene un máximo alrededor de los 10 días luego de la primoinoculación, descendiendo luego a niveles normales alrededor de los 25 a 30 días.

Con el objeto de mantener alta la respuesta secundaria se consideró conveniente volver a desafiar a estos ratones con una segunda inoculación de virus de sarcoma de Moloney a los 30 o 40 días luego de la primoinoculación. Estos ratones eran luego destinados a los estudios de inmunoprevención de leucemias.

La inoculación de leucemias trasplantables o primarias se efectuaba aproximadamente 30 días luego de la inoculación de la dosis de refuerzo. Los animales tenían aproximadamente 4 meses de edad. En los resultados se indicará la dosis utilizada en cada caso. La observación de los ratones se efectuó durante 18 meses o más en los diferentes experimentos.

En los experimentos de prevención de leucemias espontáneas de las cepas BaLB/c y los híbridos F1 Swiss x AkR, luego de la segunda inoculación se observaron a los ratones durante un lapso mayor a los 18 meses.

#### j) Evaluación

En los experimentos de protección contra leucemias primarias, trasplantables y espontáneas se efectuó un control periódico de los ratones, revisándose cuidadosamente a los mismos y sacrificando al que presentaba signos inequívocos de enfermedad.

Como parámetro para la presencia de leucemia se observaba la presencia de bazo palpable, y al autopsiarse de esplenomegalia, timomas o ganglios

( axilares, inguinales,mesentéricos ) grandes.

El cálculo de la significación estadística de los resultados se realizó utilizando los " test " estadísticos de  $\chi^2$  ( chi-cuadrado ), el test " T " de Student, y el Mann Whitney.

### 3. RESULTADOS

#### (i) Experimentos preliminares

##### a) Titulación del virus de sarcoma de Moloney

Los resultados de una titulación del material congelado se presenta en la tabla 7. Se ha desarrollado extensamente el manejo numérico del cálculo del título según el método de Reed y Muench ( 294 ) para el caso de ratones recién nacidos BaLB/c , dejándose indicado para los ratones adultos de dos meses de la misma cepa. Como se observa, los recién nacidos presentan una mayor sensibilidad que los adultos frente a una misma preparación, pero por cálculo la diferencia no resulta ser suficiente para dar una variación significativa en el título expresado en dosis tumorales 50% en un lapso de observación de 35 días.

Resulta importante para algunos experimentos poder relacionar el título de una determinada preparación con el tiempo de latencia de los sarcoma inducidos por el virus de sarcoma de Moloney. Para ello se tituló la misma partida utilizada para calcular el título anterior por medio de un método de gradación desarrollado por Blumenschein y Moloney ( 34 ).

Los datos se expresan en la tabla 8 y se graficaron según la metodología indicada en el gráfico 2 . Como se observa, a mayores diluciones la aparición de sarcomas presenta una mayor dispersión en cuanto al tiempo de latencia, si bien en todos los casos la incidencia final fue mayor del 50% en las diluciones realizadas. La dosis menos diluidas fueron utilizadas en los experimentos ya que

presentaban mayor uniformidad en cuanto a la inducción de sarcomas en los animales inoculados.

#### b) Titulación de los virus de leucemia murina

Debe ser aclarado que de todos los virus de leucemia murina empleados en este trabajo, el virus de leucemia de Moloney y el virus de leucemia de Gross, no se titularon " in vivo ", por inducir esplenomegalia y muerte a muy largo plazo en ratones inoculados. En los experimentos en que se utilizaron estos virus se emplearon dosis masivas de filtrados preparados según la técnica ya descrita.

Los virus de leucemia murina, virus de leucemia de Rauscher, virus de leucemia de Friend, virus de leucemia H179A, y virus de leucemia PLLV/T2, inducen leucemias en un lapso más breve y son más susceptibles de ser titulados " in vivo ". A modo de ejemplo, se muestra la titulación del virus de leucemia PLLV/T2 ( tabla 9 ). Títulos de diferentes preparaciones se calcularon por el método de Reed y Muench. En la tabla 10 se han indicado los títulos de las otras preparaciones de virus de leucemia utilizadas en los experimentos.

#### c) Titulación de las leucemias trasplantables celulares

Como ya se ha explicado en materiales y métodos, las leucemias de trasplante son sumamente letales, aún a dosis bajas de células. Por ello generalmente no se titulan en cantidades logarítmicas de células sino con rangos diferentes. A título de ejemplo en la tabla 11 se indica la titulación de una de las leucemias utilizadas en este trabajo, la leucemia P 277. Como se observa en un lapso muy breve, cantidades sumamente reducidas de células son letales en un alto porcentaje de ratones BalB/c.

También se han indicado en la tabla 12 el resultado de la titulación de otras dos leucemias trasplantables, la H 110 y la R 14 , que se usaron en los experimentos. Los datos indicados son los promedios de un gran número de ensayos de titulaciones.

#### d) Experimentos para determinar el protocolo experimental

Como se ha explicado, interesaba estudiar el comportamiento del virus de sarcoma de Moloney al inocularlo por la vía intramuscular, como también por la vía subcutánea.

Como se observa en la tabla 13, los ratones BaLB/c inoculados con una dosis de virus de sarcoma de Moloney con un título de  $1,5 \times 10^5$  DT<sub>50</sub>/ml tanto por la vía subcutánea como intramuscular, tuvieron un comportamiento diferente respecto al porcentaje de ratones que efectivamente mostraron tumor macroscópicamente visible dentro de un lapso de 35 días. En general, por la vía subcutánea se inducían menos tumores.

Por otra parte, se efectuaron observaciones acerca del crecimiento de los sarcomas en los animales ( gráfico 3 ). Claramente se apreció que los tumores inducidos por la misma dosis subcutáneamente adquirieron un tamaño considerablemente menor que en los ratones inoculados intramuscularmente. Por otra parte la regresión de los tumores también era considerablemente más rápida en aquellos ratones que fueron inoculados subcutáneamente, siendo de un 100% la regresión en todas las diluciones ensayadas.

Por último, interesó la sobrevida de los ratones inoculados con este protocolo ( tabla 14 ). A los 35 días de observación la vía subcutánea mostró un 100% de sobrevida en todas las diluciones contra un 90 y 66% para las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  de la vía intramuscular. Como en los experimentos de inmunoprevención se pensaba en estudios de sobrevida, interesaba saber si el efecto de la vacunación de por sí causaba muerte a largo plazo. Como se observa en los 97 días de observación de los ratones, el grupo inoculado subcutáneamente mostró casi un 100% de sobrevida. En el caso de grupo inoculado intramuscularmente la sobrevida fue pobre salvo en el grupo inoculado con una dosis  $10^{-4}$  de esta preparación.

Como parámetro necesario para poder correlacionar los datos hallados con la respuesta inmunológica del ratón a un desafío posterior con una leucemia,

se consideró necesario estudiar la inmunidad que los ratones habían adquirido con las diferentes inoculaciones tanto por vía intramuscular como por vía subcutánea. Para ello se desafió a los animales sobreviviente con 0,1 ml de una dilución  $10^{-1}$  de la preparación " stock " por vía intramuscular. Como controles se utilizaron ratones de la edad de los sobrevivientes, de 5 meses de edad y ratones más jóvenes ( 1 a 2 meses de edad ). Los resultados del desafío se observan en la tabla 15. Se observa claramente que en todos los casos, los ratones inmunizados con dosis altas ( -1, -2 y -3 ) estaban inmunes al virus de sarcoma de Moloney, aún cuando se los desafió hasta tres meses después de la primo-inoculación. Esta inmunidad era baja en los animales inmunizados con diluciones mayores de la partida de virus de sarcoma de Moloney. La actividad de la preparación utilizada quedaba demostrada por la respuesta positiva de los controles .

Del conjunto de los datos presentados, que consideraron tanto positividad de respuesta tumoral, tiempo de latencia del tumor primario, tamaño del sarcoma inducido, sobrevivida y por último estado inmune, resultó claro que para nuestro protocolo la vía subcutánea era preferible en la inmunización con virus de sarcoma de Moloney infeccioso. El hecho de que nuestra partida de virus de sarcoma de Moloney fuera letal en los ratones BaLB/c podría deberse a la cepa original utilizada. Otros investigadores, han observado comportamientos sumamente variables con otras cepas de virus de sarcoma de Moloney ( 220 ).

## (ii) Inmunoprevención de leucemias murinas primarias

### a) Inmunoprevención de la leucemia primaria de Moloney

Ya se ha detallado el protocolo experimental utilizado como así también las características principales del virus de leucemia de Moloney ( VLM-M )

Los ratones BaLB/c inoculados con 0,5 ml intraperitonealmente de un filtrado de leucemia de Moloney fueron cuidadosamente observados durante 86 días. Como ya se ha explicado la letalidad de este virus en ratones adultos es sumamente variable, por lo cual se decidió sacrificar al lote experimental y control y

observar el efecto de la vacunación mediante el peso de los bazos de los ratones sacrificados. Los datos se han indicado en el gráfico 4. Como se observa los pesos de los bazos de los ratones inmunizados con virus de sarcoma de Moloney, se concentran más alrededor de una media que se aproxima al peso normal de los bazos de estos ratones; en cambio, los ratones controles muestran mayor dispersión, con muchos bazos con franca esplenomegalia leucémica. La diferencia entre las medias de ambos grupos es significativa. Utilizando el test " U " de Mann Whitney el valor p es = a 0,2, mientras que en el test " T " de Student es  $0,01 < p < 0,02$ .

En conclusión, se pudo demostrar claramente una fuerte protección con este protocolo empleando el virus de sarcoma de Moloney como inmunógeno contra el desarrollo de leucemia inducida por el virus de leucemia de Moloney. El estudio histológico de los bazos de ambos grupos fue realizado por el Dr. Ruben P. Laguens de la Universidad de La Plata, quién confirmó la ausencia de bazos leucémicos en el grupo de ratones inmunes, mientras que los bazos pertenecientes al grupo control, por encima de los 185 g eran claramente leucémicos.

#### b) Inmunoprevención de la leucemia primaria de Rauscher

Como se ha indicado en la tabla 10, se utilizó un preparación de virus de leucemia de Rauscher ( VLM-R ) con un título de  $3,7 \times 10^2$  DL<sub>50</sub>/ ml para desafiar a los ratones inmunizados con virus de sarcoma de Moloney. Cada ratón fue inoculado con 0,2 ml de una dilución  $10^{-2}$  de esta preparación. Como se observa en el gráfico 5 se estudió a los dos grupos de ratones desafiados con VLM-R por más de 358 días ( 1 año ). La máxima diferencia en cuanto a la supervivencia se observó durante los primeros 120 días ( 4 meses ), ya que entonces el grupo inmunizado con virus de sarcoma de Moloney ( grupo experimental ) presentaba un 82% de supervivencia, y el grupo control apenas un 19%. Esta diferencia fue evaluada por el test de  $\chi^2$  siendo altamente significativa (  $p < 0,001$  )

Sin embargo, como se observa en el gráfico 5, la observación prolongada de estos dos grupos, mostró una mortalidad progresiva siendo especialmente notable en el grupo experimental. Al cabo de 369 días de observación sobrevivían 4/17 ratones experimentales ( 23 % ) y sólo 2/21 ratones controles ( 9 % ). Estudiados en la autopsia los ratones sobrevivientes no presentaban signos macroscópicos de leucemia.

El estudio de las causas de muerte de los ratones de ambos grupos durante el curso de los experimentos se indica en la tabla 16. Se observa que los ratones del grupo experimental, sólo presentaron 2 casos de leucemia macroscópicamente detectable, mientras que los controles presentaron 18 casos. Por otra parte se observaron 2 casos de recurrencias de tumores en los ratones inmunizados con virus de sarcoma de Moloney. Lo que llamó la atención fueron los 9 casos de muertes entre los regresores por otras causas, hecho que se observó en otros experimentos. En ninguno de estos casos se observaron leucemias o tumores recurrentes.

En conclusión, quedó bien claro que el protocolo experimental utilizado demostró proteger a ratones BaLB/c fuertemente en una primer etapa contra el desarrollo de leucemia primaria inducida por el virus de leucemia de Rauscher.

### c) Inmunoprevención de la leucemia primaria de Friend

Con el objeto de prevenir la leucemia primaria de Friend se inmunizaron ratones con virus de sarcoma de Moloney y se desafiaron con una preparación de virus de leucemia de Friend ( VLM-F ) con un título de  $5 \times 10^2$  DL<sub>50</sub>/ml. Cada ratón, tanto del grupo experimental como del grupo control recibió 0,2 ml de una dilución 1/500 del stock de VLM-F intraperitonealmente.

Este experimento se observó durante 169 días. Como se observa en el gráfico 6 al cabo de este período la sobrevida era de alrededor de un 33% para ambos grupos, sobreviviendo 7/21 ratones experimentales y 7/23 ratones controles, 33% y 30% respectivamente. Estudiados en la autopsia los ratones sobrevivientes no presentaban signos macroscópicos de leucemia en el grupo experimental, mientras que en el grupo control sólo un ratón presentaba esplenomegalia evidente de un total de 7 autopsiados.

Haciendo un cómputo de la esplenomegalia detectada por palpación a los 32 días luego del desafío con VLM-F, datos que se indican en la tabla 17 se observó que 5/20 ( 25% ) de ratones experimentales presentaban bazos tipo 4 cruces, contra 16/23 ( 69 % ) de los controles. Esta diferencia fue altamente significativa evaluada por el test de  $\chi^2$  (  $p < 0,001$  ).

El estudio de las causas de muerte de los ratones de ambos grupos durante el plazo de observación del experimento se indica en la tabla 18. Se observa que los ratones experimentales presentaron 7 casos de leucemia detectada macroscópicamente contra 18 en los controles. También en este caso los ratones experimentales murieron por recurrencias ( 1 ratón ) y por causas distintas a la leucemia.

Resulta claro que los ratones inmunizados con virus de sarcoma de Moloney pueden ser protegidos contra la inducción de leucemia primaria por el VLM-F. Sin embargo el efecto protector resulta atemperado por el hecho de observarse muertes en el grupo inmunizado con virus de sarcoma de Moloney no atribuibles en principio a la leucemia de origen fe VLM-F.

#### d) Inmunoprevención de la leucemia primaria de Gross

Con el objeto de inmunizar contra la leucemia primaria de Gross se preparó un grupo de ratones experimentales y controles de la cepa Swiss, de manera similar a la usada en los experimentos anteriores. Se los desafió con una preparación de virus de leucemia de Gross ( VLM-G ) preparada según la técnica ya desarrollada. Cada ratón Swiss de 3 meses de edad recibió un volumen de 0,2 ml de este preparado de VLM-G intraperitonealmente.

Este experimento se observó por 296 días. Como se observa en el gráfico 7, al cabo de este período la sobrevivida era de un 45 % para el grupo experimental ( 9/20 ) mientras que sólo de un 31% para el grupo control ( 7/22 ).

Se autopsiaron los ratones de ambos grupos que presentaban franca esplenomegalia palpable. En la tabla 19 se observa que mientras los bazos del grupo experimental tipo 4 cruces tenían una latencia menor a los 3 meses, en el grupo control los bazos tipo 4 cruces eran de latencias de 3 a 9 meses. El estudio patológico de los muertos en el curso del experimento reveló macroscópicamente la presencia de 4 leucemias francas y seis probables en el grupo experimental, mientras que 6 leucemias y tres probables en el grupo control ( tabla 20 ). Por otra parte no se observó un sarcoma recurrente en los ratones inmunizados con virus de sarcoma de Moloney.

En conclusión, no se pudo demostrar inmunidad protectora en los ratones Swiss inmunizados con virus de sarcoma de Moloney contra VLM-G por este método. Más bien se observó una aceleración de la aparición de leucemias en los ratones inmunizados con virus de sarcoma de Moloney. Fue notable que se pudieran obtener leucemias de Gross primarias en adultos Swiss, ya que este hecho es sumamente infrecuente ( 17 ), y podría deberse a un título elevado de VLM-G de la preparación utilizada.

e) Inmunoprevención de la leucemia primaria de PLLV-T2

Para este estudio se desafiaron ratones BaLB/c inmunizados con virus de sarcoma de Moloney como ya se ha indicado, con una preparación de virus de leucemia murina PLLV/T2 con un título de  $5,1 \times 10^3$  DL<sub>50</sub>/ml . Cada ratón de los grupos experimental y control recibió intraperitonealmente un volumen de 0,2 ml de una dilución  $10^{-3}$  de esta preparación.

Como se observa en el gráfico 8 el experimento se observó durante 369 días. A los 130 días posteriores al desafío con virus de leucemia PLLV/T2 sobrevivían un 68% de los ratones experimentales, contra ninguno de los controles. Esta diferencia era evidentemente significativa, evaluada por el test de  $\chi^2$  (  $p < 0,001$  ) . Todos los ratones controles murieron con un cuadro típico de leucemia PLLV-T2. Al cabo de un años ( 365 días ) sobrevivían aún 6/19 ratones del grupo experimental ( 32 % ). Por lo tanto se pudo concluir que en este caso el efecto protector de la vacunación era muy fuerte. También en este experimento se observó una letalidad progresiva en el grupo experimental.

En la tabla 21 se indican las observaciones sobre la sobrevivencia de los ratones BaLB/c tanto del grupo control como del experimental. Como se observa claramente, mientras que en el grupo control se desarrollaron 18/18 (100 % ) de leucemias en un plazo menor a los 130 días, en el grupo experimental la mortalidad observada se debió en 5/19 ( 26 % ) a leucemias detectadas. Quizás los ratones con esplenomegalia y ganglios detectables 4/19 ( 21 % ), eleva algo el número de casos de leucemia hallados en este grupo, pero siempre en un plazo que se extendió a los 369 días.

En conclusión, los datos observados permiten afirmar que el virus de sarcoma de Moloney induce una fuerte protección contra la inducción de leucemia primaria por el virus de leucemia murina PLLV/T2.

f) Inmunoprevención de la leucemia primaria de H179A

Para nuestro estudio se desafiaron ratones BalB/c adultos de 3 meses de edad, inmunizados con virus de sarcoma de Moloney, con una preparación de virus de leucemia murina H179A con un título de  $5 \times 10^4$   $DL_{50}$  /ml. Cada ratón de los grupos experimental y control recibió 0,2 ml intraperitonealmente de una dilución  $10^{-3}$  de esta preparación.

Como se observa en el gráfico 9 el experimento se observó durante 137 días. Al cabo de este tiempo sobrevivían 7/14 ( 50% ) ratones del grupo experimental, y ningún ratón del grupo control. El momento de máxima protección contra la inducción de leucemia primaria por el virus de leucemia murina H179A se evidenció a los 46 días de la primoinoculación; en ese momento sobrevivían 11/14 ratones del grupo experimental, mientras que todos los ratones controles ( 20/20 ) habían muerto de leucemia primaria inducida por VLM-H179 A. Esta diferencia era estadísticamente significativa, evaluada por el test de  $\chi^2$  siendo  $p < 0,001$ .

La sobrevivencia de los ratones del grupo experimental fue observada y los datos se indican en la tabla 22. Al día 137 los ratones experimentales se autopsiaron y se estudiaron macroscópicamente. Como se observa, mientras que el grupo control presentó un 100% de leucemias ( 20/20 ) en un plazo menor de 46 días, en el grupo inmunizado sólo se detectaron 3 leucemias evidentes y dos probables. Hubo además 3 ratones muertos por otras causas, así como también una recurrencia de sarcoma.

En conclusión estos datos permiten afirmar, que el virus de sarcoma de Moloney induce una fuerte protección contra la leucemia primaria inducida por el virus de leucemia murina H179A.

( iii ) Inmunoprevención de leucemias trasplantables

a) Inmunoprevención de la leucemia trasplantable H 110

Interesaba estudiar la efectividad del protocolo experimental de vacunación con virus de sarcoma de Moloney contra el trasplante de leucemias de pasaje de diverso origen del laboratorio de la Sección de Leucemia Experimental. En primer lugar se estudió la leucemia H110, de inducción con material humano.

Se desafiaron ratones BaLB/c adultos, inmunizados con virus de sarcoma de Moloney, con la leucemia H110, recibiendo cada ratón del grupo experimental y control 400 células en un volumen de 0,2 ml por vía intraperitoneal. Los ratones fueron observados diariamente.

Este experimento fue observado durante 165 días. En el gráfico 10 se observa que a los 13 días postdesafío el 95% de los ratones experimentales sobrevivían contra sólo 47% de los controles. Esta diferencia era estadísticamente significativa evaluada con el test de  $\chi^2$  (  $p < 0,001$  ). Si bien existió una diferencia significativa entre experimentales y controles entre los 10 y 20 días, ésta fue disminuyendo por una mortalidad progresiva en el grupo experimental.

Los ratones experimentales sobrevivientes fueron todos autopsiados al día 165 postdesafío ( tabla 23 ). Como se observa, mientras que en el grupo control se presentaron leucemias típicas H110 en 19/21 ratones en un plazo breve, en los ratones del grupo experimental se observaron sólo 10 leucemias y 3 leucemias probables en un lapso mucho mayor.

En conclusión, podemos afirmar que la vacunación con virus de sarcoma de Moloney protegería contra el desafío con leucemia trasplantable H110, pero que dicha protección es de carácter transitorio.

b) Inmunoprevención de la leucemia transplantable R 14

Se estudió la posibilidad de inmunoprevenir la leucemia de pasaje R 14, inducida originalmente por dosis de rayos X en una hembra BaLB/c de diez meses de edad.

Para ello, empleando el protocolo experimental ya descrito, se desafiaron ratones BaLB/c adultos inmunizados con virus de sarcoma de Moloney y controles normales con 1000 células de leucemia R 14, en un volumen de 0,2 ml por vía intraperitoneal. Los ratones fueron observados diariamente.

Este experimento fue observado por 102 días. A los 44 días post-desafío con células de leucemia R 14, sobrevivían 12/17 ratones inmunizados con virus de sarcoma de Moloney ( 70 % ), mientras que sólo 6/16 ratones controles ( 37% ) ( ver gráfico 11 ). Esta diferencia era estadísticamente significativa evaluada por el test de  $\chi^2$  (  $p < 0,001$  ) .Sin embargo a medida que progresaba el experimento muchos de los ratones del grupo experimental fallecieron por otras causas y no de leucemia. Como se observa en la tabla 24, en el grupo experimental aparecieron sólo 5 leucemias, mientras que hicieron lo propio 10 en los ratones controles.

En conclusión, podemos afirmar que la vacunación con virus de sarcoma de Moloney protege contra la leucemia de pasaje R 14, pero que este efecto es de carácter transitorio, ya que a los 102 días sólo sobrevivieron un 6% de los ratones experimentales.

c) Inmunoprevención de la leucemia trasplantable P 277

En este caso se estudió el efecto de la vacunación sobre una leucemia de pasaje originada por el virus de leucemia de Moloney, pero que era negativa a la presencia de virus infeccioso detectado por el ensayo de oncogenicidad " in vivo ". Era importante ver la posibilidad de prevenir una leucemia donde estuviera reducido al mínimo la expresión de componentes estructurales de los

virus leucémicos.

Se utilizó el mismo protocolo de vacunación que en los experimentos anteriores. Se desafiaron a los ratones BaLB/c de los grupos experimental y control con 250 células en un primer experimento y con 14 células en un segundo intento. En ambos casos este número de células fue inoculado en un volumen de 0,2 ml por vía intraperitoneal.

En ambos experimentos los resultados obtenidos fueron negativos. Debido a la gran letalidad de la leucemia P277 tanto los ratones experimentales como los controles presentaban un 100% de leucemia en un lapso muy breve, de 8 a 10 días, y luego morían todos los ratones alrededor del día 14 postinoculación del desafío. Por esta razón fue imposible ver un posible efecto protector de la inmunización con el virus de sarcoma de Moloney, ya que la rápida progresión de esta leucemia equiparaba el efecto en experimentales y controles ( tabla 25 ).

En conclusión, la vacunación de ratones BaLB/c con virus de sarcoma de Moloney no pareció proteger contra la inducción de leucemia de pasaje P 277.

( iii ) Inmunoprevención de leucemias espontáneas

a) Efecto de la primoinoculación de virus de sarcoma de Moloney sobre la incidencia de leucemia espontánea en la cepa BaLB/c

Ya se ha explicado que los ratones de la cepa BaLB/c presentan una incidencia baja de leucemia espontánea ( alrededor del 15% ), y por ello resultan un modelo interesante para los estudios de prevención de cáncer espontáneo. Si se demostrara que la leucemia es causada también por un virus en el hombre, la baja incidencia de la enfermedad en nuestra especie permitirá aprovechar todos los estudios que se hayan hecho en otras especies como el ratón, tratando

de prevenir la leucemia donde la misma también es de baja incidencia.

El protocolo experimental utilizado ya se ha desarrollado, y básicamente no difiere del utilizado para los estudios de prevención de leucemias primarias y trasplantables. Sin embargo, en este caso por tratarse de prevenir leucemias espontáneas que en esta cepa aparecen recién alrededor de los 18 meses se inmunizaron los ratones con 3 dosis, una a los 3 meses, otra a los 4 meses y medio y una última a los 9 meses de edad. Se observaron los animales con intervalos de 7 a 10 días.

Se ha indicado gráficamente la sobrevida de los ratones BaLB/c observados durante más de 500 días ( gráfico 12 ). Como se observa los ratones del grupo que recibió la inmunización con virus de sarcoma de Moloney - grupo experimental - sufrió una mortalidad progresiva más rápida que los ratones que no recibieron más que un extracto acelular de músculo y tejidos normales de ratones BaLB/c. Lo más notable que surgió del análisis de las muertes progresivas en el grupo experimental, es que las mismas en un 55% ( 20/36 muertes observadas ) se sucedieron entre los 300 y 370 días de edad, coincidiendo con los 30 días posteriores a la tercera dosis de refuerzo de virus de sarcoma de Moloney inoculada en estos ratones. Más adelante en la discusión analizaremos las posibles causas de este fenómeno, que de por sí diezmo progresivamente a este grupo.

En la tabla 26 se ha indicado sucintamente las observaciones de la sobrevida de estos animales durante 504 días. Mientras que en el grupo experimental aparecieron 4 leucemias, sólo se observó una en el grupo control. Con dos de las leucemias aparecidas en el grupo experimental se prepararon extractos acelulares, que inoculados subcutáneamente indujeron tumores en ratones BaLB/c recién nacidos. Quedó pues la duda si las leucemias observadas en los ratones inmunizados con virus de sarcoma de Moloney - grupo experimental - no eran realmente reticulosarcomas producto de las interacciones particulares del complejo virus de sarcoma - virus de leucemia de Moloney.

Se detectaron muchos ratones con esplenomegalia en este grupo (14/47), que fallecieron luego sin ser autopsiados. Un grupo considerable de ratones tanto en el grupo experimental como en el grupo control falleció, sin detectarse la causa de su muerte. Al respecto debe ser aclarado, que en experimentos de tan larga duración los ratones de experimentación suelen sufrir enfermedades como ectromelia, pulmonía, y otras que afectan entonces la sobrevivencia. En todos los casos de muertes por otras causas, no se pudieron palpar bazos, ni ganglios agrandados, que hicieran suponer una muerte por leucemia. Si se descartan estos ratones en ambos grupos ( experimental y control ), resulta más claro aún que en el grupo experimental ha habido una activación de la leucemogénesis, que se ha revelado con una muerte más acelerada de los ratones de este grupo.

En conclusión, con el protocolo utilizado, no se ha podido prevenir la leucemia espontánea en la cepa BaLB/c ya que muy pocos ratones alcanzaron el período de aparición de leucemias espontáneas ( 18 meses de vida aproximadamente ) como para hacer una observación con significación estadística.

b) Efecto de la primoinoculación de virus de sarcoma de Moloney sobre la incidencia de leucemia espontánea en el híbrido F1 Swiss x AkR

Como en el experimento anterior interesaba estudiar la efectividad del protocolo de vacunación que utilizaba el virus de sarcoma de Moloney contra las leucemias espontáneas en cepas murinas de alta incidencia de leucemia. Para ello se utilizó un híbrido entre ratones Swiss y AkR, ya que estos últimos son difíciles de criar en cantidades grandes. El híbrido no tiene una incidencia tan elevada de leucemia espontánea como la cepa AkR, pero orilla en un 35 % a los 18 meses de edad.

El protocolo de vacunación utilizado no difirió mayormente del indicado para los otros estudios. Sin embargo en este caso se decidió vacunar a los ratones experimentales con una sólo dosis subcutánea de virus de sarcoma de Moloney, no efectuándose una dosis refuerzo. Se estimaba de esta manera poder reducir

la incidencia de posibles recurrencias como se observara en los estudios con la cepa BaLB/c. Este efecto se logró, y se indica en el gráfico 13. La supervivencia de estos ratones fue observada durante 588 días ( más de 1 1/2 años ). Como se aprecia de la curva no parece haber habido diferencias sustanciales en el ritmo de mortalidad entre el grupo control y el experimental. Al cabo de los 588 días, cuando se dio por terminado el experimento sobrevivían un 9% de ratones en el grupo experimental y un 19% en el grupo control.

Un estudio sobre las causas de mortalidad durante este lapso en los dos grupos indicó que en el grupo experimental se observaron 10 leucemias ( 23% ), mientras que en el grupo control 11 ( 27% ) ( tabla 27 ). También como sucediera en el experimento con los ratones BaLB/c un número de ratones fallecieron por causas ajenas al experimento. Se observaron unos pocos casos de tumores sólidos en los ratones inmunizados con virus de sarcoma de Moloney - grupo experimental - 2/42 ( 5% ).

Si bien no existía una diferencia en cuanto a la incidencia de leucemias espontáneas en los grupos control y experimental, si se observó una diferencia en cuanto a la latencia de las mismas. En el gráfico 14 hemos graficado el total de leucemias aparecidas en función del mes de vida de los ratones en el momento de su aparición. Surge claramente una diferencia en cuanto a la velocidad de aparición de las leucemias en el grupo experimental, respecto de los controles respectivos. Esta diferencia es estadísticamente significativa entre el 11 y 13 mes de vida de los ratones, evaluada por medio del test de  $\chi^2$ , (  $0,01 < p < 0,02$  ).

En conclusión, con el protocolo de vacunación ensayado, no se ha podido prevenir la aparición de leucemias espontáneas en los ratones F1 Swiss x AkR. Se observó en cambio un adelanto significativo en el ritmo de aparición de leucemias espontáneas en los ratones vacunados con virus de sarcoma de Moloney. Por otra parte, se logró con el protocolo de vacunación modificado, disminuir los efectos secundarios debidos al protocolo mismo que inducían mortalidad en los ratones a largo plazo, permitiendo observar la incidencia de leucemia espontánea en ratones inmunizados con virus de sarcoma de Moloney.

#### 4. DISCUSION y CONCLUSIONES

Nuestro trabajo experimental tenía un propósito doble. En primer lugar nos interesaba estudiar un protocolo de vacunación contra diversos tipos de leucemias murinas experimentales: primarias, trasplantables y espontáneas que se encuentran en la Sección de Leucemia Experimental de la Academia Nacional de Medicina. En segundo lugar, intentábamos aportar datos para la interrelación de virus leucémicos murinos, basados principalmente en la caracterización del antígeno de trasplante específico, que sólo es posible realizar mediante experimentos " in vivo " de trasplante.

Con respecto al primer objetivo, se efectuó primeramente un estudio exhaustivo de los antecedentes existentes. Un defecto subyacente en todos los trabajos de inmunoprevención que fueron consultados era que los mismos presentaban un protocolo de inmunización determinado intuitivamente, sin la realización de estudios empíricos definidos, usando como criterio final y único sobre la efectividad del método usado, el hecho que hubiera o no crecimiento tumoral en el ratón desafiado y que su vida se prolongara.

Los trabajos de inmunoprevención estudiados muestran una gran gama de experimentos que se han concentrado en un protocolo determinado de vacunación contra un sólo tipo de leucemia. En un caso el objetivo han sido las leucemias singeneicas de trasplante ( 205, 336, 311, 9, 273, 125, 206, 88, 249, 253, 252, 369, 126, 278, 327, 303 ). En otros experimentos el objetivo fueron las leucemias primarias inducidas por virus leucémicos exógenos ( 95, 248, 15, 258, 373, 372, 245, 250, 182, 184, 45, 169, 197, 167, 166 ) o las leucemias espontáneas ( 167, 166, 176b, 326, 119 ). Sólo se han publicado unos pocos trabajos donde se han hecho estudios extensivos con el mismo protocolo tanto a leucemias trasplantables como a leucemias primarias, pero en ningún caso con las leucemias espontáneas ( 101, 26 ). Por lo tanto hasta el presente momento no se ha podido llegar a un único protocolo para la prevención de las leucemias murinas.

Se han hecho numerosos estudios de inmunoprevención de leucemia murina pero sin un detenido análisis del efecto de dicho protocolo sobre al posterior so-

brevida. Es evidente que esos estudios pueden no haber sido posibles en algunos laboratorios por diversas razones, entre ellas, la dificultad de seguir la observación de ratones en condiciones óptimas durante largos períodos como lo requieren estos trabajos. Pero estos estudios son de gran importancia, ya que como hemos observado nosotros en nuestro trabajo, una leucemia rechazada en un primer momento, no significa curación total de la enfermedad. Existe el peligro de recurrencias o complicaciones diversas. Sólo se han encontrado unos pocos trabajos en la literatura que dedican un poco de atención a este problema, con leucemias trasplantables y primarias ( 252, 182, 45 ) y con leucemias espontáneas ( 167, 176a, 176b, 316, 326, 119 ).

En nuestro trabajo comenzamos estudiando un sistema, el virus del sarcoma de Moloney, ya profusamente documentado en muchos y variados aspectos. Nos interesó definirlo virológicamente e inmunológicamente. Por ello fue necesario en primer lugar definir una serie de parámetros experimentales por medio de ensayos preliminares para así lograr un protocolo de vacunación que nos permitiera atenuar lo mejor posible, la patogenicidad residual del virus de sarcoma de Moloney infeccioso, pero al mismo tiempo manteniendo elevada su capacidad inmunizante.

Los estudios iniciales con el virus de sarcoma de Moloney ( VSM-M ) demostraron claramente que el primer problema que se debió superar fue el inherente al uso del VSM-M infeccioso como inmunógeno. Los trabajos preliminares ( 246 ) demostraron que la inoculación por vía intramuscular del VSM-M en ratones de la cepa BaLB/c inducía sarcomas que crecían y regresaban dentro de un lapso de 25 a 28 días postinoculación. Sin embargo, dentro de los 120 días postinoculación se observaban recurrencias de sarcomas en diversos sitios alejados del lugar de la primoinoculación: hígado, diafragma, bazo, etc., que ocasionaban un 50% de mortalidad en los ratones. Este hecho también fue observado por otros investigadores que utilizaron la vía subcutánea-intramuscular para estudios con VSM-M ( 321 ).

En este trabajo se ha demostrado claramente que este problema se

podía superar utilizando para la vacunación, la vía subcutánea que reducía a un mínimo el porcentaje de recidivas de sarcoma de Moloney, dentro de un plazo de 120 días luego de la primoinoculación. Por otra parte, los tumores inducidos por VSM-M inoculado subcutáneamente crecían mucho menos, y regresaban más rápidamente que en aquellos ratones inoculados por vía intramuscular. Además la sobrevivencia de los ratones inoculados por esta vía era mayor que por la vía intramuscular, dato que fue de suma importancia para los estudios contra la leucemia espontánea. Por último, esta vía permitía adquirir una fuerte inmunidad aún a dosis de virus de sarcoma de Moloney que no producían sarcomas detectables macroscópicamente.

Es importante mencionar, que los VSM-M deben ser muy cuidadosamente definidos, ya que diferentes partidas de VSM-M, pueden presentar comportamientos biológicos y patológicos diferentes ( 220 ).

Es difícil avanzar una hipótesis que explique satisfactoriamente el rol de atenuación de la vía subcutánea sobre el VSM-M y la posterior incidencia de recurrencias secundarias. Otros investigadores observaron que utilizando la vía intramuscular no se observaba correlación entre una menor cantidad de VSM-M inoculado y una menor incidencia posterior de recidivas de sarcoma ( 321 ). La cantidad de recidivas era casi la misma dentro de un plazo de observación de 159 días. Probablemente el hecho de que exista menor cantidad de tejido muscular en el panículo subcutáneo del ratón, y que este virus tenga marcado tropismo hacia este y no otro tejido, acompañado de una necesidad de reclutamiento de nuevas células para mantener la infección expliquen de alguna manera la menor letalidad observada a corto plazo.

Los resultados que hemos obtenido con este trabajo demuestran la efectividad del protocolo utilizado, ya que se observó significativa protección contra la inducción de leucemias primarias por virus ecotrópicos de leucemia murina.

En primer lugar se estudió la efectividad de nuestro protocolo contra leucemias primarias inducidas por los virus de leucemia de Friend, Moloney y Rau-

scher. Estas leucemias han sido estudiadas por muchos otros laboratorios y constituyen un modelo apropiado para ensayar la efectividad de nuevos protocolos de vacunación contra leucemias murinas.

Los ensayos positivos con nuestro protocolo contra estos virus de leucemia murina, alentaron estudios contra otros virus que se mantienen en la Sección de Leucemia Experimental de la Academia Nacional de Medicina. Así se estudió la inducción de protección contra las leucemias primarias inducidas por los virus de leucemia murina PLLV/T2 y H179A. También en estos casos los resultados fueron positivos.

Sin embargo, a pesar de los datos serológicos de la presencia de antígenos compartidos entre el virus de leucemia de Gross y el VSM-M ( 126, 89 ), no pudimos hallar protección significativa contra la inducción de leucemia primaria por el virus de leucemia de Gross, utilizando ratones Swiss adultos. Se observó sin embargo que a diferencia de lo hallado por otros investigadores ( 17 ), fue posible inducir leucemia de Gross inoculando ratones Swiss adultos, probablemente debido al mayor título de nuestra preparación. Por otra parte se observó una posible acción inductora de nuestro protocolo, ya que se registraron leucemias con latencias considerablemente menores en los ratones inmunizados con VSM-M que en los controles respectivos.

Los estudios con leucemias de trasplante inducidas por diversos métodos pertenecientes a la Sección de Leucemia Experimental, intentaron determinar la efectividad de una vacuna viral contra leucemias, cuyas células no poseen virus infeccioso detectable, utilizando para ello el ensayo altamente sensible de oncogenicidad " in vivo " en ratones recién nacidos.

Los resultados obtenidos indicaron que en algunos casos fue posible hallar protección significativa contra este tipo de leucemias celulares. La leucemia H 110 y en menor grado la leucemia R 14 pudieron ser prevenidas con nuestro protocolo. La leucemia P 277 por demostrarse en estudios repetidos ( 246 )

que era una leucemia sumamente letal y de veloz crecimiento, no pudo ser prevenida con este protocolo. Esta última leucemia, resultó ser la única que era antígeno de Gross negativa en ensayos de citotoxicidad " in vitro " ( 310 ). La falta de expresión antigénica en la membrana celular, bien podría explicar la falta de respuesta a nuestro protocolo de vacunación.

Los estudios de inmunización contra la leucemia espontánea de los ratones BaLB/c y los híbridos F1 Swiss x AkR demostraron complicaciones debidas al comportamiento del seudotipo VSM-M a largo plazo.

En los ratones BaLB/c inmunizados con repetidas dosis de VSM-M se observó una mortalidad mayor en los ratones inmunizados - grupo experimental- que en los controles, particularmente acentuada luego de recibir la tercera dosis refuerzo de VSM-M infeccioso. Se pudo apreciar que un número considerable de ratones inmunizados con VSM-M desarrollaban esplenomegalias y leucemias. Pudimos demostrar la presencia de virus de sarcoma de Moloney en los bazos leucémicos por inoculación intramuscular de extractos acelulares de estos órganos. Así se confirmó la presencia residual de VSM-M en ratones inoculados anteriormente.

En los ratones F1 Swiss x AkR se logró reducir sustancialmente la mortalidad debida a la inoculación de repetidas dosis refuerzo. Se inoculó a los ratones con una única dosis como vacuna activa, ya que los ensayos previos ( 246 ) demostraron que una dosis única protegía adecuadamente a los ratones Swiss x AkR por períodos prolongados. Si bien logramos de esta manera reducir la mortalidad debido al posible accionar del VSM-M infeccioso, se observó en este caso una significativa disminución del tiempo de latencia de las leucemias de aparición espontánea en estos híbridos entre el 11 y 13 mes de vida.

En general los resultados observados tanto con las leucemias primarias y trasplantables, como con las leucemias espontáneas demostraron que el uso del virus VSM-M infeccioso en estudios de sobrevivencia de larga duración como los que aquí se realizaron, traían aparejado una mortalidad acumulada en los ratones vacunados, superior a la de los controles correspondientes.

Existirían varias posibles explicaciones para estos hechos. En primer lugar, se ha observado que las interacciones entre los virus de leucemia de Friend , Moloney y Rauscher infecciosos con el virus de sarcoma de Moloney " in vivo ", aumentan la oncogenicidad de este último ( 56, 367 ). Se formarían nuevas mezclas fenotípicas entre el virus de leucemia inoculado primero y el virus de sarcoma inoculado posteriormente ( 54 ). Luego, se ha demostrado que en ciertas cepas de ratones como la C 58 y la AkR, el VSM-M formaría una mezcla fenotípica con el virus de leucemia de Gross endógeno en estos ratones, produciendo un nuevo seudotipo, el virus de sarcoma de Gross, que induciría sarcomas de crecimiento progresivo y letal ( 53 ). No se excluiría la posibilidad de que además de la mezcla fenotípica, existiera la posibilidad de adición de nueva información genética que modificaría las propiedades biológicas y patogénicas del nuevo seudotipo.

También se ha observado que una vez que se ha producido la regresión de los sarcomas inducidos por el VSM-M luego de la primoinoculación, el virus permanece en el ratón en los órganos linfoides en forma de una infección persistente controlada por el huésped ( 124, 55 ). Además una vez pasados los 6 meses de vida los ratones pueden volver a presentar sensibilidad a la oncogénesis por VSM-M, pudiendo entonces reiniciarse el proceso oncogénico ( 277 ). La resistencia que presentan los ratones jóvenes al VSM-M, se perdería con la edad, llegando a ser al cabo de 2 a 3 años de vida similar a la del ratón recién nacido.

Es también importante considerar el genotipo de los ratones utilizados como responsables en parte de los resultados hallados. Se ha observado que mientras los ratones BaLB/c son altamente susceptibles a la oncogénesis por el VSM-M, los ratones AkR y sus híbridos Swiss x AkR, son muy resistentes a la inducción de tumores por este virus ( 59 ). Estudios posteriores pudieron determinar la presencia de un gen dominante que regularía la susceptibilidad a la oncogenicidad por VSM-M ( 60 ).

Por último, es importante mencionar la observación de activación de leucemia espontánea que vimos en los ratones F1 Swiss x AkR. Este hecho no parece aislado, ya que inoculando la proteína viral gp71 de virus de leucemia murina de Friend en ratones C 57 y AkR, se pudo observar recientemente un fenómeno similar ( 176a, 176b ). Este hecho hablaría claramente de un mecanismo mediado por componentes estructurales de los virus tipo C, independiente al menos en ese experimento de la actividad genética del virus.

Este descubrimiento complica bastante el campo de la inmunoprevención de las leucemias espontáneas, pues aparentemente nos estaría indicando que no es suficiente la inactivación de la capacidad replicativa del virus inmunizante para evitar la activación de virogenes endógenos.

El fenómeno de la activación de los virus leucémicos es actualmente un área de la investigación sumamente polémico. Se ha podido inducir los virus leucémicos " in vitro " e " in vivo " de variadas maneras, tanto por hormonas, agentes químicos, reacciones inmunológicas o infecciones ( 162 ). También se ha observado el fenómeno de activación espontánea tanto en ratones generalmente viejos, como " in vitro " luego de varios repiques. Los mecanismos íntimos de este proceso aún se desconocen, pero evidentemente una vez conocidos permitirán aportar datos importantes para explicar el comportamiento de las vacunas a largo plazo.

El segundo objetivo de nuestro trabajo, era aportar datos para la interrelación de los virus leucémicos basados en la caracterización del antígeno de trasplante por medio de técnicas " in vivo ". Como ya se ha desarrollado previamente en la parte A de este trabajo, no está aún resuelto la estructura específica del antígeno de trasplante tumoral que interviene en el rechazo de tumores inducidos por oncornavirus. Es evidente que los componentes estructurales de los virus tipo C juegan un rol en la estructura del antígeno específico de trasplante tumoral, pero este rol no está aún bien delucidado ( 303 ). El hecho que en nuestro trabajo hayamos podido encontrar protección con una vacuna viral contra leucemias que eran virus negativas ( ensayadas por el bioensayo de oncogenicidad " in vivo " ), nos estaría indicando que en esos casos habría una expresión parcial del genoma viral integrado en el ácido desoxiribonucleico celular, con expresión y producción de

algunas proteínas estructurales de los oncornavirus. Estas se ubicarían en la membrana celular formando parte del antígeno específico de trasplante tumoral, siendo entonces reconocidas por los componentes de la respuesta inmune generada por el VSM-M. Resultados recientes en otros modelos similares dan apoyo a esta hipótesis ( 27 ).

A esta misma conclusión se ha llegado en otros trabajos recientes. Así se ha logrado recientemente proteger ratones contra células tumorales libres de virus infeccioso inmunizando previamente con células crónicamente infectadas con virus tipo C murino ( 2 ). También se ha demostrado una posible interacción entre la proteína viral gp71 de los oncornavirus y los antígenos de histocompatibilidad celulares ( 324 ).

Nuestros datos tomados en el contexto de los hallazgos realizados por otros investigadores permiten afirmar que, utilizando la técnica de trasplante " in vivo " de tumores, el antígeno específico de trasplante tumoral de las leucemias inducidas por oncornavirus estaría formado por componentes estructurales del virión que le darían la especificidad antigénica ( grupo Friend-Moloney-Rauscher ó Gross ). No posible delucidar por medio de esta técnica la naturaleza molecular de este antígeno.

Por otra parte, no es posible excluir la presencia en el antígeno específico de trasplante tumoral de antígenos comunes a los grupos Friend- Moloney Rauscher y Gross, no revelables por medio de técnicas de trasplante pero sí por métodos serológicos.

En conclusión, la técnica de trasplante " in vivo " permitiría afirmar que en el ratón los oncornavirus leucémicos formarían dos grupos separados ( Friend-Moloney-Rauscher y Gross ), a pesar que ensayos serológicos y moleculares presentados en la parte A de este trabajo indicarían que formarían un grupo único con un antecesor común en el pasado reciente ( 122b ). Esta situación no se reflejaría en la estructura del antígeno de trasplante tumoral en los ratones.

No podemos concluir esta tesis sin antes destacar la razón principal por la cual se llevó adelante este trabajo.

El mismo forma parte de un plan global sobre la " Inmunoprevención de la leucemia murina " que se viene desarrollando en la Sección Leucemia Experimental del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina.

Nuestra hipótesis de trabajo es que la leucemia y por ende el cáncer en el ratón y presumiblemente en el hombre deben su etiología a un virus. Este virus una vez aislado puede ser utilizado para fabricar vacunas. Todo nuestro trabajo apunta a este fin, y si bien el objetivo final es la cura total de la leucemia humana, entendemos que la forma de lograr esta meta puede ser trabajando con ese objetivo pero con otras especies como el ratón.

En este trabajo hemos estudiado un protocolo único contra leucemias primarias, trasplantables y espontáneas murinas. Hemos tenido éxito e inconvenientes, pero el trabajo de tesis realizado nos permite decir que actualmente nos hallamos más cerca de la prevención definitiva de la enfermedad en el ratón.

Es de esperar, que el aislamiento definitivo del responsable etiológico de la enfermedad en el hombre permita fabricar vacunas aprovechando la experiencia obtenida previniendo la enfermedad en otras especies, como el caso de la leucemia en el ratón.

## 5) RESUMEN

Los primeros trabajos de inmunización contra el cáncer se remontan a principios del siglo. Desde entonces han habido innumerables intentos de prevenir los distintos tipos de neoplasia experimentalmente, entre ellos la leucemia murina.

Los trabajos de inmunoprevención de leucemias previos al presente trabajo, han utilizado protocolos de inmunización sumamente variables. En pocas ocasiones se han efectuado estudios contra leucemias exógenas ( primarias y trasplantables ) y endógenas ( espontáneas ) conjuntamente, y que efectuaran un detenido análisis de la sobrevida final de los animales vacunados .

El propósito de nuestro trabajo fue doble. En primer lugar se estudió un protocolo de vacunación que utilizaba el virus de sarcoma de Moloney ( VSM-M ) como inmunógeno activo contra leucemias exógenas y endógenas pertenecientes a la Sección Leucemia Experimental del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina. En segundo lugar, se deseaba aportar datos para un concepto unificador de los diferentes leucovirus que inducen la leucemia murina a través de estudios de trasplante " in vivo " que permiten caracterizar a los antígenos tumorales específicos de trasplante.

El virus de sarcoma de Moloney y los sarcomas que induce han sido muy caracterizados . La utilización del virus infeccioso como inmunógeno activo y su inoculación por vía intramuscular indujo la aparición de sarcomas recurrentes en diversas localizaciones varios meses después de la primoinoculación. Utilizando la vía subcutánea se pudo reducir a un mínimo estas recurrencias, como así también observar sarcomas primarios menores de regresión más rápida, fuerte inmunización contra desafíos posteriores con VSM-M y una mayor sobrevida los ratones inmunizados.

Las partidas de VSM-M deben ser cuidadosamente definidas ya que pueden presentar comportamientos biológicos y patológicos diferentes.

La utilización del VSM-M como inmunógeno activo permitió proteger contra las leucemias primarias inducidas por los virus de leucemia de Friend, Moloney y Rauscher, demostrando la efectividad del protocolo empleado. Posteriormente se lograron resultados positivos con los virus de leucemia PLLV/T2 y H179A pertenecientes a la Sección Leucemia Experimental.

No se pudo proteger con este protocolo contra la leucemia primaria inducida por el virus de leucemia de Gross a pesar de existir datos serológicos que indicarían la presencia de antígenos comunes entre este virus y el VSM -M.

Los estudios con las leucemias de trasplante inducidas por diversos métodos pertenecientes a la Sección Leucemia Experimental y negativas a la presencia de virus infeccioso por el ensayo de oncogenicidad " in vivo " arrojaron resultados variables. La leucemia H 110 ( de inducción por material humano ) y la R 14 ( de inducción por radiación ) pudieron ser prevenidas con este protocolo. La leucemia P 277 ( de inducción con virus de leucemia de Moloney ) resultó en cambio negativa a este protocolo en experimentos repetidos.

Por último el ensayo del protocolo contra la leucemia espontánea de los ratones de las cepas BalB/c y los híbridos Swiss x AkR demostró en ambos casos una mortalidad aumentada en el grupo inmunizado con VSM-M respecto de los controles. Por otra parte fue posible detectar un menor tiempo de latencia para las leucemias espontáneas en los ratones Swiss x AkR vacunados con VSM-M, si bien en número de las mismas que aparecieron en controles e inmunizados fue la misma en 18 meses de observación.

En general los ratones vacunados con VSM-M infeccioso por vía subcutánea contra la leucemia primaria, trasplantable y espontánea demostraron que a corto plazo no había mayores problemas que afectaran significativamente la sobrevivencia producto del protocolo de vacunación utilizado. A largo plazo en cambio, los ratones vacunados con VSM-M presentaban una mortalidad superior a los controles respectivos.

Existirían varias posibles explicaciones para este hecho: a) las interacciones entre los virus de leucemia murina exógenos o endógenos con el VSM-M creándose nuevos seudotipos con características biológicas y patológicas nuevas; b) una infección crónica persistente de VSM-M que reaparecería más tarde induciendo sarcomas en lugares distantes a la primoinoculación; c) una reaparición de la sensibilidad a la oncogénesis por VSM-M con la mayor edad del ratón; d) el genotipo del ratón vacunado y su relación con la resistencia a la oncogénesis por VSM-M, y e) la activación de virogenes endógenos.

Todas estas posibilidades podrían actuar individualmente o en conjunto y ser responsables de la mayor mortalidad observada a largo plazo en los ratones vacunados con VSM-M infeccioso.

También se ha intentado llegar a un concepto unificador de los leucovirus murinos caracterizando el antígeno tumoral específico de trasplante ( ATET ) por medio de los experimentos de inmunoprevención realizados en este trabajo.

Nuestras observaciones, tomadas en el contexto de las investigaciones realizadas por otros autores, permiten concluir que el ATET inducido en el ratón por los leucovirus murinos tendría probablemente en su estructura componentes estructurales del virión que le proveerían de una especificidad antigénica FMR ( Friend-Moloney-Rauscher) o G ( Gross ).

En conclusión, en el ratón los oncornavirus leucémicos formarían dos grupos separados ( FMR y G ), a pesar de los datos serológicos y moleculares que indicarían que formarían un grupo único, posiblemente con un antecesor común en el pasado reciente.

TABLA 7 : Titulación del virus de sarcoma de Moloney " in vivo " en ratones BaLB/c recién nacidos y adultos de 2 meses.

Log de dilución	<u>RESPUESTA TUMORAL</u>			
	N°de respuestas + / total inoculado	%	N°de respuestas + / total inoculado	%
-1	12 / 12	100	12 / 12	100
-2	11 / 11	100	12 / 12	100
-3	11 / 11	100	12 / 12	100
-4	7 / 16	43	8 / 12	66
-5	0 / 12	0	0 / 12	0
-6	0 / 12	0	0 / 12	0

Cálculo del título de la preparación viral por el método de Reed y Muench ( para ratones BaLB/c recién nacidos ).

Log de dilución	N°de respuestas + / total inoculado	R +	R -	Sumatoria		Relación R + / tot , %
				R +	R -	
-1	12 / 12	12	0	41	0	41 / 41 100
-2	11 / 11	11	0	29	0	29 / 29 100
-3	11 / 11	11	0	18	0	18 / 18 100
-4	7 / 16	7	9	7	9	7 / 16 43
-5	0 / 12	0	12	0	21	0 / 21 0
-6	0 / 12	0	12	0	33	0 / 33 0

TABLA 7: ContinuaciónCálculo del título de la preparación viral por el método de Reed y MuenchManejo numérico

$$\begin{aligned}
 \text{Log dosis tumoral (DT}_{50}\text{) 50\%} &= -\log \text{dil} - (\text{distancia relativa por factor} \\
 &\quad \text{factor de dilución}) \\
 &= -3 - (100 - 50/100 - 43 \times 1) = \\
 &= -3 - (50/57) = \\
 &= -3 - 0,87 = \\
 &= -3,87
 \end{aligned}$$

$$\log \text{DT}_{50} = -3,87$$

$$\text{DT}_{50} = 10^{-3,87}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Título de la preparación} &= \frac{10^{3,87} \text{DT}_{50}/\text{ml}}{0,05 \text{ ml}} = \\
 &= 2 \times 10^{4,87} = \\
 &= 1,5 \times 10^5 \text{DT}_{50}/\text{ml}
 \end{aligned}$$

El cálculo del título para los ratones BalB/c adultos indicó:

$$\text{Título de la preparación} = 5 \times 10^{4,5} \text{DT}/\text{ml} = 1,5 \times 10^5 \text{DT}_{50}/\text{ml}$$

TABLA 8: Titulación del virus de sarcoma de Moloney " in vivo " en ratones BaLB/c de dos meses de edad ( Método de gradación ).

RESPUESTA TUMORAL

Log de dilución	Nº de respuestas + / total inoculado	Tiempo de latencia	Desviación estandar ( s )
- 1	12 / 12	5	0.42
- 2	12 / 12	7	0.42
- 3	12 / 12	10	3.3
- 4	8 / 12	16	6.4
- 5	0 / 12	+ 35	-
- 6	0 / 12	+ 35	-

TABLA 9 : Titulación del virus de leucemia murina PLLV/ T2 en ratones BaLB/c de 3 meses de edad

Log de dilución	Nº de muertos / total inoculado	R +	R -	Sumatoria		Relación		%
				R +	R -	R + / Tot		
- 1	12 / 12	12	0	31	0	31 / 31	100	
- 2	12 / 12	12	0	19	0	19 / 19	100	
- 3	6 / 12	6	6	7	6	7 / 13	54	
- 4	1 / 12	1	11	1	17	1 / 18	6	
- 5	0 / 12	0	12	0	29	0 / 29	0	

Tiempo de observación: 66 días

TABLA 9 cont: Cálculo del título por el método de Reed y Muench

Manejo numérico:

$$\begin{aligned}
 \text{Log dosis letal 50\% ( DL}_{50}\text{)} &= - \log \text{dil} - ( \text{dist. relativa por factor de} \\
 &\quad \text{dilución} ) \\
 &= - 3 - ( 54 - 50 / 54 - 6 \times 1 ) \\
 &= - 3 - ( 4 / 48 ) \\
 \log \text{DL}_{50} &= - 3,08 \\
 \text{DL}_{50} &= 10^{-3,08} \\
 \text{Título de la preparación} &= \frac{10^{3,08} \text{DL}_{50}/ \text{ml}}{0,05} \\
 &= 10^{3,08} \times 5 \\
 &= 5,1 \times 10^3 \text{DL}_{50}/ \text{ml}
 \end{aligned}$$

TABLA 10 : Títulos de otros virus de leucemia murina

<u>Virus de leucemia murina</u>	<u>Título ( DL<sub>50</sub>/ml)</u>	<u>Tiempo de observación ( días )</u>
PLLV/T2	5,1 x 10 <sup>3</sup>	66
VLM-R	3,7 x 10 <sup>2</sup>	69
VLM-F	5 x 10 <sup>2</sup>	74
VLM-H179A	5 x 10 <sup>4</sup>	56

NOTA: PLLV/T2 = virus de leucemia Precerutti-Law; VLM-R= virus de leucemia de Rauscher; VLM-F= virus de leucemia de Friend; VLM-H179A= virus de leucemia H179A .

TABLA 11: Titulación de la leucemia de trasplante P 277Ratones: BalB/c de 3 meses

Cantidad de células	N° de muertos / total inoculado	%
5 x 10 <sup>3</sup>	12 / 12	100
1 x 10 <sup>3</sup>	12 / 12	100
5 x 10 <sup>2</sup>	12 / 12	100
2,5 x 10 <sup>2</sup>	12 / 12	100
1 x 10 <sup>2</sup>	12 / 12	100
5 x 10 <sup>1</sup>	6 / 12	50
1 x 10 <sup>1</sup>	2 / 12	16

Tiempo de observación: 20 díasDosis letal 50% ( DL<sub>50</sub> ) = 50 célulasTABLA 12: Titulación de las leucemias trasplantables

<u>Leucemia murina</u>	<u>Dosis letal 50%</u> ( DL <sub>50</sub> )	<u>Tiempo de observación</u> ( días )
H 110	80	19
R 14	100	25

TABLA 13 : Respuesta tumoral de ratones BaLB/c inoculados con virus de sarcoma de Moloney por vía subcutánea e intramuscular

Edad de ratones: 2 meses

Log de dilución	<u>RESPUESTA TUMORAL</u>			
	<u>VIA SUBCUTANEA</u>		<u>VIA INTRAMUSCULAR</u>	
	Nº de respuestas + / total inoculado	%	Nº de respuestas + / total inoculado	%
- 1	11 / 12	91	12 / 12	100
- 2	10 / 12	83	12 / 12	100
- 3	9 / 12	75	12 / 12	100
- 4	2 / 10	20	8 / 12	66
- 5	0 / 12	0	0 / 12	0

TABLA 14 : Sobrevida de ratones BaLB/c inoculados con virus de sarcoma de Moloney por vía intramuscular y subcutánea

Log de dilución	<u>VIA SUBCUTANEA*</u>				<u>VIA INTRAMUSCULAR</u>					
	Días	postinoculación			Días	postinoculación				
		6	21	35	97		6	21	35	97
- 1	100	100	100	100	91	100	100	90	30	
- 2	100	100	100	100	100	100	100	66	16	
- 3	100	100	100	100	100	100	100	100	70	
- 4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
- 5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

NOTA: ( \* ) : Las cifras indicadas son % .

TABLA 15 : Desafío de ratones BaLB/c inmunizados con virus de sarcoma de Moloney por vía intramuscular y subcutánea

Tiempo de observación: 35 días

Log de dilución	<u>VIA SUBCUTANEA</u>		<u>RESPUESTA TUMORAL</u> <u>VIA INTRAMUSCULAR</u>		<u>CONTROLES</u>			
	N° de resp. + / total inoc.	%	N° de resp. + / total inoc.	%	A <sup>*</sup>		B <sup>**</sup>	
					Tot.	%	Tot.	%
- 1	0 / 11	0	0 / 2	0	8 / 12	66	6 / 6	100
- 2	0 / 12	0	0 / 1	0				
- 3	0 / 12	0	0 / 7	0				
- 4	1 / 12	8	1 / 9	10				
- 5	5 / 12	41	6 / 12	50				

NOTA:( \* ) ratones de 5 meses de edad

( \*\* ) ratones de 1 a 2 meses de edad

TABLA 16: Observaciones sobre la sobrevida de ratones BaLB/c inmunizados con virus de sarcoma de Moloney y desafiados con virus de leucemia de Rauscher

	<u>Grupo experimental</u>	<u>Grupo control</u>
Leucémicos	2	18
Normales	4	3
Recurrencias	2	-
Otras causas	9	-
Sobrevivientes	4 / 17 ( 23 % )	2 / 21 ( 9 % )

Lapso de observación: 369 días

TABLA 17 : Esplenomegalia palpable en ratones BaLB/c inmunizados con virus de sarcoma de Moloney y desafiados con virus de leucemia de Rauscher

<u>Grupo experimental</u>		<u>Grupo control</u>	
Ratones con esplenomegalia / total	%	Ratones con esplenomegalia / total	%
16 / 20	25	16 / 23	69

Tiempo de observación : 32 días

---

TABLA 18 : Observaciones sobre la sobrevida de ratones BaLB/c inmunizados con virus de sarcoma de Moloney y desafiados con virus de leucemia Friend

	<u>Grupo experimental</u>	<u>Grupo control</u>
Leucémicos	7	18
Normales	7	5
Recurrencias	1	-
Otras causas	6	-
Sobrevivientes	7 / 21 ( 33% )	7 / 23 ( 30% )

Tiempo de observación: 169 días

---

TABLA 19: Peso y latencia de bazo en ratones Swiss inmunizados con virus de sarcoma de Moloney y desafiados con virus de leucemia de Gross

<u>Grupo experimental</u>		<u>Grupo control</u>	
<u>Peso bazo</u> ( mg )	<u>Latencia</u> ( días )	<u>Peso bazo</u> ( mg )	<u>Latencia</u> ( días )
1394	76	940	83
1010	76	730	181
904	76	680	127
658	76	650	153
		410	296

TABLA 20 : Observaciones sobre la sobrevivencia de ratones Swiss inmunizados con virus de sarcoma de Moloney y desafiados con virus de leucemia de Gross

	<u>Grupo experimental</u>	<u>Grupo control</u>
Leucémicos	4	6
* Bazo y ganglio palpables, pero no autopsiados	6	3
Normales	6	8
Otras causas	3	5
Recurrencias	1	-

NOTA: ( \* ) Ratones que fallecieron imprevistamente sin poder ser autopsiados, pero con síntomas de esplenomegalia y ganglios hiperplásicos.

Tiempo de observación: 296 días

TABLA 21 : Observaciones sobre la sobrevida de ratones BaLB/c inmunizados con virus de sarcoma de Moloney y desafiados con virus PLLV/T2

	<u>Grupo experimental</u>	<u>Grupo control</u>
Leucémicos	5	18
* Bazo y ganglio palpable, pero no autopsiado	4	-
Normales	2	-
Otras causas	5	-
Recurrencias	3	-

Tiempo de observación : 369 días

NOTA: ( \* ) Animales que fallecieron imprevistamente sin poderse autopsiar, pero con esplenomegalia y ganglios hiperplásicos evidentes.

TABLA 22 : Observaciones sobre la sobrevida de ratones BaLB/c inmunizados con virus de sarcoma de Moloney y desafiados con virus de leucemia H179 A

	<u>Grupo experimental</u>	<u>Grupo control</u>
Leucémicos	3	20
* Bazo y ganglio palpable, pero no autopsiado	2	-
Normales	5	-
Otras causas	3	-
Recurrencias	1	-

Tiempo de observación: 137 días

NOTA: ( \* ) Idema tabla 22.

TABLA 23 : Observaciones sobre la sobrevida de ratones BaLB/c inmunizados con virus de sarcoma de Moloney y desafiados con leucemia de pasaje H 110

	<u>Grupo experimental</u>	<u>Grupo control</u>
Leucémicos	10	19
* Bazo y ganglio palpable, pero no autopsiados	3	-
Normales	6	2
Otras causas	3	-
Recurrencias	-	-

Tiempo de observación: 165 días

NOTA : Los ratones fallecieron imprevistamente sin poderse autopsiar, pero con esplenomegalia y ganglios hiperplásicos evidentes.

TABLA 24 : Observaciones sobre la sobrevida de ratones BaLB/c inmunizados con virus de sarcoma de Moloney y desafiados con leucemia de pasaje R 14

	<u>Grupo experimental</u>	<u>Grupo control</u>
Leucémicos	5	10
* Bazo y ganglio palpable, pero no autopsiados.	2	-
Normales	1	3
Otras causas	8	3
Recurrencias	1	-

Tiempo de observación : 102 días

NOTA: ( \* ) Los ratones fallecieron imprevistamente sin poderse autopsiar pero con esplenomegalia y ganglios hiperplásicos evidentes.

TABLA 25 : Observación de sobrevida de ratones BaLB/c inmunizados con virus de sarcoma de Moloney y desafiados con leucemia de pasaje P 277

	<u>Grupo experimental</u>	<u>Grupo control</u>
Ratones leucémicos muertos	19 / 19	20 / 20

Tiempo de observación : 14 días

Dosis de células inoculadas por ratón : 14 células / 0,2 ml intraperitoneal

TABLA 26 : Observación de la incidencia de leucemia espontánea en ratones BaLB/c inmunizados con el virus de sarcoma de Moloney

	<u>Grupo experimental</u>	<u>Grupo control</u>
Leucémicos	4	1
* Bazo y ganglio palpable, pero no autopsiados	14	-
Normales	11	27
Otras causas	18	22
Tumores varios	-	1

Tiempo de observación : 504 días

NOTA ( \* ) : Los ratones fallecieron súbitamente sin poderse autopsiar pero con esplenomegalia y ganglios hiperplásicos evidentes.

TABLA 27 : Observación de la incidencia de leucemia espontánea en ratones Swiss x AkR inmunizados con el virus de sarcoma de Moloney

	<u>Grupo experimental</u>	<u>Grupo control</u>
Leucémicos	10	11
Normales	21	16
Otras causas	9	20
Tumores sólidos	2	-

Tiempo de observación: 588 días

---

GRAFICO 1 : Protocolo para la inmunoprevención de leucemias murinas

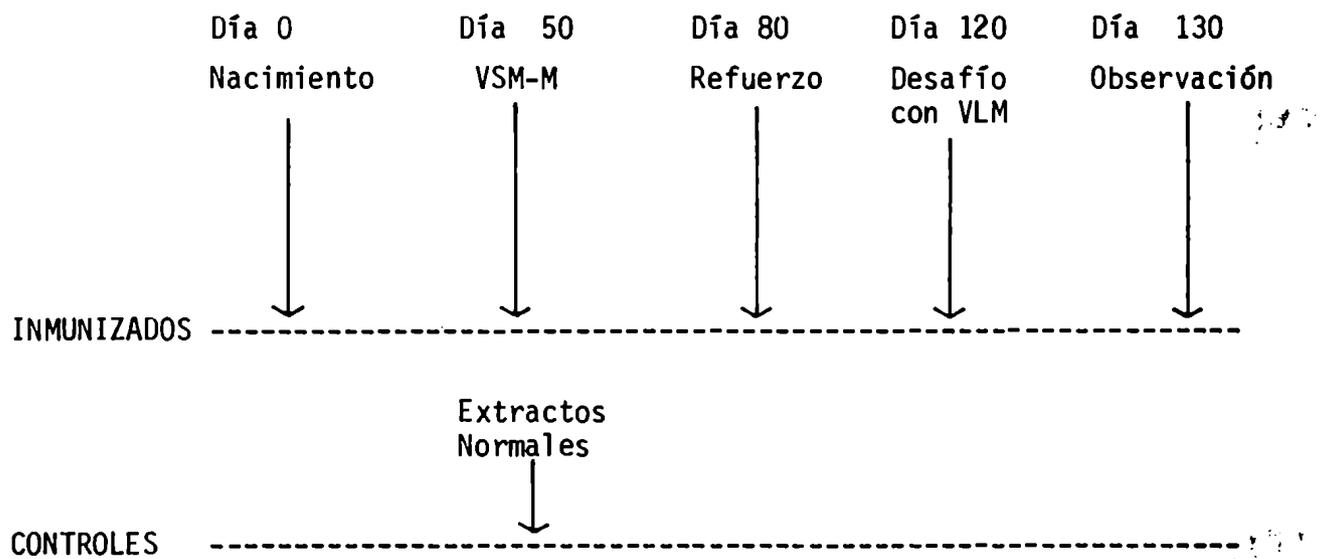


GRAFICO 2 : Titulación del virus de sarcoma de Moloney en ratones  
BaLB/c de 2 meses

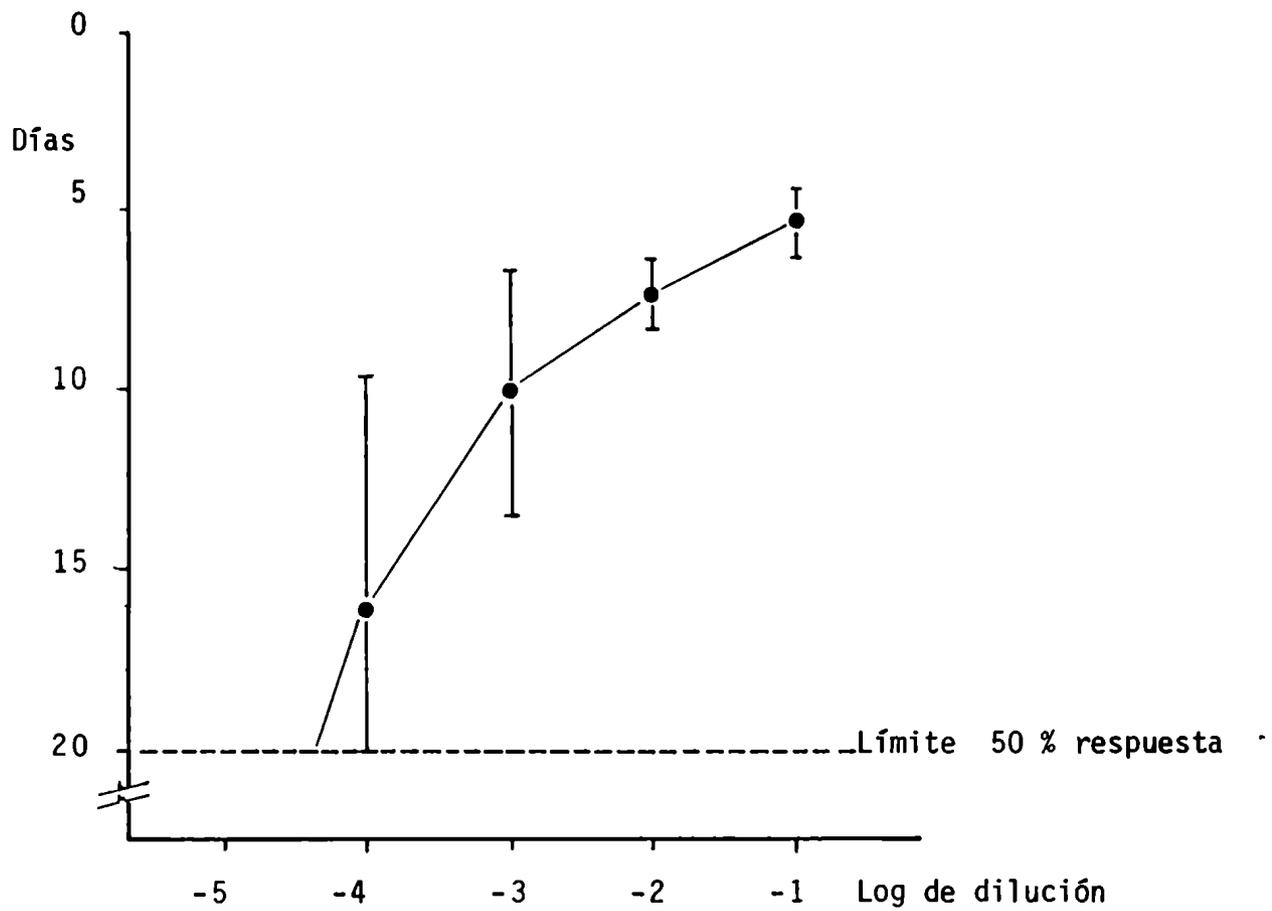
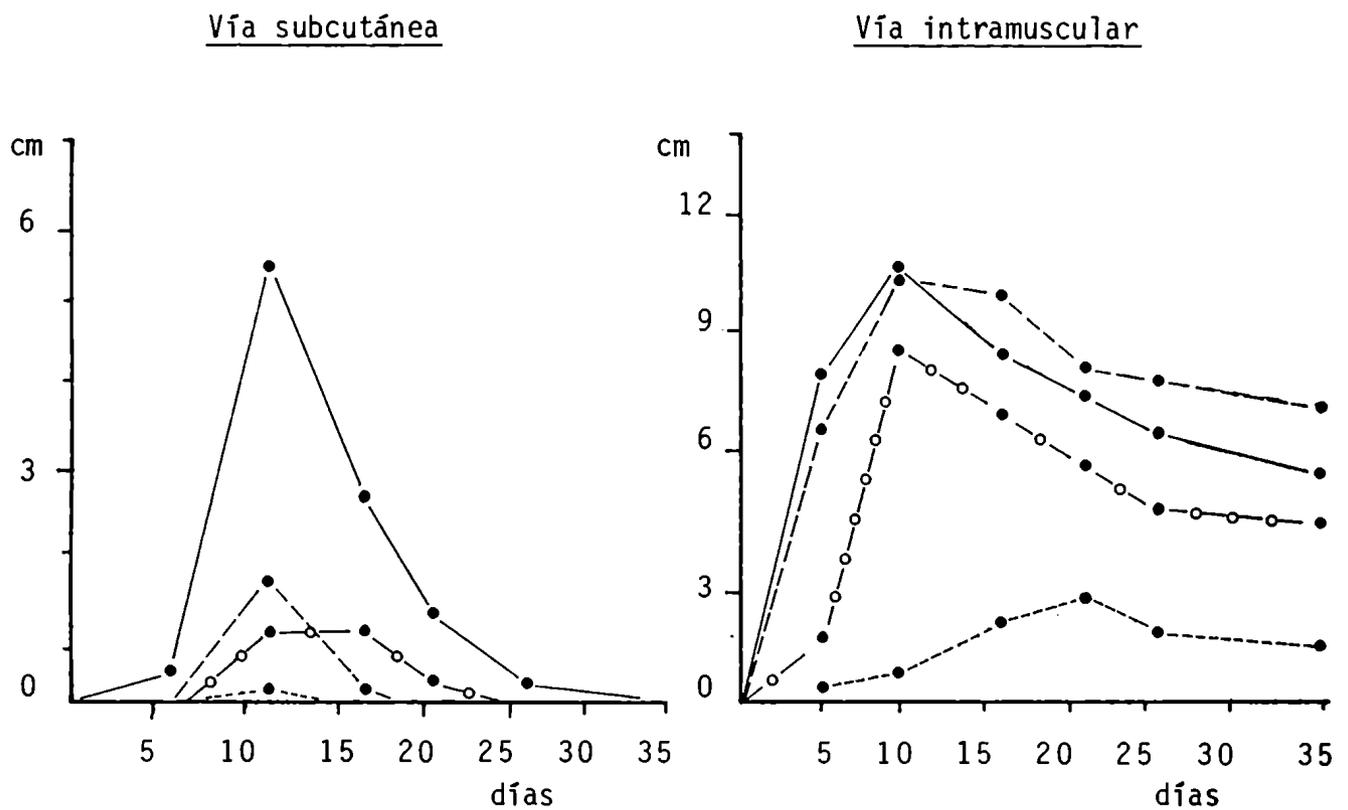


GRAFICO 3 : Crecimiento del sarcoma de Moloney en ratones BaLB/c adultos inoculados por vía subcutánea e intramuscular



Referencias:

—————	dilución $10^{-1}$
-----	dilución $10^{-2}$
-o-o-o-o-	dilución $10^{-3}$
.....	dilución $10^{-4}$

GRAFICO 4 : Inmunoprevención de la leucemia primaria de Moloney

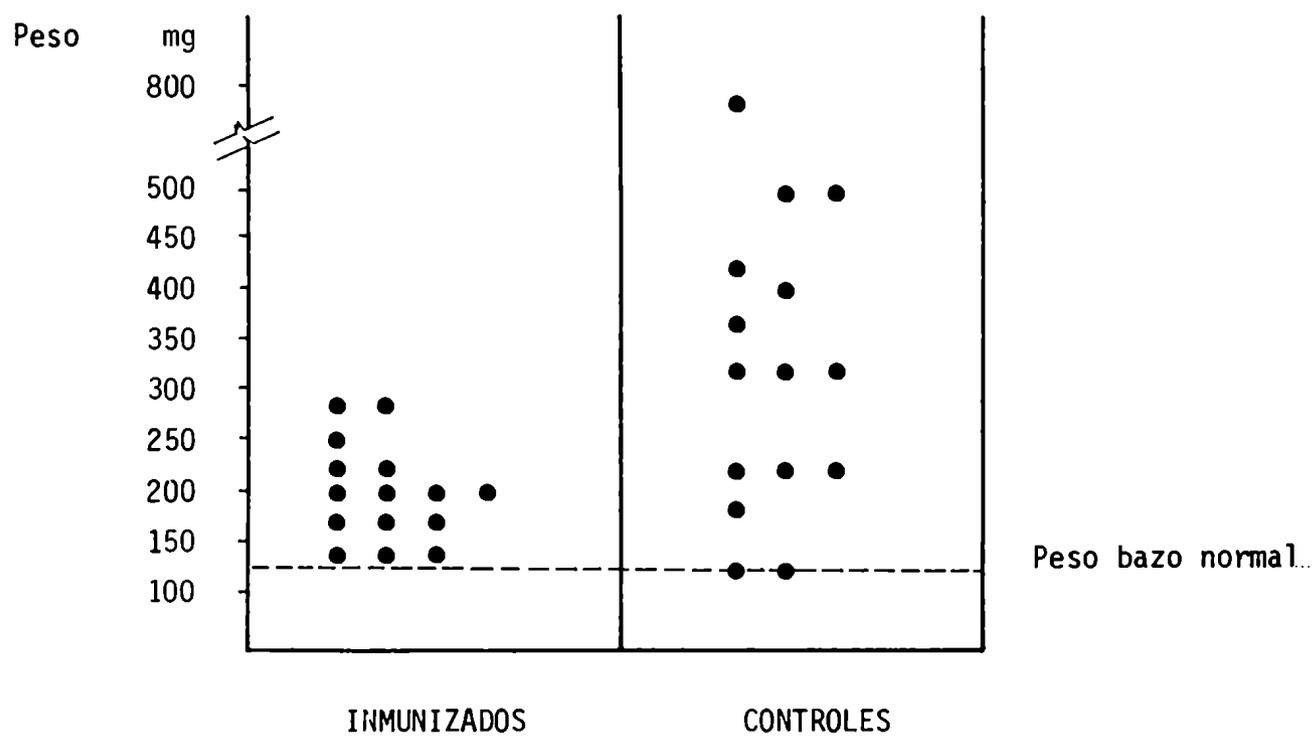


GRAFICO 5 : Inmunoprevención de la leucemia primaria de Rauscher

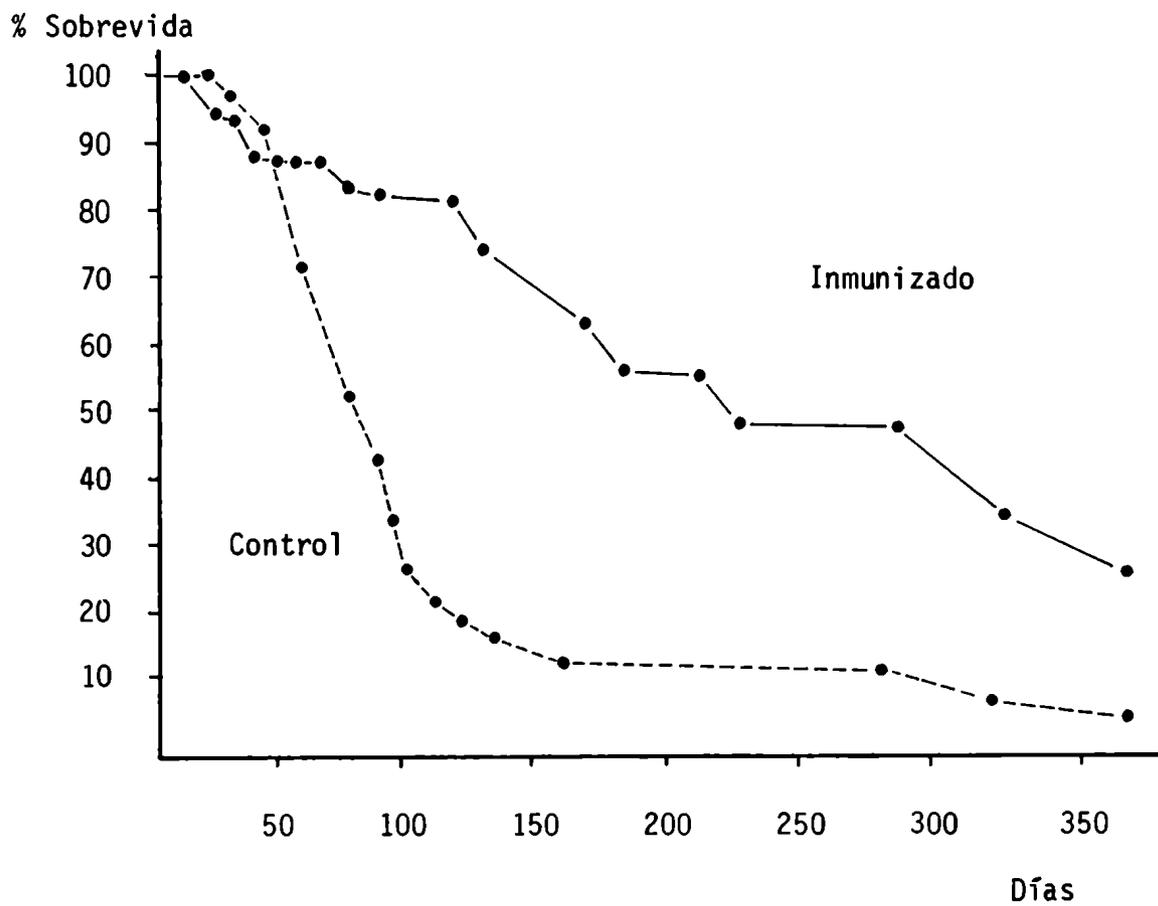


GRAFICO 6: Inmunoprevención de la leucemia primaria de Friend

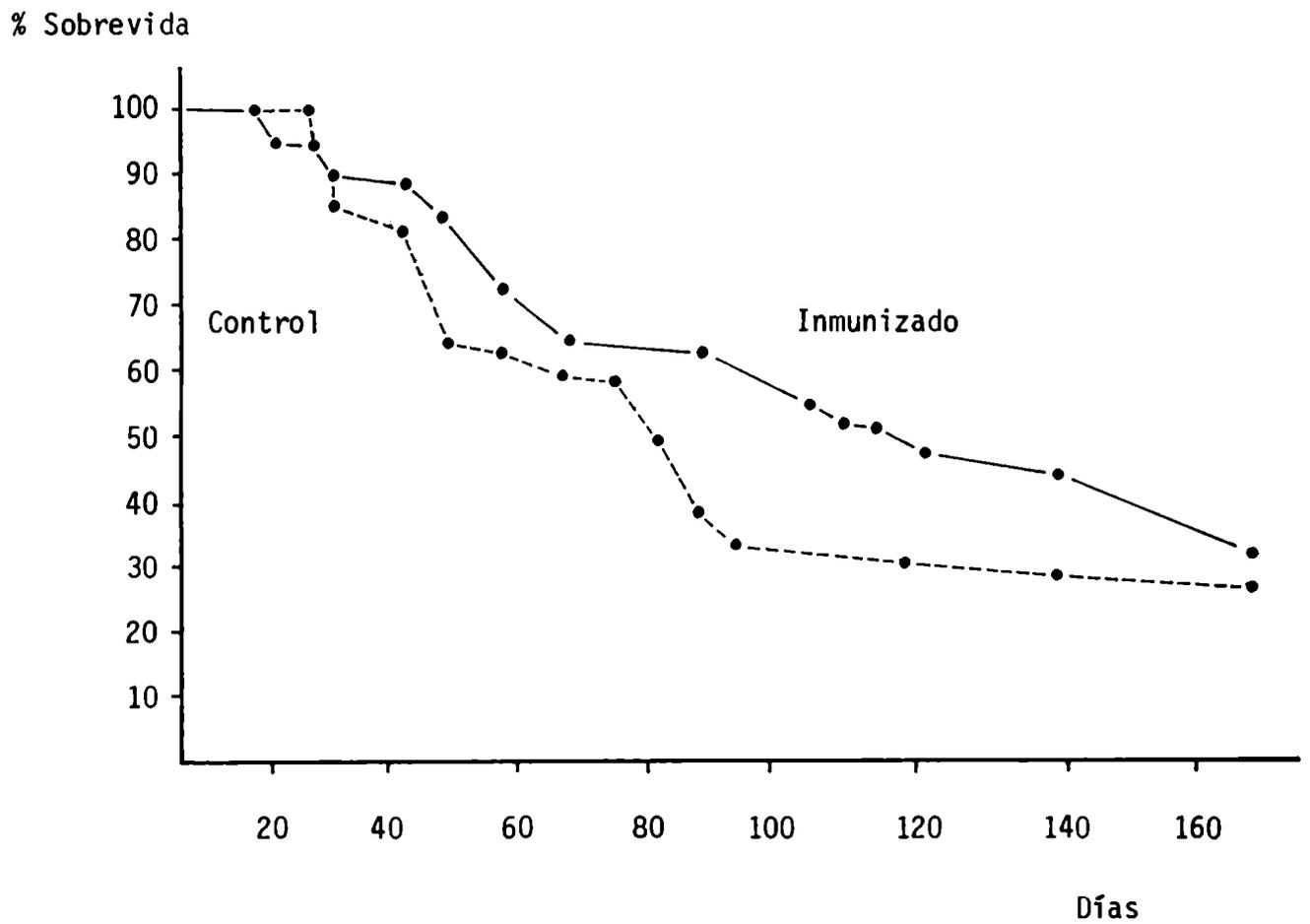


GRAFICO 7 : Inmunoprevención de la leucemia primaria de Gross

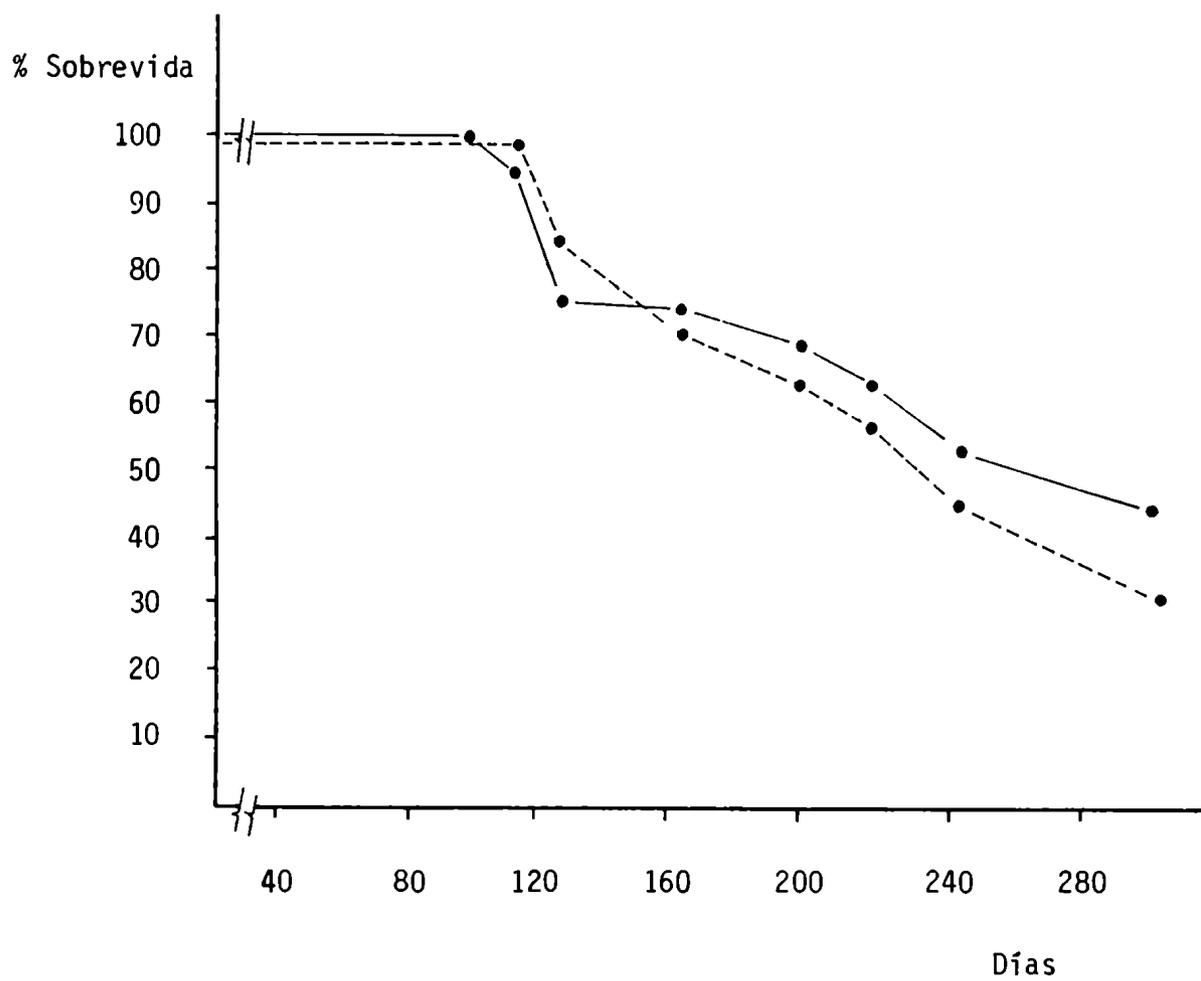


GRAFICO 8 : Inmunoprevención de la leucemia primaria de PLLV/ T2

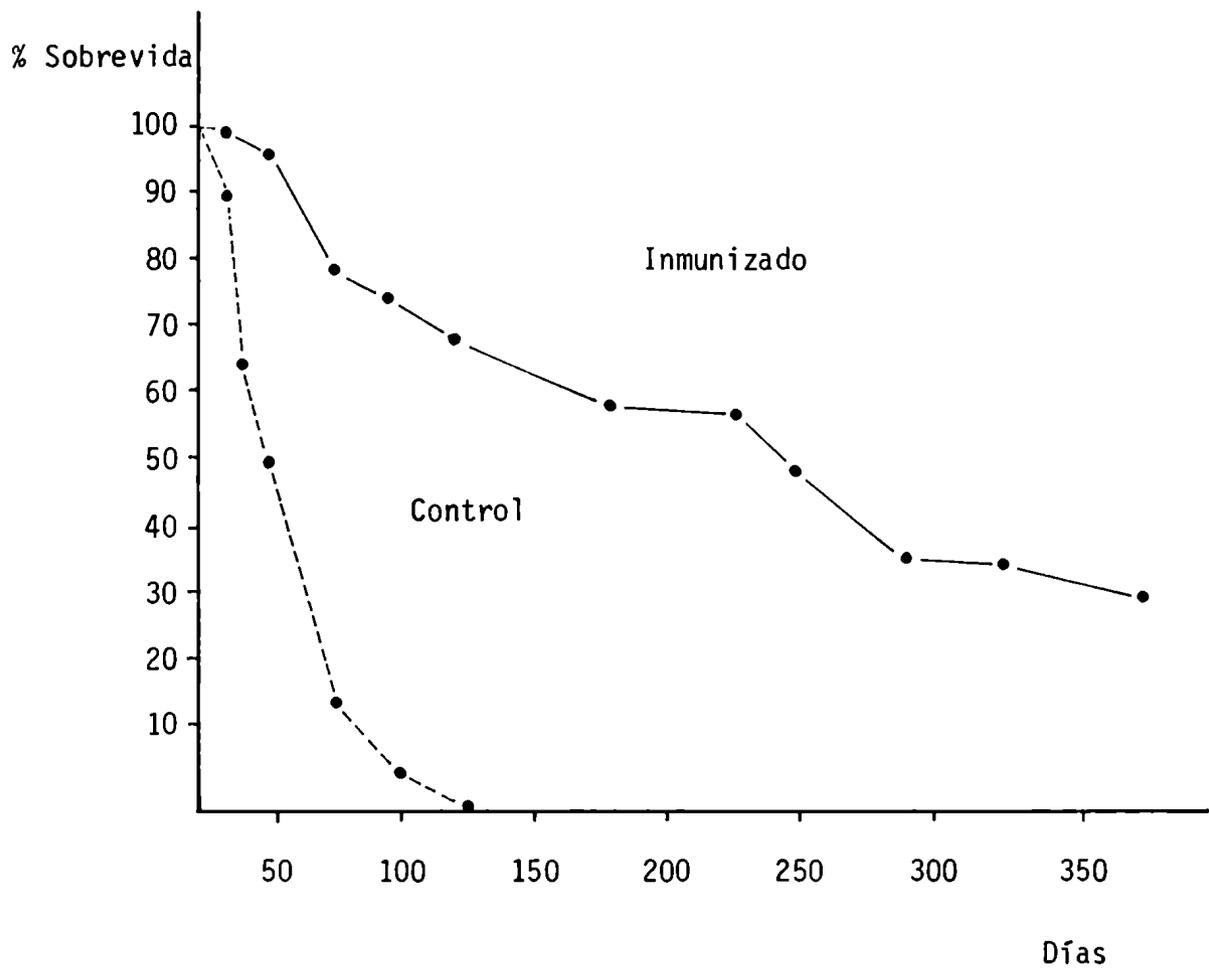


GRAFICO 9 : Inmunoprevención de la leucemia primaria de H 179 A

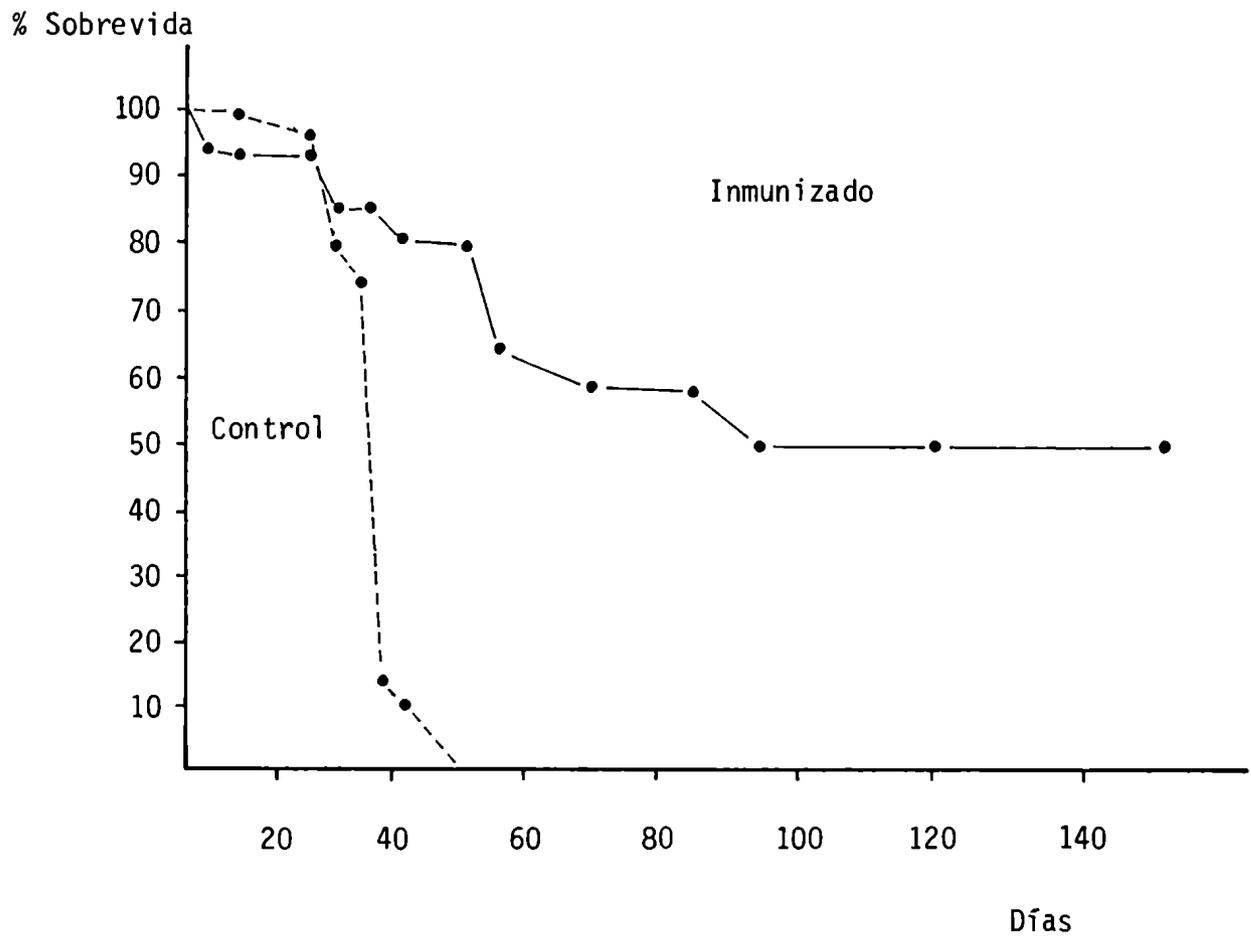


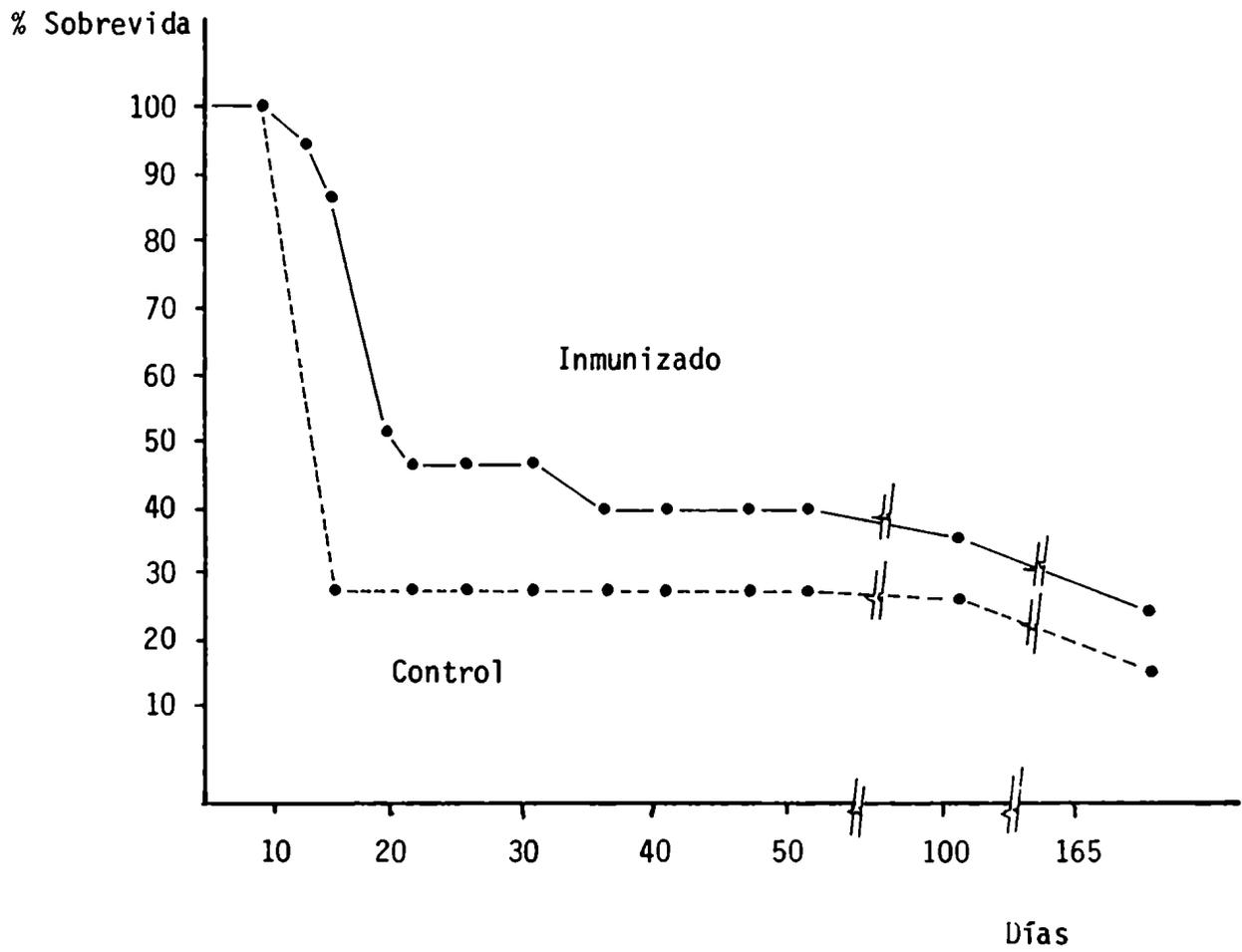
GRAFICO 10 : Inmunoprevención de la leucemia de pasaje H 110

GRAFICO 11 : Inmunoprevención de la leucemia de pasaje R 14

% Sobrevida

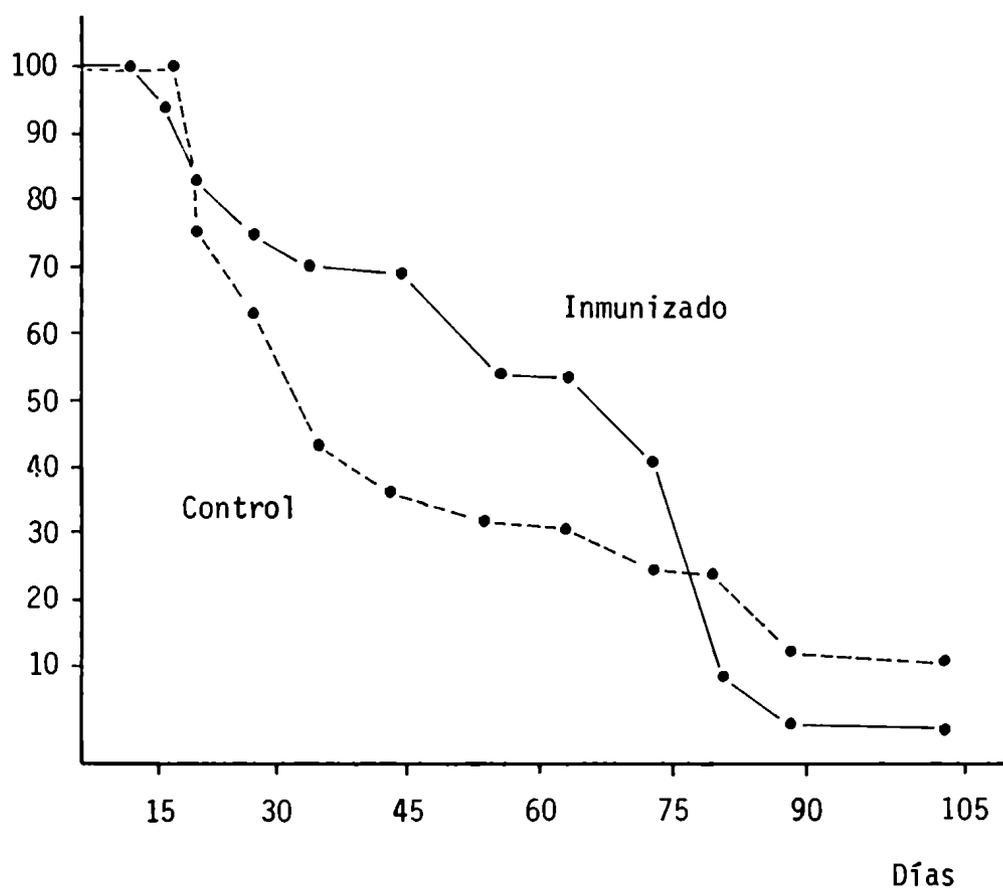


GRAFICO 12: Inmunoprevención de leucemia espontánea en ratones BaLB/c

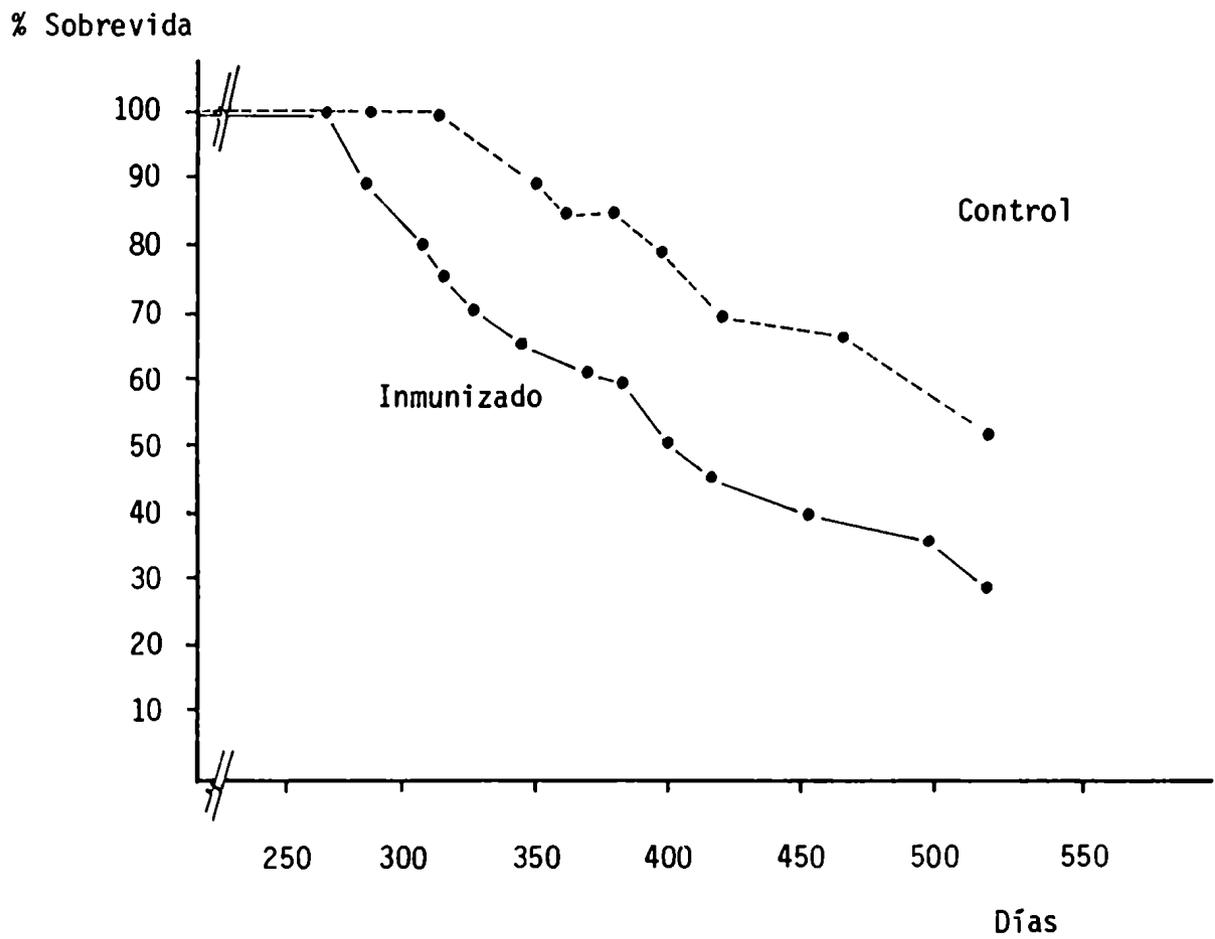


GRAFICO 13 : Inmunoprevención de leucemia espontánea en ratones Swiss/AkR

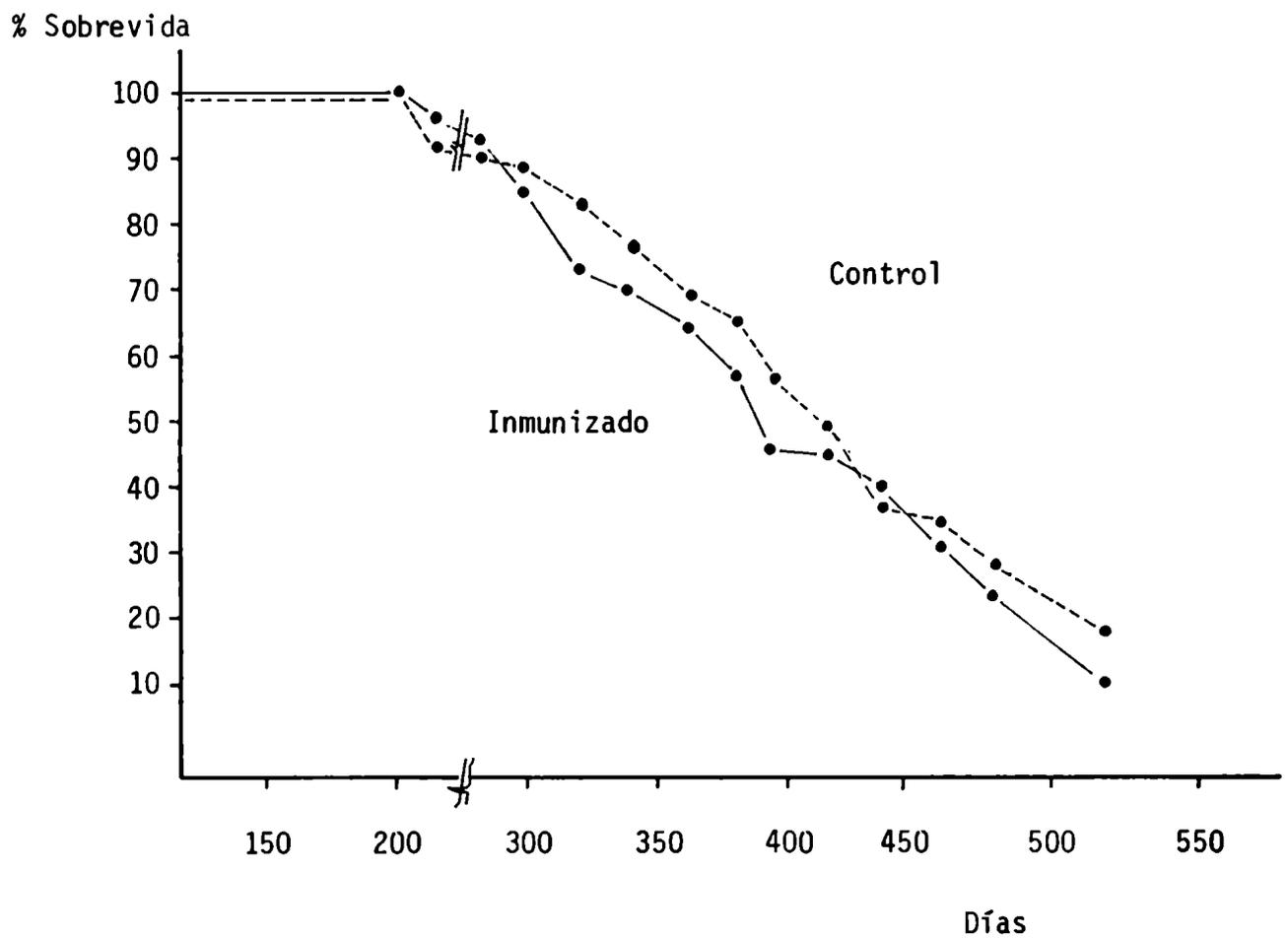
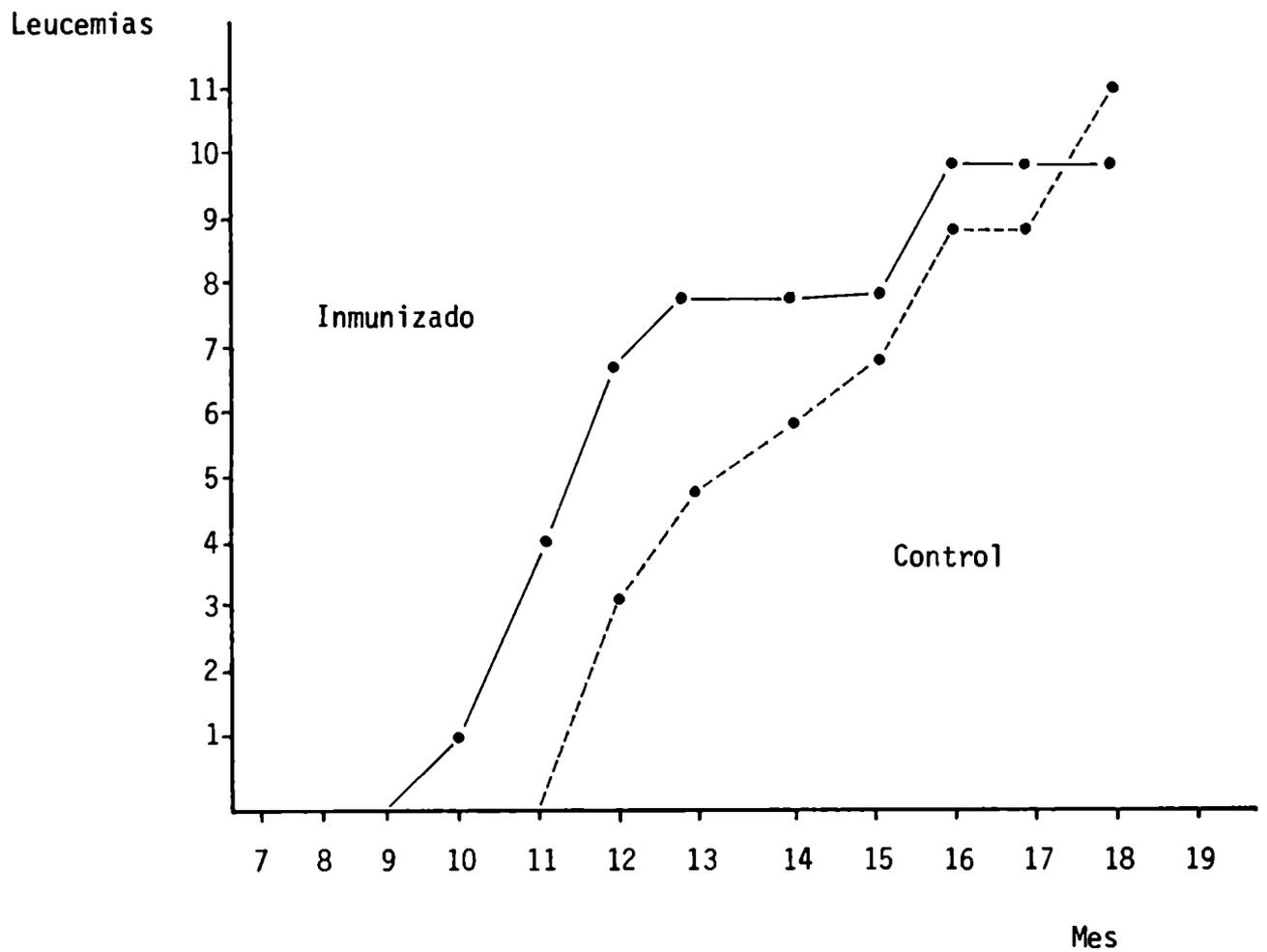


GRAFICO 14 : Inmunoprevención de la leucemia espontánea en ratones Swiss x AkR



C. BIBLIOGRAFIA

1. AARONSON, S.A. and STEPHENSON, J.R. Widespread natural occurrence of high titers of neutralizing antibodies to a specific class of endogenous mouse type C virus. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71 (5) : 1957,(1974).
2. AL-GHAZZOULI, I.K., DONAHOE, R.M., HUANG, K., SASS, B., PETERS, R.L., and KELLOFF, G.J. Immunity to a virus-free syngeneic tumor cell transplantation in the BaLB/c mouse after immunization with homologous tumor cells infected with type C virus. The Journal of Immunology 117: 2239,(1976).
3. AMOS, D.B. Some iso-antigenic systems of the mouse. Proc. of the Third Canadian Cancer Conference 24 : 258,(1959).
4. ANDERSON, R.C. Familial leukemia. Am. J. Dis. Child. 81: 313, ( 1951 ).
5. AOKI, T., BOYSE, E.A., and OLD, L.J. Occurrence of natural antibody to the G ( Gross ) Leukemia antigen in Mice. Cancer Research 26: 1415, ( 1966 ).
6. AOKI, T., BOYSE, E.A., OLD, L.J., DE HARVEN, E., HAMMERLING, U., WOOD, H.A.: Gross ( G ) and H-2 cell-surface antigens: location on Gross leukemia cells by electron microscopy with visually labelled antibody. Proc. Nat. Acad. Sci. ( Wash.) 65 : 569, ( 1970 ).
7. AUGUST, J.T., BOLOGNESI, D.P., FLEISSNER, E., GILDEN, R.V., NOWINSKI, R.C.: A proposed nomenclature for the virion proteins of oncogenic RNA viruses. Virology 60 : 595, ( 1974 ).
8. AXELRAD, A.A. and VAN DER GAAG, H.C. Susceptibility to lymphoma induction by Gross Passage A virus in C3Hf/ Bi Mice of different ages: Relation to thymic cell multiplication and differentiation. J. Natl. Cancer Inst. 28 : 1065 - 1093 ( 1962 ).
9. AXELRAD, A.A. Changes in resistance to the proliferation of isografted Gross virus-induced lymphoma cells, as measured with a spleen colony assay. Nature 199: 80, ( 1963 ).
10. BADER, J.P. Reproduction of RNA Tumor viruses. In "Comprehensive Virology" Vol 4 Capítulo 4 : 253, ( 1975 ).
11. BAGG, H.J. Individual differences and family resemblances in animal behaviour. A study of habit formation in various strains of mice. Arch. Psychol. 6:1, (1920)
12. BALDA, B.R., HEHLMANN, R., CHO, J.R. and SPIEGELMAN, S. Oncornavirus like particles in human skin cancers. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 3697, ( 1975 ).
- 13a. BARNES, A.D. and KROHN, P.L. The estimation of the number of histocompatibility genes controlling the successful transplantation of normal skin in mice. Proc. Roy. Soc. 146: 505, ( 1957 ).
- 13b. BARNES, R.D., TUFFREY, M., WILLS, E.J., MAHOUY, G., and LASNERET, J. The innate resistance of CBA Mice to endogenous murine leukaemia virus infection. Br. J. Cancer 34 : 35, ( 1976 ).

14. BARSKI, G. and YOUN, J.K. Immunization against Rauscher Mouse Leukemia with tissue culture material. Science 149: 751, ( 1965 ).
15. BARSKI, G. and YOUN, J.K. Protective effect of specific immunization in Rauscher leukemia. Nat. Cancer Inst. Mon. 22: 659, ( 1965 ).
16. BASHFORD, E.F., MURRAY, J.A. and CRAMER, W. The natural and induced resistance of mice to the growth of cancer. Proc. Roy. Soc. London Series 79: 164, ( 1907 )
17. BASOMBRIO, M.A. Comunicación personal.
18. BATHER, R. Observations on murine monocytic leukemia induced by a virus isolated from Sarcoma 37. Brit. J. Cancer 15 : 114, ( 1961 ).
19. BAUER, H. Virion and tumor cell antigens of C-type RNA tumor viruses. Advances in Cancer Research 20: 275, ( 1974 ).
- 20a. BENVENISTE, R.E., TODARO, G.J. Evolution of type C viral genes. III. Preservation of ancestral murine type C viral sequences in pig cellular DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 : 4090, ( 1975 ).
- 20b. BENVENISTE, R.E., SHERR, C.J., TODARO, G.J. Evolution of type C viral genes: Origin of feline leukemia virus. Science 190: 886, ( 1975 ).
- 20c. BENVENISTE, R.E. and TODARO, G.J. Evolution of type-C viral genes. Inheritance of exogenously acquired viral genes. Nature 252: 456, ( 1974 )
21. BERMAN, L.D. and ALLISON, A.C. Studies on Murine Sarcoma Virus: A morphological comparison of tumorigenesis by the Harvey and Moloney strains in mice, and the establishment of tumor cell lines. Int. J. Cancer 4 : 820, ( 1969 ).
22. BERNHARD, W. Electron microscopy of human cells and tumor viruses: A review. Cancer Research 18: 491, ( 1958 ).
23. BERNHARD, W. and GUERRIN, M. Presence de particules d'aspect viral dans les tissus tumoraux de souris atteintes de leucemie spontanee. Compt. Rend. Acad. Sci. ( Paris ) 247: 1802, ( 1958 ).
24. BERNHARD, W. and GROSS, L. Présence de particules d'aspect viral dans les tissus tumoraux de souris atteintes de leucemies induites. Compte Rend. Acad. Sci. ( Paris ) 248: 160, ( 1959 ).
25. BERNHARD, W. The detection and study of tumor viruses with the electron microscope. Cancer Research 20: 712, ( 1960 ).
26. BIANCO, A.R., GLYNN, J.P., and GOLDIN, A. Induction of resistance against the transplantation of leukemias induced by Rauscher virus. Cancer Research 26: 1722, ( 1966 ).
27. BILELLO, J.A., STRAND, M. and AUGUST, J.T. Murine sarcoma gene expression: Transformation which express viral envelope glycoprotein in the absence of the major internal protein and infectious particles. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71: 3234, ( 1974 ).

28. Biology of the Laboratory Mouse. Earl/ L. Green. Editor. Second Edition. 1966.
29. BISHOP, M. and VARMUS, H.E. The molecular biology of RNA tumor viruses. Cancer: A comprehensive treatise. 2: 3, ( 1974 ).
30. BISWAL, N., GRIZZARD, M.B., McCOMBS, R.M. and BENYESH-MELNICK, M. Journal of Virology 2, 1346 ( 1968 ).
31. BITTNER, J.J. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. Science 84: 162, ( 1936 ).
32. BITTNER, J.J., EVANS, C.A., and GREEN, R.G. Survival of the mammary tumor milk agent of mice. Science 101: 95, ( 1945 ).
33. BITTNER, J.J. Biological assay and serial passage of the mouse mammary tumor agent in Mammary tumours from mothers and their hybrid progeny. Tumour viruses of Murine origin. CIBA Foundation Symposium ( 1962 ).
34. BLUMENSCHNEIN, G.R. and MOLONEY, J.B. Quantitative dose-response relationships of murine sarcoma virus ( Moloney ) in BalB/c mice. J. Natl. Cancer Inst. 42: 123, ( 1969 ).
35. BOIRON, M. Les virus du groupe leucémies-sarcomes de la souris. Institute Pasteur. Microbiologie Generale 2. Les Virus. 20 : 253, ( 1976 ).
36. BOIRON, M. Etude virologique dans les leucemies humaines. Actualites Hematologiques 10: 177, ( 1976 ).
37. BOYSE, E.A., OLD, L.J., and STOCKERT, E. The relation of linkage group IX to leukemogenesis in the mouse. RNA Viruses and Host Genome in Oncogenesis 171, ( 1972 ).
38. BRIDE, J. Recherches sur le cancer des souris. Ann. Inst. Pasteur. 21: 760, ( 1907 ).
39. BRYANT, M.L., KLEMENT, V. Clonal heterogeneity of wild mouse leukemia viruses: Host range and antigenicity. Virology 73 : 532, ( 1976 ).
40. BUBENIK, J. and TURANO, A. Enhancing effect on tumor growth of humoral antibodies against tumour specific transplantation antigens in tumours induced by murine sarcoma virus ( Harvey ) Nature ( London ) 220: 928, ( 1968 ).
41. BUBENIK, J., and TURANO, A. Inhibitory effect of immune serum on carcinogenesis in mice neonatally infected with murine sarcoma virus(Harvey ). Folia Biolo. ( Prague ) 14 : 433, ( 1968 ).
42. BUBENIK, J., TURANO, A. and FADDA, G. Prevention of carcinogenesis by murine sarcoma virus ( Harvey ) following injection of immune sera during the latent period. Int. J. Cancer 4 : 648, ( 1969 ).

43. BUFFET, R.F., GRACE, J.T. Jr., and MIRAND, E.A. Properties of a lymphocytic leukemia agent isolated from Ha/ICR Swiss mice. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 116 : 293, ( 1964 ).
44. BUFFET, R.F., GRACE, J.T. and MIRAND, E.A. Protection of Litters from immunized mice against virus- induced leukemia. Proc. Am. Assoc. Cancer Research. 8: 8, ( 1967 ).
45. BUFFET, R.F. Prevention of 334 C murine virus- induced leukemia by transmission of maternal immunity to offspring. Cancer Research 34 : 559, ( 1974 ).
46. BURKITT, D. and KYALWAZI, S.K. British J. of Cancer 21: 14, ( 1967 ).
47. BURMESTER, B.R., PRICKETT, C.O. and BELDING, T.C. A filtrable agent producing lymphoid tumors and osteopetrosis in chickens. Cancer Research 6: 189 ( 1946)
48. BURROWS, H. and COOK, J.W. Spindle cell tumours and leukemia in mice after injection with a water soluble compound of 1:2:5:6 dibenzanthracene. Am. J. Cancer 27: 267, ( 1936 ).
49. CAMERON, J.C. The influence of leukemia upon pregnancy and labor. Am. J. Med. Sci. 95: 28, ( 1888 ).
50. CERROTTINI, J.C., NORDIN, A.A. and BRUNNER, K.T. Specific " in vitro " cytotoxicity of thymus-derived lymphocytes sensitized to alloantigens. NATURE 228: 1308, ( 1970 ).
51. CIUFFO, C. Investo positivo con filtrate di verruca vulgare. Giornale Italiano delle Malattie Veneree 42: 12, ( 1907 ).
52. CHESTERMAN, F.C., HARVEY, J.J., DOURMASHKIN, R.R. and SALAMAN, M.H. The pathology of tumors and other lesions induced in rodents by virus derived from a rat with Moloney Leukemia. Cancer Research 26: 1759, ( 1966 ).
53. CHIECO-BIANCHI, L., COLLAVO, D., COLOMBATTI, A., SENDO, F., AOKI, T. and FISCHINGER, P.J. Tumor induction by Murine sarcoma virus in AkR and C58 mice. The J. of Exp. Med. 140: 1162, ( 1974 ).
54. CHIECO-BIANCHI, L., COLLAVO, D., COLOMBATTI, A., and BIASI, G. In vivo interactions between Murine Leukemia and Sarcoma Viruses. Comparative Leukemia Research 1973: 613, ( 1975 ).
55. CHIECO-BIANCHI, L. and COLLAVO, D. Some illustrative systems of viral carcinogenesis: The leukemia sarcoma virus complex in the mouse. In " Scientific Foundations of Oncology " Edited by Symmington and Carter 1976.
56. CHIRIGOS, M.A., PERK, K., TURNER, W., BURKA, B, and GOMEZ, M. Increased oncogenicity of the murine sarcoma virus ( Moloney ) by coinfection with murine leukemia viruses . Cancer Research 28: 1055, ( 1968 ).

57. CHUAT, J.C., BERMAN, L, GUNVEN, P. and KLEIN, E. Studies on Murine Sarcoma Virus: Antigenic characterization of murine sarcoma virus induced tumor cells. Int. J. Cancer 4: 465, ( 1969 ).
58. CHURCHILL, A. and BIGGS, P. Agent of Marek's disease in Tissue Culture. Nature 215: 528, ( 1967 ).
59. COLOMBATTI, A., COLLAVO, D., BIASI, G., CHIECO-BIANCHI, L. Genetic control of oncogenesis by murine sarcoma virus Moloney pseudotype. I. Genetics of resistance in AkR Mice. Int. J. Cancer 16: 427, ( 1975 ).
60. COLOMBATTI, A., COLLAVO, D., BIASI, G., CHIECO-BIANCHI, L. Genetic control of oncogenesis by murine sarcoma virus pseudotype. II. A dominant epistatic susceptibility gene. Int. J. Cancer. 16: 435, ( 1975 ).
61. COOK, R.H., and OLSON, C.Jr. Experimental transmission of cutaneous papilloma of the horse. Am. J. Path. 27: 1087, ( 1951 ).
62. CORREA, J. y colaboradores. Manuscrito en preparación. 1978.
63. DALTON, A.J. An electron microscopic study of a virus-induced murine sarcoma ( Moloney ). Nat. Cancer Inst. Monograph 22: 143, ( 1966 ).
64. DAMESHEK, W. Leukemia. Grunne and Stratton. New York.: 64, ( 1964 ).
65. DAVIS, B., DULBECCO, R., EISEN, H., GINSBERG, H., WOOD, B., McCARTY, M. Microbiology. Second Edition.(1973 ).
66. DAVIS, S. Moloney sarcoma virus-induced tumors in athymic ( nude ) mice: growth pattern an antibody responses. J. of Natl. Canc. Inst. 54 ( 3): 793, ( 1975 ).
67. DECASTELLO, A. Beitrag zur Kenntnis der familiaren Leukamie. Med. Klin. 35: 1255, ( 1939 ).
68. DEMONBREUN, W.A. and GOODPASTURE, E.W. Infectious oral papillomatosis of dogs. Am. J. of Path. 8 : 43, ( 1932 ).
69. DEMONBREUN, W.A. and GOODPASTURE, E.W. An experimental investigation concerning the nature of contagious lymphosarcoma of dogs. Am. J. Cancer 21: 295, ( 1934 ).
70. DMOCHOWSKI, L. and GREY, C.E. Electron microscopy of tumours of known and suspected viral etiology. Texas Rep. Biol Med. 15: 256, ( 1957 ).
71. DMOCHOWSKI, L., GREY, C.E., SYKES, J.A., SHULLENBERGER, C.C. and HOWE, C.D. Studies on human leukemia. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 101: 686, ( 1959 )
72. DMOCHOWSKI, L. and GREY, C.E. Subcellular structures of possible viral origin in some mammalian tumors. Ann. N.Y. Acad. Sci. 68: 559, ( 1957 ).

73. DULANEY, A.D., GROSS, M.F. and MAXEY, M. Activity of cell-free extracts of Ak leukemic tissues for several strains of mice. ( Abstract ) Proc. Am. Association Cancer Research 2: 197, ( 1957 )
74. DUNN, L.C., GRUNEBERG, H. and SNELL, G.D. Report of Committee on Mouse Genetics nomenclature. J. Heredity 31: 505, ( 1940 ).
75. DUNN, T.B. Normal and pathologic anatomy of reticular tissue in laboratory mice, with a classification and discussion of neoplasms. J. Nat. Cancer Inst. 14: 1281, ( 1954 ).
76. DURYEE, W.R. Seminar on transmission studies on renal adenocarcinoma of the frog. J. Franklin Inst. 261: 377 ( 1956 ).
77. ECKNER, R.J., STEEVES, R.A. A classification of the murine leukemia viruses. Neutralization of pseudotypes of Friend spleen focus-forming virus by type-specific murine antisera. J.exp.Med. 136 : 832 ( 1972 ).
78. EDDY, B.E. Tumors produced in hamsters by SV 40. Fed. Proc. 21: 930 ( 1962 ).
79. EHRLICH, P. Experimentelle Studien an Mauseumoren. Z. Krebsforschung 5: 59, ( 1907 ).
80. ELLERMAN, V. and BANG, O. Experimentelle Leukamie bei Huhnern. Zentr. Bakteriolog. Abt. I, 46: 595, ( 1908 ).
81. ENGELBRETH-HOLM, J. and FREDRIKSEN, O. The transmission of mouse leukemia to healthy animals by means of cell-free substance. Acta Path. and Microbiol. Scand. Suppl. 37: 145, ( 1938 ).
82. ENGELBRETH-HOLM, J. Is it possible to transmit or accelerate the development of mouse leukemia by tissue extracts ? Blood 3: 862, ( 1948 ).
83. EPSTEIN, M.A., ACHONG, B.G. and BARR, Y.M. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. Lancet 1: 702, ( 1964 ).
84. ESSEX, M. The immune response to oncornavirus infections. In Viruses, evolution and cancer. Chapter 18: 513, ( 1974 ).
85. EVANS, C.A., WEISER, R.S. and ITO, Y. Antiviral and antitumour immunological mechanisms operative in the Shope papilloma-carcinoma system. Symp. Quant. Biol. 27: 453, ( 1962 ).
86. FEFER, A., McCOY, J.L., and GLYNN, J.P. Induction and regression of Primary Moloney sarcoma virus-induced tumors in Mice. Cancer Research 27: 1626 ( 1967 )
87. FEFER, A. Studies on the growth and regression of a transplantable Moloney sarcoma. Cancer Research 27: 2207, ( 1967 ).
88. FEFER, A., McCOY, J.L. and GLYNN, J.P. Antigenicity of a virus-induced murine sarcoma ( Moloney ). Cancer Research 27 ( I ) : 962, ( 1967 ).

89. FEFER, A. Neutralization of the oncogenicity of Moloney Sarcoma Virus and Moloney Leukemia virus by anti-Gross serum. Int. J. Cancer 3: 647,(1967)
90. FEFER, A. Immunologic, virologic and pathologic studies of regression of autochthonous Moloney Sarcoma virus induced tumors in mice. Cancer Research 28: 1577, ( 1968 ).
91. FEFER, A. Immunotherapy and chemotherapy of Moloney sarcoma virus-induced tumors. Cancer Research 29: 2177, ( 1969 ).
92. FEFER, A. Immunotherapy of primary Moloney sarcoma virus-induced tumors. Int. J. Cancer 5: 327, ( 1970 ).
93. FENYO, E.M. and KLEIN, G. Independence of Moloney virus-induced cell surface antigen and membran-associated virion antigens in immunoselected lymphoma sublines. Nature 260: 355, ( 1976 ).
94. FINK, M.A. and MALMGREN, R.A. Fluorescent antibody studies of the viral antigen in a murine leukemia. J. Natl. Cancer Inst. 31: 1111, ( 1963 ).
95. FINK, M.A. and RAUSCHER, F.J. Immune reactions to a murine leukemia virus. I. Induction of immunity to infection with virus in the natural host. J.Natl. Cancer Inst. 32: 1075, ( 1964 ).
96. FINKEL, M.P., BISKIS, B.O. and JINKINS, P.B. Virus induction of osteosarcomas in mice. Science 151: 698, ( 1966 ).
97. FOLEY, E.J. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. Cancer Research 13: 835, ( 1953 ).
98. FRANKS, W.R., MCGREGOR, A., SHAW, M.M. and SKUBLICS, J. Development of leukemia by cell-free filtrates of solid tumors or in mice surviving immune to these tumors. J. Proc. Am. Assoc. CancerRes. 3: 19, ( 1959 ).
99. FREEMAN, A.I. and JOHNSON, W.W. Cancer Research 28: 1490, ( 1968 ).
100. FRIEND, C. The isolation of a virus causing a malignant disease of the hematopoietic system in adult Swiss mice. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2: 204, ( 1956 ).
101. FRIEND, C. Immunological relationships of a filterable agent causing leukemia in mice ( adult ). I. Neutralization of infectivity by specific antiserum. J. Exp. Medicine 109: 217, ( 1959 ).
102. FRIEND, C. The coming of age of tumor virology: Presidential Address. Cancer Research 37: 1255, ( 1977 ).
103. FURTH, J. and STRUMIA, M. Studies on transmissible lymphoid leukemia of mice. J. Exp. Medicine 53: 715, ( 1931 ).

104. FURTH, J. Lymphomatosis, myelomatosis and endothelioma of chickens caused by a filterable agent. I. Transmission experiments. J. Exp. Medicine 58: 253, ( 1933 ).
105. FURTH, J., SEIBOLD, H.R. and RATHBONE, R.R. Experimental studies on lymphomatosis of mice. Am. J. Cancer 19 : 521, ( 1933 ).
106. FURTH, J. Transmission of myeloid leukemia in mice. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 31: 923, ( 1934 )
107. FURTH, J., FERRIS, H.W. and REZNIKOFF, P. Relation of leukemia of animals to leukemia of man. J. Am. Med. Assoc. 105: 1824, ( 1935 ).
108. FURTH, J., and KAHN, M.C. The transmission of leukemia of mice with a single cell. Am. J. Cancer 31 : 276, ( 1937 ).
109. FURTH, J. and FURTH, O.B. Monocytic leukemia and other neoplastic diseases occurring in mice following intrasplenic injection of 1: 2 benzpyrene. Am. J. Cancer 34: 169, ( 1938 ).
110. FURTH, J., COLE, R., and BOON, M.C. The effect of maternal influence upon spontaneous leukemia of mice. Cancer Res. 2 : 280, ( 1942 ).
111. FURTH, J. Recent studies on the etiology and nature of leukemia. Blood 6: 964, ( 1951 ).
112. FURTH, J. Recent experimental studies and current concepts on the etiology and nature of leukemia. Proc. Inst. Med.Chicago 19: 95, ( 1952 )
113. FURTH, J., BUFFET, R.F., BANASIEWICZ-RODRIGUEZ, M. and UPTON, A.C. Character of agent inducing leukemia in newborn mice. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med 93: 165, ( 1956 ).
114. GALLAGHER, R.E. and GALLO, R.C. Type C RNA virus isolated from cultured human myelogenous leukemia cells. Science 187: 350, ( 1975 ).
115. GALLO, R.C. and TODARO, G.J. Oncogenic RNA viruses. Seminars in Oncology 3 ( N°1 ): 81, ( 1976 ).
116. GARDNER, W.V. and DOUGHERTY, T.F. The leukemogenic action of estrogens in hybrid mice. J. Biol. and Med. 17: 75, ( 1944 ).
117. GARDNER, W.V. Steroid hormones in the induction of cancer. Cancer Research 7 : 37, ( 1947 ).
118. GARDNER, M.B., KLEMENT, V., RONGEY, R.W. et. al. Type C virus expression in lymphoma-paralysis -prone wild mice. J. Natl. Cancer Inst. 57: 585,(1976)
119. GARDNER, M.B., KLEMENT, V., ESTES, J.D., GILDEN, R.V., TONI, R. and HUEBNER, R. Suppression of infectious murine leukemia virus in wild mice ( *Mus musculus* ) by passive immunization: Brief communication. J. Natl. Cancer Inst. 58: 1855, ( 1977 ).

120. GAZDAR, A. F. Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol. 38: 509, ( 1970 ).
121. GILDEN, R.V. and OROSZLAN, S. Group specific antigens of RNA tumor viruses as markers for subinfectious expression of the RNA tumor virus genome. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 69: 1021, ( 1972 ).
122. GILDEN, R. Interrelationships among RNA tumor viruses and host cells. Advances in Cancer Research 22: 157, ( 1974 ).
- 112b. GILLESPIE, D. and GALLO, R.C. RNA processing and RNA tumor virus origin and evolution. Science 188 ( 4190 ): 802, ( 1975 ).
123. GIRARDI, A.J., HILLEMANN, M.R. and ZWICKEY, R.E. Search for virus in human malignancies. 2. In vivo studies. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 111: 84,(1962)
124. GIULIANI, F., SORANZO, C., CASAZZA, A.M. e DI MARCO, A. Oncogenicità de cellule linfoidi immuni verso el sarcoma murino de Moloney. Tumori 59: 269,(1973)
125. GLYNN, J.P., BIANCO, A.R. and GOLDIN, A. Studies on induced resistance against isotransplants of virus- induced leukemia. Cancer Research 24: 502, ( 1964 ).
126. GLYNN, J.P., McCOY, J.L. and FEFER, A. Cross-resistance to the transplantation of syngeneic Friend, Moloney and Rauscher virus-induced tumors. Cancer Research 28: 434, ( 1968 ).
127. GOLDSTEIN, P., WIGZELL, H., BLOMGREN, H. and SVEDMYR, E.A.J. Cells mediating specific " in vitro " cytotoxicity. II. Probable autonomy of thymus-processed lymphocytes ( T cells ) for the killing of allogeneic target cells. J. Exp. Med. 135: 890, ( 1972 ).
128. GOMARD, E., LECLERC, J.C., and LEVY, J.P. Murine leukemia and sarcoma viruses Further studies on the antigens of the viral envelope. J. Natl. Cancer Inst. 50: 955, ( 1973 ).
129. GORER, P.A. The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. J. Path. Bacteriol. 44: 691, ( 1937 ).
130. GORER, P.A. The antibody response to skin homografts in mice. Ann. Acad. Sci. 59: 365, ( 1955 ).
131. GRAFFI, A., BIELKA, H. and FEY, F. Leukamieerzeugung durch ein filtrierbares Agens aus malignen Tumoren. Acta Haemat. 15: 145, ( 1956 ).
132. GRAFFI, A. Chloroleukemia of mice. Ann. N.Y. Acad. Sci. 68: 540, ( 1957 ).
133. GROSS, L. Intradermal immunization of C3H mice against sarcoma that originated in an animal of the same line. Cancer Research 3: 326, ( 1943 ).
134. GROSS, L. and MATTE, M.L. Occurrence of tumors and leukemia in members of families of patients suffering from leukemia. N.Y. J. Med. 48: 1283, ( 1948 ).

135. GROSS, L. " Spontaneous " leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy with Ak-leukemic extracts, or Ak-embryos. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 76: 27, ( 1951 ).
136. GROSS, L. A filterable agent, recovered from Ak-leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 83 : 414, ( 1953 ).
137. GROSS, L. Development and serial cell-free passage of a highly potent strain of mouse leukemia virus. Proc. Soc. Exp. Biol and Med. 94: 767, ( 1957 ).
138. GROSS, L. Biological and pathogenic properties of a mouse leukemia virus. Acta Haemat. 23: 259, ( 1960 ).
139. GROSS, L. Induction of leukemia in rats with mouse leukemia ( passage A ) virus. Proc. Soc. Expt. Biol. and Med. 106: 890, ( 1961 ).
140. GROSS, L. Pathogenic potency and host range of the mouse leukemia virus. Acta Haemat. 29: 1, ( 1963 ).
141. GROSS, L. Are the common forms of spontaneous and induced leukemia and lymphomas in mice caused by a single virus ? Nat. Cancer. Inst. Monograph 22: 407, ( 1966 ).
142. GROSS, L. Oncogenic viruses. Second Edition. Pergamon Press. ( 1970 ).
143. GROSS, L. Facts and theories on viruses inducing cancer and leukemia. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71: 2013,( 1974 ).
144. GROSS, L. The role of C-type and other oncogenic virus particles in Cancer and leukemia. New. Engl. J. of Med. 294: 724, ( 1976 ).
145. GUASCH, J. Héredité des leucémies. Le Sang 25: 384, ( 1954 ).
146. HARAN-GHERA, N. Leukemogenic filtrable agent from chemically- induced lymphoid leukemia in C57 B1 mice. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 124: 697, (1967)
147. HARDY, W.D.Jr., OLD, L.J., HESS, P.W. et. al. Horizontal transmission of feline leukemia virus. Nature 244: 266, ( 1973 ).
148. HARTLEY, J.W. and ROWE, W. Production of altered cell foci in tissue culture by defective Moloney Sarcoma virus particles. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 55: 780, ( 1966 ).
149. HARTLEY, J.W., ROWE, W.P., and HUEBNER, R.J. Host-range restrictions of murine leukemia viruses in mouse embryo cell cultures. J. of Virology 5: 221, ( 1970 ).
150. HARTLEY, J.W., ROWE, W.P. Naturally occurring murine leukemia viruses in wild mice: Characterization of a new amphotropic class. J. Virol. 19: 19, ( 1976 )

151. HARVEY, J.J. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. Nature ( London ) 204: 1104, ( 1964 ).
152. HARVEY, J.J. and EAST, J. The murine sarcoma virus ( MSV ). Int. Rev. Exp. Pathology 10: 265. ( 1971 ).
153. HAYS, E.F. and BECK, W.S. The development of leukemia and other neoplasms in mice receiving cell-free extracts from a high- leukemia ( AkR ) strain. Cancer Research 18: 676, ( 1958 ).
154. HEBERMAN, R.B., HOLDEN, H.T., TING, C., LAVRIN, D.L., KIRCHNER, H. Cell-mediated immunity to leukemia virus-and tumor associated antigens in mice. Cancer Research 36: 615, ( 1976 )
155. HEINIGER, H.J., MEIER, H., KALISS, N., CHERRY, M., CHEN, H.W. and STONER, R. Hereditary immunodeficiency and leukemogenesis in HRS/J mice. Cancer Research 34: 201, ( 1974 ).
156. HEINIGER, H.J., HUEBNER, R.J. and MEIER, H. Effect of allelic substitutions at the hairless locus on endogenous ecotropic murine leukemia virus titers and leukemogenesis. J. Nat. Cancer Institute ( en prensa ) ( 1976 ).
157. HELLSTROM, I., HELLSTROM, K.E. and PIERCE, G.E. Proc. Can. Cancer Res. Conf. 8: 423, ( 1968 ).
158. HELLSTROM, I. and HELLSTROM, K.E. Studies on cellular immunity and its serum-mediated inhibition in Moloney-virus-induced mouse sarcoma. Int. J. Cancer 4: 587, ( 1969 ).
159. HELLSTROM, I., HELLSTROM, K.E., PIERCE, G.E. and FEFER, A. Studies on immunity to autochthonous mouse tumors. Transpl. Proc. 1: 90, ( 1969 ).
160. HELLSTROM, I., and HELLSTROM, K.E. Colony inhibition studies on blocking and non-blocking serum effects on cellular immunity to Moloney sarcomas. Int. J. Cancer 5: 195, ( 1970 ).
161. HESTON, N.E. Development of inbred strains in the mouse and their use in Cancer Research. 20th Comm. Lect. Jackson Lab., Bar Harbor, Maine ( 1949 )
162. HIRSCH, S.M. and BLACK, P.L. Activation of mammalian leukemia viruses. Advances in Virus Research. 19: 265, ( 1974 ).
163. HOLDEN, H.T., KIRCHNER, H.T. and HERBERMAN, R.B. Secondary cell-mediated cytotoxic response to syngeneic mouse tumor challenge. J. Immunolo. 115: 327, ( 1975 ).
164. HOLM, G., and PERLMANN, P. Antibody-induced cytotoxicity of lymphocytes. In O.R. McIntyre ( ed. ). Proceedings of the Fourth Annual Leukocyte Culture Conference, Pp. 29-36, Appleton-Century Crofts, New York ( 1971 ).

165. HUEBNER, R.J. Rescue of the defective genome of Moloney sarcoma virus from a noninfectious hamster tumor and the production of pseudotype sarcoma viruses with various murine leukemia viruses. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 56: 1164, ( 1966 ).
166. HUEBNER, R.J., GILDEN, R.V., LANE, W.T., TONI, R., TRIMMER, R.W., HILL, P. Suppression of murine type-C-Rna virogenes by type-specific oncornavirus vaccines: Prospects for prevention of cancer. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73 (2) : 620, ( 1976 ).
167. HUEBNER, R.J., GILDEN, R.V., TONI, R., HILL, R.W., TRIMMER, R.W., FISH, D.C., SASS, B. Prevention of spontaneous leukemia in AkR mice by type-specific immunosuppression of endogenous ecotropic virogene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73: 4633, ( 1976 ).
168. HUNSMANN, F., MOENNIG, V., PISTER, L., SEIFERT, E. and SCHAFER, E. Properties of mouse leukemia viruses: VII. The major viral glycoprotein of Friend leukemia virus. Seroinmunological, interfering and hemmagglutinating capacities. Virology 62: 307, ( 1974 ).
169. HUNSMANN, G., MOENNIG, V. and SCHAFER, W. Properties of mouse leukemia viruses: IX. Active and Passive immunization of mice against Friend Leukemia with isolated viral gp71 glycoprotein and its corresponding antiserum. Virology 66: 327, ( 1975 ).
170. IDA, N. Formal discussion. ( Following presentation of paper entitled " Filterable agent causing leukemia following inoculation into newborn mice " by L. Gross. Texas Rep. Biol. and Med. 15: 616, ( 1957 ).
171. IGEL, H., HUEBNER, R.J., TURNER, H., KOTIN, P. and FALK, H.L. Mouse leukemia activation by chemical carcinogenesis. Science 166: 1624, ( 1969 ).
172. IHLE, J.N., HANNA, M.G., Jr., ROBERSON, L.E. and KENNERLY, F.T. Autogenous immunity to endogenous RNA tumor virus: identification of antibody reactivity to select viral antigens. J. Exp. Med. 139: 1568, ( 1974 ).
173. IHLE, J.N., DENNY, T.P., BOLOGNESI, D.P. Purification and serological characterization of the major envelope glycoprotein from AkR murine leukemia virus and its reactivity with autogenous immune sera from mice. Journal of Virology 17: 727, ( 1976 ).
174. IHLE, N.J., LEE, J.C. and HANNA, M.G. Jr. Characterization of natural antibodies in mice to endogenous leukemia virus . Biology of Radiation carcinogenesis, Yuhas, J.M. Ed. : 261, ( 1976 ).
175. IHLE, J.N., COLLINS, J.J., LEE, J.C., FISCHINGER, P.J., MOENNIG, V., SCHAFER, W., HANNA, M.G. Jr., and BOLOGNESI, D.P. Characterization of the immune response to the major glycoprotein ( gp71 ) of Friend Leukemia Virus. I. Response in BaLB/c mice. Virology 75: 74, ( 1976 ).
- 176a. Idem. II. Response in C57Bl/6 mice. Virology 75: 88, ( 1976 )

- 176b. Idem. II. Influence on endogenous MuLV- mediated pathogenesis. Virology 75: 102, ( 1976 ).
177. IKEDA, H., STOCKERT, E., ROWE, W.P., BOYSE, E.A., LILLY, F., SATO, H., JACOBS, S., OLD, L.J. : Relation of chromosome 4 ( linkage group VIII ) to murine leukemia virus-associated antigens of AKR mice. J. Exp. Medicine 137: 1103, ( 1973 ).
178. IKEDA, H., HARDY, W.Jr., TRESS, E., and FLEISSNER, E. Chromatographic separation and antigenic analysis of proteins of the oncornaviruses. I. Identification of a new murine viral protein p15 (E). J. Virology 16: 53 ( 1975 ).
179. IOACHIM, H. Acute leukemia in uniovular twins. Review of genetic aspects of human leukemia. Cancer 15: 539, ( 1962 ).
180. IOACHIM, H.L. and BERWICK, L. Continuous viral replication and cellular neoplastic transformation in cultures of normal rat thymus infected with Gross Leukemia Virus. Intern. J. Cancer 3: 61, ( 1968 ).
181. IOACHIM, H.L. Comparison by bioassay titration of Gross Leukemia Virus (GLV ) from animal and tissue culture sources. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 10:166, ( 1969 ).
182. IOACHIM, H.L. Prevention of Gross Virus induced leukemia in progeny of immunized female rats. Cancer Research 30: 2661, ( 1970 ).
183. IOACHIM, H.I., GIMOVSKY, M.L., and KELLER, S.E. Maternal vaccination with formalin inactivated Gross lymphoma virus in rats and transfer of immunity to offspring. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 144: 376, ( 1973 ).
184. IOACHIM, H.L., KELLER, S.E., GIMOVSKY, M.L., and SHEPHERD, S. Immunity to viral leukemia in rats and the routes of transmission from mother to offspring. Cancer Research 33: 547, ( 1973 ).
185. IRINO, S., OTA, Z., SEZAKI, M. and HIRAKI, K. Cell-free transmission of 20-methylcholanthrene - induced RF mouse leukemia and electro microscopic demonstration of virus particles in its leukemic tissues. Gann 54: 225, ( 1963 ).
186. JARRETT, W.F.H., CRAWFORD, E.M., MARTIN, W.B., and DAVIE, F. Leukaemia in the cat. A virus-like particle associated with leukemia ( lymphosarcoma) Nature 202: 567, ( 1964 )
187. JARRETT, W.F.H. Feline leukemia. Int. Rev. Exp. Pathol. 10: 243, ( 1971 ).
188. JENKINS, V.K., UPTON, A.C. and ANDERSON, N.G. Transmission of radiogenic myeloid leukemia in the RF mouse. J. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 4: 31, ( 1963 ).
189. JOHNSON, W.R. Am. J. Obstet. Gynecol. 61: 701, ( 1951 ).

190. KAPLAN, H.S. Observations on radiation-induced lymphoid tumors of mice. Cancer Research 7: 141, ( 1947 ).
191. KAPLAN, H.S. and BROWN, M.B. Effect on lymphoid tumor incidence of changes in total dose, fractionation and periodicity of whole body roentgen irradiation. Cancer Research 11: 262, ( 1951 ).
192. KAPLAN, H.S. Radiation induced lymphoid tumors of mice. Acta Int. Union. Against Cancer 7: 849, ( 1952 ).
193. KAPLAN, H.S. On the etiology and pathogenesis of the leukemias; A review. Cancer Research 14: 535, ( 1954 ).
194. KATZMAN, R.A. Studies on the induction of leukemia in Swiss mice by cell-free filtrates from human tissues. J. Lab. and Clin. Med. 60: 579, ( 1962 ).
195. KAWAKAMI, T.G., MOORE, A.L., THEILEN, G.H. et al. Comparisons of virus like particles from leukotic cattle to feline leukosis virus, in Dutcher R.M (ed.) Leukemia in Animals and Man. Basel. Karger.: 471, ( 1970 ).
196. KAWAKAMI, T.G., HUFF, S.D., BUCKLEY, P.M., DUNGWORTH, D.L., SNYDER, S.P. and GILDEN, R.V. C-type virus associated with gibbon lymphosarcoma. Nature New Biology 235: 170, ( 1972 ).
197. KELLOFF, G.J., PETERS, R.L., DONAHOE, R.M, GHAZZOULI, I., SASS, B., NIMS, R.M., and HUEBNER, R.J. An approach to C-type virus immunoprevention of spontaneously occurring tumors in laboratory mice. Cancer Research 36: 622, ( 1976 ).
198. KILHAM, L. and WOKE, P.A. Laboratory transmission of fibromas ( Shope ) in cottontail rabbits by means of fleas and mosquitoes. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 83: 296, ( 1953 ).
199. KILICTURGAY, K., CAVDAR, A., and OZDEMIR, H. Virus-like particles in acute myelomonoblastic leukemia. Preliminary report. ( Turkish ) Gulhane As. Tip. Akad. , Mikrobiyol. Enst. Ankara. MIKROBIYOL. BUL. 8 (4 ): 317, ( 1974 ).
200. KIRSCHBAUM, A. Formal discussion. ( following presentation of paper entitled " Filterable agent causing leukemia following inoculation into newborn mice by L. Gross ) Texas Rep. Biol., and Med. 15: 618, ( 1957 ).
201. KIRSCHBAUM, A. Genetic and nongenetic factors influencing the induction of mouse leukemia. In: The Leukemias. Etiology. Pathophysiology and treatment. H. Ford Hospital Internat. Symposium. Academic Press, New York. Chapter 6: 121, ( 1957 ).
202. KIRCHNER, H., HERNERMAN, R.B., GLASER, M., and LAVRIN, D.H. Suppression of " in vitro " lymphocyte stimulation in mice bearing primary Moloney Sarcoma Virus induced tumors. Cellular Immunology 13: 32, ( 1974 ).

203. KIRSTEN, W.H., MAYER, L.A., WOLLMANN, R.L., and PIERCE, M.I. Studies on a murine erythroblastosis virus. J. Natl. Cancer Inst. 38: 117, ( 1967 ).
204. KLEIN, G., SJOGREN, H.O., KLEIN, E., and HELLSTROM, K.E. Demonstration of resistance against methylcholantrene-induced sarcomas in primary autochthonous host. Cancer Research 20: 1561, ( 1960 ).
205. KLEIN, G., SJOGREN, H.O. and KLEIN, E. Demonstration of host resistance against isotransplantation of lymphomas induced by the Gross agent. Cancer Research 22: 955, ( 1962 ).
206. KLEIN, E. and KLEIN, G. Antigenic properties of lymphomas induced by the Moloney Agent. J. Natl. Cancer Inst. 32: 547, ( 1964 ).
207. KLEIN, E. Tumor specific transplantation antigens. In Immunopathology . IV International Symposium, Montecarlo. Ed. Grabar Schwabe and Co. Publishers. Basel. ( 1965 ).
- 208a. KLEIN, E. and KLEIN, G. Immunological tolerance of neonatally infected mice to Moloney Leukemia virus. Nature 209: 162, ( 1966 ).
- 208b. KLEIN, G. Experimental studies in tumor immunology. Federation Proceedings 28: 739, ( 1969 ).
209. KLEMENT, V., HARTLEY, J.W., ROWE, W.P. and HUEBNER, R.J. J. Natl. Cancer Inst. 43: 925, ( 1969 ).
210. KLEMENT, V., GARDNER, M.B., HENDERSON, B.E. et al. Inefficient humoral immune response of lymphoma-prone wild mice to persistent leukemia virus infection. J. Natl. Cancer Inst. 57: 1169, ( 1976 )
211. KOBAYASHI, H., SENDO, F., SHIRAI, T., KAJI, H., KODAMA, T., and SAITO, H. Modification in growth of transplantable rat tumors exposed to Friend Virus. J. Natl. Cancer Inst. 42: 413, ( 1969 ).
212. KOLDOVSKY, P., TURANO, A., and FADDA, G. Folia Bio. ( Prague ) 15: 224, (1969)
213. KUNII, A., CALI, A., and FURTH, J. Effect of neonatal thymectomy on induction of Leukemia by virus in rats. Proc. Soc. Exp. Biol and Med. 118: 815, (1965)
214. KUNII, A., TAKEMOTO, H., and FURTH, J. Leukemogenic filterable agent from estrogen-induced thymic lymphomas in RF mice. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 119: 1211, ( 1965 ).
215. LACASSAGNE, A. Sarcomes lymphoides apparuz chez des soureis longuement traitees par des hormones oestrogenes. Comt. Rend. Soc. Biol. 126: 193, ( 1937 )
216. LAMON, E.W., SKURZAK, H.M., KLEIN, E. The lymphocyte response to a primary viral neoplasm ( MSV ) through its entire course in BaLB/c mice. Int. J. Cancer 10: 581, ( 1972 ).

217. LAMON, E.W. The lymphocyte response to primary Moloney Sarcoma Virus tumors in BalB/c mice. The J. of Exp. Med. 137 ( 6 ) : 1472, ( 1973 ).
218. LAMON, E.W., KLEIN, E., ANDERSSON, B., FENYO, E.M. and SKURZAK, H.M. The humoral antibody response to a primary viral neoplasm ( MSV ) through its entire course in BalB/c mice. Int. J. Cancer 12: 637, ( 1973 ).
219. LAMON, E.W., ANDERSSON, B., WIGZELL, H., FENYO, E.M. and KLEIN, E. The immune response to primary Moloney sarcoma virus tumors in BalB/c mice: cellular and humoral activity of long-term regressors. Int. J. Cancer 13: 91, ( 1974 ).
220. LAVRIN, D.H., HERBERMAN, R.B., NUNN, M. and SOARES, N. In vitro cytotoxicity studies of Murine Sarcoma virus-induced immunity in mice. J.Natl. Cancer Inst. 51: 1497, ( 1973 ).
221. LAW, L.V., DUNN, T.B., and BOYLE, P.J. Neoplasms in the C3H strain and in F1 hybrid mice of two crosses following introduction of extracts and filtrates of leukemic tissues. J. Natl. Cancer Inst. 16: 495, ( 1955 ).
222. LAW, L.W., TING, R.C. and ALLISON, A.C. Effect of antilymphocyte serum on tumour and leukaemia induction by murine sarcoma virus ( MSV ). Nature ( London ) 220: 611, ( 1968 ).
223. LAW, L.W., TING, R.C., and STANTON, M.F. Some biologic, immunogenic, and morphologic effects in mice after infection with a Murine sarcoma virus. I. Biologic and immunogenic studies. J. Nat. Cancer Inst. 40: 1101, ( 1968 ).
224. LAW, L.W. and TING, R.C. Antigenic properties of a nonreleaser neoplasm induced in the mouse by murine sarcoma virus . J. Natl. Cancer Inst. 44: 615, ( 1970 ).
225. LECLERC, C., SILVESTRE, D., LEVY, J.P. and VARET, B. Etude ultrastructurale d' un virus sarcomatogen ( MSV ). Int. J. Cancer 2: 465, ( 1967 ).
- 226a. LEVY, J.P., LECLERC, J.C., VARET, B., OPPENHEIM, E. Study of the antigenic specificity of Graffi leukemic cells. J. Natl. Cancer Inst. 41: 743 ( 1968 ).
- 226b. LEVY, J.P., VARET, B., OPPENHEIM, S. and LECLERC, J.C. Neutralization of Graffi leukemia virus. Nature ( London ) 224: 606, ( 1969 ).
227. LEVY, J.P. Relations hôte-virus leucemogenes: controle genetique de l'apparition de la leucemie. Bull. du Cancer 62: 213, ( 1975 ).
228. LIEBER, M. and TODARO, G. Mammalian type C RNA viruses. Cancer: a comprehensive treatise. 2: 91, ( 1974 ).
229. LIEBERMAN, M. and KAPLAN, H.S. Leukemogenic activity of filtrates from radiation-induced lymphoid tumors of mice. Science 130: 387, ( 1959 ).
230. LILLY, F. Mouse leukemia, a model of a multiple gene disease. J. Natl.Cancer Inst. 49: 927, ( 1972 ).

231. LILLY, F. and PINCUS, T. Genetic control of murine viral leukemogenesis. Adv. Cancer Res. 17: 231, ( 1973 ).
232. LILLY, F. and STEEVES, R. Antigens of murine leukemia viruses. Bioch. et. Bioph. Acta. 355: 105, ( 1974 ).
233. LILLY, F., DURAN-REYNALS, M. and ROWE, W. Correlation of early murine leukemia virus titer and H-2 type with spontaneous leukemia in mice of the BaLB/c x AKR cross: a genetic analysis. J. Exp. Med. 141: 882, ( 1975 ).
234. LITTLE, C.C. The genetics of tumor transplantation. Biology of the Laboratory Mouse. G.D. Snell, Ed. p. 279. Philadelphia, Penn. ( 1941 ).
235. LOCK, S.P. and MERRINGTON, M. Leukemia in Lewisham ( 1957-63 ). Brit. Med. J. 3: 759, ( 1967 ).
236. LOVINGER, G., LING, H.P., KLEIN, R.A., GILDEN, R.V. and HATANAKA, M. Unintegrated murine leukemia viral DNA in newly infected cells. Virology 62: 280, ( 1974 ).
237. LOWY, D.R., CHATTOPADHYAY, S.K., TEICH, N. The chromosomal localization of an endogenous murine leukemia viral genome in the AKR mouse. Biology of Radiation Carcinogenesis. J.M. Yuhas. Raven Press. ( 1976 ).
238. LUCKE, B. Carcinoma in the leopard frog.: Its probable causation by a virus. J. Exp. Med. 68: 457, ( 1938 ).
239. MACDOWELL, E.C., POTTER, J.S., BOVARNICK, M., RICHTER, M.N., TAYLOR, M.J., WARD, E.N., LAAMES, T., and WINTERSTEINER, M.P. Experimental leukemia. Year Book N°38, Carnegie Inst. of Washington: 191, ( 1939 ).
240. MACLENNAN, I.C.M., LOEWI, G. and HARDING, B. The role of immunoglobulins in lymphocyte mediated cell damage, in vitro: I. Comparison of the effects of target cell specific antibody and normal serum factors on cellular damage by immune and non-immune lymphocytes. Immunology 18: 397, ( 1970 ).
241. MAGALHAES, O. Verruga dos bovidos. Brasil-Medico 34: 430, ( 1920 ).
242. MAHY, B.W.J., HARVEY, J.J. and ROWSON, K.E.K. Some physical properties of a murine sarcoma virus ( Harvey ). Tex. Rep. Biol. Med. 24: 620, ( 1966 ).
243. MANAKER, R.A., JENSEN, E.M. and KOROL, W. Long term propagation of a murine leukemia virus in an established cell line. J. Natl. Cancer Inst. 33: 363, ( 1964 ).
244. MARTIN, S.E. and MARTIN, W.J. Anti-tumor antibodies in normal mouse sera. Int. J. Cancer 15: 658, ( 1975 ).
245. MATHOT, C. and SCHER, S. Transmission through milk of antibodies against the Friend virus in mice. Nature 219: 82, ( 1968 ).

246. MAYER, A.M.S. Trabajos preliminares.
247. MAYER, A.M.S. Recidivas de sarcoma de Moloney en ratones BaLB/c inmunizados con VSM-M. VIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de INmunología Junio 18, 1975.
248. MAYYASI, S.A., and BULFONE, L.M. Antigenic study on Moloney and Rauscher viruses cultivated in tissue culture. Cancer 18: 1322, ( 1965 ).
249. MAYYASI, S.A. and MOLONEY, J.B. Induced resistance of mice to a lymphoid strain of leukemia virus ( Moloney ). Cancer 20 : 1124, ( 1967 ).
250. MAYYASI, S.A., FOSTER, H.F., BULFONE, L.M., WRIGHT, B.S., SHIBLEY, G.P. Induction of immunity in mice with tissue culture cells chronically infected with Rauscher Leukemia virus. Proc. Soc. Exp. Biol. and Medi. 128: 1088, ( 1968 ).
251. MAZURENKO, N.P. The role of viruses in the etiology of leukoses. Gosudarstvennoe Izdatelestvo, USSR, Kiev.(1962).
252. McCOY, J.L., FEFER, A., and GLYNN, J.P. Influence of infectious virus on the induction of transplantation resistance in the Friend Tumor System. Cancer Research 27: 2266, ( 1967 ).
253. McCOY, J.L., FEFER, A. and GLYNN, J.P. Comparative studies on the induction of transplantation resistance in BALB/c and C57BL/6 mice in three murine leukemia systems. Cancer Research 27: 1743, ( 1967 ).
254. MEIER, H., TAYLOR, B., CHERRY, M. and HUEBNER, R.J. Host-gene control of type-C RNA tumor virus expression and tumorigenesis in inbred mice. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70: 1450, ( 1973 ).
255. MELENDEZ, L.V., DANIEL, M.D., GARCIA, F.G., FRASER, C.E.O., HUNT, R.D., and KING, N. W. Herpes saimiri. I. Further characterization of a new virus from the squirrel monkey. Lab. Anim. Care. 19: 372, ( 1969 ).
256. MELENDEZ, L.V., HUNT, R.D., KING, N.W., et al. Herpes- virus ateles, a new lymphoma virus of monkeys. Nature New Biology 235: 182, ( 1972 ).
257. MIKULSKA, Z.B., SMITH, C. and ALEXANDER, P. Evidence for an immunological reaction of the host directed against its own actively growing primary tumor. J. Natl. Cancer Inst. 36: 29, ( 1966 ).
258. MIRAND, E.A., GRACE, J.T. and BUFFET, R.F. Passive and active immunity to Friend virus disease. Nature 209: 696, ( 1966 ).
- 259a. MOLONEY, J.B. Biological studies on a lymphoid leukemia virus extracted from sarcoma S 37. I. Origin and introductory investigations. J. Natl. Cancer Inst. 24: 933, ( 1960 ).
- 259b. MOLONEY, J.B. The murine leukemias . Federation Proc. 21: 19, ( 1962 ).
- 259c. MOLONEY, J.B. A virus-induced rhabdomyosarcoma of mice. Conference on Murine Leukemia. Nat. Cancer Inst. Monograph N° 22: 139, ( 1966 ).

260. MOORE, A.E. Induction of tumors in newborn mice by inoculation of preparations of human tissues ( Abstract ). Proc. Am. Assoc. Cancer. Research 3: 135, ( 1960 ).
- 260a. MORTENSEN, R.F., CEGLOWSKI, W.S., and FRIEDMAN, H. Leukemia virus induced immunosuppression. X. Depression of T- cell mediated cytotoxicity after infection of mice with Friend Leukemia Virus. The J. of Immunology 112 (6): 2077, ( 1974 ).
261. National Program for the Conquest of Cancer. Report of the National Panel of Consultants on the Conquest of Cancer. Document N° 92-9, ( 1971 ).
262. NOWINSKI, R.C., KAEHLER, S.L. and BURGESS, R.R. Immune response in the mouse to endogenous leukemia viruses. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 39 ( 2 ) : 1123, ( 1974 ).
263. OLD, L., BOYSE, E.A. and STOCKERT, E. Antigenic properties of experimental leukemias. I. Serological studies " in vitro " with spontaneous and radiation-induced leukemias . J.Natl. Cancer Inst. 31: 977, ( 1963 ).
264. OLD, L., BOYSE, E.A., and STOCKERT, E. Typing of mouse leukaemias by serological methods. Nature 201: 777 , ( 1964 ).
265. OLDSTONE, M.B.A., DEL VILLANO, D.C., DIXON, F.J. Autologous immune response to the major oncornavirus polypeptides in unmanipulated AKR/J mice. J. of Virology 18 (1): 176, ( 1976 ).
266. OLSON, C., MILLER, L.D., MILLER, J.M. et al. Transmission of lymphosarcoma from cattle to sheep. J. Natl. Cancer Inst. 49: 1462 ( 1972 ).
267. PADGETT, B.L., ZURHEIM, G.M., WALKER, D.L., et al. Cultivation of papovavirus-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. Lancet 1 : 1257, ( 1971 ).
268. PARSONS, R.J. and KIDD, J.G. A virus causing oral papillomatosis in rabbits. Proc.Soc. Exp. Biol. and Med. 35: 438, ( 1936 ).
269. PASQUALINI, C. Dosne de, HOLMBERG, E.A.D., RABASA, S.L. and PAVLOVSKY, A. Immunity to Sarcoma 180 and the induction of Leukemia. Cancer Research 21: 387, ( 1961 ).
270. PASQUALINI, C. Dosne de, HOLMBERG, E.A.D., RABASA, S.L., and PAVLOVSKY, A. Leukemia induced by Sarcoma 180 and the development of reciprocal immunity. Cancer Research 23: 974, ( 1963 ).
271. PASQUALINI, C. Dosne de, SAAL, F., SEN, L., y RABASA, S.L. Leucemia murina. Medicina ( Buenos Aires ) XXVIII ( sup 1 ): 116, ( 1968 ).

272. PASQUALINI, C. Dosne de, SAAL, F., BRAYLAN, R.C., and RABASA, S.L. Induction of leukemia in BALB mice by allogeneic AKR leukemic cells. International J. Cancer. 5: 338, ( 1970 ).
273. PASTERNAK, G. and GRAFFI, A. Induction of resistance against isotransplantation of virus-induced myeloid leukemias. Brit. J. of Cancer 17: 532,(1963).
274. PASTERNAK, G. Serologic studies on cells of Graffi virus-induced myeloid leukemia in mice. J. Natl. Cancer Inst. 34: 71, ( 1965 ).
275. PASTERNAK, G. Antigens induced by the mouse leukemia viruses. In: Advances in Cancer Research. Vol 12: 1, ( 1969 ).
276. PASTERNAK, G. Virus induced surface antigens of the leukemia specific type in tumors induced by MSV. Advances in Cancer Research Vol 12: 74, ( 1969 ).
277. PAZMIÑO, N.H., YUHAS, J.M. Senescent loss of resistance to murine sarcoma virus ( Moloney ) in the mouse . Cancer Research 33: 2668, ( 1973 ).
- 278a. PEARSON, R.G. Protective effects of immune sera against transplantable Moloney virus-induced sarcoma and lymphoma. Cancer Research 33: 171, ( 1973 ).
- 278b. PEARSON, G.R., REDMON, L.W., and BASS, L.R. Protective effect of immune sera against transplantable Moloney virus-induced sarcoma and lymphoma. Cancer Research 33: 171, ( 1973 ).
279. PERK, K. and MOLONEY, J.B. Pathogenesis of a virus-induced rhabdomyosarcoma in mice. J. Natl. Cancer Inst. 37: 581, ( 1966 ).
280. PERK, K. and MOLONEY, J.B., and JENKINS, E.G. Further studies on the relationship of a rhabdomyosarcoma virus to muscle tissue. Int. J. of Cancer 2: 33, ( 1967 ).
281. PERK, K., MOLONEY, J.B. and JENKINS, E.G. J. Natl. Cancer Inst. 40: 337, ( 1968 ).
282. PERLMANN, P., and PERLMANN, H. Contractual lysis of antibody-coated chicken erythrocytes by purified lymphocytes. Cell. Immunol. 1: 300, ( 1970 ).
283. POLLACK, S., HEPPNER, G., BRAUN, J.R., and NELSON, K. Specific killing of tumor cells "in vitro" in the presence of normal lymphoid cells and sera from hosts immune to the tumor antigens. Int. J. Cancer 9: 316, ( 1972 ).
284. POPE, J.H. The isolation of a mouse leukemia virus resembling Friend virus. Australian J. Exp. Biol. and Med. Sci. 40: 263, ( 1962 ).
285. PRECERRUTTI, A. and LAW, L.W. Isolation of a murine leukaemogenic virus P-LLV. Nature 198: 801, ( 1963 ).
286. PREHN, R.T. and MAIN, J.M. Immunity to methylcholanthrene induced sarcomas. J. Natl. Cancer Inst. 18: 769, ( 1957 ).

287. PREHN, R.T. and PREHN, L.M. Pathobiology of Neoplasia. A teaching Monograph. American J. of Path. 80: 529, ( 1975 ).
288. PREVOST, J.M. Oncogenic viruses: Implications for human diseases. Part I. Europ. J. of Cancer 12: 327, ( 1976 ).
289. RAPP, F. Viruses as an etiological factor in cancer. Seminars in Oncology. 3: 49, ( 1976 ).
290. RASHEED, S., GARDNER, M.B., CHAN, E. Amphotropic host range of naturally occurring wild mouse leukemia viruses. J. Virol. 19: 13, ( 1976 ).
291. RASK-NIELSEN, R. Investigations into the varying manifestations of leukemic lesions following injections of 9:10:dimethyl-1-2 Benzanthracene into different subcutaneous sites in mice. Brit. J. Cancer 3: 549, ( 1949 ).
292. RASK-NIELSEN, R. Evidence of murine, virus-induced paraprotein-producing leukemia and its relation to other virus-induced leukemias. Nature 200: 440, ( 1963 ).
293. RAUSCHER, F.J. A virus-induced disease of mice characterized by erythrocytopenia and lymphoid leukemia. J. Nat. Cancer. Inst. 29: 515, ( 1962 ).
294. REED, L.J. and MUENCH, H.A. A simple method of estimating 50 Per Cent End-points. Am. J. of Hyg. 27: 493, ( 1938 ).
295. RIBACCHI, R. and GIRALDO, G. Leukemia virus release in chemically or physically induced lymphomas in BALB/c mice. In; Conference on Murine Leukemia. Nat. Cancer Inst. Monograph N° 22: 701, ( 1966 ).
296. RIBACCHI, R. and GIRALDO, G. Studies with Moloney sarcoma virus. Lav. Inst. Anat. Istol. Patol. Univ. Studi. Perugia 27: 167, ( 1967 ).
297. RIBACCHI, R. In " Immunity and tolerance in oncogenesis ". L. Severi, ed. Univ. of Perugia, Perugia. : 437, ( 1970).
298. RICH, M.A. and JOHNS, L.W.Jr. Morphology of an agent associated with a murine leukemia. Virology 20: 373, ( 1963 ).
299. RICH, M.A., GELDNER, J., MEYERS, P. Studies on Murine Leukemias. J. Natl. Cancer Inst. 35: 523, ( 1965 ).
300. RICHTER, M.N. and MacDOWELL, E.C. The experimental transmission of leukemia in mice. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 51: 659, ( 1930 ).
301. RICHTER, M.N. and MacDOWELL, E.C. Studies on mouse leukemia. VII. The relation of cell death to the potency of inoculated cell suspensions. J. Exp. Med. 57: 1, ( 1933 ).
302. RICKARD, C.G. Feline leukemia. Lymphosarcoma symposium . J. Small Animal. Pract. 10: 615, ( 1969 ).

303. ROGERS, M.J., LAW, L.W., APPELLA, E., OROSZLAN, S., and TING, C. Solubilized TSTA and the major viral structural proteins, gp70 and p30, in the immune response to Murine Leukemias induced by Friend and Rauscher virus. Int. J. Cancer 20: 303, ( 1977 ).
304. ROUS, P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. J. Exptl. Med. 13: 397, ( 1911 ).
305. ROWE, W.P., PUGH, W.E., HARTLEY, J.W. Plaque assay techniques for murine leukemia viruses. Virology 42: 1136, ( 1970 ).
306. ROWE, W.P., HARTLEY, J.W., and BREMNER, T. Genetic mapping of a murine leukemia virus-inducing locus of AKR mice. Science 178: 860, ( 1972 ).
307. RUBIN, H., CORNELIUS, A., FANSHIER, L. The pattern of congenital transmission of an avian leukosis virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47: 1058 (1961)
308. RUDALI, G., and JULLIEN, P. Production de leucémies verticalement transmissibles a l'aide d'extraits d'un adenocarcinome pulmonaire. Acta Intern. Union Against Cancer 19: 381, ( 1963 ).
309. RUSSELL, S.W., FRANCKE, U., BUETTNER, L. and COCHRANE, C.G. Modes of growth and spread of a transplantable virus producing murine Moloney Sarcoma: Karyotypic analyses. J. Natl. Cancer Inst. 53: 801, ( 1974 ).
310. SAAL, F. Tesis doctoral. Estudio antigénico de leucemias y tumores murinos. Facultad de Ciencias Médica de la Universidad de Córdoba. 1969.
311. SACHS, L. Transplantability of an x-ray-induced and a virus-induced leukemia in isologous mice inoculated with a leukemia virus. J. Natl. Cancer Inst. 29: 759, ( 1962 ).
312. SANARELLI, G. Das myxomatogene Virus. Beitrag zum studium der Krankheitserreger ausserhalb des Sichtbaren. Centralbl. f. Bakt. Abt. I, 23: 865 ( 1898 ).
313. SARMA, P.S. and GAZDAR, A.F. Recent progress in studies of mouse type-C viruses. In Current Topics in Microbiology 68: 1, ( 1974 ).
314. SCHACHAT, D.A., FEFER, A. and MOLONEY, J.B. Effect of cortison on oncogenesis by murine Sarcoma Virus ( Moloney ). Cancer Research 28: 517, ( 1968
315. SCHAEFER, W., DEMSEY, A., FRANK, H. et al. Morphological, chemical and antigenic organization of mammalian C-type viruses. Bibl. Haemat. 40: 497, ( 1975 ).
316. SCHAFER, W., SCHWARZ, H., THIEL, H., WECKER, E., and BOLOGNESI, D. Properties of Mouse Leukemia Viruses. XIII. Serum Therapy of virus induced Murine Leukemias. Virology 75: 401, ( 1976 ).
317. SCHAFER, W., BOLOGNESI, D.P., DE NORONHA, F., FISCHINGER, P.J., HUNSMANN, G., IHLE, J.N., MOENNIG, V., SCHWARZ, H. and THIEL, H. Immuno-prophylaxis and therapy of C-type oncorna viral diseases in mice and cats. Med. Microbiol. Immunol. 164: 217, ( 1977 ).

318. SCHAFFER, W. and BOLOGNESI, D.P. Mammalian C-type oncornaviruses: Relationships between viral structural and cell-surface antigens and their possible significance in immunological defense mechanisms. In Contemporary Topics in Immunobiology 6, Chapter 4: 127, ( 1977 ).
319. SCHER, C.D., SCOLNICK, E.M., SIEGLER, R. Induction of erythroid leukemia by Harvey and Kirsten sarcoma viruses. NATURE 256: 225, ( 1975 ).
320. SCHLOM, J. Biological characterization of the Moloney Sarcoma-Leukemia virus complex: Oncogenicity, antigenicity and genetic heterogeneity. Ph.D. Thesis. Rutgers University. 1969.
321. SCHLOM, J., MOLONEY, J.B. and GROUPE, V. Immunological and pathological manifestations of Murine Sarcoma Virus ( Moloney ) infections. Cancer Research 30: 2955, ( 1970 ).
322. SCHMIDT, F. Zur heterologen Übertragung von Krebs- und Leukämie material des Menschen auf Laboratoriumstiere. Zeitschr. f. Krebsforsch. 63: 532, (1960).
323. SCHOOLMAN, H.M., SPURRIER, W., SCHWARTZ, S.O. and SZANTO, P.B. Studies in leukemia. VII. The induction of leukemia in Swiss mice by means of cell-free filtrates of leukemic mouse brain. Blood 12: 694, (1957) .
324. SCHRADER, J.W., CUNNINGHAM, B.A. and EDELMAN, G.M. Functional interactions of viral and histocompatibility antigens at tumor cell surface. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75: 5066, ( 1975 ).
325. SCHWARTZ, S.O., SCHOOLMAN, H.M., SZANTO, P.B. and SPURRIER, W. Studies in leukemia. VI. The induction of leukemia in AKR mice by means of cell-free brain filtrates of humans who died of leukemia. Cancer Research 17: 218, ( 1957 ).
326. SCHWARTZ, H., THIEL, H.J., and SCHAFFER, W. Spontaneous leukemia of AKR mice. Successful passive immunization with goat antibodies against isolated glycoprotein gp71 of Friend Leukemia virus. Z. Naturforsch. 32: 459, (1977)
327. SEKINE, I., VREDEVOE, D.L., HAYS, E.F. Virus expression and immunoprophylaxis of a murine lymphoma. J. Natl. Cancer Inst. 54: 727, ( 1975 ).
328. SHOPE, R.E. A filterable virus causing tumor-like condition in rabbits and its relationship to virus myxomatousum. J. Exp. Med. 56: 803, ( 1932 ).
329. SHOPE, R.E. Infectious papillomatosis of Rabbits. J. Expt. Med. 58: 607, ( 1933 ).
330. SHOPE, R.E. An infectious fibroma of deer. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 88: 533, ( 1955 ).
331. SHOPE, R.E. Koch's postulates and a viral cause of human cancer. Guest editorial Cancer Research 20: 1119, ( 1960 ).

332. SIEGLER, R. Pathogenesis of virus-induced murine sarcoma. I. Light microscopy. J. Natl. Cancer Inst. 45: 135, ( 1970 ).
333. SIMONS, P.J. and TURANO, A. Studies with murine sarcoma virus. Ig. Mod. 59: 119, ( 1966 ).
334. SIMONS, P.J. and McCULLY, D.J. Pathologic and virologic studies of tumors induced in mice by two strains of murine sarcoma virus. J.Natl. Cancer Inst. 44: 1289, ( 1970 ).
335. SJOGREN, H.O. Transplantation methods as a tool for detection of tumor specific antigens. Prog. Exp. Tumor Res. 6: 289, (1965).
336. SLETTENMARK, B. and KLEIN, E. Cytotoxic and neutralization tests with serum and lymph node cells of isologous mice with induced resistance against Gross lymphoma. Cancer Research 22: 947, ( 1962 ).
337. SLYE, M. The incidence and inheritability of spontaneous tumors in mice. J. Exp. Med. Res. 30: 281, ( 1914 ).
338. SLYE, M. The relation of heredity to the occurrence of spontaneous leukemia, pseudo-leukemia, lymphosarcoma and allied diseases in Mice. Preliminary report. Am. J. Cancer 15: 1361, ( 1931 ).
339. SMADJA-JOFFE, F., HASMIN, C., KERDILES, C., KLEIN, B. Friend Leukemia: A Model for the physiopathology of human chronic leukemia. Europ. J. Cancer 11: 831, ( 1975 ).
340. SNELL, G.D. The immunology of tissue transplantation. 16th. Ann. Symposium of Fundamental Cancer Res., Houston, Texas. 1: 27, ( 1962 ).
341. SNYDER, S.P., THEILEN, G.H. Transmissible feline fibrosarcoma. Nature 221: 1074, ( 1969 ).
342. STAATS, J. Standardized Nomenclature for inbred strains of Mice.: Fourth Listing. Cancer Research 28: 391, ( 1968 ).
343. STANTON, M.F., LAW, L.W., and TING, R.C. Some biologic, immunogenic and morphologic effects in Mice after infection with a Murine Sarcoma Virus II. Morphologic studies. J. Natl. Cancer Inst. 40: 1113, ( 1968 ).
344. STEINER, F. Familiare Leukamie. Muchen, Med. Wochenschr. 80: 1822,( 1933 )
345. STEPHENSON, J.R. and AARONSON, S.A. Antigenic properties of Murine Sarcoma virus-transformed BALB/3T3 nonproducer cells. The J. of Exp. Med. 135: 503, ( 1972 ).
346. STEWART, S.E. Neoplasms in mice inoculated with cell-free extracts or filtrates of leukemic mouse tissues. I. Neoplasms of the parotid and adrenal glands. J. Natl. Cancer Inst. 15: 1391, ( 1955 ).
347. STEWART, S.E. Neoplasms in mice inoculated with cell-free extracts or filtrates of leukemic mouse tissues. J. Natl. Cancer Inst 16: 41, ( 1955).

348. STEWART, S.E., EDDY, B.E., GOCHENOUR, A.M., BORGESE, N.G., and GRUBBS, G.E. The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumors by tissue culture. Virology 3 : 380, ( 1957 ).
350. STOCKERT, E., OLD, L.J., BOYSE, E.A. The  $G_{1X}$  system. J. Exp. Med. 133: 1334, ( 1971 ).
351. STRAND, M., AUGUST, J.T. Structural proteins of mammalian oncogenic RNA viruses: Multiple antigenic determinants of the major internal protein and envelope glycoprotein. Journal of Virology 13 (1): 171, ( 1974 ).
352. STRAND, M., LILLY, F., and AUGUST, J.T. Host control of endogenous murine leukemia virus gene expressions: Concentration of viral proteins in high and low leukemia strains. Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 71: 3682, ( 1974 ).
353. STRANDSTROM, H., VEIJALAINEN, P., MOENNIG, V., HUNSMANN, G., SCHWARZ, H., SCHAFER, W. C-type particles produced by a permanent cell line from a leukemic pig. I. Origin and properties of the host cells and some evidence for the occurrence of C-type like particles. Virology 57: 175, ( 1974 ).
354. STRONG, L.C. The establishment of the " A " strain of inbred mice. J. Heredity 27: 21, ( 1936 ).
355. STRONG, L.C. The origin of some inbred mice. Cancer Research 2: 531, ( 1942 )
- 356a. TEMIN, H.M. and MIZUTANI, S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma Virus. Nature 226: 1211, ( 1970 ).
- 356b. TEMIN, H.M. The provirus: Speculations on the significance of RNA directed DNA synthesis for normal development and for carcinogenesis . J. Natl. Cancer Inst. 46: 3, ( 1971 ).
357. TEMIN, H. Mechanisms of cell transformation by RNA tumor viruses. Ann. Rev. Microbiol. 25: 609, ( 1971 ).
358. TEMIN, H.M. and BALTIMORE, D. RNA directed DNA synthesis and RNA tumor viruses. Advances Virus Res. 17: 129, ( 1972 ).
359. TEMIN, H.M. Introduction to virus caused cancers. Cancer ( Philadel. ) 37: 1347, ( 1974 ).
- 360a. TENNANT, J.R. Derivation of a murine lymphoid leukemia virus. J. Natl. Cancer Inst. 28: 1291, ( 1962 ).
- 360b. TENNANT, J.R., LAMBERTENGI, G., KINGSLEY, S. and DE HARVEN, E. Correlation between the presence of leukemia virus in cultured cells and their immunogenicity in a leukemia isograft system. J. Natl. Cancer Inst. 47: 781, ( 1971 ).
361. THEILEN, G.H., GOULD, D., FOWLER, M. and DUNGWORTH, D.L. C-type virus in tumor tissue of a woolly monkey ( *Lagothrix* sp.p. ) with fibrosarcoma. J. Nat. Cancer Inst. 47: 881, ( 1971 ).

362. THIERSCH, J.B. Aspects of leukaemia. Proc. Royal Austral. College of Physicians. 2: 31, ( 1947 ).
363. TILL, M.M., HARDISTY, R.M., PIKE, M.C., and DOLL, R. Childhood leukaemia in greater London: A search for evidence of clustering. Brit. Med. J. 3: 755, ( 1967 ).
- 364a. TODARO, G.J., HUEBNER, R.J. The viral oncogene hypothesis. New Evidence. Proc. Natl. Acad. Sci. Wash. 69: 1009, ( 1972 ).
- 364b. TODARO, G.J., LIEBER, M.M., BENVENISTE, R.E., et al. Infectious primate type C viruses: 3 isolates belonging to a new subgroup from the brains of normal gibbons. Virology 67 ( 2 ): 335, ( 1975 ).
- 364c. TODARO, G.J., BENVENISTE, R.E., CALLAHAN, R. et al. Endogenous primate and feline type C viruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39: 1159, (1974)
365. TOOZE, J. The molecular biology of tumour viruses. Cold Spring Harbor Lab. Monograph Series, Cold Spring Harbor, New York, ( 1973 ).
366. TOTH, B. Development of malignant lymphomas by cell-free filtrates prepared from a chemically induced mouse lymphoma. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 112: 873, ( 1963 ).
367. TURNER, W. and CHIRIGOS, M.A. Enhancement of murine sarcoma virus ( Moloney ) infection and tumorigenesis " in vivo " by coinfection with Rauscher leukemia virus. Cancer Research 29: 1956, ( 1969 ).
368. TRONICK, S.R., STEPHENSON, J.R. and AARONSON, S.A. Immunological characterization of a low molecular weight polypeptide of murine leukemia virus. Virology 54: 199, ( 1973 ).
369. TYNDALL, R.L., OTTEN, J.A., TEETER, E. and BOWLES, N.D. Inhibition of solid tumor formation by prior immunization with formalized neoplastic spleen extracts. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 125: 399, ( 1967 ).
370. VARET, B., LEVY, J.P., LECLERC, J.C. and SENIK, A. Role d l' immunite dans le rejet des tumeurs induites par le virus MSV. Effet des serums antithymocytes. Int. J. Cancer 3: 727, ( 1968 ).
371. VIDEBAEK, A. Heredity in human leukaemia and its relation to cancer. A genetic and clinical study of 209 probands. 279 p. London ( 1947 ).
- 371a. VREDEVOE, D.L. and HAYS, E.F. Brief communication: Therapy of transplanted lymphomas. J. Natl. Cancer Inst. 56: 663, ( 1976 ).
372. WAHREN, B. Immunotherapy in Friend Virus Leukemia. II. Prevention of Friend Leukemia by Passive administration of immune serum and cells to young mice. J. Natl. Cancer Inst. 41: 931, ( 1968 ).
373. WAHREN, B. Immunotherapy in Friend Virus Leukemia. I. Prevention of Friend Leukemia in offspring of immunized Mothers. J. Natl. Cancer Inst. 41: 923, ( 1968 ).

374. WEINER, L. A family with high incidence of leukemia and unique Ph chromosome findings. Blood 26: 871, ( 1965 ).
375. WIGZELL, H. The functional significance of surface structures on lymphocytes. Ann. Immunol. 1: 401, ( 1972 ).
376. WOOLLEY, G.W. and SMALL, M.C. Experiments on cell-free transmission of mouse leukemia. Cancer 9: 1102, ( 1956 ).
377. ZEIGEL, R.F. and CLARK, H.F. Electron microscopic observations on a C-type virus in cell cultures derived from a tumor-bearing viper. J. Natl. Cancer Inst. 43: 1097 ( 1969 ).
378. ZILBER, L.A. and POSTNIKOVA, Z.A. Induction of a leukemogenic agent by a chemical carcinogen in inbred mice. In: Conference on Murine Leukemia. Nat. Cancer Inst. Monograph N° 22: 397, ( 1966 ).
379. ZHDANOV, V.M., TRUSHINSKAYA, G.N., MAZURENKO, N.N. and ZAIROV, G.K. Possible association of oncornavirus type D with some forms of human cancer. NEOPLASMA 22 ( 1 ): 13, ( 1975 ).