

Tesis de Posgrado

Aspectos bioquímicos de la oncogénesis viral en células de mamíferos

Michelin, Severino Carlos

1987

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

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

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

Cita tipo APA:

Michelin, Severino Carlos. (1987). Aspectos bioquímicos de la oncogénesis viral en células de mamíferos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2078_Michelin.pdf

Cita tipo Chicago:

Michelin, Severino Carlos. "Aspectos bioquímicos de la oncogénesis viral en células de mamíferos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2078_Michelin.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesis
2079
Ej. 2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TEMA DE TESIS

ASPECTOS BIOQUIMICOS
DE LA ONCOGENESIS VIRAL
EN CELULAS DE MAMIFEROS

AUTOR

SEVERINO CARLOS MICHELIN

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSE MAYO

LUGAR DE TRABAJO: DTO. DE RADIOBIOLOGIA
COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1987

- 2078 -
g. 2

A mi esposa, cuya comprensión, apoyo y estímulo permanente posibilitaron la concreción de este trabajo.

A mis hijos Patricio y Nadia por su paciencia durante las horas dedicadas al mismo en mi hogar.

A mis padres, que pese a su humilde condición, posibilitaron mi progreso

Agradezco

Al Dr. José Mayo director de tesis, por su orientación especialmente en mis primeros pasos y por haberme brindado libertad para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Eduardo Scodeller por su permanente e invaluable apoyo, por sus sugerencias y análisis crítico de este trabajo.

A Jorge Latricchina por su colaboración en la preparación del material fotográfico.

A Daniel Quattrini por su colaboración en el desarrollo experimental.

A Delina Mamonte por su esmerada y responsable preparación del material empleado en la experimentación.

A Diana Prahic y Alicia Petragalli por su labor en la dosimetría e irradiación de los animales.

A la Dra. Beatriz Molinari de Rey por sus enseñanzas en la preparación y observación de muestras por microscopía electrónica.

Al Dr. Jorge Lombardo por su permanente estímulo.

A todos mis compañeros del Dto. de Radiobiología.

ABREVIATURAS

- BHK-21(C-13) : Línea de células de riñón de hamster sirio recién nacido (Baby Hamster Kidney), cultivada en monocapa.
- BHK-21(C-13)S: Clon de la línea BHK-21(C-13), cultivada en suspensión.
- SSHA : Solución salina de Hanks con antibiótico.(94)
- S.C. : Subcutánea.
- I.P. : Intraperitoneal.
- T.A. : Temperatura ambiente.
- PAI : Partículas A intracisternales.
- x g. : Valor de aceleración de la gravedad para el radio medio.
- M.E. : Microscopía electrónica.
- cDNA : ADN complementario
- Kd : 10^3 Dalton
- SFB : Suero fetal bovino.
- Rad : Un tejido ha recibido una dosis de 1 rad, como consecuencia de su exposición a las radiaciones ionizantes, cuando dentro del tejido se ha liberado una cantidad de energía equivalente a 100 ergios por gramo del mismo.(116).
- M rad : Equivalente a 10^6 rad
- 1 Gray (Gy) : Equivalente a 100 rad
- DL_{50/30} : Dosis a la cual muere el 50% de la población a los 30 días.

LTR : Secuencias repetitivas en los extremos del
genoma viral.

En este trabajo, los términos tumor y neoplasia, fueron utilizados como sinónimos de malignidad en el sentido de una formación celular invasiva y metástizante.

En este trabajo, el término transformación, se empleó para células que han adquirido todas las características asociadas a la malignidad.

INDICE

INTRODUCCION GENERAL.....	18
OBJETIVOS GENERALES.....	35

CAPITULO II. INTRODUCCION

I.1.	Características de la línea celular BHK-21(C-13).....	37
I.2.	Objetivos del capítulo I Partes A y B.....	44
	Partes C y D.....	45

I.3. MATERIALES Y METODOS DE LAS PARTES A, B,
C y DCULTIVO DE TEJIDOS

I.3.1.	Cultivo de las líneas celulares BHK-21 (C-13) y BHK-21(C-13)S.....	47
I.3.2.	Obtención de la línea celular 169. Man- tenimiento en monocapa y en suspensión.....	48
I.3.3.	Obtención de la línea celular 215. Man- tenimiento en monocapa.....	48
I.3.4.	Obtención de la línea celular 15. Man- tenimiento en monocapa.....	49
I.3.5.	Estudio citogenético de: a) células de la línea 15	

	b) células del tumor ascítico obtenido en ratones de la cepa BALB/c por inoculación de células de las líneas 215 y 15.....	49
I.3.6.	Microscopia electrónica de células de las líneas BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S, 169, 215 y 15.....	50
I.3.7.	Cultivo primario de células de exudado peritoneal de hamster.....	52
I.3.8.	Cultivo primario de células de embrión de hamster.....	52
I.3.9.	Cultivo primario de células de riñón de hamster.....	53
	<u>ANIMALES EXPERIMENTALES</u>	
I.3.10.	Animales empleados.....	53
I.3.11.	Irradiación total de hamster.....	55
I.3.12.	Obtención de tumor ascítico en hamster irradiados, por inoculación intraperitoneal de células de la línea BHK-21(C-13).....	56
I.3.13.	Obtención de tumor ascítico en hamster irradiados, por inoculación intraperitoneal de células de la línea BHK-21(C-13)S.....	57
I.3.14.	Obtención de tumor ascítico en ratones de la cepa N:NIH/nu/nu, por inoculación intraperitoneal de células de la línea BHK-21(C-13)S.....	57
I.3.15.	Obtención de tumor ascítico en ratones de la cepa BALB/c por inoculación intraperitoneal de células de las líneas 215 y 15.....	58
I.3.16.	Inoculación subcutánea de células de las	

- líneas BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S y 169
 en hamster y ratones de las cepas N:NIH/
 nu/nu y BALB/c.....58
- I.3.17. Inoculación intraperitoneal de células de
 las líneas BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S,
 y 169 en ratones de la cepa BALB/c.....58
- I.3.18. Inoculación subcutánea en hamster, de cé-
 lulas de cultivos primarios transformadas
 "in vitro".....59

OBTENCION E INOCULACION DE MATERIAL

ACELULAR

- I.3.19. Inoculación intraperitoneal del sobrena-
 dante de cultivo, de las líneas celulares
 BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S y 169 en
 hamster irradiados.....59
- I.3.20. Inoculación intraperitoneal de pellet de
 sobrenadante de cultivo, de las líneas
 celulares BHK-21(C-13) y BHK- 21(C-13)S
 en hamster irradiados.....60
- I.3.21. Obtención de suspensión acelular de cé-
 lulas de las líneas BHK-21(C-13) y 169.....60
- I.3.22. Obtención de suspensión acelular del
 fibrosarcoma producido en hamster, por
 inoculación de células de las líneas
 BHK-21(C-13) y 169
 Ensayo de su actividad biológica "in vivo"
 e "in vitro".....61

CAMARAS DE DIFUSION

- I.3.23. Construcción, esterilizado y llenado de las cámaras de difusión.....62
- I.3.24. Implantación intraperitoneal de cámaras de difusión en hamster.....64

EXPERIENCIAS IN VITRO

- I.3.25. Empleo de cámaras de difusión conteniendo células de las líneas BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S, 169, 215 y 15 en cultivos primarios de hamster.....65
- I.3.26. Infección de células de cultivos primarios de hamster, con sobrenadante de cultivo de las líneas celulares BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S, 169, 215 y 15.....66
- I.3.27. Infección de células de cultivos primarios de hamster con pellet del sobrenadante de cultivo de las líneas celulares BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S y 215.....66
- I.3.28. Caracterización histológica de los tumores sólidos y ascíticos.....67

I.4. PARTE A

I.4.1. RESULTADOS IN VIVO

I.4.1.1.	Características de crecimiento de la línea celular BHK-21(C-13).	68
I.4.1.2.	Estudio por microscopía electrónica de células de la línea BHK-21(C-13).....	71
I.4.1.3.	Evolución de la neoplasia en hamster por inoculación subcutánea de células de la línea BHK-21(C-13).....	73
I.4.1.4.	Evolución de la neoplasia en ratones de la cepa N:NIH/nu/nu por inoculación subcutánea de células de la línea BHK-21(C-13).....	75
I.4.1.5.	Actividad de las células de la línea BHK-21(C-13) en ratones de la cepa BALB/c Inoculación subcutánea e intraperitoneal	76
I.4.1.6.	Resultados obtenidos por inoculación intraperitoneal en hamster irradiados de: a) sobrenadante de cultivo de células, de la línea BHK-21(C-13) b) pellet del mismo sobrenadante	78
I.4.1.7.	Resultados obtenidos en hamster irradiados por inoculación intraperitoneal de: a) acelular de células de la línea BHK-21(C-13) b) acelular de fibrosarcoma producido en hamster por inoculación de células de la línea BHK-21(C-13).....	79
I.4.1.8.	Transformación neoplásica inducida en hamster por células de la línea BHK-21 (C-13) alojadas en cámaras de difusión.....	79

I.4.1.9. RESULTADOS IN VITRO

I.4.1.9.1. Transformación neoplásica de células de cultivos primarios de hamster por sobrenadante de cultivo de la línea BHK-21(C13).....83

I.4.1.9.2. Transformación neoplásica de células de cultivos primarios de hamster por pellet de:

a) sobrenadante de cultivo

b) suspensión acelular de células de la línea BHK-21(C-13)

c) suspensión acelular del fibrosarcoma producido por inoculación de células de la línea BHK-21(C-13) en hamster.....89

I.4.1.9.3. Transformación de células de cultivos primarios de hamster por células de la línea BHK-21(C-13) alojadas en cámaras de difusión.....91

I.5 RESUMEN DE LAS EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

DE LA PARTE A

I.5.1. Experiencias y resultados obtenidos con las células de la línea BHK-21(C-13).....94

I.5.2. Experiencias y resultados obtenidos con sobrenadante de cultivo de células de la línea BHK-21(C-13).....95

I.6.	<u>PARTE B</u>	
I.6.1.	<u>RESULTADOS IN VIVO</u>	
I.6.1.1.	Características de crecimiento de la línea celular BHK-21(C-13)S.....	96
I.6.1.2.	Estudio por microscopía electrónica de células de la línea BHK-21(C-13)S.....	100
I.6.1.3.	Evolución de la neoplasia en hamster por inoculación subcutánea de células de la línea BHK-21(C-13)S.....	100
I.6.1.4.	Evolución de la neoplasia en ratones de la cepa N:NIH/nu/nu por inoculación sub- cutánea de células de la línea BHK-21 (C-13)S.....	101
I.6.1.5.	Actividad de células de la línea BHK-21 (C-13)S en ratones de la cepa BALB/c Inoculación subcutánea e intraperitoneal	101
I.6.1.6.	Resultados obtenidos por inoculación intraperitoneal en hamster irradiados de: a) sobrenadante de cultivo de células de de la línea BHK-21(C-13)S b) pellet del mismo sobrenadante.....	103
I.6.1.7.	Análisis de la capacidad oncogénica en hamster, de células de la línea BHK-21 (C-13)S alojadas en cámaras de difusión	104

I.6.1.8. RESULTADOS IN VITRO

- I.6.1.8.1. Comprobación de la transformación neoplásica de células de cultivo primario de hamster por:
- a) sobrenadante de cultivo de la línea celular BHK-21(C-13)S
- b) pellet del mismo sobrenadante.....104
- I.6.1.8.2. Estudio de la capacidad oncogénica de células de la línea BHK-21(C-13)S alojadas en cámaras de difusión
- Ensayo en cultivos primarios de hamster.....105

I.7. RESUMEN DE LAS EXPERIENCIAS Y RESULTADOS DE LA PARTE B

- I.7.1 Experiencias y resultados obtenidos con las células de la línea BHK-21(C-13)S.....106
- I.7.2. Experiencias y resultados obtenidos con sobrenadante de cultivo de células de la línea BHK-21(C-13)S.....107

I.8. DISCUSION DE LAS PARTES A y B.....108

I.9. PARTE C

I.9.1. RESULTADOS IN VIVO

- I.9.1.1. Características del tumor ascítico originado por inoculación intraperitoneal

	de células de la línea BHK-21(C-13) en hamster irradiados.....	114
I.9.1.2.	Características de la línea celular 169.....	116
I.9.1.3.	Estudio por microscopía electrónica de células de la línea 169.....	120
I.9.1.4.	Evolución de la neoplasia en hamster por inoculación subcutánea de células de la línea 169.....	122
I.9.1.5.	Evolución de la neoplasia en ratones de la cepa N:HIH/nu/nu por inoculación subcutánea de células de la línea 169.....	122
I.9.1.6.	Evolución de la neoplasia por inoculación subcutánea e intraperitoneal de células de la línea 169 en ratones de la cepa BALB/c.....	123
I.9.1.7.	Evolución del tumor ascítico en hamster irradiados por inoculación intraperitoneal de sobrenadante de cultivo de células de la línea 169	126
I.9.1.8.	Resultados obtenidos en hamster por inoculación intraperitoneal y subcutánea de: a) acelular de células de la línea 169 b) acelular del fibrosarcoma producido en hamster, por inoculación de células de la línea 169.....	127
I.9.1.9.	Evolución de la transformación inducida en hamster por células de la línea 169 alojadas en cámaras de difusión.....	129

I.9.1.10. RESULTADOS IN VITRO

- I.9.1.10.1. Transformación de células de cultivos primarios de hamster por sobrenadante de cultivo de la línea celular 169.....131
- I.9.1.10.2. Transformación de células de cultivos primarios de hamster por suspensión acelular del fibrosarcoma producido por inoculación de células de la línea 169 en hamster.....134
- I.9.1.10.3. Transformación de células de cultivos primarios de hamster por células de la línea 169 alojadas en cámaras de difusión136

I.10. RESUMEN DE LAS EXPERIENCIAS Y RESULTADOS DE LA PARTE C

- I.10.1. Experiencias y resultados obtenidos con las células de la línea 169.....138
- I.10.2. Experiencias y resultados obtenidos con sobrenadante del cultivo de células de la línea 169.....139

I.11. PARTE D

I.11.1. RESULTADOS IN VIVO

- I.11.1.1. Evolución del tumor ascítico en hamster irradiados por inoculación intraperitoneal de células de la línea BHK-21(C-13)S140

I.11.1.2.	Evolución del tumor ascítico en ratones de la cepa N:NIH/nu/nu por inoculación intraperitoneal de células de la línea BHK-21(C-13)S	141
-----------	---	-----

LINEA 215 Y 15. RESULTADOS IN VIVO E IN VITRO

I.11.1.3.	Aspecto morfológico y estudio por M.E de células de las líneas 215 y 15.....	141
I.11.1.4.	Evolución de las experiencias "in vivo" e "in vitro" con células de las líneas 215 y 15.....	143
I.11.1.5.	Análisis de la capacidad oncogénica de células de las líneas 215 y 15 por inoculación subcutánea e intraperitoneal en ratones de la cepa BALB/c.....	143
I.12.	<u>RESUMEN DE LAS EXPERIENCIAS Y RESULTADOS DE LA PARTE D</u>	
I.12.1.	Experiencias y resultados obtenidos con las células de las líneas 215 y 15.....	145
I.12.2.	Experiencias y resultados obtenidos con sobrenadantes de las líneas 215 y 15.....	146
I.12.3.	DISCUSION DE LAS PARTES C y D	147
I.13.	<u>CONCLUSIONES DEL CAPITULO I</u>	
I.13.1.	Cuadro comparativo y conclusiones del capítulo I.....	149

CAPITULO II

II.1	<u>OBJETIVOS</u>	157
II.2.	<u>MATERIALES Y METODOS</u>	
II.2.1.	Cultivos celulares.....	160
II.2.2.	Marcación del cultivo.....	160
II.2.3.	Aislamiento de la partícula.....	161
II.2.4.	Microscopía electrónica.....	163
II.2.5.	Medición de la actividad incorporada.....	163
II.2.6.	Análisis con Ribonucleasa.....	164
II.2.7.	Análisis electroforético en geles de poliacrilamida.....	164
II.2.8.	Infección de células de cultivo prima- rio de embrión de hamster.....	166
II.3.	<u>RESULTADOS</u>	
II.3.1	Características morfológicas del virus- like intracitoplasmático.....	167
II.3.2.	Aislamiento de la partícula.....	169
II.3.3.	Análisis de resistencia a ribonucleasa.....	172
II.3.4.	Análisis electroforético de las proteínas de la partícula virus-like.....	174
II.3.5	<u>EXPERIENCIAS IN VITRO</u>	
II.3.5.1.	Transformación de células de cultivo primario de embrión de hamster.....	177

II.4.	<u>DISCUSION DEL CAPITULO II</u>	178
II.5	<u>POSIBILIDADES FUTURAS</u>	179
II.6.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	182

INTRODUCCION GENERAL

La mayoría, si no todos los organismos eucarióticos están sujetos a desórdenes en el crecimiento y diferenciación celular que origina la aparición de tumores localizados o diseminados.

Aunque un gran número de agentes físicos, químicos y biológicos han sido implicados en la etiología del crecimiento neoplásico (22,23,39,40,118), es generalmente aceptado, que algún estado del proceso neoplásico, involucra alteraciones genéticas específicas en células individuales, cuya progenie constituirá la masa del tumor.(2,23)

Estas alteraciones pueden ser múltiples, ya sea heredadas, inducidas o facilitadas por algunos de los agentes antes mencionados.(8,97)

Los virus oncogénicos al igual que otros virus son convencionalmente clasificados de acuerdo a su composición química, organización y tamaño de su genoma.

Los virus ARN han sido aislados de diversas especies de animales y pueden producir distintas patologías, a través de una variedad de mecanismos. Estos virus se identifican por la naturaleza de su genoma, su forma de entrar a la célula, su composición, estructura y su modo de replicación vía un intermediario de ADN.(119)

Esta última propiedad, mas que alguna otra distingue esta clase de virus de otros virus ARN. Por lo tanto los virus que utilizan la ADN pol-ARN dependiente, codificada por ellos mismos, están agrupados y clasificados como retrovi-

rus, independientemente si ellos son capaces de producir los efectos biológicos de los reales virus oncogénicos.

Algunos retrovirus no oncogénicos son mutantes o variantes estrechamente relacionados a ellos, otros están relacionados a los retrovirus por su modo de replicación y morfología.

Descubrimiento de los retrovirus

Los retrovirus aparecen como una clasificación separada dentro de los virus ARN, en los últimos 15 años. Esto reemplazó el término generalizado de virus oncogénicos ARN que fue utilizado luego del descubrimiento de los virus productores de sarcomas y leucemias en aves y mamíferos.

Vallee y Carre demostraron en 1904, que un agente filtrable era responsable de la anemia infecciosa equina. Hoy este agente es un virus de la familia de los retrovirus.

Sin embargo, fue el descubrimiento por Ellerman y Bang del virus de leucemia aviar (ALV) en 1908 y el aislamiento del primer virus de sarcoma aviar (RSV) en 1911 por Peyton Rous, que pusieron énfasis en esta nueva familia de virus.

Luego de estos descubrimientos, otros virus de sarcoma y leucemia fueron reconocidos en especies aviares.

El aislamiento de virus de mamíferos comenzó a tener éxito varios años después. En 1942 Bittner demostró que el agente presente en la leche materna de ratones era un virus conocido posteriormente como virus de tumor de mama de ratón (MMTV), un retrovirus tipo B.

En 1951 Ludwik Gross aisló el primer virus leucémico de mamíferos, conocido actualmente como virus de leucemia murina de Gross (MuLV). Esto permitió el reconocimiento y aislamiento de otros virus oncogénicos ya sea con genoma ARN o ADN.(53)

Los retrovirus son responsables de una variedad de leucemias y sarcomas de ratón, gato, ratas y primates.(71,119) Han sido descritos en animales de distintas especies incluyendo peces, anfibios e insectos.(119)

Durante mucho tiempo no fue conocido su mecanismo de replicación dentro de la célula. Esto fue finalmente aclarado en 1970 por Temin y Mizutani (113) y Baltimore (9), por el hallazgo de la enzima ADN pol-ARN dependiente o transcriptasa reversa.

Esta permite al virus hacer un cDNA de su genoma e integrarse al cromosoma de la célula huésped. En el caso de infecciones exógenas no todas las células del huésped infectado llevan la información viral.

Por lo tanto el virus aparece formando parte del ADN celular. Alternativamente, puede entrar a la línea germinal del huésped y pasar a futuras generaciones como provirus, dentro del material genético de todas las células del futuro individuo.

Se encontró recientemente para algunos retrovirus, por ejemplo, para visna, que ocurren ciclos infecciosos, sin el paso de integración al ADN celular.(56)

Las evidencias iniciales de la existencia de retrovirus endógenos proviene de las observaciones de antígenos de ALV en células de embrión de pollo no infectadas. (37)

Posteriormente se detectó la presencia de virus tipo C (MuLV) en células de ratones no infectados.(1)

Estos resultados corroboran las primeras observaciones de Gross, Dreyfus y Bentvelzen sobre la transferencia de retrovirus patógenos a la progenie por vía de la línea germinal.

Clasificación de los retrovirus

Con el hallazgo de la ADN polimerasa-ARN dependiente, en una variedad de virus, se realizó una clasificación en base a la presencia o no de esta enzima.

La clasificación se subdividió en 3 subfamilias denominadas, oncovirinae, spumavirinae y lentivirinae (119).

Los oncovirus (aquellos asociados con cáncer) fueron reagrupados en tipos A, B y C de acuerdo a sus características morfológicas descritas inicialmente por Bernhard (11). Posteriormente se agregó el tipo D, también clasificado en base a su morfología (42).

El primer miembro de los spumavirus fue descrito en 1955 (101) y su denominación se debió a las lesiones vacuolares que producía en células de macacos (119).

En la tercer subfamilia de retrovirus, los lentivirus (virus lentos), se agruparon el virus de la anemia infecciosa equina, visna y virus de la artritis caprina.

Estos 3 virus están asociados a otras condiciones patológicas y no a la malignidad. Se caracterizan por sus efectos citopáticos en cultivo y su asociación con enfermedades de largos períodos de incubación. Recientemente se in-

cluyó dentro de esta subfamilia al virus de SIDA (Síndrome de inmunodeficiencia adquirida)

Características biológicas de los retrovirus

Receptores virus específicos: la interacción de los retrovirus con receptores específicos sobre las células es una característica importante de esta familia de virus, ya que permite su penetración (35,119).

Se cree que los virus entran a la célula fusionándose con la membrana celular vía receptor, o son conducidos dentro de la misma por el complejo virus-receptor.

Antígenos de la superficie celular: muchos retrovirus durante el ciclo infeccioso brotan de la superficie de la célula sin inducir efectos citopáticos. Estas células sobreviven y pueden servir como productoras de nuevos virus. Sin embargo la infección por lentivirus, spumavirus y algunos oncovirus pueden producir la muerte celular.

Durante la infección con retrovirus, la membrana celular se cubre con proteínas retrovirales. Esto puede producir la muerte celular mediada por células inmunocompetentes o puede afectar la comunicación intercelular y reducir sus funciones (119).

Latencia: otra característica biológica importante de la infección por retrovirus es su estado latente.

Bajo esta condición, el virus, luego de la infección, queda presente en la célula, pero su expresión, la de su ARN o proteínas es demasiado pequeña o suprimida y por lo tanto no detectada.

En este estado la célula infectada por el virus escapa a la vigilancia inmunológica.

Los retrovirus endógenos que no se expresan pueden ser activados bajo ciertas condiciones y obtener viriones infecciosos.

Estudios con células embrionarias de ratón de la cepa AKR fueron los primeros en demostrar que el estado reprimido puede ser liberado por pirimidinas halogenadas (74). Las radiaciones ionizantes y ultra violeta, así como varios compuestos, incluyendo inhibidores de proteínas poseen efectos similares (40,64,79,99,100,119).

Mezcla fenotípica: los retrovirus pueden producir una mezcla fenotípica cuando ellos coinfectan células susceptibles. La envoltura de uno de ellos sirve como cubierta para el genoma de otro virus (117).

Por este mecanismo, células de ratón pueden ser infectadas con retrovirus aviares y "vice versa" (72).

La mezcla fenotípica puede también ocurrir entre retrovirus y otros virus con envoltura, tales como rabdovirus y mixovirus.

Retrovirus y cáncer

Gran cantidad de evidencias han relacionado los retrovirus a enfermedades malignas en muchas especies animales incluyendo humanos.

Su mecanismo de acción, sin embargo no es completamente conocido.

Muchos de estos virus, originalmente no patógenos, parecerían haber transducido genes celulares normales (protooncogenes) dentro de su genoma (13).

Su potencial oncogénico deriva ya sea de una expresión aumentada de estos oncogenes o la producción de un producto por un gen celular alterado tal como una protein quinasa (21). En algunos casos el producto del oncogén se parece a un factor de crecimiento celular normal o a su receptor(38).

Existen aproximadamente 20 retrovirus portadores de distintos oncogenes. La forma como estos genes fueron incorporados a los virus oncogénicos no ha sido aun totalmente aclarada.

Experimentos de transfección usando ADN de tumores humanos han apoyado el rol de los oncogenes en el proceso maligno. Se ha encontrado una estrecha similitud de ciertas secuencias celulares "transformantes" con el oncogén ras (65,103).

No se sabe aún como este gen celular "normal" puede ser activado.

Un método distinto de transformación ha sido propuesto para los virus leucémicos que causan enfermedad luego de un largo tiempo de latencia.

Ellos pueden insertar un promotor viral (por ej. LTR) cerca de genes celulares normales y amplificar la producción de un producto celular normal permitiendo la transformación de la célula (57).

Alternativamente estos virus oncogénicos "transformantes lentos" pueden codificar para proteínas

"trans-acting" que difunden a través de la célula e inducen a las LTR a aumentar la transcripción de su oncogen (106).

Estas proteínas puede también influenciar genes celulares y eventualmente inducir la transformación neoplásica.

Otras teorías han sugerido que las leucemias inducidas por retrovirus son el resultado de una constante estimulación por la unión de glicoproteínas virales a receptores específicos sobre la superficie celular. Por este método el virus no necesitaría entrar a la célula y actuaría como mitógeno induciendo una replicación celular continua (84).

Finalmente se ha considerado la hipótesis de un "hit and run". Un ejemplo son los linfomas de células B de ratones causados por el Abelson MuLV. En algunos tumores, el virus que está asociado con la inducción de leucemia, es posteriormente eliminado de la célula maligna.

Este proceso podría explicar la inducción por virus de otras enfermedades, particularmente autoinmunes, en las cuales, la investigación de un agente etiológico puede ser demasiado tarde para el tiempo que ha transcurrido desde el comienzo de la enfermedad (54).

Este comportamiento es similar al observado con algunos virus oncogénicos ADN (46).

Retrovirus humanos

La mayoría de los trabajos sobre virus oncogénicos se han concentrado en trabajos con animales. La identificación de partículas retrovirales en placentas humanas, en em-

briones en desarrollo (61,88,91), en ciertas líneas celulares humanas, tales como teratocarcinomas (15) y la detección de secuencias de retrovirus en células humanas han enfatizado la posible existencia de retrovirus humano (17,77).

El primer retrovirus tipo C aislado de una leucemia humana de células T llamado HTLV-1, está asociado con el desarrollo de la malignidad pero el mecanismo de patogenicidad no ha sido aclarado (96).

Aunque muchos individuos están infectados con este virus, aun no desarrollaron la enfermedad, y en otros el período de latencia supera los 10 años.

El genoma de este virus es muy estable ya que muestras aisladas de Japón y EEUU tienen los mismos perfiles de restricción.

En cultivo transforma linfocitos T en líneas con crecimiento continuo y se integra al azar en el genoma de las células infectadas (al igual que los retrovirus) pero el eventual desarrollo de leucemia ocurre solamente con ciertos clones.

Parecería, como es cierto para otros virus leucémicos, que ocurre la integración a muchas células, pero eventualmente una sola posee la capacidad para replicarse eficientemente y emerger como una línea leucémica.

Esto permanece aun sin explicación y no se han detectado oncogenes codificados por este virus.

Otro retrovirus humano relacionado al anterior, denominado HTLV-II ha sido aislado de una línea celular de un paciente con leucemia vellosa. La relación de este virus con

el de leucemia de células T no ha sido correctamente establecida.

El reciente reconocimiento de los retrovirus asociados con cánceres humanos e inmunodeficiencia, los involucra como potenciales agentes responsables de otras enfermedades tales como autoinmunidad y esclerosis múltiples

Los retrovirus no solamente pueden ser agentes oncogénicos o citopáticos, ellos pueden existir como agentes endógenos en el ADN cromosomal de muchas especies diferentes y no causar enfermedades.

En efecto este último grupo de virus parece ser el predominante, lo que sugiere, la probable intervención de los mismos en el proceso de desarrollo normal y patológico.

Los genomas virus-like reconocidos en *Drosophila* (102) y otras especies de animales menores pueden ser ejemplos de este hecho.

El material genético de los retrovirus puede actuar como transposones y este podría ser su mecanismo para mantenerse dentro del huésped y afectar su camino evolutivo.

Por su facilidad para moverse dentro del material genético de la célula estos virus pueden influenciar el desarrollo de animales a travez de la promoción, aumento o supresión de genes celulares específicos. Esta idea ha sido propuesta fundamentalmente para partículas A no infecciosas que han mostrado estos efectos en cultivos celulares.

TRANSFORMACION MALIGNA IN VITRO: CRITERIOS Y CARACTERISTICAS BIOLOGICAS

El campo de la transformación "in vitro", también conocido como oncogénesis o carcinogénesis en cultivo, es un área de investigación que comenzó en 1925 con los estudios de Alexis Carrel quien sostenía que el mejor método para conocer las propiedades que caracterizaban un tejido maligno sería transformar "in vitro" una cepa de células conocida, en células capaces de producir un sarcoma o carcinoma y estudiar los cambios sufridos por ellas.

Este criterio no fue utilizado hasta hace 3 décadas en que se comenzó a observar la producción de tumores por células transformadas por virus, agentes químicos y radiaciones, mientras las células controles no mostraban transformación espontánea.

Sistemas de cultivos usados en estudios de transformación

Existen dos principales sistemas celulares utilizados en el estudio de la transformación neoplásica en cultivo:

a) Cultivos primarios: estas células derivan directamente del tejido animal o humano. Son células diploides, tienen una vida finita, la cual difiere de un tipo celular a otro y su longevidad está relacionada a la especie de la cual se originan o derivan.

Los cultivos embrionarios inicialmente consisten en una mezcla de poblaciones pero los subcultivos tienden a se-

leccionar los células similares a fibroblastos, por lo tanto luego de varios pasajes son considerados cultivos fibroblásticos.

b) Línea celular establecida: las líneas celulares representan poblaciones que se originaron como cultivos primarios, y que continuando con los subcultivos resultó la selección de una población que crece indefinidamente. Su cariotipo puede ser diploide pero se caracteriza mas aún por varios reordenamientos cromosómicos y heteroploidia.

Iniciación de la transformación neoplásica "in vitro" y su expresión fenotípica

La transformación "in vitro" consiste en una secuencia de eventos que sigue los siguientes pasos.

a) iniciación, por ejemplo exposición de los cultivos celulares a un agente viral, químico o radiación.

b) fijación del estado transformado, esto requiere la replicación celular luego de la iniciación.

c) expresión del estado transformado, requiere varias duplicaciones de la célula resultando en un foco o clón el cual, en el caso de los fibroblastos y algunas células epiteliales son morfológicamente distintas de los controles.

Criterios de transformación

Entre los criterios utilizados para determinar la transformación "in vitro" podemos citar:

a) pérdida de la inhibición de contacto y cambios en la superficie celular, este es el cambio fenotípico mas evidente que se observa en fibroblastos transformados. La pérdida de inhibición de contacto, crecimiento irregular y su facilidad para crecer en multicapas, aparece tempranamente luego de iniciada la transformación, esto hace posible identificar claramente una colonia neoplásica o un foco de transformación de la contraparte no neoplásica.

A nivel celular puede observarse, por microscopía de barrido, excrecencias que permanecen como una parte integral de la célula transformada.

b) Disminución de requerimiento de suero: una vez que la transformación se ha expresado, la dependencia de nutrientes disminuye y las células son capaces de proliferar hasta alta densidad con concentraciones de suero tan bajas como 1%, en contraste, las no transformadas requieren una concentración cercana al 10%.

c) Crecimiento en agar: la transformación neoplásica "in vitro" es un conjunto de múltiples eventos y la capacidad de las células para proliferar en suspensión o en medio semisólido indica que han progresado hacia un estado el cual esta asociado, generalmente, con la propiedad de dar tumores en huéspedes apropiados.

d) Tumorigenicidad: la última e inequívoca demostración de malignidad es la inducción de tumores en huéspedes singeneicos o en animales inmunodeprimidos. La mayoría de las células transformadas "in vitro" son de origen fibroblástico y dan sarcomas "in vivo".

e) Otros parámetros: existe una serie de parámetros que están asociados a la transformación "in vitro" tales como, cambios estructurales de las membranas (cambios en las glicoproteínas de membrana), producción de enzimas proteolíticas y alteraciones cromosómicas tanto en cariotipo como en los patrones de bandeo

EMPLEO DE ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE NEOPLASIAS

El trasplante de tumores de una especie a otra comenzó hace más de un siglo. La mayoría de esos intentos estaban orientados a la transferencia de tumores humanos a otras especies para su estudio.

Estos ensayos fueron negativos y solo luego de varios intentos se comprobó que los trasplantes eran exitosos cuando se utilizaban tumores y huéspedes singenéticos. Solamente algunos ejemplos fueron las excepciones, por ejemplo el tumor ascítico de Ehrlich, originalmente un tumor mamario, se lo transformó en tumor ascítico y pudo ser transplantado a ratones de diversas cepas.

El próximo paso para la obtención de heterotransplantes fue la búsqueda de zonas, dentro del propio animal, con una baja respuesta inmune, por ejemplo la cámara anterior del ojo del conejo o cobayo, el cerebro de ratones, y las bolsas fasciales del hamster.

Esto presentó algunas dificultades para el seguimiento de la evolución del tumor y además, con el desarrollo del mismo se estimulaba la respuesta inmune modificando los resultados.

Posteriormente se comenzaron a utilizar animales inmunes. Para esto las células tumorales eran inoculadas en ratones recién nacidos y en fetos, los cuales son naturalmente inmunoincompetentes, pero con el desarrollo del animal aparecía el rechazo del tumor. Asimismo la manipulación de las crías causaba una alta mortandad por canibalismo.

El paso siguiente fue la inmunodepresión de animales adultos por irradiación y la combinación o no de drogas inmunosupresoras.

Con el desarrollo del conocimiento del sistema inmune se determinó la importancia del timo en la activación de los linfocitos T, los cuales son unos de los responsables del rechazo del tumor transplantado.

Se ha demostrado que el uso de la timectomía, suero antilinfocito (ALS) o suero antitimocito (ATS) en varias combinaciones permite el implante de tumores alogénicos y xenogénicos.

Todos estos animales inmunodeprimidos resultaban susceptibles a infecciones, especialmente luego de la irradiación total, sin embargo con el uso de instalaciones apropiadas y de antibióticos se pudo lograr sobrevividas que permitieron el desarrollo de la neoplasia inoculada.

Una nueva solución al problema del rechazo apareció con el empleo de animales genéticamente inmunodeprimidos.

En 1966 Flanagan desarrolló una mutante de ratones con alopecia, demostrándose luego que eran congénitamente atímicos. En el comienzo, una severa limitación, fue su corta vida por ser criados en bioterios convencionales. Al

mantenerlos en ambientes libres de gérmenes, su sobrevivencia fue similar a la de los ratones normales.

Estos ratones presentan un gen mutado (gen nude), localizado en el par XVIII. La expresión del gen nude produce una alopecia parcial y una disgénesis del timo, en consecuencia, ausencia de linfocitos T.

Esta circunstancia permite el trasplante de células neoplásicas xenogénicas. El ratón de esta cepa conserva sus células B y puede producir una respuesta humoral. Las células NK están presentes en niveles algo superiores a los que existen en ratones convencionales y el número y capacidad funcional de los macrófagos es similar al de otros ratones .

La incidencia de tumores espontáneos no es mayor que en los ratones de las cepas de las cuales provienen, debido posiblemente al rol que desempeñan las células NK en la defensa inmunológica (43,47).

La inoculación de tumores xenogénicos y humanos en estos ratones ha sido utilizada para el estudio de su biología, su bioquímica, la característica de crecimiento de células con diferente grado de malignidad y en terapia experimental.

En las experiencias de este trabajo se utilizaron ratones atímicos de la cepa N:NIH/nu/nu y hamster sirios.

En 1930 Aharoni capturó en Siria 8 hamsters de ambos sexos y los llevó a Jerusalem. A partir de este núcleo, en el Dto. de Parasitología de la Universidad hebrea Hadassah, Ben Menachem desarrolló una colonia de hamsters sirios dorados para propósitos experimentales.

Todos los hamsters sirios utilizados en el mundo provienen de este núcleo inicial.

Estos roedores poseen las siguientes características: 1) facilidad de adaptación a las condiciones de laboratorio, 2) facilidad para la reproducción, 3) relativa ausencia de enfermedades y tumores espontáneos y 4) susceptibilidad a ciertos virus, tales como poliomielitis, aftosa, influenza etc.(53).

EMPLEO DE RADIACIONES IONIZANTES

Las radiaciones ionizantes, son un factor oncogénico (40,55,64,79,99), dosificable, altamente reproducible y de gran valor para el estudio de : 1) activación de virus endógenos y exógenos (100,118), 2) como inductor de la transformación neoplásica de células "in vitro" (18,19,100) • posiblemente por activación de oncogenes celulares o 3) como promotor del desarrollo de células neoplásicas por inmunodepresión del huésped debido a la radiosensibilidad de los órganos inmunocompetentes. (45,55,114).

I.2. OBJETIVOS GENERALES

Teniendo en cuenta, que las células de la línea BHK-21(C-13), producen tumores en hamster y son portadoras de una partícula virus-like ARN cuya actividad no se había demostrado (70), se estudiarán las probables modificaciones del comportamiento oncogénico de estas células y de su partícula virus-like por pasaje en animales inmunodeprimidos por radiaciones ionizantes (Rx).

Se investigará además las posibles diferencias con otro clon derivado de ella denominado BKH-21(C-13)S.

Los motivos de haber escogido las radiaciones ionizantes (Rx) como inmunodepresoras, además de las ventajas antes mencionadas, se debió a la experiencia previa de este laboratorio obtenida con un picorna virus (virus de la fiebre Aftosa) donde se estudió la modificación de su comportamiento por pasajes en hamster totalmente irradiados (73,80).

A continuación se enumeran los objetivos principales de este trabajo.

- 1) Comparar, "in vivo" la actividad oncogénica de células de la línea BHK-21(C-13), que crecen en monocapa con un clon derivado de ella que crece en suspensión, denominado BHK-21(C-13)S.

- 2) Comprobar si las células de las líneas BHK-21(C-13) y BHK-21(C-13)S liberan al medio de cultivo, factores con actividad oncogénica, capaces de transformar células de cultivos primarios o de inducir neoplasias "in vivo".

- 3) Estudiar si existen modificaciones en el comportamiento biológico de las células de las líneas BHK- 21(C-

13) y BHK-21(C-13)S por pasaje en animales inmunodeprimidos por radiaciones ionizantes (Rx).

4) De acuerdo a los resultados obtenidos en 2 y 3, aislar el factor oncogénico, estudiar su naturaleza y actividad biológica.

Para el desarrollo de estos objetivos el trabajo fue dividido en dos capítulos.

CAPITULO I

I. INTRODUCCION

I.1. Características de la línea celular BHK-21(C-13)

En 1961 Michael Stoker e Ian MacPherson del Instituto de Virología de la Universidad de Glasgow, obtuvieron la línea BHK-21(C-13), a partir de cultivos primarios de riñones de hamster sirios (*Mesocricetus auratus*) de 1 día de edad (108,109). Estos cultivos estaban inicialmente compuestos por una mezcla de células fibroblásticas y epiteliales, siendo las primeras predominantes. Durante las primeras 8 semanas, estos autores observaron un desarrollo lento del cultivo, hasta que luego de 65 días notaron, en algunos frascos, una aceleración del crecimiento. A los 85 días clonaron esas células y uno de esos clones, recibió el nombre de BHK-21(C-13). (108).

Las células de la línea BHK-21(C-13) son elongadas y crecen con una orientación paralela asemejándose a fibroblastos. El tiempo de duplicación de la población es de aproximadamente 12 horas en la etapa de crecimiento logarítmico, empleándose medio de cultivo Eagle suplementado con 10% de suero bovino, doble concentración de aminoácidos y vitaminas y 10% de triptosa fosfato. (109)

La densidad de saturación final en monocapa es de $1,5 \cdot 10^5$ cel/cm². El cariotipo de las células BHK-21(C-13) es

de células diploides con un número modal de 44 cromosomas (5,109).

Diversos autores relacionaron el número de células BHK-21(C-13) inoculadas por vía subcutánea en hamster con el porcentaje de tumores obtenidos. Gotlieb-Steinatsky y col (50) obtuvieron neoplasias en el 100% de los animales con 10^4 células. Ubertini y col (115) emplearon 10^5 células para tener resultados similares, mientras que con 10^4 células obtenían tumores en el 75% de los animales.

Capstick y Garland (28) realizaron intentos para inducir tumores en otros animales por la inoculación de células BHK-21(C-13). Utilizando 10^7 células, obtuvieron resultados negativos en bovinos, ovinos, porcinos, conejos, cobayos, ratas y ratones, luego de 25 semanas de observación. Resultados similares obtuvieron con células BHK-21(C-13) que permanecieron 230 días en suspensión.

En el año 1974 Freedman y Shin (44) indujeron tumores en ratones atímicos de la cepa N:NIH/nu/nu por inoculación de células BHK-21(C-13) por vía subcutánea.

Capstick y col.(28) realizaron experiencias "in vivo" para comprobar, si el sobrenadante del cultivo de células BHK-21(C-13) tenía capacidad oncogénica, para lo cual, inocularon por vía subcutánea 10 ml del mismo en vacunos, porcinos y ovinos y entre 2 y 5 ml en hamster, ratas, ratones, conejos y cobayos. Luego de 25 semanas de observación ningún animal desarrolló una neoplasia. Ubertini y col. (115), Capstick y col. (28) demostraron que solamente células enteras pueden producir tumores en hamster, ya que, extractos libres de células, obtenidos por congelación y des-

congelación sucesiva de $3 \cdot 10^8$ células filtrados por filtros de 450 nm de poro e inoculados por vía subcutánea en hamster, no indujeron tumor luego de 12 meses de observación.

Dada la susceptibilidad a la infección viral las células de la línea BHK-21(C-13) , son utilizadas para investigar los mecanismos de replicación y transformación viral de diferentes grupos de virus, entre ellos, virus polioma, adeno virus, pox virus, herpes virus, mixovirus, arbovirus encefalomiocarditis, virus rábicos, de fiebre aftosa, BK virus, estomatitis vesicular y virus oncogénicos (14,52,69,83,98,109). En la práctica se la emplea en la elaboración de vacuna antiaftosa y antirrábica (26,29,32,33,41,69).

Es utilizada además en estudios de carcinogénesis química. (20,36,60)

Dado que la producción de células BHK-21(C-13) en monocapa, resultaba inapropiada para la elaboración masiva de vacunas, Capstick y col (30) adaptaron la línea BHK 21-(C-13) a crecer en suspensión. Para ello determinaron las condiciones ideales de cultivo hasta obtener $2 \cdot 10^6$ cel/ml.

Con el fin de estudiar, las posibles alteraciones en la carcinogenicidad de las células BHK-21(C-13) mantenidas en suspensión, estos autores realizaron experiencias con 2 sublíneas de BHK-21(C-13), la 2 P y la 3 P. Estas sublíneas que habitualmente crecen en monocapa, fueron adaptadas a crecer en suspensión y luego inoculadas en hamsters, no observándose resultados concluyentes , en lo que se refiere a una variación en la capacidad oncogénica debido al cultivo en suspensión (27).

Las células que se han adaptado a crecer en suspensión y son vueltas al cultivo en monocapa, presentan alteraciones morfológicas con respecto a las que lo hacen habitualmente en monocapa. Entre el 20 y 30 % de las células se adhieren y aparecen aplanadas, las restantes permanecen adheridas pero redondeadas y algunas en suspensión. Los pasajes sucesivos en monocapa no modifican estas características. (27)

Hasta el año 1964 no se había realizado ningún estudio por microscopía electrónica (M.E.) de estas células. Bernhard y Tournier, fueron los primeros en describir partículas similares a virus en células de la línea BHK-21(C-13) que definieron como partículas virus-like (12). También fueron descritas como partículas R (104) o H (31). Estudios posteriores han confirmado la presencia de estas partículas en otros clones de esta línea celular tales como BHK-21(C-13) F, BHK 21C-13 TC/A, BHK 21/13 S (59,104) variando su concentración de acuerdo al clon estudiado (31,104). Se han observado además en fibrosarcomas producidos en hamster por inoculación de células BHK-21(C-13) (31,63,78), en neoplasias espontáneas de hamster (107) y en tumores obtenidos en hamster por inoculación de células BHK-21(C-13) transformadas "in vitro" por virus SV 40 (12).

Partículas similares fueron observadas en carcinomas inducidos por topicaciones con 7-12 dimetilbenzantraceno sobre la mucosa lingual de hamster (92). Estas partículas también fueron observadas en cultivos de células de riñón de ternera entre los pasajes 190 y 210 (89).

Cortes de células observados por M.E. muestran estas partículas en las cisternas del retículo endoplásmico rugoso y ocasionalmente asociadas a la envoltura nuclear. (12,63,92,104,107)

Tienen un diámetro de 85 a 120 nm con un nucleoide electrónicamente denso de 40 a 50 nm de diámetro y una estructura radial semejante a una rueda de carro. En algunos casos aparecen formas elongadas midiendo hasta 1 de largo y un diámetro promedio de 85 a 105 nm (6,7,104). Una preparación de partículas obtenidas por centrifugación a 100000 x g del sobrenadante del cultivo de células BHK-21(C-13)S y observada al microscopio electrónico mostró, según los autores, la apariencia de coronavirus (95).

El aislamiento y posterior caracterización de esta partícula virus-like obtenida del sobrenadante de cultivo de células de la línea BHK-21(C-13)F (3) muestra que su ácido nucleico es ARN, con un coeficiente de sedimentación entre 60 y 70 S y un peso molecular aproximado de 10^7 dalton.

Sobis y Vandeputte (105) hallaron que células de embriones y fetos de hamster contienen partículas idénticas a las observadas por otros autores en tumores de hamster o en cultivos de células BHK-21(C-13). Observaron que hasta el noveno día de desarrollo intrauterino, las partículas virus-like se encuentran solas o en grupos y algunas en estado de brotación. A partir del décimo día la brotación disminuye progresivamente hasta desaparecer completamente al día 14. Coincidiendo con otros autores no han podido observar estas partículas en tejidos normales de hamsters adultos. (12,31,104).

Este comportamiento es similar al de las partículas A intracisternales (PAI) descritas para tumores de ratón y líneas celulares derivadas de ellos (67). De igual modo que las PAI, los virus-like aparecen en animales adultos, asociadas a neoplasias inducidas por agentes químicos (92) o producidas por inoculación de células transformadas por virus "in vitro" (12).

En 1968 Kuff y col lograron aislar las PAI de una línea de mieloma de ratón BALB/c (67) las cuales fueron caracterizadas en trabajos posteriores (66,121).

Con el cDNA preparado a partir del ARN aislado de las PAI del ratón, se estudió la existencia de secuencias homólogas en el ADN de otras especies. Luders y col (75) encontraron bajos niveles de homología en los ADNs de ratas y cobayos, pero fueron sorprendentemente altos en hamster sirio, lo que sugirió que múltiples copias de la contraparte de la PAI de ratón se encontrarían en esta especie. Estos autores postularon que estas zonas de ADN de hamster podrían codificar para los virus-like observados en células embrionarias y en líneas tumorales de hamster, de manera análoga a la expresión de las PAI.

Secuencias homólogas a PAI fueron clonadas partiendo de ADN de hígado de hamster y se observó que hibridaban con el ARN total de células BHK-21(C-13) (que expresan la partícula) pero no se obtuvo una significativa hibridación con el ARN aislado de células de hígado de hamster (que no la expresan) lo que indica que la transcripción de las partículas esta relacionada con su expresión. (75,111)

Joel Lesser y col (70) han logrado un aumento de la expresión de los virus-like por tratamiento de las células BHK-21(C-13) con 5-azacitidina, lo que confirmaría la integración de su genoma al ADN celular.

Estos resultados obtenidos recientemente, sugieren que podría existir un comportamiento similar entre las PAI y las partículas virus-like de hamster.

Hasta el presente no se había podido demostrar si esta partícula con aspecto viral, presente en células de hamster, posee la capacidad de inducir la transformación maligna de células normales "in vivo" o "in vitro". (31,70,115).

OBJETIVOS DEL CAPITULO I

Para un mejor ordenamiento el capítulo I se dividió en las partes A, B, C y D.

OBJETIVOS DE LAS PARTES A y B

a) Estudiar la característica de crecimiento de las líneas celulares BHK-21(C-13) y BHK-21(C-13)S.

b) Analizar por microscopía electrónica la presencia de partículas intracisternales en las células de las líneas BHK-21(C-13) y BHK-21(C-13)S.

c) Comparar la evolución de los tumores producidos por inoculación subcutánea de células de las líneas BHK-21(C-13) y BHK-21(C-13)S en hamster, y ratones de las cepas N:NIH/nu/nu y BALB/c.

d) Comprobar si existen sustancias producidas por las células de ambas líneas, que pasan al sobrenadante de cultivo y son capaces de inducir a) transformación neoplásica de células de cultivos primarios "in vitro" y b) una neoplasia "in vivo".

e) Comprobar la actividad biológica "in vivo" e "in vitro", de suspensiones acelulares obtenidas de : 1) células de las líneas BHK-21(C-13) y BHK-21(C-13)S, 2) neoplasias obtenidas en hamster por inoculación subcutánea de células de las líneas BHK-21(C-13) y BHK-21(C-13)S.

f) De acuerdo a los resultados obtenidos en a, comprobar si existe relación entre el grado de oncogenicidad y

la cantidad de virus-like presentes en ambas líneas celulares.

Se ha demostrado en animales de experimentación, que la inmunodepresión del huésped facilita la expresión de virus ADN y ARN ya sean oncogénicos o no (48,58), administrados por inyección, adquiridos por el animal del medio ambiente o endógenos. Otra característica de los animales inmunodeprimidos es su falta de rechazo a la multiplicación de células neoplásicas provenientes de animales heterólogos o de humanos. Esto permitió el estudio bioquímico de tumores de muy variados orígenes.

La inmunodepresión del huésped puede ser lograda por selección genética (43), timectomía, administración de drogas inmunosupresoras, radiaciones ionizantes (Rx, gama) o por radiaciones ultravioletas (24,40,55,64).

Estos antecedentes sugirieron que el pasaje de células de las líneas BHK-21(C-13) y BHK-21(C-13)S por hamster inmunodeprimidos por radiaciones, proporcionaría un modelo para investigar la posible intensificación de las propiedades oncogénicas de estas y relacionarla con la probable activación de las partículas intracisternales virus-like.

La inoculación intraperitoneal de células tumorales ha demostrado ser la vía apropiada para la obtención de tumores ascíticos, los que ofrecen la ventaja de proporcionar una elevada concentración de células y abundante cantidad de líquido intercelular para estudios bioquímicos. (49,62,81)

OBJETIVOS DE LAS PARTES C y D

De acuerdo a la hipótesis y los antecedentes mencionados en el párrafo precedente, los objetivos de las partes C y D fueron:

a) Obtener tumores ascíticos a través de la inoculación por vía intraperitoneal células de las líneas BHK-21(C-13) y BHK-21(C-13)S en hamster totalmente irradiados.

b) Obtención de una línea de células del posible tumor ascítico originado por inoculación de las líneas antes mencionadas

c) Estudiar las características de crecimiento de las células de las posibles líneas obtenidas en b.

d) Analizar por microscopía electrónica la presencia de partículas intracisternales en las células de las posibles líneas obtenidas en b.

e) Comparar, la evolución e histología de las neoplasias en hamster, ratones de las cepas N:NIH/nu/nu y BALB/c, producidas por inoculación de células de las posibles líneas obtenidas en b

f) Comprobar si existen sustancias producidas por las células de ambas líneas que pasan al sobrenadante de cultivo y son capaces de inducir la transformación neoplásica de células de cultivos primarios "in vitro" y una neoplasia "in vivo".

g) Comprobar la actividad biológica "in vivo" e "in vitro" de suspensiones acelulares de: 1) células de ambas líneas de cultivo, 2) tumores producidos en hamster por inoculación de estas dos líneas celulares.

I.3. MATERIALES Y METODOS DE LAS PARTES A B, C Y D

CULTIVO DE TEJIDOS

I.3.1. Cultivo de las líneas celulares BHK-21(C-13) y BHK-21(C-13)S.

Se utilizaron células de las líneas BHK-21(C-13) cultivadas en monocapa y BHK-21(C-13)S cultivadas en suspensión, ambas mantenidas en medio de cultivo Glasgow-Mem (GMEM-BHK 21 Cat.410-2200 Gibco) suplementado con 10% SFB (Gibco), bicarbonato de sodio 6 mM (Sigma), glutamina 2 mM (Sigma), HEPES-NAOH 20 mM (Gibco), 200 U/ml de penicilina y 100 g/ml de estreptomycin (Laboratorios Richet). El PH del medio fue de 7,2 a 7,4.

Los sucesivos repiques de los cultivos en suspensión se realizaron cuando la concentración celular llegó a 10^6 cel/ml, transfiriendo al nuevo frasco $2 \cdot 10^5$ cel/ml. En todos los casos el conteo de células se realizó empleando una cámara cuenta glóbulos Neubauer.

Los cultivos en monocapa se repicaron al llegar a confluencia, desprendiendo las células con tripsina 0,25% p/v, (Tripsina 1:250 Difco) en solución salina de Hanks sin calcio ni magnesio y sembrando $2 \cdot 10^5$ células en cada frasco de 25 cm^2 de superficie (Corning tissue culture flasks N^o 25100). Las líneas se mantuvieron permanentemente a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. En algunos casos se utilizaron frascos de 75 cm^2 de área, (Corning tissue culture flasks N^o 75100)

El cultivo en suspensión, se mantuvo con un agitador magnético a una velocidad de 100 rev/min, en frascos de 250 ml.

I.3.2. Obtención de la línea celular 169. Mantenimiento en monocapa y en suspensión

Las células del mesotelioma (I.3.13. de este trabajo), originado por la inoculación intraperitoneal de células BHK-21(C-13), se cultivaron "in vitro". A los 5 días de haber iniciado el pasaje N⁰ 20, se extrajo por punción intraperitoneal el tumor ascítico, se le agregó 1 ml de heparina cada 10 ml del mismo (Heparina Biochem 10 mg/100 ml en SSHA) y se centrifugó 10 min a 800 x g a T.A.. El pellet se resuspendió en medio de cultivo Glasgow-Mem y se sembró $2 \cdot 10^5$ células por frasco de 25 cm² de area.

La línea se mantuvo en medio de cultivo Glasgow-Mem en las mismas condiciones que las BHK-21(C-13).

El cultivo en suspensión se mantuvo en similares condiciones que las BHK-21(C-13)S.

I.3.3. Obtención de la línea celular 215. Mantenimiento en monocapa

Luego de 10 pasajes sucesivos por hamster totalmente irradiados, las células en suspensión en el líquido ascítico, originado por la inoculación intraperitoneal de $5 \cdot 10^6$ células BHK-21(C-13)S, se cultivaron "in vitro". Entre los 5 y 6 días de inoculadas las células del transplante N⁰ 9, se

extrajeran por punción intraperitoneal y se agregó heparina en igual proporción que en I.3.3., se centrifugaron 10 min a $800 \times g$ a T.A.. El pellet se resuspendió en medio de cultivo Glasgow-Mem y se sembró 2.10^5 células por frasco de 25 cm^2 de area.

La línea se mantuvo en medio de cultivo Glasgow-Mem en las mismas condiciones que las BHK-21(C-13).

I.3.4. Obtención de la línea celular 15. Mantenimiento en monocapa

Luego de 5 pasajes sucesivos por ratones de la cepa N:NIH/nu/nu, las células en suspensión en el líquido ascítico, originado por la inoculación intraperitoneal de 5.10^6 células BHK-21(C-13)S, se cultivaron "in vitro". Entre los 5 y 6 días de inoculadas las células de transplante N⁰ 4, se extrajo por punción intraperitoneal el líquido ascítico en las mismas condiciones que en I.3.3. y se centrifugó 10 min a $800 \times g$ a T.A.. El pellet se resuspendió en medio de cultivo Glasgow-Mem y se sembró 2.10^5 células por frasco de 25 cm^2 de area.

La línea se mantuvo en medio de cultivo Glasgow-Mem en las mismas condiciones que las BHK-21(C-13).

I.3.5. Estudio citogenético de:

a) células de la línea 15

b) células del tumor ascítico obtenido en ratones de la cepa BALB/c por inoculación de células de las líneas 215 y 15

Se realizó el estudio citogenético de la línea 15 y de células del tumor ascítico producido en ratones BALB/c, por inoculación de células 215 y 15. Con este propósito las células del tumor ascítico fueron mantenidas "in vitro" hasta la finalización de la experiencia.

A un cultivo creciendo en fase logarítmica se le agregó 0,1 ml, cada 5 ml de medio de cultivo, de Colchicina (Biochem) (solución stock, 400 g/ml en SSHA a PH 7,3), se dejó incubar 90 min a 37 °C, luego se descartó el sobrenadante, y se desprendieron las células con tripsina 0,25 % p/v en SSHA sin calcio ni magnesio a PH 7,6. Se centrifugó a 800 x g durante 5 min (todas las centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente) y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 5 ml de CLK 0,075 M y se incubó 30 min a 37 °C con agitación periódica. Se centrifugó nuevamente a 800 x g descartándose el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 ml de solución de Carnoy (1:3 ácido acético, metanol) recién preparado. Se dejó 45 min a 4 °C, se centrifugó 5 min a 800 x g y el pellet se resuspendió en 1 ml de solución de Carnoy. Esta última operación se repitió 2 veces más, el pellet del último lavado se resuspendió en 1 ml de Carnoy y se colocó varias gotas sobre un portaobjetos. Se dejó secar y se coloreó con solución de Giemsa 10 % (Giemsa Merck) durante 10 min. Se lavó con agua corriente, se dejó secar y se observó al microscopio. (34)

I.3.6. Microscopía electrónica de células de las líneas BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S, 169, 215 y 15.

Las $3 \cdot 10^6$ células se desprendieron con tripsina 0,25 %, se centrifugaron 10 min a 800 x g (todas las centrifugaciones se realizaron a temperatura ambiente) y se fijaron con glutaraldehído 3,5% en buffer cacodilato durante 60 min a 4⁰ C con agitación periódica. Posteriormente se centrifugaron 10 min a 800 x g, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en buffer fosfato PH 7,4 permaneciendo 30 min a 4⁰ C. Esta operación se realizó una vez mas, finalmente se centrifugó 10 min a 800 x g. La post fijación se realizó resuspendiendo el pellet obtenido con tetróxido de osmio 2% en buffer fosfato PH 7,4 y mantenido durante 60 min a 4⁰ C. Luego se centrifugó 10 min a 800 x g, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en buffer fosfato PH 7,4 permaneciendo 30 min a 4⁰ C. Esta operación se repitió una vez mas. El pellet final se incluyó en agar 2 % y una vez solidificado se cortó en pequeños trozos de aproximadamente 1 mm³ para iniciar la deshidratación.

La deshidratación se realizó con concentraciones crecientes de etanol de (30 , 40, 50, 60, 70, 80, 96 y 100 %) permaneciendo 30 min en cada concentración

Posteriormente, las piezas se se sumergieron durante 2 periodos de 30 min cada uno en óxido de propileno (Óxido de propileno Merck), luego 60 min en óxido de propileno-Polybed (2:1), otros 60 min en óxido de propileno-Polybed (1:1) y finalmente en Polibed. Se polimerizó en cápsulas Been a 75⁰ C durante 72 horas, al cabo de las cuales se cortaron cortes ultrafinos en un ultramicrotomo Reichert, utilizando navajas de diamante.

Los cortes se montaron en grillas de cobre y se contrastó con acetato de uranilo y nitrato de plomo .

Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico Philips 300.(112)

I.3.7. Cultivo primario de células de exudado peritoneal de hamster

Para la obtención de estos cultivos se inoculó por vía intraperitoneal a cada animal, 1 ml de vaselina líquida 72 horas antes de iniciar el cultivo. Transcurrido este tiempo se inoculó por la misma vía 15 ml de SSHA PH 7,3 y se extrajo inmediatamente el líquido conteniendo las células peritoneales. Se centrifugó 10 min a 800 x g a T.A., se re-suspendió el pellet en medio de cultivo Glasgow-Mem y se sembró 10^6 células por frasco de 25 cm². Para el mantenimiento de estos cultivos se utilizó el medio Glasgow-Mem similar al empleado para las células BHK-21(C-13). (94,120).

I.3.8. Cultivo primario de células de embrión de hamster

Se utilizaron embriones de 9 a 11 días de gestación, extraídos por incisión ventral de la madre en condiciones asépticas, los que fueron triturados y dejados en tripsina 0,25 % p/v (1 ml de tripsina por cada embrión) toda la noche a 4 °C. Posteriormente se agitó 15 min a 37 °C y se dejó decantar. Se extrajo el sobrenadante, el cual se neutralizó con medio de cultivo Glasgow-Mem (5 ml cada 10 ml de tripsinado). Se repitió el proceso de tripsinado con el material

restante agregando nuevamente tripsina. Se dejó con agitación 10 min mas a 37 °C y se extrajo el sobrenadante. (94,120).

Ambos sobrenadantes se mezclaron y centrifugaron 15 min a 800 x g.a T.A.. El pellet se resuspendió en medio de cultivo Glasgow-Mem y se sembró $5 \cdot 10^5$ células por frasco de 25 cm².

I.3.9. Cultivo primario de células de riñón de hamster

Se emplearon animales de 0 a 48 horas de edad. Estos fueron sacrificados por decapitación y sus riñones extraídos asépticamente por incisión dorsal. Los órganos fueron lavados con SSHA PH 7,3, colocados en una cápsula de Petri con 2 ml de tripsina 0,25 % p/v y seccionados en trozos del orden de 1 mm³. El tejido permaneció a 4 °C durante toda la noche con 1 ml de tripsina por cada riñón. Posteriormente se agitó 15 min a 37 °C, se decantó y extrajo el sobrenadante, neutralizándolo con 5 ml de medio de cultivo Glasgow-Mem por cada 10 ml de tripsinado. Se repitió el proceso y ambos sobrenadantes se mezclaron y centrifugaron 15 min a 800 x g a T.A.. El pellet se resuspendió en medio de cultivo Glasgow-Mem y se sembró 10^6 células por frasco de 25 cm² de area. (94,120).

ANIMALES EXPERIMENTALES

I.3.10. Animales empleados

a) Hamster sirio (*Mesocricetus Auratus*) de 12 a 20 semanas de edad de ambos sexos, de 100 a 120 gramos. FOTO 1



FOTO 1: Hamsters de 12 a 20 semanas de edad, utilizados en las experiencias del presente trabajo.

b) Crias de hamster de 0 a 48 horas de edad para la extracción de los riñones destinados a cultivos primarios.

c) ratones de la cepa BALB/c de ambos sexos de 8 a 12 semanas. Todos los animales fueron obtenidos del bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica y mantenidos en las condiciones habituales, de un bioterio convencional.

d) ratones de la cepa N:NIH/nu/nu de ambos sexos de 8 a 12 semanas de edad, de 25 a 35 gramos.

Su mantenimiento se realizó en un ambiente limpio a 28⁰ C en cajas con cama (viruta de madera) y agua esterilizada por autoclavado durante 30 min a 1 atm., y el alimento esterilizado por radiación gama (3,2 Mrad) con una fuente de ⁶⁰Co. (Dto. de Fuentes Intensas de Radiación, de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA). FOTO 2



FOTO 2: Ratón de la cepa N:NIH/nu/nu de 8 a 12 semanas de edad utilizado en las experiencias del presente trabajo

I.3.11. Irradiación total de hamster

Los animales fueron irradiados con rayos X de un equipo de radioterapia convencional 250/25:N.V. (Philips Groeilampen fabrieken, Eindhoven, Holland), bajo las siguientes condiciones: 250 kv, 8 ma, capa de hemirreducción equivalente a 1,3 mm de cobre, distancia foco-centro del animal 34 cm, dosis de irradiación total 7 Gy (1 Gy= 100 rad). (16). Para la irradiación, los animales fueron colocados en una caja de acrílico, la que a su vez se introdujo en un fantoma de madera. Previamente la dosis fue medida colocando dentro del fantoma de madera una caja de acrílico con un fantoma de cera similar en tamaño y volumen a la cantidad de animales irradiados cada vez.

Para la dosimetría se utilizó un dosímetro Simplex (Simplex Universal Dosimeter Physikalisch Technische) con la cámara de ionización colocada dentro del fantoma de cera a un nivel que correspondió, a la parte media del conjunto de animales que se irradian dentro de la caja de acrílico.(80)

I.3.12. Obtención de tumor ascítico en hamster irradiados por inoculación intraperitoneal de células de la línea BHK-21(C-13).

Esta neoplasia se obtuvo por la inoculación intraperitoneal de $5 \cdot 10^6$ células de la línea BHK-21(C-13) en hamster que habían sido totalmente irradiados con 7 Gy, 24 horas antes (DL 50/30 7 Gy). (55,114). El primer trasplante se realizó transfiriendo $5 \cdot 10^6$ células a cada animal entre las 4 y 5 semanas después de la inoculación. Luego de 3 a 4 pasajes por animales irradiados los trasplantes sucesivos fueron realizados en animales no irradiados cada 7 u 8 días. Para asegurar su sobrevivencia en estado de inmunodepresión los animales fueron mantenidos con cama y agua estéril y tratados con 0,5 mg de gentamicina /100 g de peso, por vía SC diariamente hasta los 7 a 10 días. Este tratamiento se siguió todas las veces que se irradiaron los animales (82). A partir del quinto pasaje el tumor se mantiene en animales normales inoculando 10^6 células cada animal.

Los sucesivos trasplantes se realizaron punzando la cavidad peritoneal del animal entre los 5 y 7 días de haber sido inoculado, utilizando una jeringa heparinizada y 5 ml de SSHA PH 7,3.

I.3.13. Obtención de tumor ascítico en hamster irradiados, por inoculación intraperitoneal de células de la línea BHK-21(C-13)S.

Esta neoplasia se obtuvo por la inoculación intraperitoneal de $5 \cdot 10^6$ células de la línea BHK-21(C-13)S en hamster que habían sido totalmente irradiados con 7 Gy 24 horas antes. El primer trasplante se realizó inoculando $5 \cdot 10^6$ células entre la primera y segunda semana después de la inoculación. Los posteriores trasplantes se realizaron permanentemente en animales irradiados, los que fueron mantenidos con cama y agua estéril y tratados con 0,5 mg de gentamicina/100 g de peso hasta los 7 días. A partir del tercer trasplante se inoculó 10^6 células por animal. Los trasplantes se realizaron a los 7 días por extracción de las células de la cavidad peritoneal por punción, utilizando una jeringa heparinizada y 5 ml de SSHA PH 7,3.

I.3.14. Obtención de tumor ascítico en ratones de la cepa N:NIH/nu/nu, por inoculación intraperitoneal de células de la línea BHK-21(C-13)S.

El tumor ascítico se obtuvo por la inoculación intraperitoneal de $5 \cdot 10^6$ células de la línea BHK-21(C-13)S. El primer trasplante se realizó entre los 8 y 10 días. Los pasajes sucesivos se obtuvieron inoculando 10^6 células cada animal cada 7 días. Para la extracción se siguió la metodología empleada en los casos anteriores.

I.3.15. Obtención de tumor ascítico en ratones de la cepa BALB/c por inoculación intraperitoneal de células de las líneas 215 y 15.

Se inocularon por vía intraperitoneal $20 \cdot 10^6$ células de la línea 215 en cada uno de los ratones de la cepa BALB/c. Los trasplantes sucesivos se realizaron cada 4 a 6 días inoculando igual cantidad de células. Para la obtención del tumor ascítico por inoculación de células de la línea 15 se procedió de igual manera.

I.3.16. Inoculación subcutánea de células de las líneas BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S y 169 en hamster y ratones de las cepas N:NIH/nu/nu y BALB/c

Se inocularon $2 \cdot 10^6$ células resuspendidas en 0,5 a 1 ml en SSHA PH 7,3 en el dorso de cada animal. Cuando se utilizaron ratones BALB/c se inocularon hasta $2 \cdot 10^7$ células.

I.3.17. Inoculación intraperitoneal de células de las líneas BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S, 169, en ratones de la cepa BALB/c.

Se inocularon por vía intraperitoneal hasta $2 \cdot 10^7$ células resuspendidas en 1 ml de SSHA. En los casos que se desarrollaron neoplasias las células fueron extraídas por punción de la cavidad abdominal con una jeringa heparinizada

y 5 ml de SSHA. Los sucesivos trasplantes se realizaron inoculando $2 \cdot 10^7$ cel/animal cada 5 a 7 días.

Las células de las líneas 215 y 15 también fueron inoculadas por vía subcutánea.

I.3.18. Inoculación subcutánea en hamster, de células de cultivos primarios transformadas "in vitro".

Las células de los cultivos primarios transformadas "in vitro", se desprendieron con tripsina 0,25% p/v, se neutralizó con medio de cultivo, se centrifugó 10 min a 800 x g a T.A. y se resuspendió en SSHA hasta una concentración de $2 \cdot 10^6$ cel/ml. Se inoculó entre 2 y $3 \cdot 10^6$ células por animal.

Previamente a la inoculación, se afeitó la zona dorsal del animal para establecer con mayor exactitud la aparición de un posible tumor. Este procedimiento se siguió en todos los casos en que se inocularon células por vía subcutánea.

OBTENCION E INOCULACION DE MATERIAL ACELULAR

I.3.19. Inoculación intraperitoneal del sobrenadante de cultivo, de las líneas celulares BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S y 169 en hamster irradiados.

Los animales utilizados fueron irradiados con 7 Gy 24 horas antes de ser inoculados. Cada animal recibió por vía intraperitoneal 15 ml de sobrenadante de una monocapa confluyente de células BHK-21(C-13) y 169 o de un cultivo en

suspensión de células BHK-21(C-13)S con una concentración de 1 a $1,2 \cdot 10^6$ cel/ml. Este sobrenadante se centrifugó 15 min a $7500 \times g$ y luego se filtró por filtros de 450 nm de poro, (Millipore tipo HA) . Los animales fueron mantenidos durante 10 días con cama, agua estéril y 0,5 mg de gentamicina/100 g de peso.

I.3.20. Inoculación intraperitoneal de pellet de sobrenadante de cultivo, de las líneas celulares BHK-21 (C-13) y BHK-21(C-13)S en hamster irradiados

Para comprobar la actividad oncogénica del pellet "in vivo", 500 ml de sobrenadante de cultivo de cada línea celular en condiciones de crecimiento similares a I.3.20.1, se centrifugaron 30 min a $12000 \times g$ a $4^{\circ}C$, se descartó el pellet compuesto de células y restos celulares y el sobrenadante se filtró por filtros de 450 nm de poro.

El filtrado se ultracentrifugó 90 min a $100000 \times g$ a $4^{\circ}C$ en rotor Beckman SW 25. El pellet se resuspendió en 4 ml de SSHA PH 7,3 inoculándose 2 ml a cada animal.

I.3.21. Obtención de suspensión acelular de células de las líneas BHK 21(C-13) y 169

Se utilizó 10^8 células de ambas líneas celulares mantenidas en cultivo. Estas se resuspendieron en 2 ml de SSHA PH 7,3 y homogeneizaron con 0,5 g de arena estéril.

La arena es previamente filtrada por una fina malla metálica, tratada con ácido clorhídrico 20% v/v durante 60

min., posteriormente se lava con agua destilada, se deja en hidróxido de sodio 20% v/v, 60 min y finalmente se lava con agua destilada hasta obtener un ph entre 6 y 7.

La suspensión acelular así obtenida se llevó a 50 ml con SSHA PH 7,3 y se centrifugó 10 min a 6800 x g y 15 min a 12000 x g. a 4 °C. El sobrenadante se filtró por filtros de 450 nm de poro y centrifugó 90 min a 100000 x g. a 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió en 4 ml de SSHA PH 7,3 y se utilizó 2 ml para infectar cada frasco de cultivo primario. Para esto se extrajo el sobrenadante, se agregó 2 ml del inóculo, se incubó 120 min a 37 °C, posteriormente se lavó el cultivo con SSHA PH 7,3 y se agregó 4 ml de Glasgow-Mem.

I.3.22. Obtención de suspensión acelular del fibrosarcoma producido en hamster, por inoculación de células de las líneas BHK-21(C-13) y 169.
Ensayo de su actividad biológica "in vivo" e "in vitro"

Para la obtención de la suspensión acelular se partió de 10 g de tejido neoplásico producido por la inoculación subcutánea de $2 \cdot 10^6$ células. El tumor se extrajo asépticamente y se homogeneizó en potter de vidrio con arena estéril y SSHA PH 7,3. La suspensión acelular se llevó a 100 ml con SSHA PH 7,3, se centrifugó 10 min a 6800 x g a 4 °C, se extrajo el sobrenadante y se centrifugó 15 min a 12000 x g a 4 °C. El sobrenadante se filtró por filtros de 450 nm de poro, y finalmente se centrifugó 90 min a 100000 x g a 4 °C

El pellet obtenido se utilizó para ensayar su actividad "in vivo", e "in vitro" para lo cual se resuspendió en 4 ml de SSHA y se inoculó 2 ml cada animal por vía subcutánea o intraperitoneal.

Cuando se ensayó en cultivo el pellet se resuspendió en 6 ml de medio de cultivo Glasgow-Mem, utilizando 1 ml para la infección de cada frasco

El proceso de filtrado se verificó mediante el cultivo de una alícuota del pellet resuspendido en Glasgow-Mem o mediante el filtrado de una suspensión de E. Coli y posterior cultivo del mismo.

CAMARAS DE DIFUSION

I.3.23. Construcción, esterilizado y llenado de las cámaras de difusión

Se utilizó un anillo de acrílico de 13 mm de diámetro externo, 10 mm de diámetro interno y 3 mm de altura, en el cual se efectuó un orificio de 0,5 mm de diámetro, por donde se inyectó la suspensión celular, y otros dos anillos de 1 mm de altura e iguales diámetros. Todos ellos fueron lavados con una solución diluida de detergente y enjuagados con abundante agua destilada. Para el armado de la cámara, un filtro tipo Millipore se pegó al anillo mayor con una solución de acrílico 1,5 % p/v en cloroformo (Merck) en ambas caras. Por el mismo procedimiento se pegaron los anillos menores a ambos lados de la cámara sobre los papeles de filtro. La esterilización se efectuó por autoclavado durante 15

min a 1 atm. En algunas oportunidades se emplearon cámaras con diámetro externo de 25 mm, interno de 19 mm y espesor de 8 mm. (25,86,87)

La suspensión de células BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S, 169, 215 y 15 ($20 \cdot 10^6$ cel en 0,20 ml) es introducida en la cámara por el orificio lateral por medio de una jeringa con aguja 15/5. El orificio es sellado con una espátula metálica calentada, presionando sobre el, hasta lograr la fusión del acrílico. FOTO 3

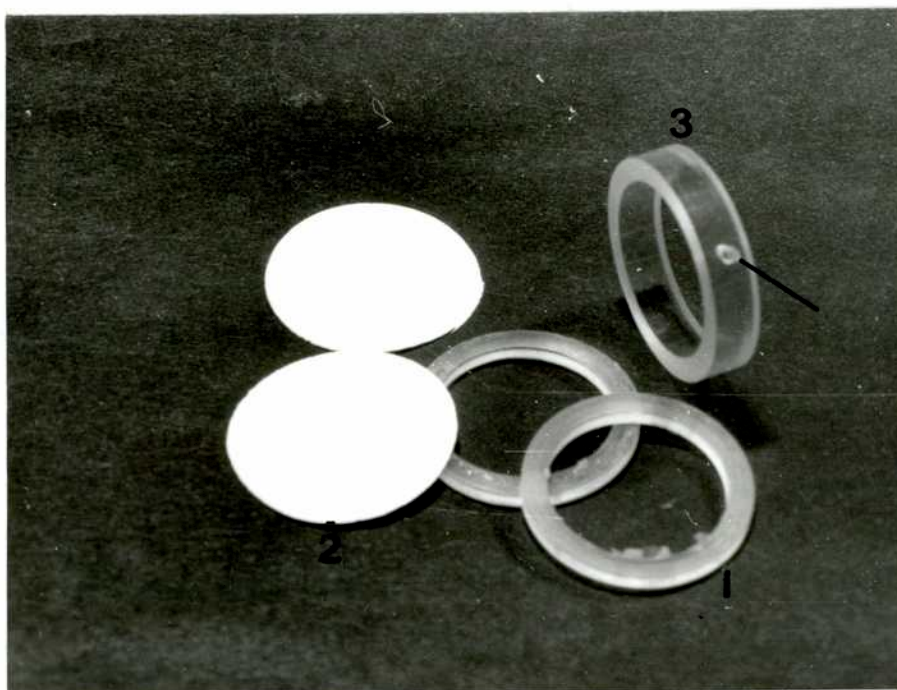


FOTO 3: Componentes de las cámaras de difusión, 1) anillo menor, 2) Membrana de nitrocelulosa (tipo millipore) 3) anillo mayor. La flecha señala el orificio para el llenado de la misma.

I.3.24. Implantación intraperitoneal de cámaras de difusión en hamster

Los animales se anestesiaron con solución de Nembutal en SSHA PH 7,3, 6mg/ml, inoculándose 6 mg/100 g de peso por vía subcutánea. Posteriormente se afeitó la región abdominal y se efectuó una laparotomía mediana. La cámara se introdujo mediante una pinza implantadora en uno de los flancos de la cavidad abdominal. La pared abdominal se suturó en dos planos con hilo de algodón, peritoneo y músculo y luego aponeurosis y piel. Se utilizaron cámaras con filtros de 450, 220, y 50 nm de poro. Las cámaras permanecieron en el animal hasta finalizar la experiencia. FOTO 4

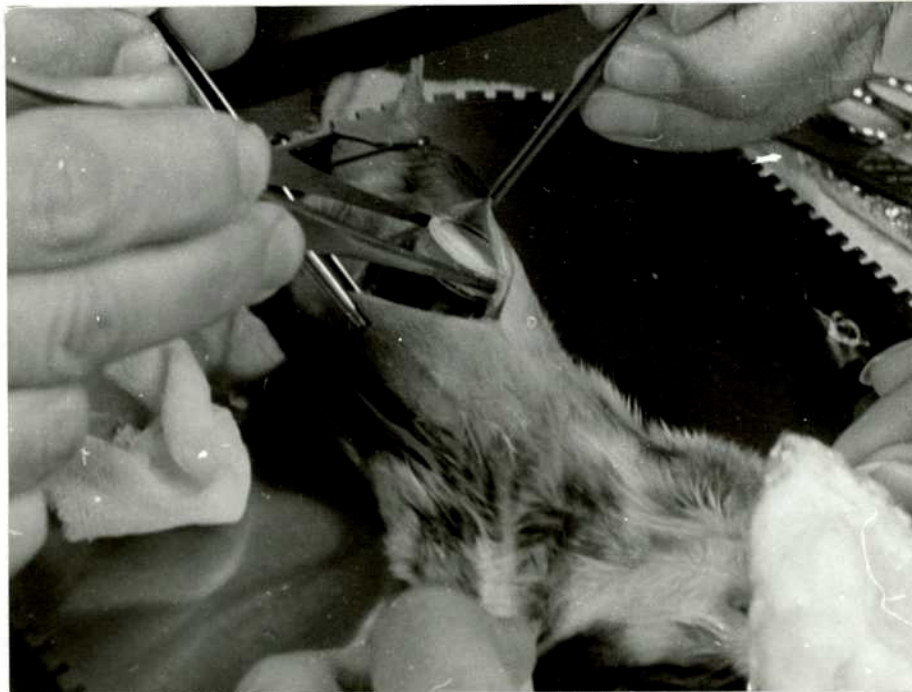


FOTO 4: Implantación de la cámara de difusión en la cavidad peritoneal del hamster

EXPERIENCIAS IN VITRO

I.3.25. Empleo de cámaras de difusión conteniendo células de las líneas BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S, 169, 215 y 15 en cultivos primarios de hamster.

Las cámaras se llenaron con $20 \cdot 10^6$ cel resuspendidas en 0,20 ml de medio de cultivo Glasgow-Mem y se selló el orificio lateral. Posteriormente se depositaron sobre el cultivo. A las 48 horas se le cambió el medio al cultivo y 24 horas después se retiraron las cámaras del cultivo. FOTO 5



FOTO 5: Cámara de difusión colocada sobre cultivos primarios de hamster, en cápsulas de Petri. Las cámaras poseen 3 soportes de 1 mm de altura en la parte inferior.

I.3.26. Infección de células de cultivos primarios de hamster con sobrenadante de cultivo de líneas celulares BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S, 169, 215 y 15

Se utilizó el sobrenadante de una monocapa confluyente de células de 48 horas de incubación, en el caso de células BHK-21(C-13), 169, 215 y 15 y el de células BHK-21(C-13)S, cuando la concentración celular llegó a 10^6 cel/ml. Los sobrenadantes se centrifugaron 15 min a $12000 \times g$ a $4^\circ C$ para la eliminación de células y restos celulares, posteriormente se filtraron por filtros con poros de $0.220 \mu m$ (MF-Millipore tipo GS). Se extrajo el sobrenadante de los cultivos primarios a infectar, se lavó con SSHA y se agregó 2,5 ml de los sobrenadantes de las líneas mencionadas por cada caja de 25 cm^2 de superficie. Se dejó incubar 120 min a $37^\circ C$ y luego se agregó 1,5 ml de medio Glasgow-Mem sin extraer el inóculo. El primer cambio de medio se realizó a las 24 horas.

I.3.27. Infección de células de cultivos primarios de hamster, con pellet del sobrenadante de cultivo de las líneas celulares BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S, y 215.

Se utilizó 500 ml de sobrenadante de

a) monocapas confluentes de células de las líneas BHK-21(C-13) y 215 de 48 horas de incubación.

b) cultivos de células BHK-21(C-13)S con una concentración celular de 10^6 cel/ml.

Los 500 ml de sobrenadantes fueron centrifugados 15 min a 12000 x g a 4 °C, filtrados por filtros de 450 nm y finalmente centrifugados 90 min a 100000 x g a 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió en 4 ml de SSHA y se utilizó 2 ml para infectar cada frasco de cultivo primario. Para esto se extrajo el sobrenadante del cultivo se agregó los 2 ml del inóculo y se incubó 120 min a 37 °C. Posteriormente se completó hasta 4 ml con medio con Glasgow-Mem sin extraer el inóculo .

I.3.28. Caracterización histológica de los tumores sólidos y ascíticos.

Se realizó la caracterización histológica del tumor ascítico producido en hamster por la inoculación intraperitoneal de células BHK-21(C-13) y los tumores sólidos producidos en hamster y ratones de la cepa N:NIH/nu/nu, por células BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S y 169. (90).

I.4. PARTE A

I.4.1. RESULTADOS IN VIVO

Las experiencias realizadas y los resultados obtenidos en esta parte se resumen en I.5

I.4.1.1. Características de crecimiento de la línea celular BHK-21(C-13).

Estas células, originadas a partir de un cultivo primario de riñón de hamster, (109) poseen un aspecto fibroblástico con orientación definida y disposición en haces formando remolinos. (FOTO 6).

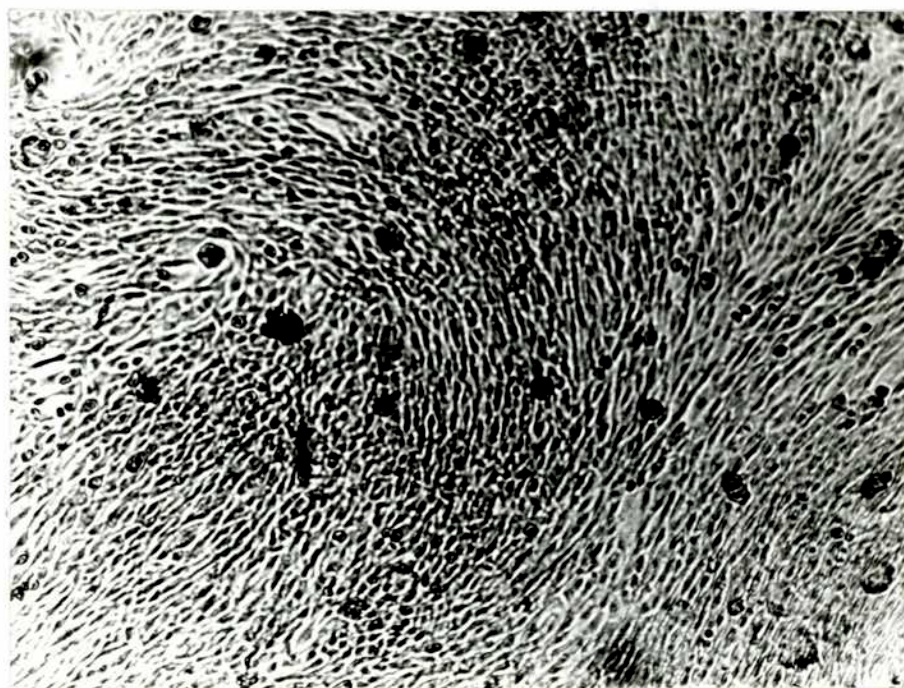


FOTO 6: Cultivo de células de la línea BHK-21(C-13) formando una monocapa. Se observan células fusiformes fibroblásticas con orientación definida y disposición en haces formando remolinos.

Con el objeto de determinar el tiempo de duplicación de la población se sembraron $2 \cdot 10^5$ células /frasco de 25 cm^2 de área las 20 horas ya se notó un incremento del número de células, llegando entre las 90 y 100 horas a cubrir todo el frasco y alcanzando una densidad de saturación de $18-21 \cdot 10^4 \text{ cel/cm}^2$.

El tiempo de duplicación de esta población es de aproximadamente 20 a 22 hs en la etapa de crecimiento logarítmico. Entre las 100 y 120 horas el cultivo alcanza a cubrir toda la superficie. Posteriormente las células comienzan a desprenderse y mueren.

Los datos se resumen en la TABLA I y FIGURA 1.

TABLA I: Aumento del número de células en función del tiempo de cultivo.

<u>Tiempo (hs)</u>	<u>N⁰ de células por frasco. 10^5</u>
0	2
20	3
42	7,8
65	16
83	35
99	50
120	52
138	52

El número de células representa el promedio de 3 frascos de 25 cm^2 de área para cada tiempo.

FIGURA 1: Característica de la curva de crecimiento de células de la línea BHK-21(C-13).

Curva de Crecimiento BHK -21(C-13)

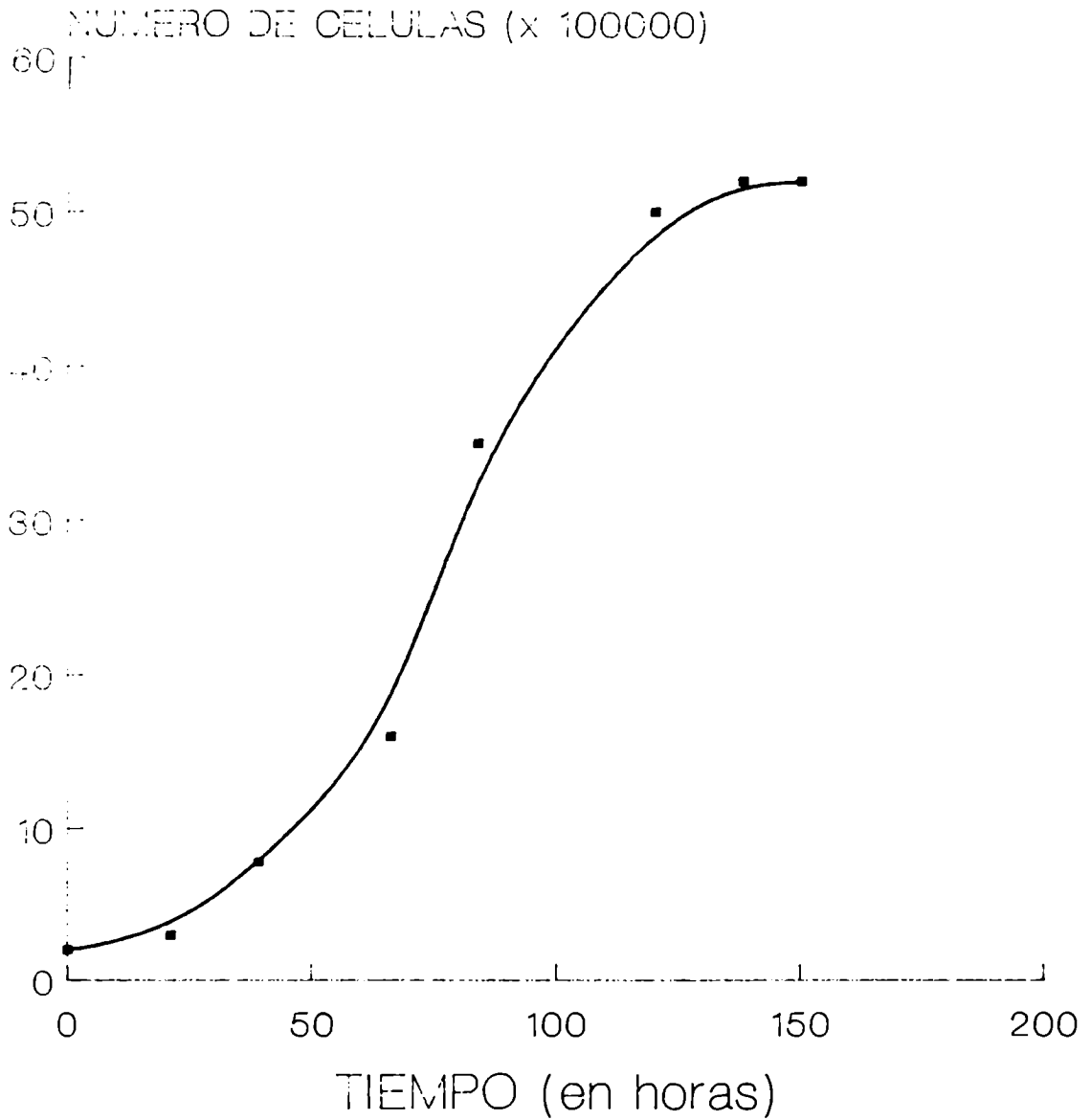


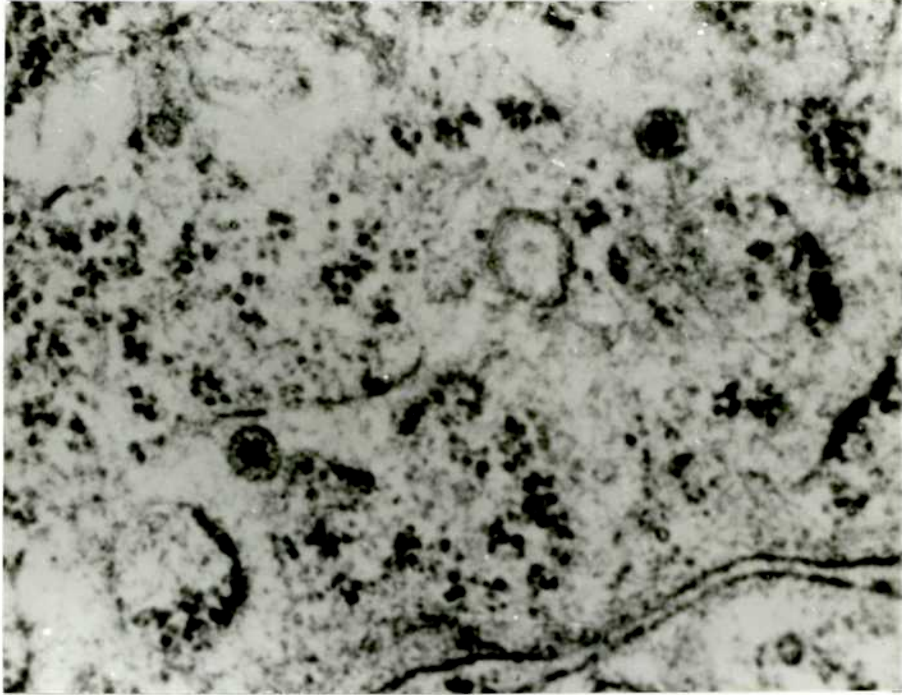
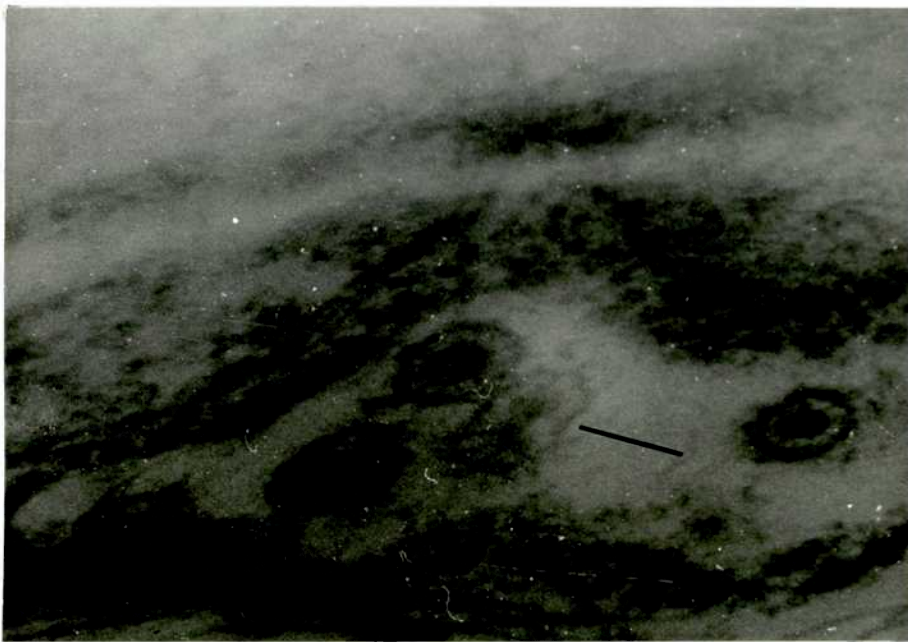
Figura 1

I.4.1.2. Estudio por microscopía electrónica de células de la línea BHK-21(C-13)

El examen por microscopía electrónica muestra las células conteniendo las partículas en las cisternas del retículo endoplásmico rugoso. La morfología de las mismas coincide con la descrita por otros autores (12,104).(FOTOS 7 y 8). Poseen un diámetro de 80 a 100 nm, con un nucleoide central electrónicamente denso de 40 a 45 nm de diámetro del cual salen estructuras radiales y una membrana externa que da la apariencia de una rueda de carro. Estas partículas no se encontraron en el núcleo, libres en el citoplasma o brotando de la membrana celular. Otros autores han definido estructuras elongadas (6,7) que se han podido observar en estos preparados. En este clón entre un 20 y 30 % de las células son portadores de alguna partícula. FOTOS 7 y 8

FOTO 7: Citoplasma de células BHK-21(C-13). Se observan partículas con el aspecto descrito. Magnificación 50000 x

FOTO 8: La flecha señala una estructura elongada. Magnificación 50000x. Aumento 3 diámetros

FOTO 7FOTO 8

I.4.1.3. Evolución de la neoplasia en hamster por inoculación subcutánea de células de la línea BHK-21 (C-13).

La inoculación subcutánea de $2 \cdot 10^6$ células en el dorso del hamster, confirmó el comportamiento neoplásico de las mismas. Entre los 13 y 15 días se palpa de un nódulo en el lugar de inoculación. A los 35 días se observa una masa tumoral de 2 a 3 cm de diámetro. Los tumores aparecieron parcialmente encapsulados, adheridos a los planos superficiales, polilobulados o formando nódulos independientes muy vascularizados. Se observó metástasis a nivel de hígado y pulmón. Histológicamente es un fibrosarcoma. Entre los 50 y 60 días el animal muere con un tumor que alcanza a tener 5 cm de largo por 3 de ancho. (FOTO 9). (TABLA II)

FOTO 9 :Hamster con tumor subcutáneo.

- a) nódulos neoplásicos a los 30 días de la inoculación de $2 \cdot 10^6$ células BHK-21(C-13).
- b) los nódulos son polilobulados muy vascularizados y adheridos a los tejidos vecinos.

FOTO 9 a)



FOTO 9 b)



I.4.1.4. Evolución de la neoplasia en ratones de la cepa N:NIH/nu/nu por inoculación subcutánea de células de la línea BHK-21(C-13)

Se verificó la susceptibilidad de esta cepa de ratones al desarrollo de tumores producidos por la inoculación de células BHK-21(C-13) (41). Se inocularon $2 \cdot 10^6$ células en el dorso del animal. Se observó un nódulo entre los 7 y 9 días en el lugar de inoculación. Entre los 40 y 50 días los tumores se componen de varios lóbulos muy vascularizados. A partir de este momento el estado general del animal decae y mueren entre los 60 y 70 días con tumores que alcanzan los 3 a 4 cm de diámetro. Histológicamente corresponde a un fibrosarcoma. Estas neoplasias producen metástasis pulmonares, ganglionares y esplenomegalia. (FOTO 10).(TABLA II).

FOTO 10: Nódulos neoplásicos producidos a los 50 días de la inoculación subcutánea de $2 \cdot 10^6$ células BHK-21 (C-13) Los nódulos son polilobulados y muy vascularizados. Se observan metástasis ganglionares.



I.4.1.5. Actividad de las células de la línea BHK-21(C-13)
en ratones de la cepa BALB/c
Inoculación subcutánea e intraperitoneal

La inoculación de $2 \cdot 10^6$ hasta $2 \cdot 10^7$ células cada ratón por vía subcutánea o intraperitoneal no desarrolló neoplasias luego de 180 días de observación. En esta fecha los animales fueron sacrificados. No observándose ninguna alteración macroscópica. (TABLA II)

TABLA II: Evolución de neoplasias por inoculación subcutánea de células de la línea BHK 21(C-13).

Huésped	N ⁰ de células	días de aparición ¹	días de sobrevida	<u>animales con tumor</u> <u>animales totales</u>
Hamster	2.10 ⁶	15±2	55±5	<u>30</u> 30
Ratones NIH/nu	2.10 ⁶	8±1	65±5	<u>20</u> 20
Ratones BALB/c	2.10 ⁶ o 2.10 ⁷	---	180 ²	<u>0</u> 10

(1) Se utilizó la palpación como método de detección

(2) Se sacrificaron

I.4.1.6. Resultados obtenidos por inoculación intraperitoneal en hamster irradiados de:

- a) sobrenadante de cultivo de células de la línea BHK-21(C-13)
- b) pellet del mismo sobrenadante

Con el objeto de comprobar si la partícula pasa al sobrenadante de cultivo y su posible actividad biológica "in vivo" se inoculó por vía intraperitoneal a cada animal 15 ml de sobrenadante obtenido como se describió en I.3.19.

Luego de 180 días los 5 animales fueron sacrificados sin observarse ninguna patología.

Teniendo en cuenta los resultados negativos obtenidos, se pensó en aumentar la cantidad de partículas inoculadas, concentrando el sobrenadante por centrifugación.

La inoculación del pellet, proveniente de 250 ml de sobrenadante a cada animal no dió resultados positivos luego de 180 días de observación, a pesar de haberse inmunodeprimido el animal por irradiación.

Estos resultados sugieren que la cantidad es insuficiente o son inactivas "in vivo". Otros autores obtuvieron resultados similares en hamster no irradiados empleando sobrenadante sin concentrar. (28,115).

I.4.1.7. Resultados obtenidos en hamster irradiados, por inoculación intraperitoneal de:

- a) acelular de células de la línea BHK-21(C-13)
- b) acelular de fibrosarcoma producido en hamster por inoculación de células de línea BHK-21(C-13)

Dado que los resultados obtenidos con el sobrenadante, fueron negativos, se consideró conveniente intentar extraer la partícula de células mantenidas en cultivo o del tumor originado por inoculación de las mismas en el hamster.

Empleando métodos que aseguraran la ausencia de células se obtuvo un pellet, proveniente de una suspensión acelular de 10^8 células o de 5 g de tumor sólido, el cual se inoculó por vía intraperitoneal a cada hamster. Como en el caso anterior los animales fueron inmunodeprimidos por radiación .

Luego de 180 días de observación los animales fueron sacrificados sin notarse ninguna patología.

Estos resultados confirman la inactividad, "in vivo", de las suspensiones acelulares de células BHK-21(C-13) ya demostrado por otros autores.

I.4.1.8. Transformación neoplásica inducida en hamster por células de la línea BHK-21(C-13) alojadas en cámaras de difusión

De acuerdo a los resultados negativos obtenidos con el sobrenadante de cultivo y con las suspensiones acelulares

se decidió comprobar si sería necesario un estímulo constante para inducir la transformación "in vivo".

Con este fin se emplearon cámaras de difusión con poros de 450, 220 y 50 nm, como se describió en I.3.24., que impiden el pasaje de células y en el caso de las dos primeras podrían permitir el pasaje de la partícula.

Estas cámaras, conteniendo $20 \cdot 10^6$ células en 0,20 ml de medio de cultivo Glasgow-Mem fueron implantadas en la cavidad peritoneal del hamster induciéndose un fibrosarcoma que se desarrolló en el lugar del implante. El tumor fue palpable a los 15 días fijando la cámara a los tejidos vecinos. Su desarrollo fue progresivo matando al animal entre los 30 y 50 días. TABLA III

En la autopsia la cámara de difusión apareció englobada por el tejido tumoral del cual fue fácilmente enucleable. El fibrosarcoma es sólido, no hemorrágico, infiltra los tejidos vecinos y es transplantable. (FOTO 11) Las experiencias colocando las cámaras de difusión conteniendo medio de cultivo Glasgow-Mem solamente, no indujo ningún tumor y solo se observó una escasa reacción fibrosa luego de 180 días. Experiencias previas demostraron que el 70 % de las células permanecen viables luego de 96 horas. Otros autores han obtenido una sobrevida de hasta 7 días colocando pequeños explantos de tejidos tumorales dentro de las cámaras (4).

Los resultados positivos obtenidos empleando cámaras con poros de 50 nm podrían sugerir la existencia de factores de menor P.M. que la partícula que posean actividad oncogénica. Estos resultados están siendo evaluados actualmente y serán motivo de próximas experiencias.

FOTO 11: Animal sacrificado a los 40 días de introducida la cámara de difusión conteniendo $2 \cdot 10^7$ células BHK-21(C-13). El tumor intraperitoneal tiene un volumen de 4x 3 cm. Histológicamente corresponde a un sarcoma. La flecha indica la ubicación de la cámara

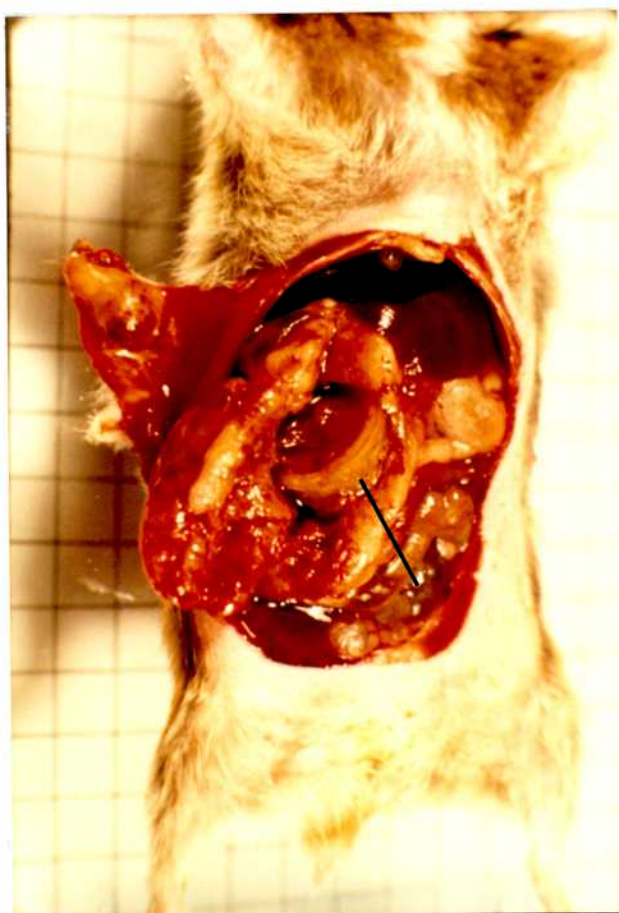


TABLA III: Evolución de las neoplasias por implantación de cámaras de difusión

Poros de la cámara nm	<u>animales con tumor</u> animales totales	días de aparición ¹	días de sobrevida
450	$\frac{10}{12}$	19±3	40±10
220	$\frac{11}{13}$	16±3	45±11
50	$\frac{6}{8}$	16±3	32±6
220 ²	$\frac{0}{8}$	--	180 ³

1 Se empleó la palpación como método de detección

2 Se emplearon como testigos

3 Los animales fueron sacrificados

I.4.1.9. RESULTADOS IN VITRO

I.4.1.9.1. Transformación neoplásica de células de cultivos primarios de hamster por sobrenadante de cultivo de la línea BHK-21(C-13)

La imposibilidad, de demostrar la actividad oncogénica del sobrenadante y de la suspensión acelular de células BHK-21(C-13) "in vivo", sugirió la posibilidad, de realizar experiencias "in vitro", teniendo en cuenta que se podía disponer de cultivos primarios de hamster de distintos orígenes y que este sería un sistema mas sensible.

Se emplearon células de cultivos primarios de riñón y de exudado peritoneal, como se describió en I.3.26.

a) Transformación neoplásica de células de cultivo primario de riñón.

Estos cultivos son inicialmente mezcla de fibroblastos y células epiteliales, en los cuales los fibroblastos son predominantes. A las 36 horas el cultivo se encuentra cubriendo el 50 % de la superficie del frasco. En este momento el sobrenadante de las células BHK-21(C-13) se centrifugó y filtró por filtros de 220 nm de poro y se puso en contacto con la monocapa semiconfluente de células de riñón. Entre los 10 y 12 días post infección se detectaron múltiples focos de transformación neoplásica caracterizados por células alargadas de aspecto fibroblástico con pérdida de la orientación y estratificación. Estas características se

acentúan en los sucesivos repiques. Las células del testigo sufren un proceso degenerativo que a partir del tercer repique conduce a la muerte del cultivo. (FOTOS 12 y 13). (TABLA IV).

FOTO 12: Cultivo primario de células de riñón de hamster recién nacido, luego de 48 horas de sembrado. El cultivo forma una monocapa semiconfluente de células de aspecto fibroblástico.

FOTO 13: Cultivo primario de riñón de hamster 14 días después de la infección por sobrenadante de cultivo de células BHK-21(C-13). Se observa :a) desaparición de la monocapa con desorganización de la orientación celular, b) multiestratificación con formación de focos celulares.

FOTO 12

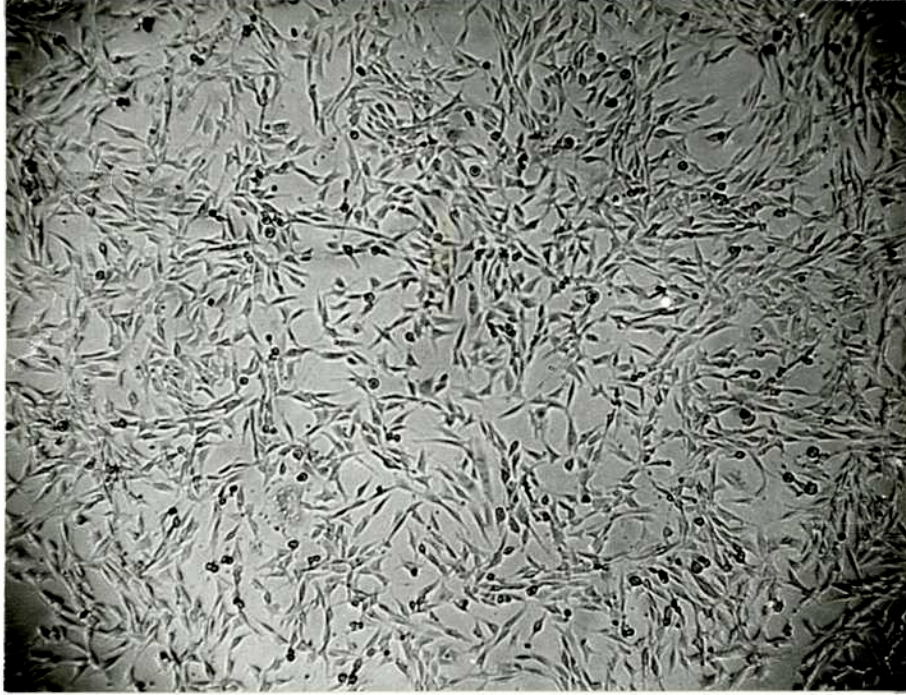
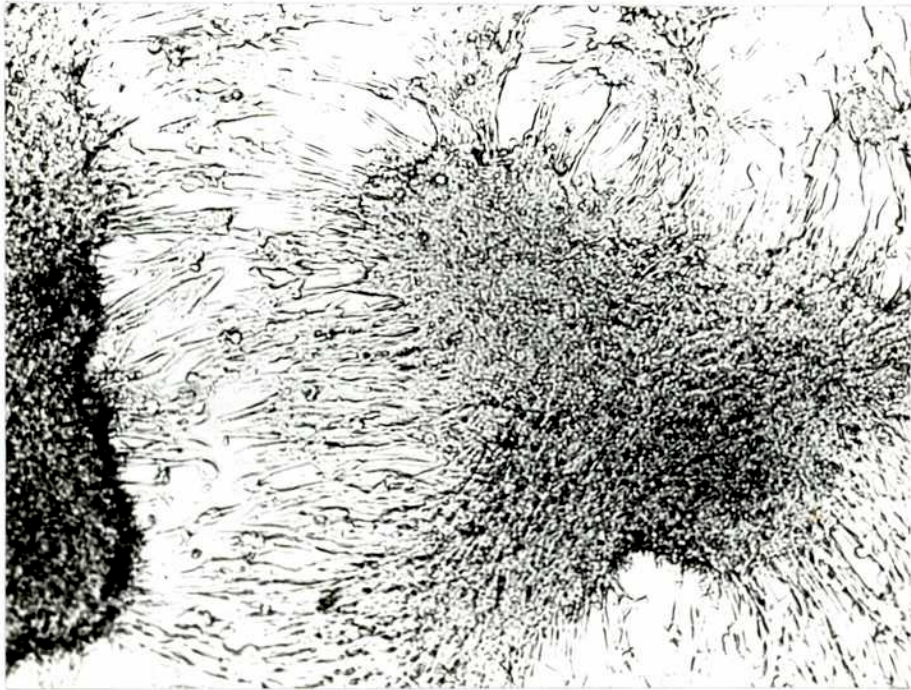


FOTO 13



b) Transformación neoplásica de células de cultivo primario de exudado peritoneal

Normalmente estos cultivos consisten en una mezcla de linfocitos, granulocitos formando pequeños cúmulos, células de tipo fibroblástico, macrófagos y células mesoteliales.

Para la infección de estos cultivos se empleó el mismo procedimiento que en a.

Entre los 15 y 18 días post infección se observó la formación de focos de células alargadas de aspecto fibroblástico, otros formados por células redondeadas y rodeados por fibroblastos sin orientación definida. Estas características se acentuaron en los sucesivos repiques. (FOTOS 14 y 15). (TABLA IV).

Cuando ambos cultivos primarios presentaron las características propias de transformación neoplásica (multiestratificación, desorganización y entrecruzamiento celular), (10,76), fueron inoculados en el hamster, produciendo un tumor detectable entre los 7 y 10 días. Histológicamente corresponde a un sarcoma.

La inoculación en los animales se realizó dado que las características morfológicas de transformación "in vitro" no son un criterio suficiente para afirmar que dicha transformación es maligna (43).

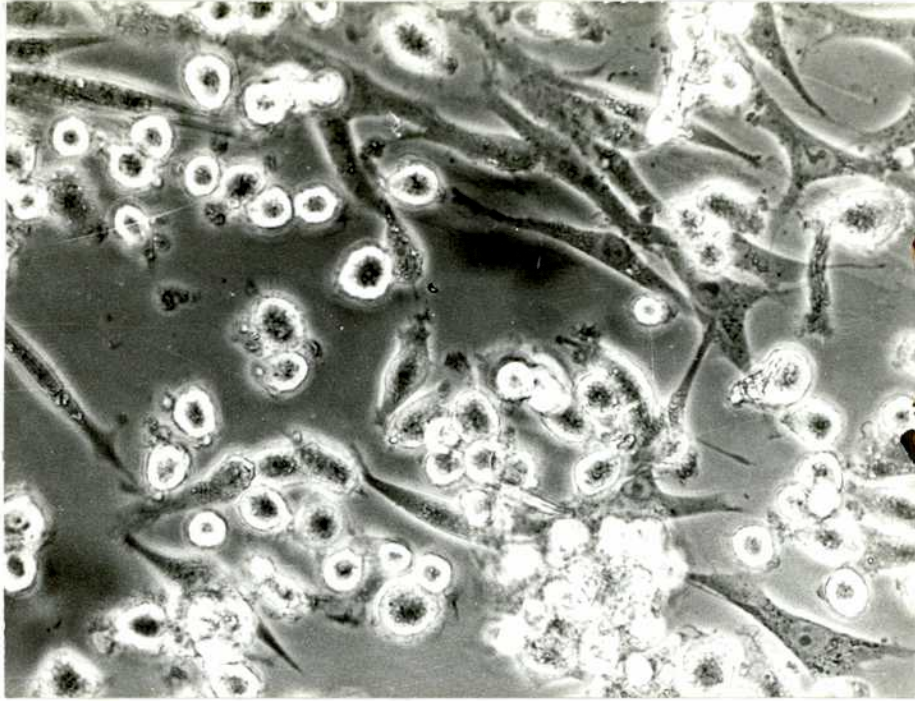


FOTO 14: Cultivo primario de células de exudado peritoneal de hamster a las 72 horas de cultivo in vitro. Se observan células redondas o formando pequeños acúmulos celulares y células de aspecto fibroblástico y epitelial.

FOTO 15: Vista panorámica del cultivo primario de células de exudado peritoneal transformado por sobrenadante de cultivo de células BHK 21(C-13). A los 20 días de la infección se observan abundantes focos de transformación de forma redondeada y células de aspecto fibroblástico.

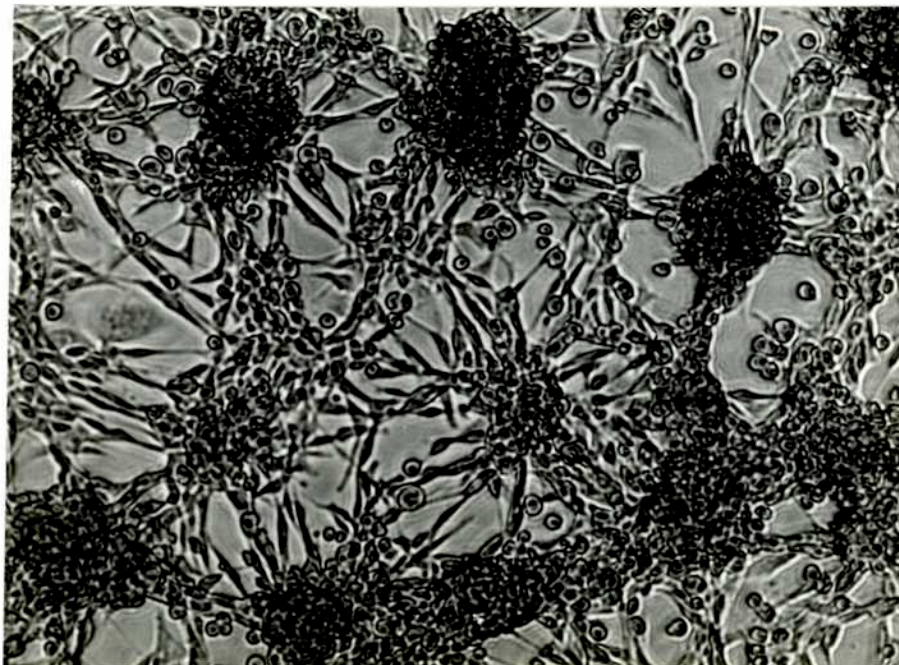


TABLA IV: Transformación de cultivos primarios por sobrenadante de células BHK-21(C-13) filtrado por filtros de 220 nm de poro.

Cultivo celular	<u>fcos.infectados</u> fcos. transformados	transf. (1)	<u>animales/tumor</u> animales totales
Riñón de hamster	$\frac{5}{5}$	10±2	$\frac{4}{5}$
Exudado peritoneal	$\frac{7}{7}$	14±3	$\frac{5}{5}$

(1) Día en el cual el cultivo presentaba las características morfológicas de transformación.

I.4.1.9.2. Transformación neoplásica de células de cultivos primarios de hamster por pellet de:

a) sobrenadante de cultivo,

b) suspensión acelular de células de la línea BHK-21(C-13)

c) suspensión acelular del fibrosarcoma producido por inoculación de células de la línea BHK-21(C-13) en hamster.

La transformación de los cultivos primarios de hamster por el sobrenadante de cultivo de células BHK-21(C-13), sugirió la posibilidad de comprobar, si el factor transformante podría ser la partícula presente en el medio de cultivo, para lo cual se ultracentrifugó el sobrenadante de cultivo como se describió en I.3.27. y utilizó el pellet para infectar cultivos primarios.

Por otra parte, dada la susceptibilidad de estos cultivos primarios se pensó extraer la partícula de las células BHK-21(C-13) o del fibrosarcoma, como se describió en I.3.22. y demostrar si era biológicamente activa. De este modo el sobrenadante del cultivo o las suspensiones acelulares podrían ser utilizados como fuente de material para una posterior caracterización de la partícula.

La actividad biológica se ensayó sobre cultivos primarios de exudado peritoneal y riñón de hamster. Entre los 15 y 20 días de cultivo, luego de haber realizado 2 a 3 repiques en ambos casos, estos comenzaron a presentar las características de transformación. Cuando las mismas fueron bien evidentes las células se inocularon por vía subcutánea

en hamster, obteniéndose un sarcoma. Los resultados de transformación "in vitro" se muestran en la TABLA V.

TABLA V: Transformación de cultivos primarios de hamster por pellet del sobrenadante de cultivo, acelular de células BHK-21(C-13) y del fibrosarcoma.

Cultivo celular	material infectante	$\frac{\text{fcos.transf.}}{\text{fcos.inf.}}$	transf. ¹	$\frac{\text{animales/tumor}}{\text{animales totales}}$
	pellet sobren.	$\frac{5}{6}$	15±3	$\frac{5}{6}$
Riñón	acelular BHK-21(C-13)	$\frac{5}{5}$	15±3	$\frac{5}{5}$
	acelular fibrosarcoma	$\frac{3}{3}$	14±2	$\frac{3}{3}$
	pellet sobren.	$\frac{5}{5}$	18±3	$\frac{5}{5}$
Exud. perit.	acelular BHK-21(C-13)	$\frac{4}{5}$	17±4	$\frac{4}{5}$
	acelular fibrosarcoma	$\frac{2}{3}$	15±2	$\frac{2}{2}$

(1) días a los cuales la transformación fue detectada.

I.4.1.9.3. Transformación de células de cultivos primarios de hamster por células BHK-21(C-13) alojadas en cámaras de difusión.

Con el objeto de repetir "in vitro" los resultados obtenidos "in vivo" con las cámaras de difusión, se emplearon cultivos primarios de hamster como método de detección de la actividad transformante de la partícula. (I.3.25)

Las cámaras de difusión con poros de 450, 220 y 50 nm conteniendo $2 \cdot 10^7$ células, colocadas sobre cultivos primarios de riñón y exudado peritoneal indujeron transformación celular entre los 6 y 10 días. Esta presentó características similares a las obtenidas con el sobrenadante de cultivo. (FOTO 16). La transformación neoplásica se verificó por la inoculación de $2 \cdot 10^6$ células por animal por vía subcutánea. Se observó la formación de un tumor sólido que se palpó a los 14 días, de desarrollo progresivo que determinó la muerte del animal entre los 50 y 60 días.

Al igual que los resultados obtenidos "in vivo" con las cámaras de 50 nm de poro, los mismos podrían sugerir la existencia de factores de menor peso molecular que la partícula que posean actividad oncogénica. Estos resultados están siendo evaluados actualmente para el diseño de próximas experiencias.

Las cámaras conteniendo el medio de cultivo Glasgow-Mem, colocadas sobre cultivos primarios no produjeron alteraciones, confirmando la no toxicidad de las mismas. Estos cultivos primarios luego de 2 a 3 pasajes dejan de dividirse y mueren. La inoculación, en hamster, de los cultivos que

permanecieron 72 horas en contacto con las cámaras testigo no indujeron neoplasias.

Para comprobar que el armado de las cámaras con esta metodología, no permite el paso de células se tomaron al azar 2 de ellas en cada experiencia, las que fueron llenadas con $20 \cdot 10^6$ células BHK-21(C-13) y mantenidas durante 72 horas en una capsula de Petri con medio Glasgow-Mem. A los 15 días de extraída la cámara no se obsevó crecimiento celular sobre la superficie de la cápsula de Petri.

En la TABLA VI se muestran los resultados obtenidos con las cámaras de difusión "in vitro".

FOTO 16: Células de cultivo de riñon de hamster transformado luego de 12 días de cultivo. Se observan focos bien definidos de transformación celular. Entre ellos células de aspecto fibroblástico y ausencia de orientación celular.

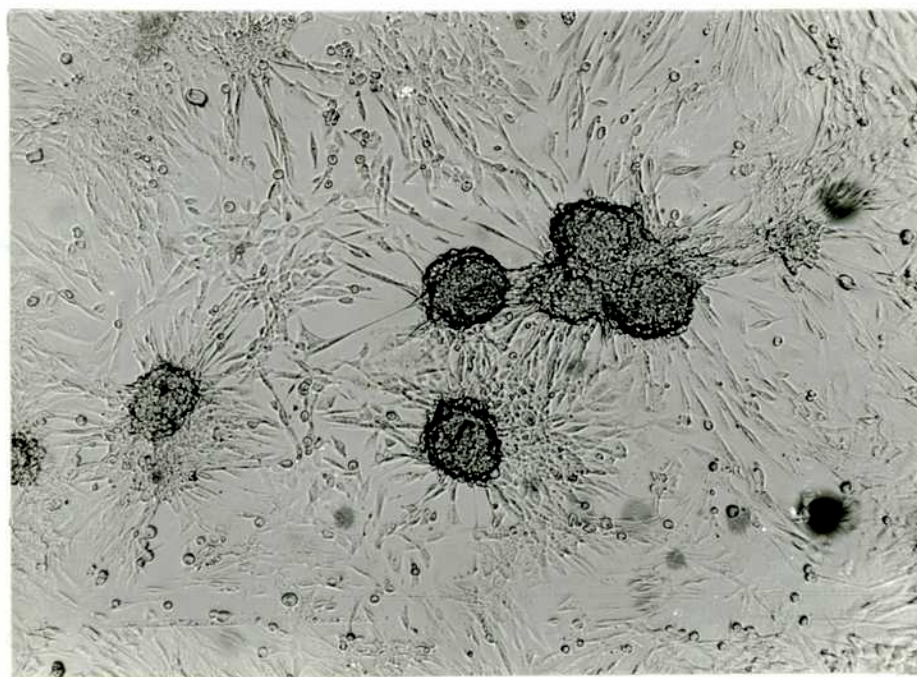


TABLA VI: Cámaras de difusión conteniendo células BHK-21 (C-13) en cultivos primarios.

Cultivo celular	poro de la cámara (nm)	$\frac{\text{fcos.infect.}}{\text{fcos.transf.}}$	transf. (1)	$\frac{\text{animales/tumor}}{\text{animales totales}}$
	450	$\frac{5}{5}$	6 ± 2	$\frac{5}{5}$
Riñón de hamster	220	$\frac{5}{5}$	7 ± 2	$\frac{5}{5}$
	50	$\frac{3}{3}$	6 ± 2	$\frac{3}{3}$
	450	$\frac{13}{14}$	8 ± 2	$\frac{5}{5}$
Exud. perit.	220	$\frac{9}{10}$	10 ± 2	$\frac{4}{5}$
	50	$\frac{2}{3}$	9 ± 2	$\frac{2}{3}$

(1) días a los cuales la transformación fue detectada.

I.5. RESUMEN DE LAS EXPERIENCIAS Y RESULTADOS DE LA PARTE A

I.5.1. Experiencias y resultados obtenidos con células de la línea BHK-21(C-13)

Material utilizado	vía de inoculación		Cultivos primarios		
	SC.	IP	Riñón	Exud peritoneal	Embr
Células	+(1)	+(4)			
Células	+(2)	nd(2)			
Células	-(3)	-(3)			
Susp. acelular de células	nd	-	+	+	nd
Susp. acelular de fibrosarcoma	nd	-	+	+	nd
Cámara de difusión	nd(1)	+(1)	+	+	nd

Microscopía electrónica: se observaron partículas					

(1) Las experiencias se realizaron en hamsters

(2) Las experiencias se realizaron en ratones N:NIH/nu/nu

(3) Las experiencias se realizaron en ratones BALB/c

(4) Desarrollado en la Parte C

+ "in vivo" se obtuvo a tumor en los animales

+ "in vitro" se obtuvo transformación del cultivo

- "in vivo" no se obtuvo neoplasia en los animales

nd no determinado

I.5.2. Experiencias y resultados obtenidos con sobrenadante de cultivo de células de la línea BHK-21(C-13)

Proceso del sobren.	Vía de inoculación		Cultivos primarios		
	SC	IP	Riñón	Exudado peritoneal	Embrionario
filtrado	nd	- (1)	+	+	nd
pellet 100000 xg	nd	- (1)	+	+	nd

(1) Las experiencias se realizaron en hamsters

+ "in vitro" se obtuvo transformación del cultivo
 - "in vivo" no se obtuvo neoplasia en los animales
 - "in vitro" no se obtuvo transformación del cultivo
 nd no determinado

I.6. PARTE B

I.6.1. RESULTADOS IN VIVO

Las experiencias realizadas y los resultados obtenidos en esta parte se resumen en I.7

I.6.1.1. Características de crecimiento de la línea celular BHK-21(C-13)S.

Se sembró inicialmente $2 \cdot 10^5$ cel/ml. Luego de 15 a 20 horas se comenzó a percibir un incremento del número de células, llegando a $20 \cdot 10^5$ cel/ml a las 80 horas con una viabilidad (medida por la permeabilidad al azul tripán) del 94-96 %. En este momento se observan cúmulos celulares integrados por 10 a 15 células y otros con menor cantidad. Posteriormente el número de células muertas aumenta debido a la acidez y agotamiento del medio del medio de cultivo.

Con el objeto de calcular el tiempo de duplicación de la población se determinó el número de células a distintos tiempos. TABLA VII y FIGURA 2.

El tiempo de duplicación de la población es de aproximadamente 20 a 22 horas en la etapa de crecimiento logarítmico. Entre las 60 y 80 horas el cultivo alcanza la máxima densidad de saturación.

Con el fin de observar alguna alteración en la morfología de las células que se cultivan en suspensión, se las mantuvo, creciendo en monocapa durante 15 pasajes. En el primero entre el 20 y 30 % de las células aparecen adheridas

con aspecto fibroblástico, entre el 60 y 70 % se adhieren a la superficie pero permanecen redondas y refráctiles, el porcentaje restante esta compuesto por células cuyo diámetro es aproximadamente el doble de las restantes y permanecen en suspensión. Algunas células que permanecen adheridas son multinucleadas.

Luego de 15 pasajes sucesivos no se notó alteración en las características descriptas (27). (FOTO 17).

FOTO 17: Cultivo de células de la línea BHK-21(C-13)S luego de 15 pasajes sucesivos in vitro. Se observan células grandes multinucleadas, otras en suspensión y algunas con aspecto fibroblástico.



TABLA VII: Aumento del número de células en función del tiempo de cultivo

<u>Tiempo (hs)</u>	<u>N⁰ de células/ml .10⁵</u>
0	2
20	3,8
42	8,1
62	17
80	19,5
100	20

El número de células representa el promedio de 2 frascos para cada tiempo.

FIGURA 2: Características de la curva de crecimiento de células de la línea BHK-21(C-13)S.

Curva de Crecimiento BHK -21(C-13)S

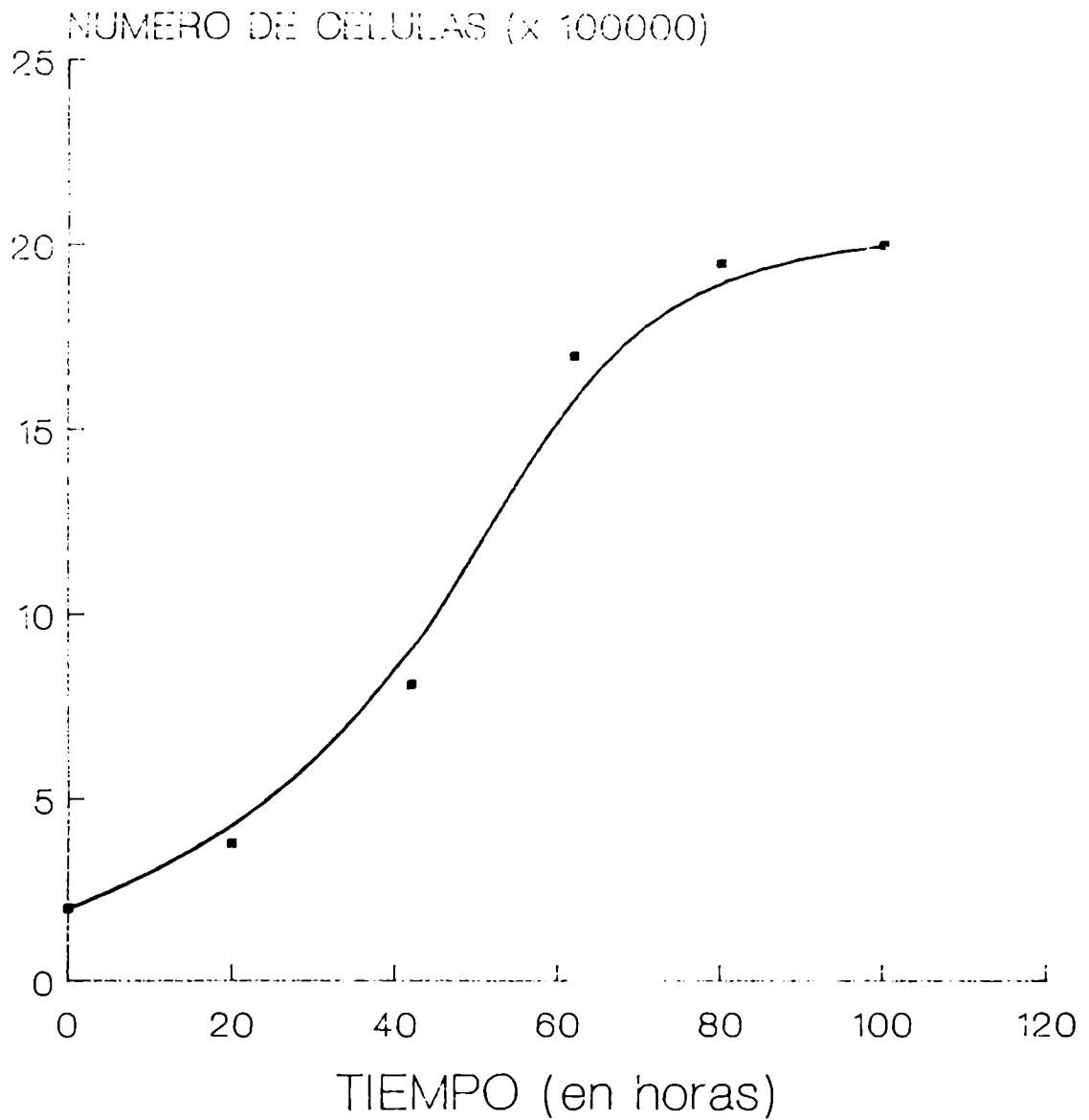


Figura 2

I.6.1.2. Estudio por microscopía electrónica de células de la línea BHK-21(C-13)S

El examen por M.E. no reveló la presencia de partículas virus-like. Luego de haber analizado entre 50 y 70 células no fue posible identificar ninguna estructura similar a la descrita para las células BHK-21(C-13). Estos resultados confirman los trabajos previos de otros autores que encuentran concentraciones variables de partículas virus-like según las sublíneas de BHK-21(C-13) analizadas (31,104).

I.6.1.3. Evolución de la neoplasia en hamster por inoculación subcutánea de células de la línea BHK-21(C-13)S.

La inoculación subcutánea de $2 \cdot 10^6$ células en el dorso del hamster confirmó el comportamiento neoplásico de este clon. Entre los 8 y 10 días se palpa un nódulo en el lugar de la inoculación. A los 25 días se observa una masa tumoral de 3 cm de diámetro.

Los tumores poseen las mismas características que los originados por las células BHK-21(C-13). Aparecen encapsulados, adheridos a los planos superficiales, polilobulados y muy vascularizados. Se observaron metástasis en hígado y pulmón. Entre los 40 y 50 días el animal muere. TABLA VIII.

I.6.1.4. Evolución de la neoplasia en ratones de la cepa N:NIH/nu/nu, por inoculación subcutánea de células de la línea BHK-21(C-13)S

Se verificó la susceptibilidad de esta cepa de ratones al desarrollo de tumores producidos por la inoculación subcutánea de las células BHK-21(C-13)S. Se inocularon $2 \cdot 10^6$ células y se observó un nódulo entre los 3 y 5 días. Entre los 25 y 35 días alcanza aproximadamente 2,5 cm de diámetro. En algunos animales se observaron varios nódulos muy próximos. Histológicamente corresponde a un fibrosarcoma. Se observaron metástasis pulmonares, ganglionares y esplenomegalia.

Entre los 30 y 40 días los animales mueren con un estado de desnutrición apreciable. TABLA VIII

I.6.1.5. Actividad de células de la línea BHK-21(C-13)S en ratones de la cepa BALB/c.
Inoculación subcutánea e intraperitoneal

Al igual que en los animales inoculados con células BHK-21(C-13) no se observó la formación de tumores luego de inocular hasta $2 \cdot 10^7$ células por ambas vías. Solamente fue perceptible un pequeño nódulo en la parte dorsal luego de 7 días que alcanzó un tamaño de aproximadamente 1-2 mm y luego involucionó. Los intentos para transplantarlo fueron negativos. Los animales fueron sacrificados luego de 180 días sin observarse ninguna alteración macroscópica. TABLA VIII

TABLA VIII: Evolución de las neoplasias por inoculación subcutánea de células BHK-21(C-13)S.

Huesped	N ⁰ de células	días de ¹ aparición	días de sobrevida ²	<u>animales con tumor</u> <u>animales totales</u>
Hamster	2.10 ⁶	8±2	45±5	<u>10</u> 10
Ratones NIH/nu	2.10 ⁶	4±1	35±5	<u>10</u> 10
Ratones BALB/c	2.10 ⁶ a 2.10 ⁷	---	180 ²	<u>0</u> 10

(1) Se utilizó la palpación como método de detección

(2) Se sacrificaron

I.6.1.6. Resultados obtenidos por inoculación intraperitoneal en hamster irradiados de:

- a) sobrenadante de cultivo de células de la línea BHK-21(C-13)S
- b) pellet del mismo sobrenadante

Si bien por M.E. no se observaron partículas virus-like en las células podría ocurrir que en el sobrenadante existiera algún factor con actividad oncogénica.

Con el objeto de comprobarlo se inocularon por vía intraperitoneal a cada animal 15 ml de sobrenadante de un cultivo de 50 horas de agitación, y una concentración de 1,2 a $1.8 \cdot 10^6$ cel/ml el cual previamente se centrifugó y filtró por filtros de 450 nm de poro como se describió en (I.3.19.)

Luego de 180 días los 7 animales fueron sacrificados no observándose tumor en ninguno de ellos .

Al igual que con las células de la línea BHK-21(C-13), se pensó en aumentar la concentración de posibles partículas, centrifugando el sobrenadante a 100000 x g como se describió en (I.3.20.). La inoculación del pellet proveniente de 250 ml a cada animal no dio resultados positivos, luego de 180 días de observación.

Esto indicó, que si existieran partículas en el sobrenadante, no son suficientes o activas, "in vivo", confirmando lo obtenido en la parte A y por otros autores. (28,115).

I.6.1.7. Análisis de la capacidad oncogénica en hamster, de células de la línea BHK-21(C-13)S alojadas en cámaras de difusión

Al igual que en las experiencias con células BHK-21(C-13) se implantaron cámaras de difusión conteniendo células BHK-21(C-13)S, con poro de 450 nm. Entre los 90 y 100 días los animales fueron sacrificados no observándose la formación de tumores. Esto indicaría que las células BHK 21(C-13)S no liberan sustancias capaces de inducir la transformación "in vivo", en los sistemas empleados.

I.6.1.8. RESULTADOS IN VITRO

- I.6.1.8.1. Comprobación de la transformación neoplásica de células de cultivo primario de hamster por:
- a) sobrenadante de cultivo de línea BHK-21(C-13)S
 - b) pellet del mismo sobrenadante.

La imposibilidad, de demostrar la actividad oncogénica del sobrenadante "in vivo", sugirió la posibilidad de realizar estas experiencias "in vitro" empleando células de cultivos primarios de hamster.

Para esto se emplearon cultivos primarios de riñón y embrionarios, siguiendo la metodología descrita en I.3.26. y I.3.27. Luego de 20 días de cultivo no se observó ninguna característica de transformación.

Los mismos resultados se obtuvieron infectando con el pellet del sobrenadante.

Estos ensayos permiten concluir que, sobre estos sistemas de detección, el sobrenadante de las células BHK-21(C-13)S no posee actividad oncogénica.

I.6.1.8.2. Estudio de la capacidad oncogénica de células de la línea BHK-21(C-13) alojadas en cámaras de difusión

Ensayo en cultivos primarios de hamster.

Con el fin de repetir in vitro los resultados obtenidos en los animales con las cámaras de difusión y estudiar, si un sistema mas sensible sería factible de ser transformado, se colocaron sobre cultivos primarios de riñón y embrionarios, cámaras con poros de 450 nm en las condiciones descritas en I.3.25.

Luego de 20 días no se observó ninguna característica de transformación y los cultivos comenzaron a tener signos de sufrimiento celular, siendo descartados a los 30 días.

I.7. RESUMEN DE LAS EXPERIENCIAS Y RESULTADOS DE LA PARTE B

I.7.1. Experiencias y resultados obtenidos con las células de la línea BHK-21(C-13)S.

Material utilizado	Vía de inoculación		Cultivos primarios		
	SC	IP	Riñón	Exud peritoneal	Embr.
Células	+(1)	+ (4)			
Células	+(2)	nd(2)			
Células	-(3)	-(3)			
Cámara de difusión	nd	-(1)	-	nd	-

Microscopía electrónica: no se observaron partículas

- (1) Las experiencias se realizaron en hamsters
 (2) Las experiencias se realizaron en ratones N:NIH/nu/nu
 (3) Las experiencias se realizaron en ratones BALB/c
 (4) Desarrollado en la Parte D

+ "in vivo" se obtuvo a tumor en los animales
 - "in vivo" no se obtuvo neoplasia en los animales
 - "in vitro" no se obtuvo transformación del cultivo
 nd no determinado

I.7.2. Experiencias y resultados obtenidos con sobrenadante de cultivo de células de la línea BHK-21(C-13)S.

Procesado del sobren.	Vía de inoculación		Cultivos primarios		
	SC	IP	Riñón	Exudado peritoneal	Embrionario
Filtrado	nd	-(1)	-	nd	-
Pellet 100000 xg	nd	-(1)	-	nd	-

(1) Las experiencias se realizaron en hamsters

- "in vivo" no se obtuvo neoplasia en los animales
- "in vitro" no se obtuvo transformación del cultivo
- nd no determinado

I.8. DISCUSION DE LAS PARTES A y B

Dado el amplio uso de algunos clones de la línea BHK- 21(C-13) mantenidos en suspensión, para la elaboración de vacunas animales y la falta de información concreta en lo referente a las modificaciones del comportamiento oncogénico de estas clones se estudiaron las características "in vivo" e "in vitro" de la línea BHK-21(C-13)S, comparándola con la BHK-21(C-13). Los resultados de la parte A y B del capítulo I confirman el comportamiento oncogénico de las células BHK-21(C-13) y BHK-21(C-13)S, por la formación de sarcomas en hamster y ratones N:NIH/nu/nu al inocularlas por vía subcutánea.

Para estas líneas celulares no se obtuvo diferencias en el tiempo de duplicación de la población. En ambos casos fue de 20 a 22 horas y la densidad de saturación fue de $2 \cdot 10^6$ cel/ml para las BHK-21(C-13)S y de $20 \cdot 10^4$ cel/cm² para las BHK-21(C-13).

Se observaron variaciones morfológicas "in vitro" y de crecimiento "in vivo". Las células de la línea BHK-21(C-13)S, mantenidas en monocapa presentan un acentuado polimorfismo donde se observan células redondas, otras grandes multinucleadas, algunos fibroblastos y otras redondas en suspensión. Esto contrasta con el aspecto fibroblástico formando remolinos de las BHK-21(C13).

Las células de la línea BHK-21(C-13)S, inoculadas por vía subcutánea en hamster y ratones N:NIH/nu/nu, producen un tumor que se desarrolla mas rápidamente que el originado por la inoculación de las células BHK-21(C-13).

Entre los 3 y 5 días se percibe un nódulo de 1 a 1,5 mm de diámetro en los ratones inoculados con las BHK-21(C-13)S, siendo su sobrevivencia de 30 a 40 días. En los inoculados con BHK-21(C-13) se observa entre los 7 y 9 días y mueren entre los 55 y 65 días. En los hamster la aparición de un nódulo por inoculación de células BHK-21(C-13)S ocurre entre los 6 y 10 días con una sobrevivencia de 40 a 50 días y entre los 13 y 17 días empleando células BHK-21(C-13). En este caso la sobrevivencia fue de 45 a 55 días.

En los ratones se observó, con ambas líneas, la formación de metástasis ganglionares que llegan a los 0,5 cm de diámetro y esplenomegalia

La presencia de las partículas virus-like en células BHK-21(C-13), en tumores espontáneos de hamster, en neoplasias inducidas por virus o agentes químicos, sugiere que las mismas estarían relacionadas con el proceso oncogénico. Dado que, algunos clones descritos por otros autores (3,95), liberan partículas al medio de cultivo se intentó demostrar esta relación utilizando el sobrenadante de cultivo de las células BHK-21(C-13), filtrado por filtros de 220 nm.

La concentración por ultracentrifugación de este sobrenadante y posterior transformación de cultivos primarios empleando el pellet confirmó la hipótesis que un factor particulado es liberado por las células.

La obtención de una suspensión acelular, de células de la línea BHK-21(C-13) o del fibrosarcoma inducido en hamster, por estas células y posterior transformación de cultivos primarios por el pellet de 100000 x g, corrobora

los resultados anteriores y permite concluir que en el pellet utilizado existe un factor con capacidad transformante.

En ningún caso se obtuvo efecto citopático en los cultivos primarios empleados.

La transformación neoplásica de los cultivos primarios, caracterizada por formación de focos con apilamiento celular, entrecruzamiento y desorganización celular, fue confirmada por la producción de neoplasias en el hamster.

Con el fin de estudiar el comportamiento "in vivo" del sobrenadante del cultivo o de las suspensiones acelulares de la línea BHK-21(C-13) se inoculó por vía intraperitoneal a cada hamster 15 ml de sobrenadante filtrado por filtros de 450 nm de poro o el pellet correspondiente a 250 ml de sobrenadante de cultivo o a 5 g de tumor. Los animales fueron previamente irradiados con 7 Gy para obtener su inmunodepresión.

En ningún caso, se obtuvo el desarrollo de una neoplasia, estos resultados confirman los obtenidos por otros autores quienes no han podido inducir tumores en hamster y otros animales utilizando sobrenadante de cultivo o extractos acelulares (28,115).

Los resultados negativos "in vivo" con el sobrenadante de cultivo o con las suspensiones acelulares planteó la hipótesis que sería necesario un estímulo constante por el factor oncogénico. Por tal motivo se implantaron cámaras de difusión, conteniendo $20 \cdot 10^6$ células BHK-21(C-13), en la cavidad peritoneal de los hamster. Si bien este número resulta muy superior a la densidad de saturación obtenida "in vitro", se debe tener en cuenta, que los productos del meta-

bolismo celular pasan por el filtro y son eliminados por el mecanismo homeostático del animal, lo que permite la supervivencia de las células durante varios días. Por otra parte el animal aporta nutrientes para el mantenimiento de la viabilidad durante este período. (4)

Como se expresó en resultados el empleo de estas cámaras permitió la inducción de un sarcoma que a los 30 días la engloba totalmente, lo que confirma la hipótesis enunciada precedentemente.

Para confirmar estos resultados se hicieron experiencias similares "in vitro", colocando cámaras de difusión sobre cultivos primarios de hamster. Las cámaras fueron retiradas a las 72 horas comprobándose entre un 80 y 90 % de viabilidad en las células interiores. Entre los 10 y 12 días se comienzan a observar las características típicas de transformación en los cultivos de riñón y exudado peritoneal. Estos poseen las mismas características morfológicas que los transformados por el sobrenadante.. La transformación fue confirmada por la producción de neoplasias en hamster por la inoculación de estas células.

La formación de tumores "in vivo" y la transformación "in vitro" empleando cámaras con poros de 50 nm, por los cuales la partícula no pasa, nos induce a pensar en la posibilidad de la existencia de sustancias de P.M. menores que la partícula que posean actividad transformante en los sistemas empleados.

La implantación de cámaras de difusión en hamster, conteniendo medio de cultivo Glasgow-Mem solamente, produjo

una escasa reacción peritoneal luego de 180 días de permanencia en el animal.

La M.E. de las células BHK-21(C-13) permitió observar partículas intracisternales de 100 nm de diámetro con un nucleoide electrónicamente denso de 40-50 nm de diámetro y una estructura radial similar a la descrita por otros autores.

De esta primer parte se concluye que las células de la línea BHK-21(C-13) producen una partícula que liberan al medio que es capaz de transformar cultivos primarios "in vitro" y posiblemente participar en la inducción de la neoplasia "in vivo".

Las células BHK-21(C-13)S poseen mayor capacidad oncogénica que las BHK-21(C-13), ya que inducen neoplasias más rápidamente y con menor tiempo de evolución.

Para explicar estos resultados sólo se cuenta con la observación "in vitro" donde, de acuerdo a la morfología del cultivo, las células de la línea BHK-21(C-13)S poseen características de transformación más notables que la BHK-21(C-13), lo cual favorecería su desarrollo "in vivo", sin embargo los estudios de M.E. no revelaron la presencia de partículas virus-like.

No fue posible obtener la transformación "in vitro" por el sobrenadante de cultivo, aun luego de concentrarlo por ultracentrifugación.

El sobrenadante inoculado "in vivo" tampoco indujo transformación neoplásica.

Si bien originalmente se planificó la realización de suspensiones acelulares con células BHK-21(C-13)S y con cé-

lulas del fibrosarcoma inducido en hamster por inoculación de las mismas, los resultados de M.E. no justificaron la realización de estas experiencias.

Las cámaras conteniendo estas células colocadas sobre cultivos primarios, no indujeron transformación, así como las colocadas "in vivo", en la cavidad peritoneal, tampoco indujeron tumores.

De esto se concluye que:

a) la capacidad oncogénica del sobrenadante de las células BHK-21(C-13) estaría relacionada con la presencia de las partículas , así como a la posible liberación de factores subvirales con actividad oncogénica que atraviesan los poros de 50 nm .

b) la oncogenicidad de las células de la línea BHK-21(C-13)S es independiente de la presencia de partículas.

I.9 PARTE C

I.9.1. RESULTADOS IN VIVO

Las experiencias realizadas y los resultados obtenidos en esta parte se resumen en I.10

I.9.1.1. Características del tumor ascítico originado por inoculación intraperitoneal de células de la línea BHK-21(C-13) en hamster irradiados.

El tumor ascítico se obtuvo como se indicó en I.3.12.

Luego del cuarto pasaje se llegó a una disminución de la sobrevivencia de 40 a 10 días.

La neoplasia obtenida por pasajes de las células BHK-21(C-13) en animales irradiados consiste en múltiples nódulos hemorrágicos de 2 a 6 mm de diámetro localizados en el peritoneo parietal, epiplón y mesenterio. (FOTO 18). Después del quinto día se observan en el pulmón pequeñas zonas hemorrágicas. En algunos casos avanzados se observaron hemorragias difusas e intensos edemas pulmonares. (FOTO 19). El estudio histológico demostró un mesotelioma mixto peritoneal con metástasis hepáticas y pulmonares. (90,110) Los animales presentan entre 4 y 10 ml de ascitis hemorrágica en el momento del trasplante, con concentraciones variables de células entre 50 y $80 \cdot 10^6$ cel/ml. En algunos casos presentaron hasta 2 ml de hemotorax con abundantes células en suspensión.

FOTO 18: Mesotelioma intraperitoneal luego de 20 pasajes. Se observan nódulos neoplásicos a nivel de epiplón y del peritoneo parietal. Probeta con líquido ascítico hemorrágico extraído del animal.



FOTO 19: Pulmón edematoso y hemorrágico como consecuencia de una neumonitis coexistente con la neoplasia.



I.9.1.2. Características de la línea celular 169

Las células del mesotelioma peritoneal de hamster fueron cultivadas "in vitro" en monocapa obteniéndose una nueva línea celular, denominada 169.

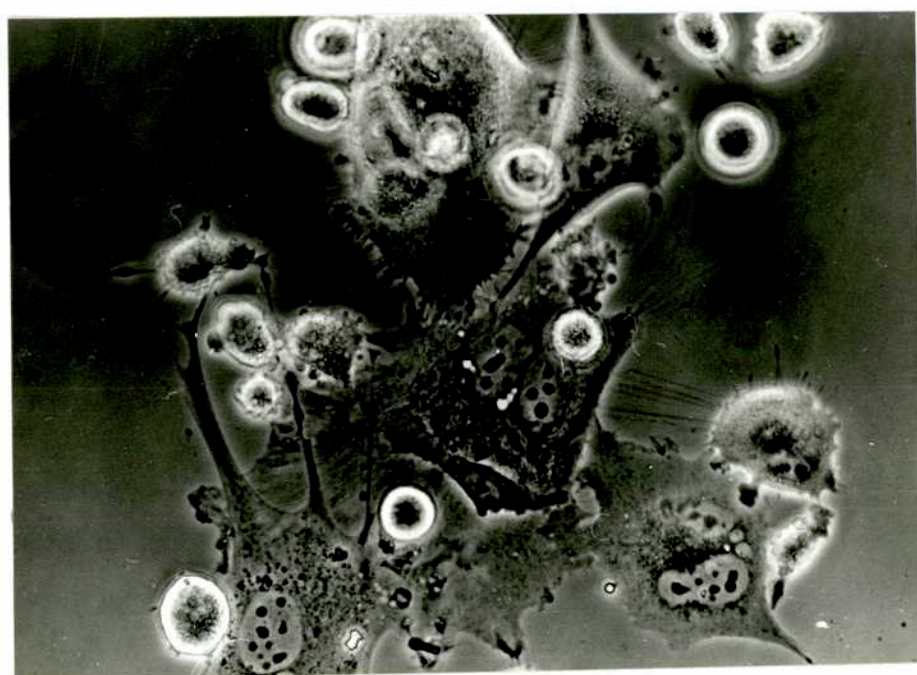
Morfológicamente el cultivo se presenta constituido por células epiteliales planas de forma aproximadamente rectangular con uno o mas núcleos prominentes, algunas células gigantes multinucleadas y en menor número células de aspecto fibroblástico y entre ambos tipos, formas de transición con una marcada anisocitosis. Presenta además zonas donde las células crecen en forma apilada similares a los focos de transformación. (FOTO 20). Estas células también fueron mantenidas en medio agitado. Por las características citológicas del cultivo "in vitro" y del tumor del cual se originó esta línea se clasificó como mesotelioma mixto.(90) (FOTO 21).

Esta línea celular mantiene la capacidad oncogénica luego de 100 pasajes ya que inoculando $2 \cdot 10^6$ células en hamster no irradiados se obtiene una neoplasia de iguales características que el tumor que le dió origen matando al animal en 9 a 11 días.



FOTO 20: Cultivo de células de la línea 169 de 48 horas. Se observan células planas epiteliales y de tipo fibroblástico y algunas multinucleadas.

FOTO 21: Células de la línea 169. Se observan microvellosidades propias de las células mesoteliales.



Las características de crecimiento de estas células son similares a las de las BHK-21(C-13) y BHK-21(C-13)S. El tiempo de duplicación de la población fue de 20 a 22 horas. Luego de las 100 a 120 horas el cultivo cesa su crecimiento debido a la acidez y agotamiento del medio de cultivo.

La densidad de saturación "in vitro", en monocapa, llega a $1,6-1,7 \cdot 10^5$ cel/cm² y en suspensión llegó a $20 \cdot 10^5$ cel/ml.

Los datos de crecimiento en monocapa se muestran en la tabla IX y en la figura 3

TABLA IX: Aumento del número de células en función del tiempo de cultivo

<u>Tiempo (hs)</u>	<u>N⁰ de células totales /frasco.10⁵</u>
0	2
20	3,1
41	8
60	16,5
80	32
100	40
120	42
150	40

El número de células representa el promedio de 3 frascos de 25 cm² de área, para cada tiempo.

FIGURA 3: Característica de la curva de crecimiento células de la línea 169

Curva de Crecimiento

Linea 169

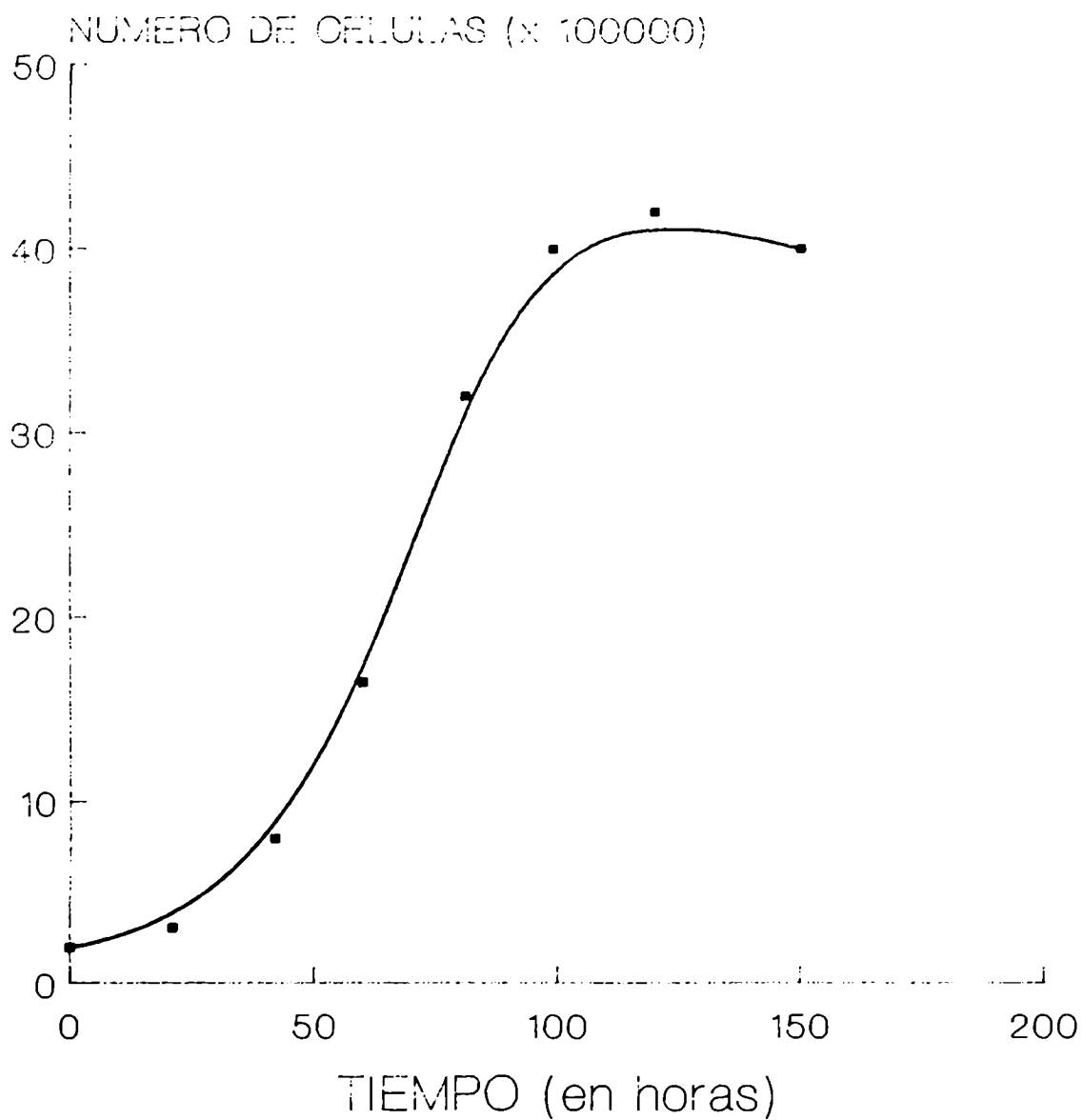


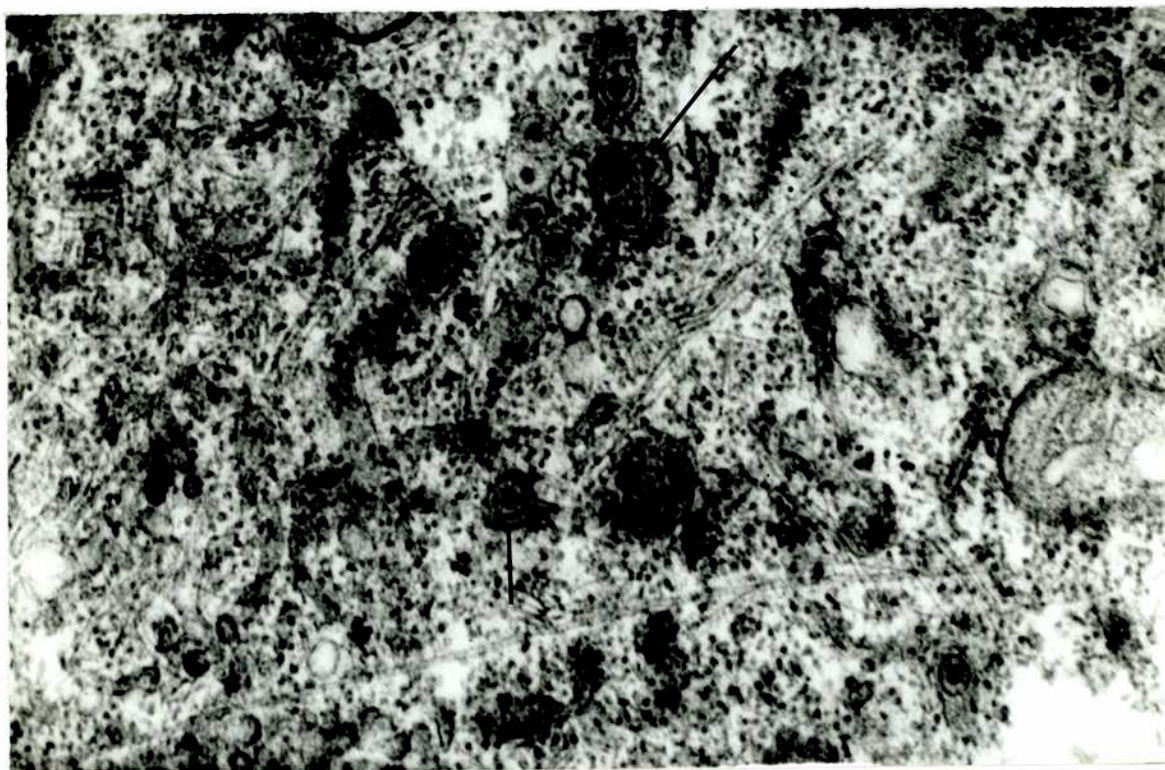
Figura 3

I.9.1.3. Estudio por microscopía electrónica de células de la línea 169

Los estudios de M.E. certificaron la presencia de virus-like con los mismos diámetros que los presentes en las células BHK-21(C-13), englobados en las cisternas del retículo endoplásmico rugoso . No se ha podido observar partículas libres en el citoplasma. Una característica de estas células, no observada en las BHK-21(C-13), es la mayor cantidad de células conteniendo partículas y además, el mayor número de virus-like por célula. Se calculó que entre el 40 y 60 % de las células son portadoras de al menos una partícula.(FOTO 22).

Estos resultados sugieren que el pasaje de las células BHK-21(C-13) por animales inmunodeprimidos por radiaciones ionizantes, posibilitaría la selección de una población celular portadora de mayor número de partículas y/o la activación de la expresión de los virus-like.

FOTO 22: Microscopía electrónica de las células de la línea 169. Se observan partículas en las cisternas del retículo endoplásmico con aspecto de rueda de carro. Aumento 15000 x



I.9.1.4. Evolución de la neoplasia en hamster por inoculación subcutánea de células de la línea 169

La inoculación subcutánea de $2 \cdot 10^6$ células en el dorso del hamster produce una neoplasia que aparece a los 7 días alcanzando a los 30 un tamaño que duplica el obtenido con las células BHK-21(C-13), acortando la sobrevida del animal a 30-40 días. (TABLA X). Macroscópicamente aparece como un tumor polilobulado muy vascularizado similar al originado por ambas líneas de células BHK-21(C-13), y en el estado terminal con un centro necrótico debido a su rápido desarrollo y pobre vascularización. Histológicamente es un sarcoma sumamente anaplásico con predominio de células de apariencia fibroblástica .

I.9.1.5. Evolución de la neoplasia en ratones de la cepa N:NIH/nu/nu por inoculación subcutánea de células de la línea 169

Se demostró, por inoculación en los hamster, que las células de la línea 169 poseen una mayor capacidad oncogénica que las BHK-21(C-13) y similar a las BHK-21(C-13)S. La inoculación de $2 \cdot 10^6$ células por vía subcutánea produce una neoplasia que se detecta entre los 3 y 5 días. (TABLA X). Las características morfológicas son similares a las descritas para las células BHK-21(C-13) de ambas líneas. Los animales tienen una sobrevida de 20 a 30 días, observándose metástasis pulmonares.

I.9.1.6. Evolución de la neoplasia por inoculación subcutánea e intraperitoneal de células de la línea 169 en ratones de la cepa BALB/c.

Con el objeto de comparar la línea 169 con la BHK-21(C-13) y con la BHK-21(C-13)S y ver si el pasaje por hamster inmunodeprimidos modificaba el comportamiento celular en animales de otra especie, se inocularon estas células en ratones BALB/c.

La inoculación por vía subcutánea de 2.10^7 células produce una tumoración de 3 mm de diámetro luego de 7 días en el lugar de inoculación que no es transplantable y desaparece progresivamente hasta hacerlo totalmente a los 15 días. (TABLA X)

La inoculación intraperitoneal de 2.10^7 células produjo entre los 5 y 7 días un tumor ascítico con una concentración celular de hasta 80.10^6 cel/ml, obteniéndose de cada animal entre 4 y 7 ml de líquido. (TABLA X). Dada la corta evolución no existe tumor sólido.

Estas células son transplantables a otro animal de la misma especie inoculando igual cantidad y son capaces de reproducir un mesotelioma cuando son inoculadas en el hamster intraperitonealmente.

En los ratones a partir de los 8 a 10 días la concentración de células en el líquido ascítico disminuye, así como la distensión abdominal del animal y entre los 11 y 13 días ya no se pueden extraer células, permaneciendo el animal con aspecto normal. Se siguió su evolución durante 180 días no observándose ninguna alteración.

Las células del líquido ascítico fueron cultivadas "in vitro" para la realización del cariotipo, comprobándose que son células de hamster.

TABLA X: Evolución de las neoplasias por inoculación de células 169

Huesped	N ⁰ de células	días de ¹ aparición	días de sobrevida	<u>animales con tumor</u> <u>animales totales</u>
Hamster	2.10 ⁶	7±2	35±5	<u>19</u> 19

Ratones <u>N:NIH/nu/nu</u>	2.10 ⁶	4±1	25±5	<u>20</u> 20

Ratones S.C BALB/c	2.10 ⁷	7±2 (2)	180(3)	<u>3</u> (2) 10
	I.P 2.10 ⁷	6±1(4)	180(3)	<u>20</u> (2) 20

- (1) Se utilizó la palpación como método de detección
 (2) Luego se reabsorbió
 (3) Fueron sacrificados
 (4) A partir de los 8 a 10 días se comienza a reabsorber

I.9.1.7. Evolución del tumor ascítico en hamster irradiados por inoculación intraperitoneal de sobrenadante de cultivo de células de la línea 169

La inoculación como se indicó en I.3.19. del sobrenadante de cultivo de esta nueva línea celular, portadora de mayor cantidad de partículas virus-like que la original, indujo un mesotelioma que produjo la muerte del animal entre los 35 y 45 días.(TABLA XI).

Hecha la autopsia se observaron las mismas características macroscópicas que en los tumores producidos por células enteras.

Esta es otra diferencia con respecto a la BHK-21(C-13), con la cual, no se obtuvo una neoplasia por inoculación del sobrenadante de cultivo en animales inmunodeprimidos.

Dado que los resultados fueron positivos con el sobrenadante no fue necesaria la concentración por ultracentrifugación para ensayar su actividad "in vivo".

Estos resultados permitirían contar con una fuente de partículas para encarar su aislamiento y parcial caracterización.

I.9.1.8. Resultados obtenidos en hamster por inoculación intraperitoneal y subcutánea de:

a) acelular de células de la línea 169

b) acelular del fibrosarcoma producido en hamster por inoculación de células de la línea 169.

Si bien el sobrenadante fue activo "in vivo", se pensó en extraer la partícula de las células o del fibrosarcoma para contar con una fuente alternativa de las mismas para ensayar su purificación y caracterización.

La inoculación por vía intraperitoneal del pellet proveniente del acelular de células de cultivo o del fibrosarcoma resuspendido en SSHA indujo un mesotelioma mixto que determinó la muerte del animal entre los 20 y 30 días. Cuando se inoculó por vía subcutánea entre los 7 y 10 días se palpa una tumoración en el lugar de la inoculación, que finalmente origina un fibrosarcoma determinando la muerte del animal entre los 35 y 45 días. El tumor alcanzó los 3 a 4 cm de diámetro. (TABLA XI).

TABLA XI: Evolución de las neoplasias en hamster por inoculación de sobrenadante de cultivo y acelular de las células de la línea 169 y del fibrosarcoma.

Material	via de inoculación	<u>animales con tumor</u> animales totales	sobrevida días
Sb de cultivo	I.P.	$\frac{6}{7}$	35±5
Acelular de cultivo	I.P.	$\frac{5}{5}$	25±5
	S.C.	$\frac{8}{8}$	40±5
Acelular fibrosarc.	I.P.	$\frac{8}{8}$	20±5
	S.C.	$\frac{6}{6}$	40±5

I.9.1.9. Evolución de la transformación inducida en hamster por células de la línea 169 alojadas en cámaras de difusión

La implantación intraperitoneal como se indicó en I.3.24. de cámaras de difusión con poros de 450 , 220 y 50 nm conteniendo $2 \cdot 10^7$ células del mesotelioma indujo en el hamster una neoplasia que se observó en la totalidad de los animales del grupo experimental.

Luego de un periodo de 10 días aproximadamente la cámara fue fijada a las estructuras vecinas por el tejido tumoral.

En la autopsia se observó un tumor del orden de 3 a 4 cm de diámetro que infiltró la pared abdominal. Se observaron numerosos nódulos en la pared parietal del peritoneo, epiplón, mesenterio y entre 3 y 5 ml de hemoperitoneo con células neoplásicas en suspensión. (FOTO 23). El pulmón presentó lesiones hemorrágicas. La sobrevida de estos animales fue de 16 a 22 días. El empleo de cámaras con poros de 50 nm, no modificó la sobrevida de los animales . Los testigos implantados con cámaras conteniendo medio de cultivo Glasgow-Mem no desarrollaron tumor hasta los 180 días en que fueron sacrificados. TABLA XII .

Al igual que lo expresado en la parte A los resultados con cámaras de 50 nm sugieren la posible existencia de factores subvirales con actividad oncogénica.

TABLA XII: Evolución de las neoplasias por implantación de cámaras de difusión conteniendo células de la línea 169

Poros de la cámara	<u>animales con tumor</u> animales totales	tiempo de ¹ aparición	sobrevida días
450	$\frac{7}{8}$	10±3	19±5
220	$\frac{6}{6}$	10±2	22±3
50	$\frac{5}{5}$	12±3	20±2

(1) Se empleó la palpación como método de detección

Este tumor es transplantable y una suspensión acelular del mismo es capaz de inducir un mesotelioma cuando se inoculara por vía intraperitoneal en hamster.

FOTO 23: Animal sacrificado a los 20 días de implantada la cámara conteniendo $2 \cdot 10^7$ células de la línea 169. Se observan nódulos en la pared peritoneal y en mesenterio



I.9.1.10. RESULTADOS IN VITRO

Las experiencias realizadas "in vitro" tuvieron por objeto verificar los resultados obtenidos "in vivo" con el sobrenadante de cultivo, con la suspensión acelular del fibrosarcoma y con las cámaras de difusión, empleando los cultivos primarios de hamster.

I.9.1.10.1. Transformación de células de cultivos primarios de hamster por sobrenadante de cultivo de la línea celular 169

a) Transformación de cultivos primario de riñón

Las monocapas semiconfluentes de cultivos primarios de riñón infectadas, presentaron entre los 6 y 8 días modificaciones celulares caracterizadas por a: alteraciones morfológicas con células mas alargadas y delgadas, b: apilamiento celular en focos, c: desorientación celular. FOTOS 24 Y 25.

Estas células transformadas sustituyen rápidamente a las originales, las cuales experimentan un proceso degenerativo. La inoculación de $2 \cdot 10^6$ de estas células en hamster producen un fibrosarcoma. TABLA XIII.

b) Transformación de células de exudado peritoneal.

Estos cultivos presentaron a los 8 días de la infección la transformación de las células originales dando origen a dos tipos bien definidos de poblaciones celulares. Uno inicialmente predominante estuvo constituido por células

planas epiteliales con núcleo voluminoso y células multinucleadas. En la parte periférica de estos focos se observaron células fibroblásticas formando conglomerados sin orientación definida. Con la evolución del cultivo los focos fibroblásticos fueron sustituyendo a las células del tipo epitelial para ocupar la totalidad del cultivo. TABLA XIII.

Los subcultivos mantuvieron la estructura fibroblástica y la inoculación intraperitoneal del cultivo transformado en hamster dio lugar al desarrollo de un mesotelioma cuyo aspecto y evolución fue similar a la neoplasia original.

FOTO 24: Vista panorámica de un cultivo primario de células de riñón de hamster de 72 horas de cultivo.

FOTO 25: El cultivo anterior observado a los 15 días de la infección. Abundantes fibroblastos, falta de orientación celular y numerosos focos de transformación neoplásica.

FOTO 24

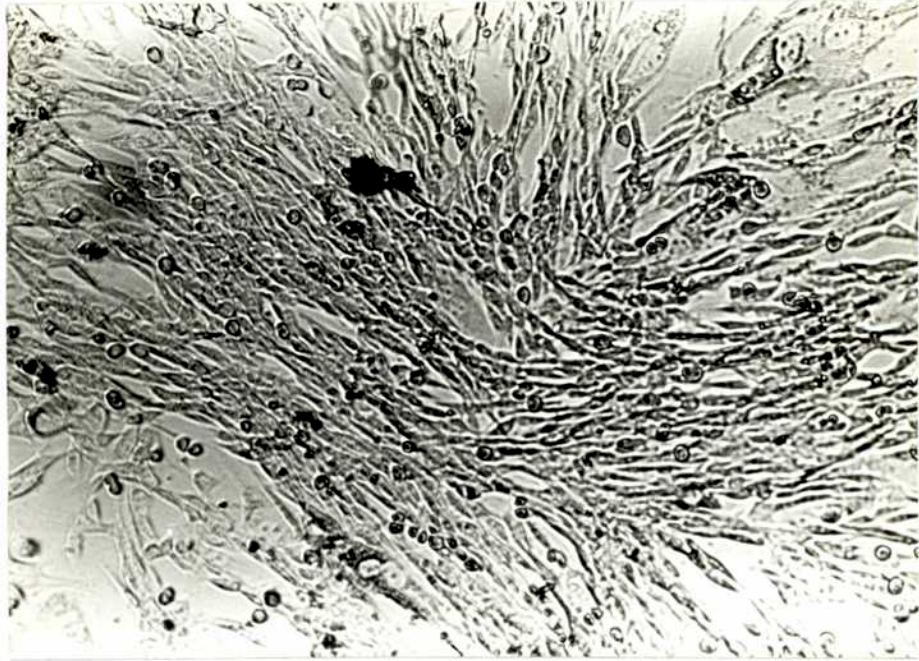
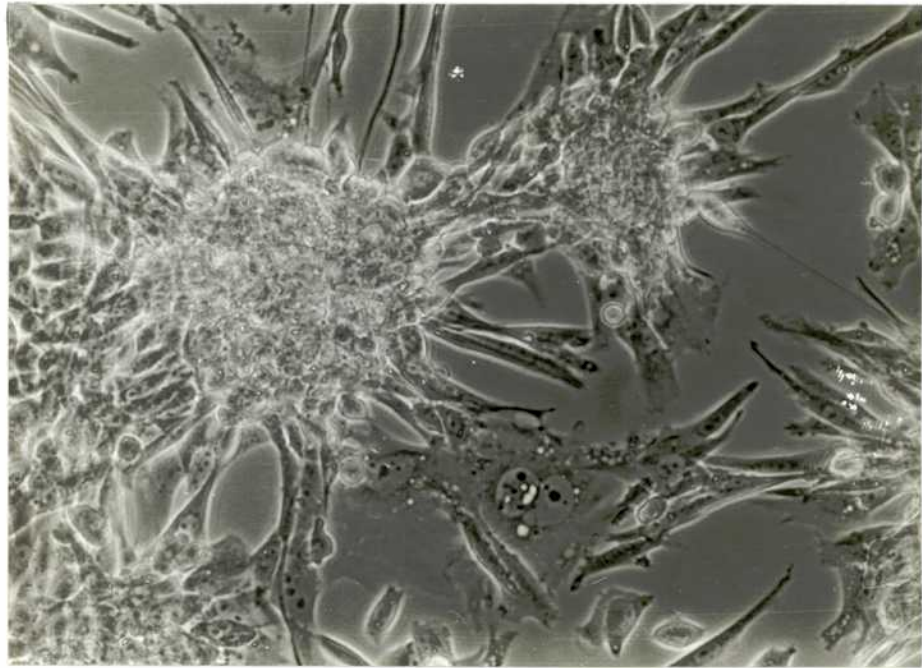


FOTO 25



I.9.1.10.2. Transformación de células de cultivos primarios de hamster por suspensión acelular del fibrosarcoma producido por inoculación de células de la línea 169 en hamster

a) Transformación de cultivo de embrión de hamster

Los cultivos de embrión de hamster puestos en contacto con el pellet del acelular experimentaron la transformación neoplásica. A los 4 días se observaron modificaciones morfológicas y de la orientación celular. A los 10 días se observaron focos de transformación formados por células redondeadas, multiestratificadas. Estos focos se encuentran rodeados por células alargadas de tipo fibroblástico sin orientación definida. Estas células reemplazan rápidamente a las normales formando múltiples focos que ocupan toda la superficie. TABLA XIII.

Las células transformadas fueron mantenidas hasta el tercer pasaje y luego inoculadas por vía subcutánea en el hamster, originando un fibrosarcoma.

b) Cultivo primario de riñón de hamster

Las monocapas semiconfluentes de cultivos primarios de riñón de hamster infectadas con el acelular presentaron a los 6 días modificaciones celulares similares a las experimentadas por los demás cultivos transformados. TABLA XIII.

Cuando estas células fueron inoculadas por vía subcutánea en hamster produjeron un fibrosarcoma.

TABLA XIII: Transformación de cultivos primarios de hamster por sobrenadante y suspensión acelular del fibrosarcoma

Cultivo celular	material infectante	$\frac{\text{fcos transf}}{\text{fcos infect}}$	transf ¹	$\frac{\text{animales/tumor}}{\text{animales totales}}$
	sobrenad.	$\frac{5}{6}$	6±2	$\frac{5}{5}$
Riñón hamster	susp acel	$\frac{4}{4}$	6±2	$\frac{4}{4}$
Exudado perit.	sobrenad	$\frac{5}{5}$	10±2	$\frac{5}{5}$
Emb.	Susp acel	$\frac{3}{3}$	8±2	$\frac{3}{3}$

(1) día en el cual el cultivo presentó las características de transformación

I.9.1.10.3. Transformación de células de cultivos primarios de hamster por células de la línea 169 alojadas en cámaras de difusión

Las cámaras de difusión con poros de 450, 220 y 50 nm conteniendo $20 \cdot 10^6$ células colocadas sobre cultivos primarios de células de exudado peritoneal o de riñón de hamster recién nacido indujeron transformación celular entre los 10 y 12 días en el primer caso y entre los 6 y 8 en el segundo. En ambos casos la transformación presentó características similares a las obtenidas con el sobrenadante de cultivo.

Cuando fueron colocadas sobre cultivos embrionarios de hamster se observaron modificaciones morfológicas y de orientación. A los 7 días predominan células fibroblásticas entrecruzadas y formando focos de transformación característicos. Estas células fueron mantenidas hasta el tercer repique y luego inoculadas por vía subcutánea en el dorso del hamster, originando un fibrosarcoma.

El empleo de cámaras con poros de 50 nm colocadas sobre cultivos primarios de riñón y de exudado peritoneal reprodujo los resultados obtenidos "in vivo".

Se observó la transformación neoplásica del cultivo entre los 6 y 8 días. Las características morfológicas fueron similares a las descritas para la transformación por el sobrenadante y suspensión acelular. TABLA XIV

Esto sugiere, al igual que lo obtenido en la parte A, la posible existencia de factores de menor peso molecular que el virus-like que poseen actividad transformante.

TABLA XIV: Transformación de células de cultivos primarios por cámaras de difusión conteniendo células 169

Cultivo celular	poro de la cámara	$\frac{\text{fcos.infect.}}{\text{fcos.transf.}}$	transf (1)	$\frac{\text{animales/tumor}}{\text{animales totales}}$
	450	$\frac{4}{4}$	6 ± 2	$\frac{5}{5}$
Riñón de hamster	220	$\frac{3}{4}$	6 ± 2	$\frac{5}{5}$
	50	$\frac{2}{3}$	6 ± 2	$\frac{2}{2}$
	450	$\frac{8}{10}$	10 ± 2	$\frac{5}{5}$
Exudado peritoneal	220	$\frac{9}{10}$	10 ± 2	$\frac{5}{5}$
	50	$\frac{2}{2}$	10 ± 2	$\frac{2}{2}$
Embrionario	220	$\frac{5}{5}$	7 ± 2	$\frac{5}{5}$

(1) días a los cuales se comienza a percibir la transformación

I.10. RESUMEN DE LAS EXPERIENCIAS Y RESULTADOS DE LA PARTE C

I.10.1. Experiencias y resultados obtenidos con las células de la línea 169.

Material utilizado	Vía de inoculación		Cultivos primarios		
	SC	IP	Riñón	Exud. peritoneal	Embr
Células	+(1)	+(1)			
Células	+(2)	nd			
Células	-(3)	+(3)			
Susp. acelular de células	+(1)	+(1)	nd	nd	nd
Susp. acelular de fibrosarcoma	+(1)	+(1)	+	nd	+
Cámara de difusión	nd	+(1)	+	+	+

Microscopía electrónica: se observan partículas

- (1) Las experiencias se realizaron en hamsters
 (2) Las experiencias se realizaron en ratones N:NIH/nu/nu
 (3) Las experiencias se realizaron en ratones BALB/c

+ "in vivo" se obtuvo a tumor en los animales
 + "in vitro" se obtuvo transformación del cultivo
 - "in vivo" no se obtuvo neoplasia en los animales
 nd no determinado

I.10.2. Experiencias y resultados obtenidos con sobrenadante
del cultivo de células de la línea 169

Procesado del sobren.	Vía de inoculación		Cultivos primarios		
	SC	IP	Riñón	Exud. peritoneal	Embrionario
Filtrado	nd	+(1)	+	+	nd

(1) Las experiencias se realizaron en hamsters

+ "in vivo" se obtuvo tumor en los animales

+ "in vitro" se obtuvo transformación del cultivo

nd no determinado

I.11. PARTE D

I.11.1. RESULTADOS IN VIVO

Las experiencias realizadas y los resultados obtenidos en esta parte se resumen en I.12.

I.11.1.1 Evolución del tumor ascítico en hamster irradiado por inoculación intraperitoneal de células de la línea BHK-21(C-13)S

Se inocularon por vía intraperitoneal $5 \cdot 10^6$ células BHK-21(C-13)S en hamster totalmente irradiados. Todos los pasajes sucesivos fueron realizados en animales inmunodeprimidos.

Al igual que con las BHK-21(C-13) se obtuvo un tumor ascítico con una concentración celular de 70 a $80 \cdot 10^6$ cel/ml, que en este caso redujo la sobrevivencia del animal a 7 o 9 días desde el comienzo de la experiencia.

Las características morfológicas macroscópicas de la neoplasia son similares a la obtenida con BHK-21(C-13). Se observaron nódulos en mesenterio, curvatura mayor y menor de estomago, pared peritoneal y entre 5 y 7 ml de líquido ascítico hemorrágico. Se observaron metástasis pulmonares.

Luego de 10 pasajes las células fueron cultivadas "in vitro" originándose una nueva línea celular denominada 215.

La observación microscópica de las células de esta línea no mostró las características propias de un mesotelioma.

I.11.1.2 Evolución del tumor ascítico en ratones de la cepa N:NIH/nu/nu por inoculación intraperitoneal de células de la línea BHK-21(C-13)S

Con el objeto de estudiar las posibles modificaciones del comportamiento de las células BHK-21(C-13)S luego del pasaje por ratones N:NIH/nu/nu naturalmente inmunodeprimidos, se inocularon por vía intraperitoneal $5 \cdot 10^6$ células BHK-21(C-13)S, originándose un tumor ascítico que mata al animal entre los 8 y 10 días.

Se observaron nódulos en mesenterio, pared abdominal, diafragma etc.. Al séptimo día el animal presenta 2 a 4 ml de líquido ascítico con una concentración de aproximadamente $60 \cdot 10^6$ cel/ml.

Entre los 10 y 15 pasajes se realizó el cariotipo de estas células confirmándose que son células de hamster, y cuando son inoculadas por vía intraperitoneal en hamster reproducen el tumor ascítico.

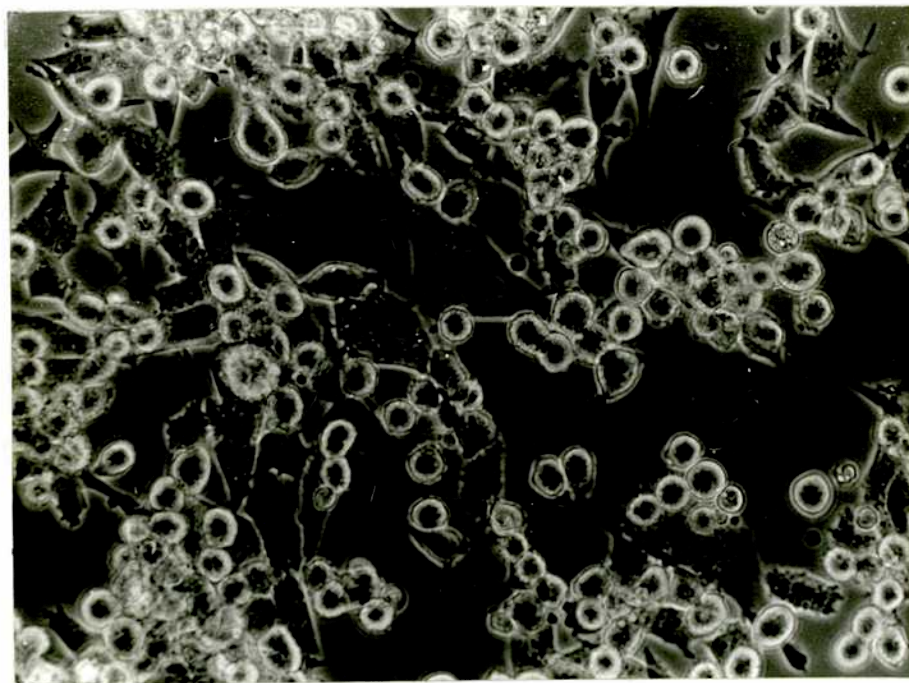
El cultivo en monocapa de este tumor ascítico dió origen a otra línea celular denominada 15.

I.11.1.3 Aspecto morfológico y estudio por M.E. de las células de las líneas 215 y 15

Ambas líneas celulares son morfológicamente similares a las BHK-21(C-13)S. Se observaron células redondas adheridas, otras en suspensión, algunas con aspecto epitelial multinucleadas y algunos fibroblastos. FOTO 26

El examen por M.E. no reveló ninguna diferencia entre las líneas 15, 215 y BHK-21(C-13)S. En toda ellas no se pudo detectar la presencia de partículas luego de observar entre 50 y 70 células.

FOTO 26: Cultivo de células de la línea 215 luego de 10 pasajes "in vitro". Se observan algunos fibroblastos células redondas en suspensión y otras adheridas y multinucleadas



I.11.1.4 Evolución de las experiencias "in vivo" e "in vitro" con células de las líneas 215 y 15

Empleando ambas líneas celulares no fue posible obtener la transformación "in vitro" de cultivos primarios de células de riñón y exudado peritoneal ya sea utilizando el sobrenadante, el pellet del sobrenadante o cámaras de difusión.

En todos los casos los cultivos primarios luego de 30 a 35 días fueron descartados.

"In vivo" no fue posible obtener neoplasias en hamster por la implantación de cámaras de difusión conteniendo estas células.

Dado que no se obtuvieron resultados positivos "in vitro" con el pellet del sobrenadante no se realizaron experiencias "in vivo" con este material.

I.11.1.5 Análisis de la capacidad oncogénica de células de las líneas 215 y 15 por inoculación subcutánea e intraperitoneal en ratones de la cepa BALB/c

Con el objeto de comparar la línea 215 y 15 con las BHK-21(C-13) y BHK-21(C-13)S y ver si el pasaje por hamster inmunodeprimidos y por ratones de la cepa N:NIH/nu/nu, en el caso de las células BHK-21(C-13)S, modificaba el comportamiento celular en animales de otra especie, se inocularon estas células en ratones BALB/c.

La inoculación por vía subcutánea de $2 \cdot 10^7$ células produce una tumoración de 0,3 cm de diámetro luego de 7 días

en el lugar de inoculación que no es transplantable y desaparece progresivamente hasta hacerlo totalmente a los 20 días.

La inoculación intraperitoneal de $2 \cdot 10^7$ células produjo entre los 4 y 6 días un tumor ascítico obteniéndose una concentración celular de hasta $80 \cdot 10^6$ cel/ml. Estas células son transplantables a otro animal de la misma especie inoculando igual cantidad de células y son capaces de producir un sarcoma cuando son vueltas a inocular en el hamster por vía subcutánea.

A partir de los 7 a 9 días la concentración de células en el líquido ascítico disminuye, así como la distensión abdominal y entre los 10 y 12 días ya no se pueden extraer células, permaneciendo el animal con aspecto normal. Se siguió su evolución durante 180 días no observándose ninguna alteración. La producción del líquido ascítico no fue observada con la inoculación de $2 \cdot 10^7$ células BHK-21(C-13) o BHK-21(C-13)S.

Por estudios cromosómicos se comprobó que las células del líquido ascítico, son células de hamster.

Esto confirma que el pasaje de las células por los animales inmunodeprimidos facilita la selección de una población celular con actividad oncogénica distinta a la original.

I.12. RESUMEN DE LAS EXPERIENCIAS Y RESULTADOS DE LA PARTE D

I.12.1. Experiencias y resultados obtenidos con las células
de las líneas 215 y 15

Material utilizado	Vía de inoculación		Cultivos primarios		
	SC	IP	Riñón	Exud. peritoneal	Embr.
Células 215	nd(1)	+(1)			
Células 215	nd(2)	nd(2)			
Células 215	-(3)	+(3)			
Cámaras de difusión con células 215	nd	-(1)	-	-	nd
Células 15	nd	+(1)			
Células 15	nd	+(2)			
Células 15	-(3)	+(3)			
Cámaras de difusión con células 15	nd	-(1)	-	-	nd

Microscopía electrónica: no se observaron partículas en
ambas líneas.

- (1) Las experiencias se realizaron en hamsters
(2) Las experiencias se realizaron en ratones N:NIH/nu/nu
(3) Las experiencias se realizaron en ratones BALB/c

+ "in vivo" se obtuvo tumor en los animales
- "in vivo" no se obtuvo neoplasia en los animales
- "in vitro" no se obtuvo transformación del cultivo
nd no determinado

I.12.2. Experiencias y resultados obtenidos con sobrenadantes de las líneas 215 y 15

Procesado del sobren.	Vía de inoculación		Cultivos primarios		
	SC	IP	Riñón	Exud peritoneal	Embr.
Filtrado	nd	nd	-	-	nd
Pellet de 100000 xg	nd	nd	-	-	nd

- "in vitro"	no se obtuvo la transformación del cultivo				
nd	no determinado				

I.13. DISCUSION DE LAS PARTES C Y D

La inoculación de células BHK-21(C-13) en hamster irradiados indujo la formación de un mesotelioma mixto de cavidad peritoneal que se mantiene en animales normales, siendo la sobrevida de 6 a 7 días. A partir de este mesotelioma se originó una línea celular denominada 169. La reinoculación de estas células luego de 60 pasajes "in vitro" o mantenidas congeladas en nitrógeno líquido entre 3 y 5 años reproduce el mesotelioma original. Cuando $2 \cdot 10^6$ células de la línea 169 o del mesotelioma son inoculadas por vía subcutánea en hamster, producen un sarcoma muy anaplásico que mata al animal en 30 a 40 días y cuando son inoculadas en ratones N:NIH/nu/nu producen un sarcoma que mata al animal en 15 a 20 días.

Los estudios de M.E. confirman la presencia de partículas virus-like de 80 a 100 nm de diámetro con ubicación citoplasmática dentro de las vacuolas con una morfología radial similar a las observadas en las BHK-21(C-13).

La infección de cultivos primarios por el sobrenadante de células 169 induce entre los 6 y 10 días las características de transformación, confirmada por la inoculación de estas células en hamster, con la producción de una neoplasia.

El empleo de cámaras de difusión con poros de 450, 220 y 50 nm conteniendo células del mesotelioma inducen la transformación de cultivos primarios entre los 8 y 10 días, confirmándose por la inoculación de estas células en hamster con la producción de un sarcoma.

Cuando las cámaras fueron implantadas en la cavidad peritoneal del hamster se obtuvo una neoplasia que mató al animal entre los 15 y 20 días.

Las suspensiones acelulares obtenidas del fibrosarcoma inducen la formación de un mesotelioma o fibrosarcoma cuando son inoculadas intraperitonealmente o por vía subcutánea.

La inoculación intraperitoneal del sobrenadante de la línea 169 indujo un mesotelioma con características similares al originado por las células. Esto dio la posibilidad de utilizar este medio como fuente de partículas para ensayar su aislamiento y caracterización.

Se realizaron experiencias para comprobar si el pasaje de las células BHK-21(C-13)S por animales inmunodeprimidos (hamster y ratones N:NIH/nu/nu) permitiría obtener resultados similares a los logrados con las BHK-21(C-13), es decir, la selección de una población con mayor cantidad de partículas virus-like y la posible inducción de una neoplasia "in vivo e "in vitro" por las suspensiones acelulares.

Los resultados indican que el pasaje por animales inmunodeprimidos permite la selección de células con mayor capacidad oncogénica, ya que se obtuvo la formación de líquido ascítico en ratones BALB/c con las líneas 215 y 15, pero no favoreció la expresión de partículas completas ya que, por M.E. no se las pudo observar en la línea 215 ni en la 15.

Tampoco fue posible obtener con ambas líneas la transformación de cultivos primarios ni la inducción de tumores in vivo por material libre de células.

I.13 CONCLUSIONES DEL CAPITULO I

I.13.1 Cuadros comparativos y conclusiones del capítulo

Evolución de las neoplasias por inoculación de células de las líneas BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S, 169, 215 y 15.

Línea celular	Hamster		Ratón N:NIH/nu/nu		Ratón BALB/c	
	SC	IP	SC	IP	SC	IP
BHK-21(C-13)	+	+	+	nd	-	-
BHK-21(C-13)S	+	+	+	+	-	-
169	+	+	nd	+	-	+
215	nd	+	nd	nd	-	-
15	nd	+	nd	+	-	+

+ "in vivo" se obtuvo a tumor en los animales

- "in vivo" no se obtuvo neoplasia en los animales

nd no determinado

Resultados empleando el sobrenadante de cultivo de células de las líneas BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S, 169, 215 y 15.

Línea celular	Sobrenadante de cultivo		Pellet del sobrenadante	
	Hamster	Cultivo	Hamster	Cultivo
BHK-21(C-13)	-	+	-	+
BHK-21(C-13)S	-	-	-	-
169	+	+	nd	nd
215	nd	-	nd	-
15	nd	-	nd	-

+ "in vivo" se obtuvo a tumor en los animales
 + "in vitro" se obtuvo transformación del cultivo
 - "in vivo" no se obtuvo neoplasia en los animales
 - "in vitro" no se obtuvo transformación del cultivo
 nd no determinado

Ensayo de actividad oncogénica de suspensiones acelulares de células de las líneas BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S, 169, 215 y 15.

Línea celular	Inoculación en hamster		Infección de cultivos primarios
	SC	IP	
BHK-21(C-13)	nd	-	+
BHK-21(C-13)S	nd	nd	nd
169	+	+	nd
215	nd	nd	nd
15	nd	nd	nd

+ "in vivo"	se obtuvo a tumor en los animales		
- "in vivo"	no se obtuvo neoplasia en los animales		
+ "in vitro"	se obtuvo transformación del cultivo		
nd	no determinado		

Ensayo de actividad oncogénica de la suspensión acelular del fibrosarcoma, producido en hamster, por inoculación de células de las líneas BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S, 169, 215 y 15

Fibrosarcoma producido por células	Inoculación en hamster		Infección de cultivos primarios
	SC	IP	
BHK-21(C-13)	nd	-	+
169	+	+	+

+ "in vivo"	se obtuvo a tumor en los animales		
+ "in vitro"	se obtuvo transformación del cultivo		
- "in vivo"	no se obtuvo neoplasia en los animales		
nd	no determinado		

Resultados empleando cámaras de difusión conteniendo células de las líneas BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S, 169, 215 y 15.

Células contenidas en las cámaras de difusión	"In vivo"	"In vitro"
BHK-21(C-13)	+	+
BHK-21(C-13)S	-	-
169	+	+
215	-	-
15	-	-

+ "in vivo" se obtuvo a tumor en los animales

+ "in vitro" se obtuvo transformación del cultivo

- "in vivo" no se obtuvo neoplasia en los animales

- "in vitro" no se obtuvo transformación del cultivo

Presencia de partículas virus-like en las células de las líneas BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S, 169, 215 y 15.

Línea celular	Presencia de partículas
BHK-21(C-13)	+
BHK-21(C-13)S	-
169	+
215	-
15	-

En este capítulo se demostró que:

a) los tiempos de duplicación de la población celular "in vitro" son iguales para las células de las líneas BHK-21(C-13), BHK-21(C-13)S y 169.

"In vivo" el comportamiento de la línea BHK-21(C-13) difiere de las otras dos líneas. A igual número de células ($2 \cdot 10^6$) inoculadas por la misma vía, las BHK-21(C-13)S y las 169 desarrollan neoplasias en los animales con las siguientes características: 1) tiempo de aparición mas breve, 2) desarrollo mas rápido y 3) menor sobrevida del huésped.

Esta diferencia de comportamiento se podría atribuir a que los cultivos de las líneas BHK-21(C-13)S y 169 presentan características acentuadas de transformación celular (anisocitosis, células gigantes multinucleadas, y desorganización con tendencia a la multiestratificación)

Por el contrario la línea BHK-21(C-13) presenta un crecimiento en monocapa con mayor uniformidad y orientación celular.

Esta característica de mayor grado de transformación de los cultivos de las líneas BHK-21(C-13)S y 169 observadas en cultivo, a pesar de su similar tiempo de duplicación, se expresarían mas fácilmente "in vivo" al contar el tumor con un estroma muy vascularizado que le provee los medios nutritivos necesarios incrementando de esta manera su fracción de crecimiento y reduciendo su pérdida celular

b) las células BHK-21(C-13) producen y liberan un factor particulado con capacidad de inducir la transformación neoplásica de cultivos primarios de hamster. La producción de tumores "in vivo", en las condiciones experimentales

empleadas en el presente trabajo sugiere que esta partícula esta involucrada en el proceso neoplásico sin descartar la existencia de otros factores.

c) que la transformación de cultivos primarios y la inducción de tumores "in vivo" por material libre de células, proveniente de células BHK-21(C-13), esta asociada a la presencia de partículas virus-like intracitoplasmáticas ya que los sobrenadantes de las células BHK-21(C-13)S (que no presentan estas partículas) no indujeron la transformación "in vitro" ni tampoco "in vivo" cuando se utilizaron cámaras de difusión

d) el pasaje de las células BHK-21(C-13) por hamster inmunodeprimidos por radiaciones ionizantes (Rx), permitió la inducción de una neoplasia de origen mesotelial y la selección de una población celular con mayor capacidad oncogénica (169) , portadora de mayor número de partículas, las cuales libera al sobrenadante.

e) el pasaje de las células BHK-21(C-13)S por animales inmunodeprimidos (hamster irradiados o ratones N:NIH/nu/nu) no favoreció la expresión de partículas virus-like completas aunque permitió la selección de una población celular con mayor capacidad oncogénica que la original, capaz de producir un tumor ascítico en ratones de la cepa BALB/c.

f) la existencia de fracciones subvirales con actividad transformante que atraviesan poros de 50 nm esta asociada a la presencia de partículas virus-like, dado que empleando las líneas BHK-21(C-13)S, 215 o 15 no se obtuvieron

neoplasias "in vivo" ni transformación "in vitro" aun con cámaras de 450 nm.

El hecho que el sobrenadante de las células de la línea 169, induzca una neoplasia "in vivo" y que los cultivos primarios de hamster, sean un medio adecuado para expresar la actividad biológica de esta partícula, hizo que se encarara el aislamiento y caracterización bioquímica de la misma.

CAPITULO II

II.1 OBJETIVOS

Varios autores han demostrado, por técnicas de M.E. que las células de la línea BHK-21(C-13) y diversos clones derivados de ella, son portadores de una partícula de aspecto viral (31,63,78,104). La actividad biológica de la misma aún no había sido demostrada aunque se la responsabilizó de las propiedades oncogénicas de estas células (12,31,104) . Se ha demostrado además, que pasan al sobrenadante de cultivo a partir del cual pueden ser aisladas (3,95).

Estudios realizados por E. Albu y K. Holmes (3) con células de la línea BHK-21(C-13)F permitieron el aislamiento y caracterización parcial de la partícula, que definieron como virus-like.

Su ácido nucleico es ARN con un coeficiente de sedimentación que varía entre 60 y 70 en gradiente de sacarosa con un peso molecular de 10^7 D estimado por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Los resultados obtenidos en el capítulo I demostraron que las células de las líneas BHK-21(C-13) y 169 son portadoras de partículas virus-like, observándose mayor concentración en estas últimas.

Se demostró en los sobrenadantes de cultivo de estas líneas, una fracción particulada que posee la capacidad de transformar cultivos primarios de hamster.

Por otra parte, a diferencia de lo ocurrido con el sobrenadante de cultivo de células BHK-21(C-13), la inoculación intraperitoneal, en hamster del sobrenadante de la línea 169 indujo un mesotelioma. Esto sugirió que en este medio habría mayor cantidad de partículas que en el de las células BHK-21(C-13) pues se demostró que existe correlación entre concentración de partículas endógenas y actividad transformante del sobrenadante (Capítulo I, parte A y B).

Una segunda interpretación sugiere que el pasaje de las células BHK-21(C-13) por hamster irradiados aumentaría la capacidad transformante del virus-like ya que "in vitro" la transformación de cultivos primarios fue detectada antes que empleando el sobrenadante de la línea original.

Utilizando como base la metodología empleada por Albu y Holmes (3) se realizó el aislamiento y parcial caracterización de la partícula partiendo del sobrenadante de la línea 169.

Este sistema posee la ventaja de ser mas simple que la suspensión acelular pues, no es necesaria la rotura de las células, esta relativamente libre de restos celulares y es de fácil obtención.

Teniendo en cuenta los resultados del capítulo I, los objetivos de este capítulo fueron:

a) Marcación de las células de la línea 169 con ^3H Uridina.

b) Comprobar si existe una fracción particulada en el sobrenadante de la línea 169 que haya incorporado el isótopo.

c) Si se produjo incorporación encarar el aislamiento y purificación de dicha fracción.

d) Confirmar que la incorporación del radionucleído se realizó al ARN de una estructura que no es degradable por ribonucleasa.

e) Observar por microscopia electrónica el aspecto morfológico de esta fracción.

f) Comprobar su actividad biológica infectando cultivos embrionarios de hamster, y poder así considerarlo como un nuevo virus oncogénico.

g) De acuerdo a los resultados obtenidos en (f), iniciar los estudios de caracterización con el fin de determinar a que sub familia de virus oncogénicos pertenece.

II.2. MATERIALES Y METODOS

II.2.1 Cultivos celulares

Con el fin de obtener un volumen considerable de sobrenadante para iniciar el aislamiento, se adaptó a crecer en suspensión la línea 169 originalmente mantenida en monocapa.

Luego de 30 días de subcultivos se obtuvo una línea que crece normalmente en suspensión y llega a una concentración de 2 a $2,2 \cdot 10^6$ cel/ml. Se la mantiene con agitación en medio Glasgow-Mem similar al empleado para el mantenimiento de la línea BHK-21(C-13)S y en las mismas condiciones de agitación. Los sucesivos subcultivos se realizaron transfiriendo $2 \cdot 10^5$ cel/ml al nuevo frasco.

II.2.2. Marcación del cultivo

A 250 ml de cultivo de células de la línea 169 creciendo en fase logarítmica con una concentración de 6 a $8 \cdot 10^5$ cel/ml se le agregó 20 Ci/ml de ^3H -Uridina (Uridina 5,6- ^3H , 40 Ci/mmol Dupont).

Luego de 20 horas de incubación las células se centrifugaron 15 min a $800 \times g$, se resuspendieron en 50 ml de SSHA, se centrifugaron otros 15 min a $800 \times g$. Estas células son resuspendidas nuevamente en 50 ml de SSHA, vueltas a centrifugar y finalmente resuspendidas en 500 ml de medio. La extracción del sobrenadante como fuente de partículas se realizó a las 48 horas de extraída la marcación.

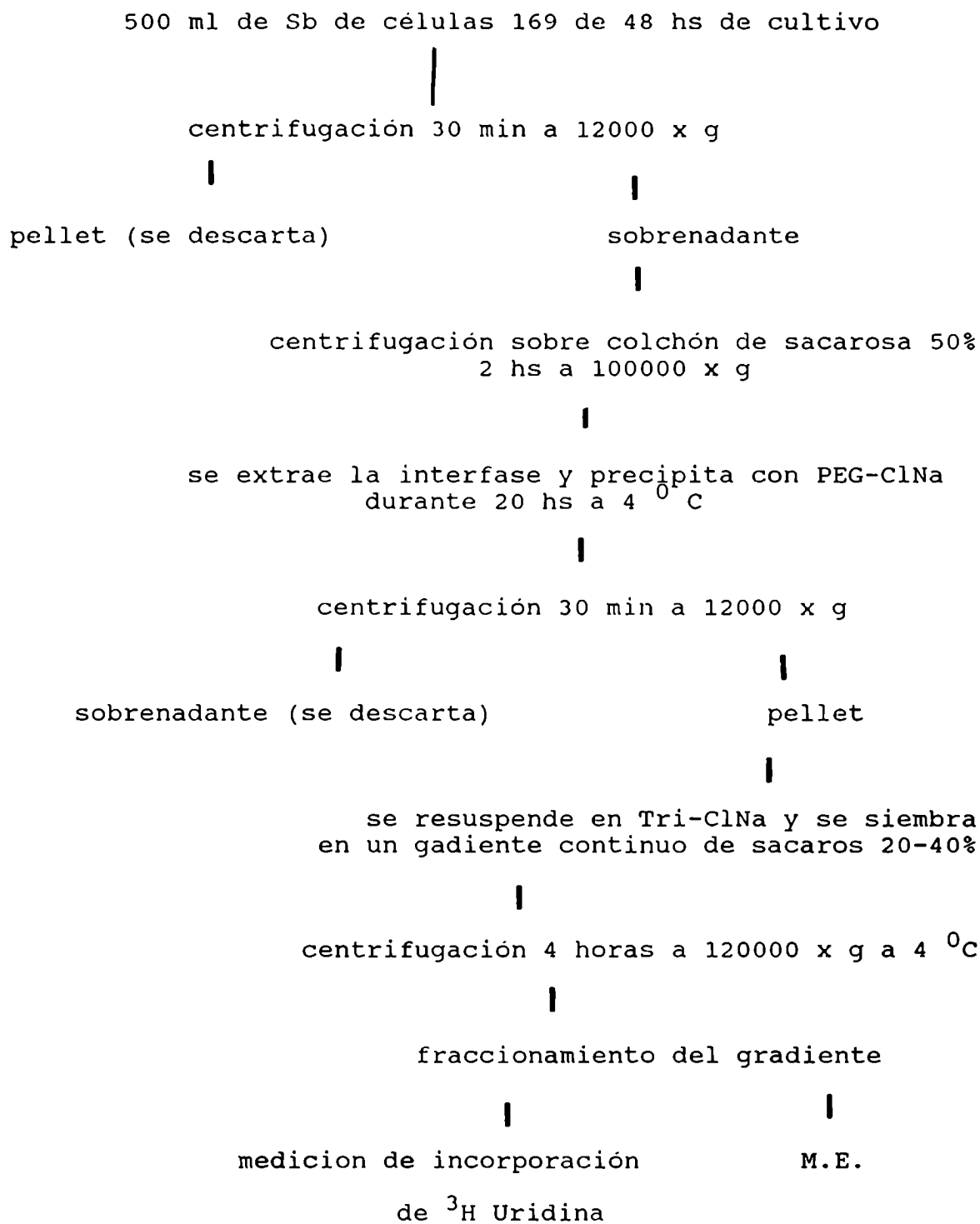
II.2.3. Aislamiento de la partícula

Para el aislamiento de la partícula 500 ml del sobrenadante de la línea 169 fueron centrifugados 30 min a 12000 x g a 4 °C para extraer células y restos celulares. El sobrenadante se sembró sobre un colchón de sacarosa al 50% (Sigma) en buffer Tris-ClNa (50 mM Tris, PH 7,4, 100 mM ClNa) con 1% de albúmina bovina (Sigma). Se centrifugó 120 min a 100000 x g a 4 °C en rotor Beckman SW 40. La interfase fue recogida con pipeta Pasteur y precipitada con polietilenglicol-6000 (PEG-6000), 7,5% en ClNa 1 M, por agitación durante 20 horas a 4 °C.

La suspensión fue centrifugada 30 min a 12000 x g a 4 °C en rotor SS34 Sorvall, resuspendida en 0,1 del volumen original en buffer Tris-ClNa y sembrada en un gradiente continuo de sacarosa 20-40%. Se centrifugó 4 horas a 120000 x g a 4 °C en rotor Beckman SW 25.

El gradiente se fraccionó en alícuotas de 1 ml introduciendo un capilar hasta el fondo del tubo de centrifuga y extrayendo la solución con una bomba peristáltica. De cada fracción se montaron grillas para ser observadas al M.E. y se extrajeron 100 l para cuantificar la incorporación de ³H Uridina.

Un resumen de la metodología empleada para la purificación viral fue la siguiente



II.2.4. Microscopía electrónica

Para la observación fue depositada una gota de cada fracción del gradiente sobre una grilla (cubierta con Formvar y sombreada con carbón). Luego de 60 segundos se secó el exceso de muestra y se lavó colocando una gota de agua destilada, luego se absorbió el agua y se tiñó con acetato de uranilo 2% en agua durante 60 segundos.

Las grillas fueron observadas en un microscopio Jeol 300 o Philips 300. Las fracciones conteniendo las posibles partículas fueron mezcladas, diluidas 5 veces su volumen en buffer Tris-ClNa y reprecipitadas por ultracentrifugación durante 1 hora a 200000 x g a 4⁰ C en rotor Beckman SW 65. El pellet se resuspendió en 10 l totales de buffer Tris-ClNa se montaron nuevamente grillas y procediendo como se indicó anteriormente fueron nuevamente teñidas y observadas

II.2.5. Medición de la actividad incorporada

Se extrajo 100 l de cada fracción del gradiente, se agregó como carrier 50 g de RNA de levadura (Sigma) y se precipitó con 1 ml de ácido tricloro acético 10 % (TCA). Luego se filtró por filtros de 450 nm de poro (tipo Millipore) los cuales se lavaron con 10 ml de TCA frío y dejó secar a 37⁰C.

Los filtros son colocados en viales con 10 ml de solución centelladora (solvente principal Tolueno, centellador

primario 2,5-difenioxazol 4 g/l (PPO) y se contó la actividad en un contador de centelleo líquido Tri-carb.

II.2.6. Análisis con Ribonucleasa

Para el análisis de resistencia a ribonucleasa se partió de 500 ml de sobrenadante de cultivo y se procedió como en II.2.3.

Las fracciones que presentaron actividad fueron mezcladas, diluidas a 5 veces su volumen con buffer Tris-ClNa y reprecipitadas por ultracentrifugación durante 1 hora a 200000 x g. El pellet se resuspendió en 1 ml y la mitad de la muestra se llevó a 10 g/ml de Ribonucleasa pancreática bovina A (Sigma tipo II A). Se incubó 30 min a 37 °C. La otra mitad de la muestra permaneció en iguales condiciones pero sin tratamiento enzimático.

Ambas fracciones se sembraron en un gradiente continuo de sacarosa 20-40 % y se centrifugó 4 horas a 120000 x g. Se fraccionó el gradiente en alícuotas de 1 ml y se midió la actividad como ya se describió.

II.2.7. Análisis electroforético en geles de poliacrilamida

Para el análisis electroforético de las proteínas del virus-like se partió de 500 ml de sobrenadante de cultivo.

Siguiendo la metodología descrita en II.2.3., se obtuvieron las fracciones que incorporaron el radionucleido, las que fueron mezcladas y diluidas hasta 5 veces su volumen

con buffer Tris-ClNa. Posteriormente se centrifugó 1 hora a 200000 x g en rotor Beckman SW 65 y el pellet se resuspendió en 5 ml de buffer muestra compuesto por Tris-ClH 0,0625 M, PH 6,8, Dodecilsulfato de sodio (SDS) 2%, Glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5% y 0,001% de azul de bromofenol (68).

Las proteínas de la partícula fueron disociadas calentándolas 90 segundos en agua a 100 °C.

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida en placa utilizando un gel concentrador con una concentración final de acrilamida del 3% p/v , 0,08% p/v de N N'-bis-metilenacrilamida y una concentración final de Tris-ClH 0,125 M PH 6,8, SDS 0,1% y 0,01% de persulfato de amonio. La polimerización se indujo por el agregado de 0,025% v/v de tetrametiletilendiamino (Temed).

La concentración del gel separador fue 10% p/v 0,8% p/v de N N'-bismetilenacrilamida, Tris-ClH 0,375 M PH 8,8 , SDS 0,1% y persulfato de amonio 0,01%.

El gel se polimerizó en las mismas condiciones que el gel concentrador. La concentración del buffer de los electodos fue Tris 0,025 M, glicina 0,192 M y SDS 0,1% p/v.

La electroforésis se llevó a cabo a corriente constante (15 mA) hasta que el colorante indicador llegó al final del gel.(68).

Finalizada la corrida el gel se sumergió durante 5 min en 200 ml de una solución compuesta por 0,0034 M de dicromato de potasio y 0,0032 N de ácido nítrico. Posteriormente se lavó con agua desionizada durante periodos de 30-60 segundos y se lo sumergió en una solución 0,012 M de nitrato de plata durante 30 segundos. A continuación se lo lavó con

dos porciones de 300 ml de solución de carbonato de sodio 0,28 M y 0,5 ml/l de formol.

Se dejó hasta que la imagen apareció y se detuvo el revelado extrayendo la solución anterior y agregando 100 ml de ácido acético 1% p/v (85).

Se utilizaron como marcadores de PM: fosforilasa b (PM 97400), albúmina bovina (PM 66000), ovoalbúmina (PM 45000), B-lactoglobulina (PM 18400) y lisozima (PM 14000), todos marca Sigma.

II.2.8. Infección del cultivo primario de embrión de hamster

Se utilizó un cultivo de embrión de hamster obtenido como se describió en (I.3.8.). La infección se realizó con el pellet obtenido por centrifugación durante 1 hora a 200000 x g de las fracciones que presentaron incorporación de ^3H Uridina previamente diluidas 5 veces en buffer Tris-ClNa. Este pellet proveniente de 500 ml de sobrenadante de cultivo se resuspendió en 2 ml de medio de cultivo Glasgow-Mem y se utilizó para infectar 2 frascos de 25 cm² de área cada uno. Se dejó incubar 2 horas a 37 °C con agitación periódica, posteriormente se agregó 3 ml de medio sin extraer el inóculo. A las 24 horas se realizó el primer cambio de medio.

II.3. RESULTADOS

II.3.1. Características morfológicas del virus-like intracitoplasmático

Los cortes de células de la línea 169 vistos por M.E. muestran estas partículas dentro de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso generalmente asociadas en grupos de 2 o más o eventualmente solas, FOTO 27, en estas experiencias una sola vez se observó una partícula entre la membrana nuclear. FOTO 28. No se observaron partículas brotando de la membrana plasmática ni libres en el citoplasma o en el núcleo.

Morfológicamente estas partículas están presentes en 2 formas, una redondeada y otra elongada. Según otros autores (7,92) las primeras se originarían por clivaje de las segundas. Ambas poseen un núcleo electrónicamente denso rodeado por una cubierta separada del mismo por estructuras similares a rayos que le dan el aspecto de rueda de carro.

FOTO 27: En la figura se observan las partículas dentro de las cisternas, la ultraestructura ya ha sido descrita en detalle por otros autores. Posee un diámetro de 80-100 nm y un núcleo de 45-50 nm, se ha observado densas líneas radiales que van del núcleo al exterior dando el aspecto de rueda de carro

FOTO 28: La flecha señala una partícula entre la membrana nuclear.

FOTO 27

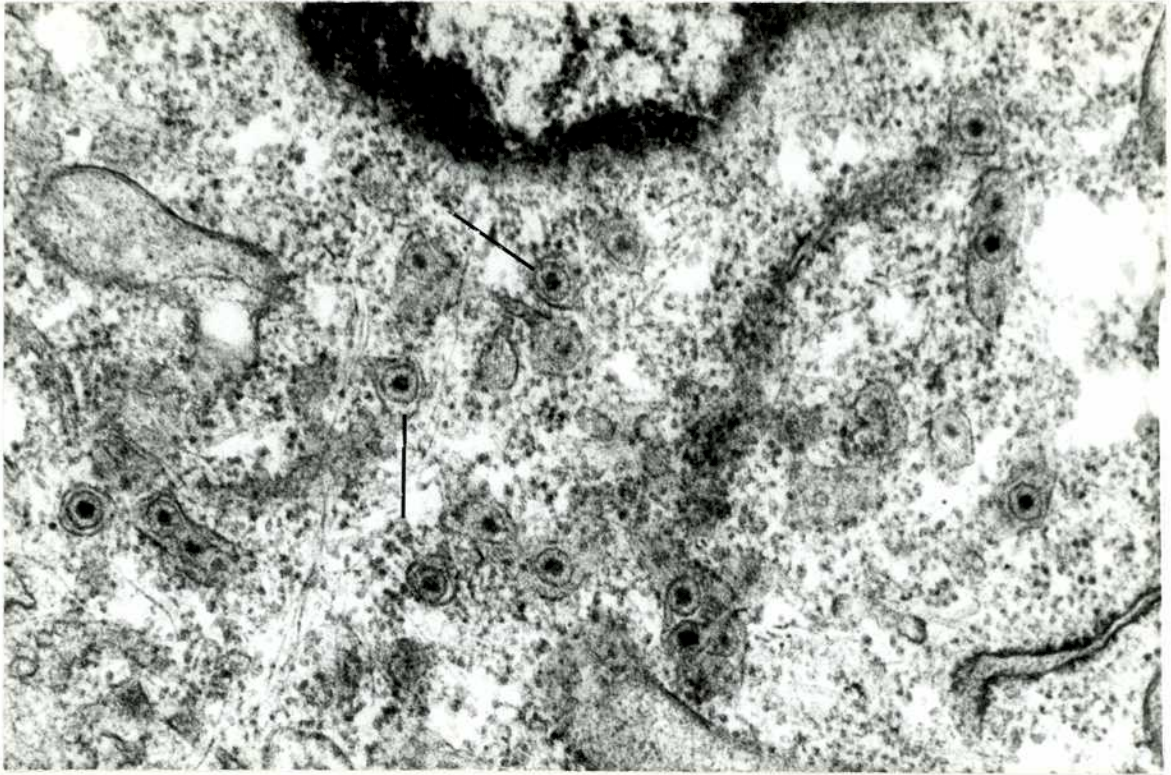


FOTO 28



II.3.2. Aislamiento de la partícula

Como se expresó anteriormente se utilizó la línea 169 ya que en experiencias previas (parte I.6.2.7.) se demostró que el sobrenadante del cultivo tenía la capacidad de inducir un mesotelioma en el hamster. Por otra parte la microscopía electrónica mostró un número mayor de partículas por célula que en las demás líneas estudiadas en este trabajo.

Ante la posibilidad de obtener partículas directamente del sobrenadante o por rotura de las células, se optó por la primera, dado que de este modo se parte de una preparación relativamente libre de células y restos celulares.

Como se describió en materiales y métodos las fracciones conteniendo el pico de actividad fueron ultracentrifugadas nuevamente para su concentración y posterior observación. FOTO 29

El análisis de las restantes zonas del gradiente no reveló la existencia de estructuras similares. La coincidencias entre el pico de radioactividad y la presencia de partículas en esa fracción del gradiente sugiere que dichas partículas contienen ARN .

Los resultados se muestran en la figura 4

FIGURA 4: Fraccionamiento del gradiente continuo de sacarosa centrifugado 4 horas a 120000 x g en rotor Beckman SW 25. Las fracciones se numeran desde el fondo del tubo.

Aislamiento del virus

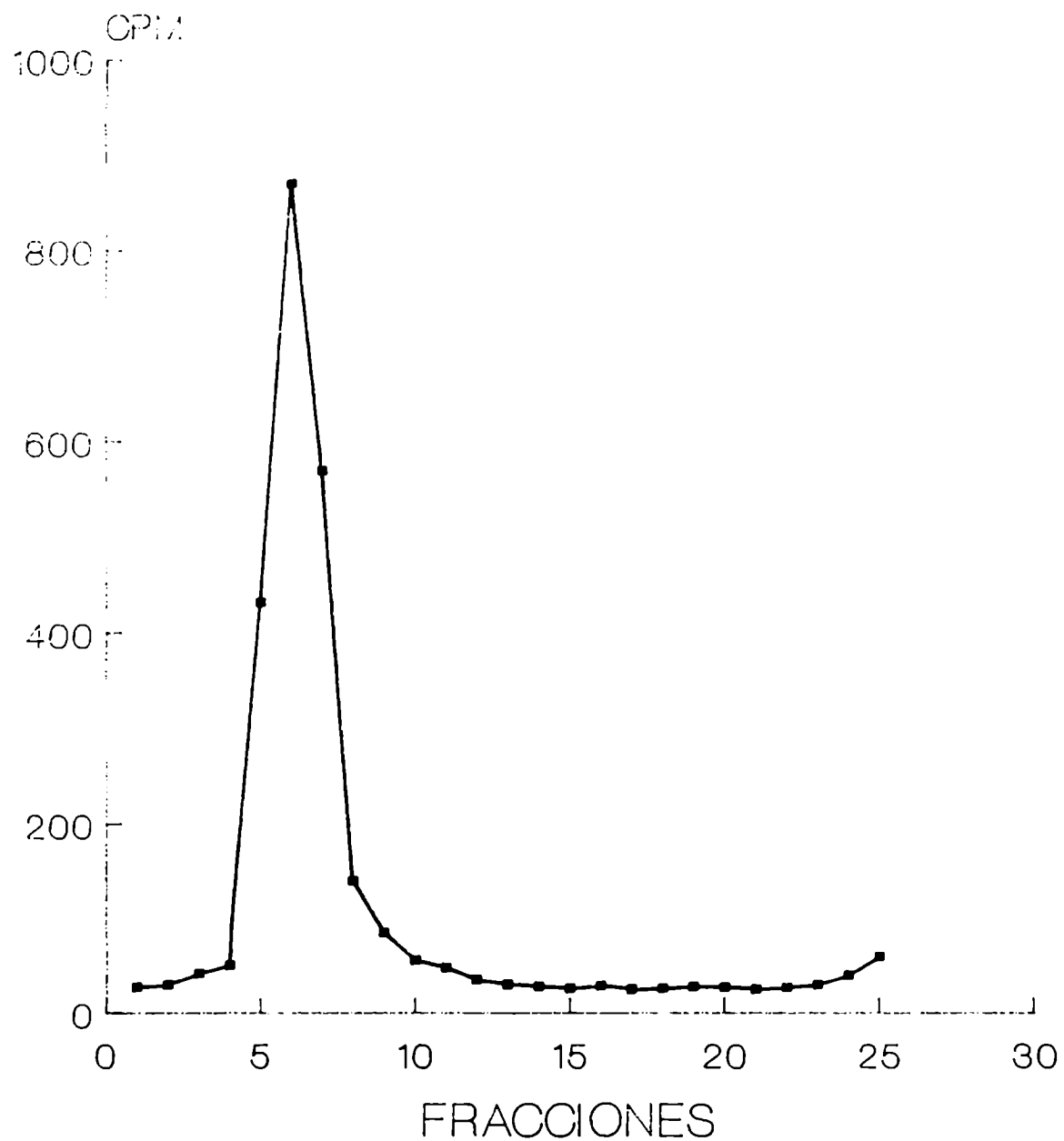
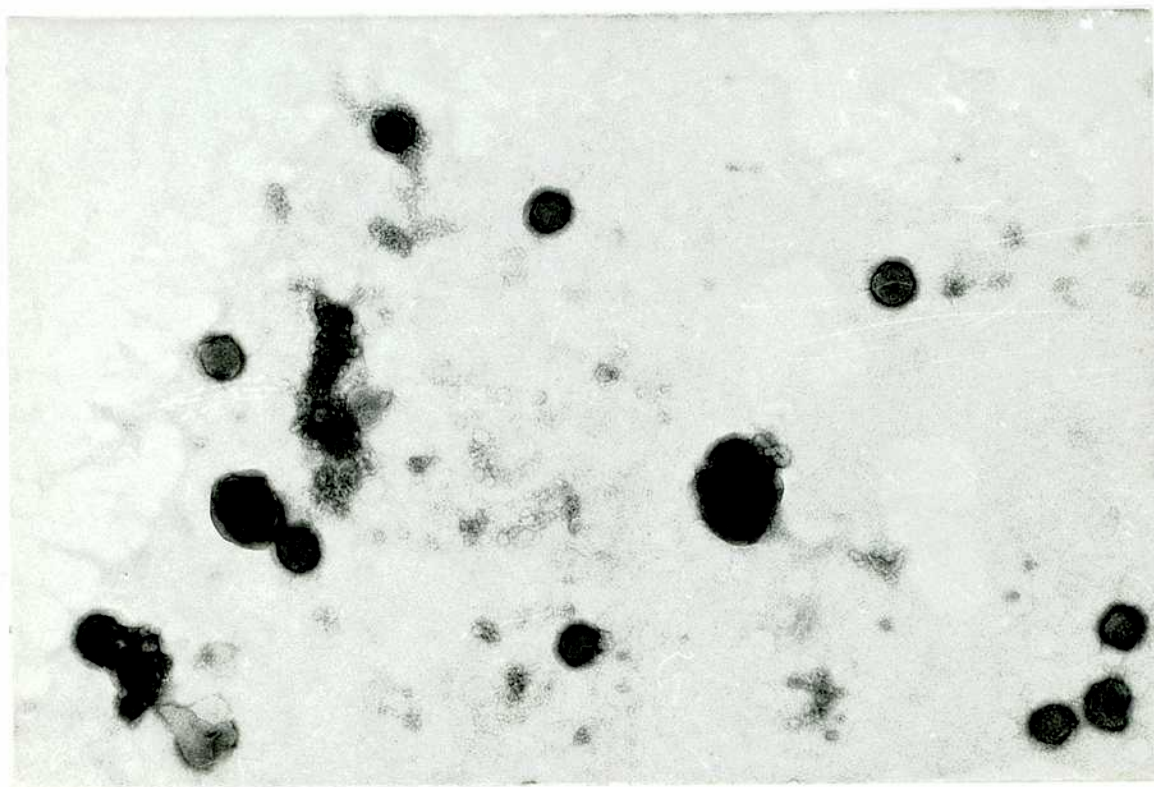


Figura 4

FOTO 29: Microscopia electrónica de las partículas virus-like aisladas del sobrenadante de cultivo. Se observan estructuras circulares con proyecciones, asemejándose a los peplómeros de los retrovirus



II.3.3. Análisis de resistencia a Ribonucleasa

Con el objeto de confirmar que la marcación detectada se debió a la incorporación de ^3H Uridina al ARN de la partícula se trató la mitad del pellet con RNAsa pancreática quedando la otra mitad como testigo. Posteriormente se ultracentrifugaron paralelamente ambas muestras en las condiciones descritas en II.2.6. Se fraccionaron los gradientes y se midió la actividad existente precipitando con ácido tricloro acético

En ambos casos se detectó actividad en la misma fracción del gradiente y coincidiendo con la obtenida previamente, confirmando que la uridina se incorporó al ARN del virus-like. FIGURA 5

FIGURA 5: En la figura 5 se observa que un solo pico resistente a RNAsa es detectable y que su ubicación coincide con el observado en la figura 4 y con la presencia de partículas virus-like.

Tratamiento con RNAsa

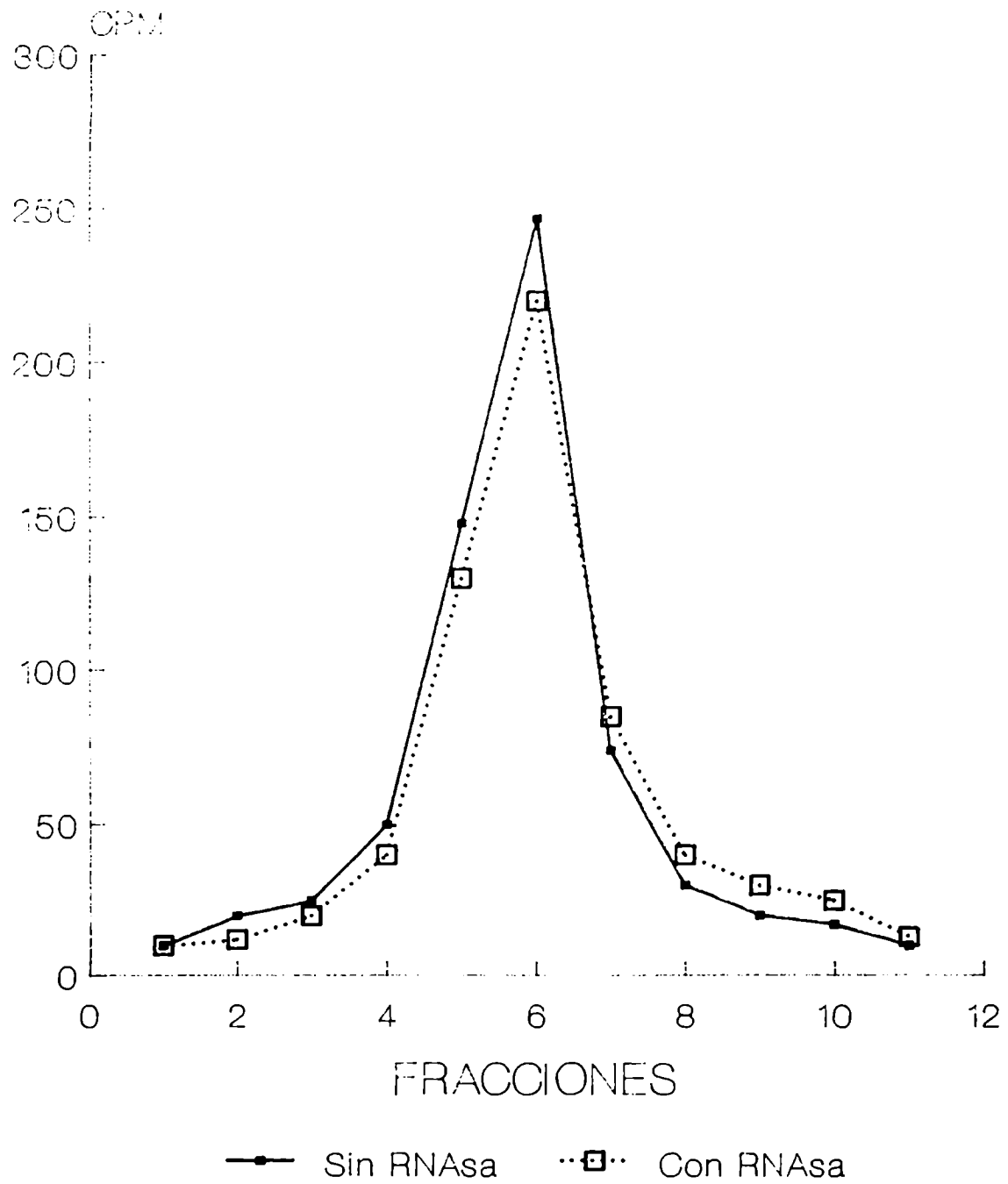


Figura 5

II.3.4. Análisis electroforético de las proteínas de la partícula virus-like

Con el fin de analizar la constitución proteica de la partícula aislada, las fracciones del gradiente conteniendo actividad fueron tratadas como se describió en II.2.7. El pellet final fue resuspendido y sembrado en gel de poliacrilamida 10%.

La utilización de marcadores de P.M. conocidos permitió comprobar la existencia de bandas proteicas de PM de 97, 81, 57, 55, 42, 28,5, 18 y 15 Kd. FOTO 30 y FIGURA 6.

FIGURA 6: Comparación de los PM de las diferentes proteínas constituyentes del virus-like. Gráfico del PM vs distancia de migración.

Proteínas del virus-like

Pesos moleculares

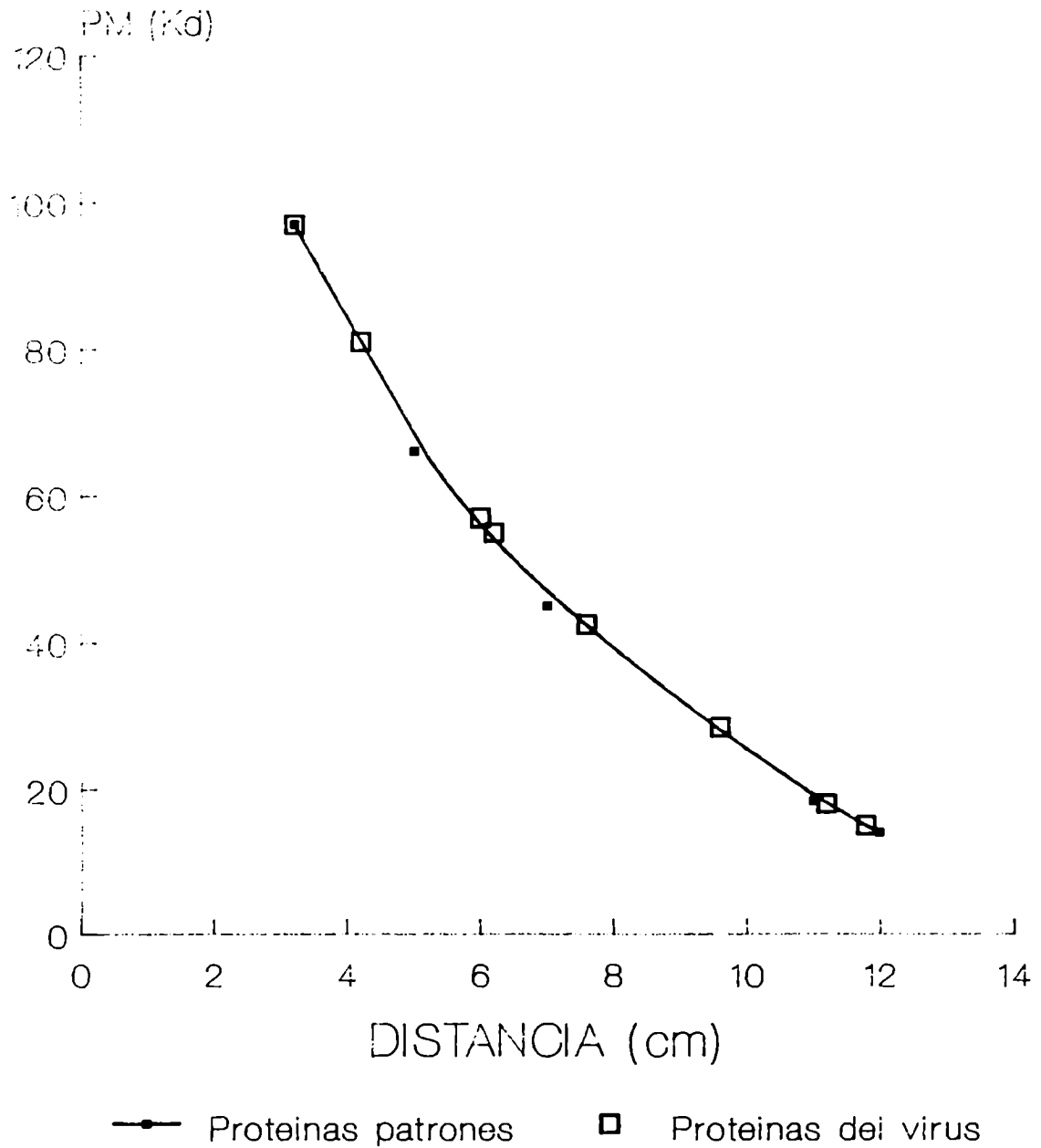
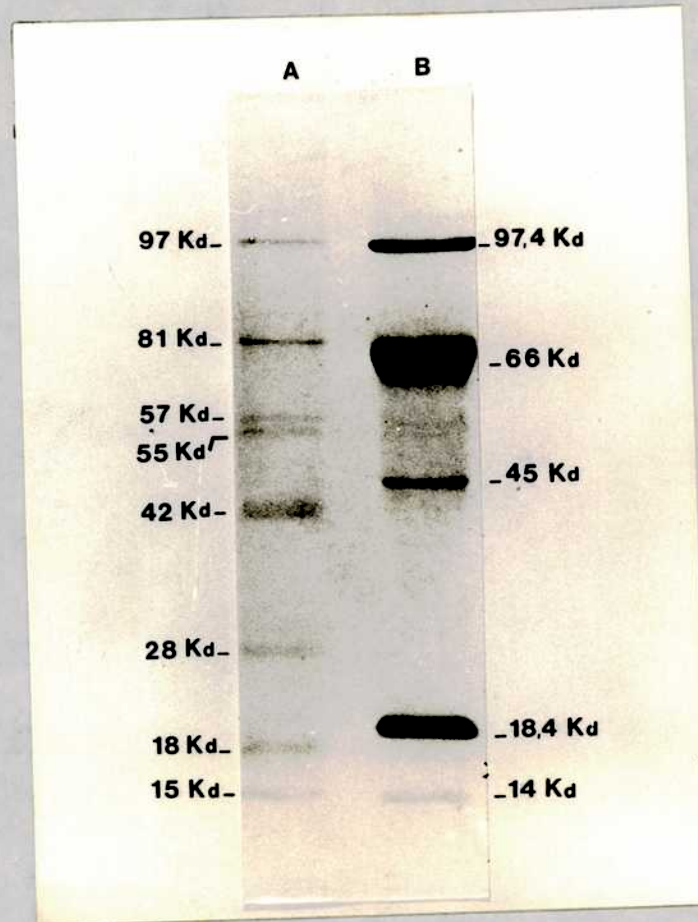


Figura 6

FOTO 30: Identificación de proteínas del virus-like aisladas en geles de poliacrilamida 10%. Los geles fueron preparados de acuerdo al método de Laemmli y teñidos con NO_3Ag según Merrill.



II.3.5. EXPERIENCIAS IN VITRO

II.3.5.1. Transformación de células de cultivo primario de embrión de hamster

El estudio de la infectividad de la partícula se realizó sobre un cultivo embrionario pues el mismo está constituido por una población heterogénea de células con alto potencial de división lo que facilita la fijación de la posible transformación neoplásica.

El pellet obtenido como se describió en II.2.8. fue resuspendido en 1 ml de medio de cultivo y puesto en contacto con una monocapa semiconfluyente de cultivo embrionario. La obtención de la partícula para la infección del cultivo se realizó dentro de las condiciones más asepticas posibles para evitar contaminación del cultivo por hongos y bacterias .

A las 48 horas de infectado el cultivo es repicado 1/10. Entre los 7 y 9 días post infección comienzan a observarse apilamientos celulares similares a los observados cuando se infectó cultivos primarios con el sobrenadante.

En el tercer repique esta característica se acentúa y finalmente el cultivo adopta la morfología de una transformación "in vitro".

La inoculación de $2 \cdot 10^6$ células por vía subcutánea en hamster originó un fibrosarcoma con evolución similar a las descritas anteriormente, confirmando la oncogenicidad de las células transformadas "in vitro".

II.4. DISCUSION DEL CAPITULO II

La actividad biológica "in vivo" e "in vitro" del medio de cultivo de la línea 169 sugirió que este podría ser utilizado como fuente para la extracción y ensayo de la actividad biológica de la partícula.

La utilización del sobrenadante presentó la ventaja de partir de un sistema relativamente libre de células y restos celulares.

La purificación en gradiente permitió separar una fracción en la cual se observó partículas redondeadas de tamaño similar al descrito para los virus-like.

Se observó además que la máxima actividad de ^3H -Uridina incorporada coincidía con la misma fracción y que el tratamiento enzimático con RNAsa y posterior ultracentrifugación permitió asegurar que la actividad observada se debió a la incorporación de ^3H Uridina al ARN de la partícula.

El análisis electroforético confirmó la existencia de un número discreto de bandas cuyos pesos moleculares están dentro de los valores que poseen las proteínas estructurales y de envoltura de los retrovirus (89). Asociado a esto, la transformación neoplásica de cultivos primarios de embrión de hamster permite afirmar que la partícula virus-like presente en el sobrenadante de esta línea posee actividad oncogénica y debe ser considerada como un virus oncogénico.

POSIBILIDADES FUTURAS

De los resultados obtenidos se concluyó que las células de la línea BHK-21(C-13) y 169 portadoras de un virus oncogénico, liberan esta partícula al sobrenadante de cultivo, del cual puede ser aislada por centrifugación, demostrándose su actividad por la transformación neoplásica de cultivos primarios de hamster.

"In vivo" se demostró la inducción de neoplasias por la utilización de cámaras de difusión con poros de 450, 220 y 50 nm conteniendo estas células, lo que sugiere la existencia de al menos dos factores con actividad neoplásica, el virus y otro no determinado que atraviesa los poros de 50 nm. Estos resultados fueron confirmados por experiencias "in vitro".

Este comportamiento no es general para todos los clones derivados de esta línea ya que las células de la línea BHK-21(C-13)S no expresan estas partículas y su medio condicionado no posee actividad neoplásica, si bien "in vivo" produjeron tumores con desarrollos mas rápido.

El pasaje de las células BHK-21(C-13) por hamster irradiados posibilitó la obtención de una población celular con mayor actividad neoplásica, portadora de un número superior de partículas y posiblemente con actividad oncogénica mayor a las originales. Este hecho no fue comprobado con las células de la línea BHK-21(C-13)S.

El aislamiento del virus permite contar con una fuente de partículas con un grado apreciable de purificación para la extracción de su ácido nucleico.

De acuerdo a estos resultados, se prevee la realización de experiencias, para tratar de explicar a nivel molecular, la diferencia de comportamiento de las células BHK-21(C-13)S, así como continuar la caracterización del virus y poder clasificarlo.

Por otra parte, determinar la naturaleza y el tamaño del factor oncogénico que atraviesa las cámaras con poros de 50 nm, empleando filtros de menor diámetro, teniendo en cuenta que ha sido descrita una familia de polipeptidos de bajo peso molecular denominada "factores de crecimiento" (51) dentro de la cual podría ubicarse el factor mencionado.

Dado que existirían evidencias que el genoma del virus está integrado al ADN celular (70,111), se prevee la realización de experiencias de transfección sobre células 3T3 de ratón con el ADN de las células de la línea 169 y en caso de tener positividad, aislar el segmento responsable.

Por otra parte, utilizando una porción del genoma de las PAI, Ono y colaboradores clonaron una secuencia homóloga a estas de 7951 pares de bases partiendo del ADN de hígado de hamster, que correspondería al genoma del virus-like y que está presente en múltiples copias en el ADN del hamster (93,111).

El objetivo será comprobar el grado de homología entre la fracción de ADN aislada de las células de la línea 169, el ARN del virus y esta porción de 7951 pares de bases, enviada a nuestro laboratorio por el Dr. Ono, así como la realización de ensayos de transfección con el segmento ya clonado.

Estas experiencias tenderán a comprobar a nivel molecular la integración del genoma del virus al ADN de las células de las líneas BHK-21(C-13) y BHK-21(C-13)S y de ser factible determinar que diferencias y semejanzas existen entre las partículas liberadas por las células de las líneas BHK-21(C-13) y 169.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aaronson, S.A., Hartley, J.W. and Todaro, G.J.. Mouse leukemia virus "spontaneous" release by mouse embryo cells after long-term "in vitro" cultivation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 64. 87-94. 1969.
- 2.- Advances in medical oncology research and education. Vol III Epidemiology 1978. Jillian Editor.
- 3.- Albu, E. and Holmes, K.V.. Isolation and preliminary characterization of the RNA-containing R-type, virus-like particle of BHK-21 cells. Journal of Virology 12. 1164-1172. 1973.
- 4.- Algire, G.H., Borders, M.L., Evans, V.J.. Studies of heterografts in diffusion chambers in mice. J. Nat. Cancer Inst. 20. N⁰ 6. 1187-12-1. 1958.
- 5.- American Type culture collection. Catalogue of Strains II. Fourth Edition. 1983.
- 6.- Andre Thomas, J., Delain, E., Hollande, E..Morphogenese d'un virus du hamster associe a la souche BHK, ou a des tumeurs. C. R. Acad. Sc. Paris. 264. Serie D. 785-788. 1967.

- 7.- Andre Thomas, J., Henry, M., Hollande, E., Vilain, C..
Nouvelles observations sur le virus du hamster associe
aux cellules BHK et aux tumeurs. C. R. Acad. Sc. Paris
266. Serie D. 2129-2132. 1968.
- 8.- Armitage, P. and Doll, R.A. A two-stage theory of car-
cinogenesis in relation to the age, distribution of
human cancer. Br. J. Cancer 11. 161-169. 1957
- 9.- Baltimore, D.. Viral RNA-dependent DNA polymerase. Na-
ture 226. 1209-1211. 1970.
- 10.- Benjamin, T.L..Methods of cell transformation by tumor
virus. Methods of cell biology. 3. 368-437. Academic
Press 1974.
- 11.- Bernhard, W. The detection and study of tumor viruses
with the electron microscope. Cancer Research 20. 712-
726. 1960.
- 12.- Bernhard, W., Tournier, P..Infections virale inappa-
rente de cellules de hamsters decelee par la microsco-
pie electronique. Ann de L'Inst. Pasteur. 107. 447-
452. 1964.
- 13.- Bishop, J.M.. Cellular oncogenes and retrovirus. Annu.
Rev. Biochem.. 52. 301-354. 1983.

- 14- Boettiger, D.. Reversion and induction of Rous Sarcoma Virus expression in virus-transformed baby hamster kidney cells. *Virology* 62. 522-529. 1974.
- 15.- Boller, K., Frank, H., Lower, R. and KKurth, R.. Structural organization of unique retrovirus-like particles budding from human teratocarcinoma cell lines. *J. Gen. Virol.* 64. 2549-2559. 1983.
- 16.- Bond, V.P., Fliedner, T.M., Archambeau, J.O.. Mammalian Radiation Lethality. Academic Press, 1965.
- 17.- Bonner, T.I., O Connel, C., and Cohen, M.. Cloned endogenous retroviral sequences from human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79. 4709-4713. 1982.
- 18.- Borek, C. Malignant transformation in vitro: criteria, biological markers, and application in environmental screening of carcinogens. *Radiation Research* 79 209-232 1979.
- 19.- Borek, C.. Radiation oncogenesis in cell culture. *Advances in Cancer research.* 37. 159-227. 1982
- 20.- Bouck, N., Di Mayorca, G.. Chemical carcinogens transform BHK cells by inducing a recessive mutation. *Mol. Cell. Biol.* 97-105. 1982.

- 21.- Brugge, J.S. and Erikson, R.L.. Identification of a transformation specific antigen induced by an avian sarcoma virus. Nature 269. 346-348. 1977.
- 22.- Cairns, J. Mutation selection and the natural history of cancer. Nature 255. 197-200. 1975.
- 23.- Cairns, J. The origins of human cancers. Nature 289. 353-357. 1980.
- 24.- Cancer. Vol 1. Etiology: Chemical and Physical Carcinogenesis. 1975 Federick F. Becker. Editor
- 25.- Capalbo, E.E., Albrigt, J.F. and Bennet, W.E.. Evaluation of the diffusion chamber culture technique for study of the morphological and functional characteristics of linfoid cells during antibody production. J.Immun. 92. 243-251. 1964
- 26.- Capstick, P.B., Garland, A.J., Chapman, W.G., Masters, R.C.. Production of foot-and mouth disease virus antigen from BHK 21 clone 13 cells grown and infected in deep suspension culture. Nature 205. 1135-1136. 1965.
- 27.-Capstick, P.B.,Garland, A.J., Masters, R.C. and Chapman, W.G.. Some functional and morphological alterations occurring during and after the adaptation of BHK 21 clone 13 cells to suspension culture. Exp. Cell. Res. 44. 119-128. 1966.

- 28.- Capstick, P.B. and Garland, A.J.. Observations on the use of BHK 21 clone 13 cells for foot-and-mouth disease vaccine production. Bull. Off. Int. Epiz. 64. 215-223. 1965
- 29.- Capstick, P.B., Tellin. R.C., Chapman, W.G., Stewart, D.L.. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to de virus of foot-and-mouth disease. Nature 195. 1163-1164. 1962.
- 30.- Capstick, P.B.. Growth of baby hamster kidney cells in suspension. Proc. Roy. Soc. Med. 56. 1062-1064. 1963.
- 31.- Cesarini, J.P., and De Micco, C.. Studies on type-H virus-like particles in hamster: their role in oncogenesis. Int. J. Cancer 10. 174-185. 1972
- 32.- Clarke, J.B., Spier, R.E.. Variation in the susceptibility of BHK populations and cloned cell line to three strains of foot-and mouth disease virus. Archives of Virology 63. 1-9. 1980.
- 33.- Crick, J. and Brown, F.: An inactivated body hamster kidney cell rabies vaccine for use in dogs and cattle. Res.Vet.Sci. 12. 156-161. 1971.

- 34.- Darlington, C.D., Le Cour, L.F.. The handling of chromosomes. The Macmillan Company. New York 1960.
- 35.- De Larco, J., and Todaro, G.J.. Membrane receptors for murine leukemia viruses: characterization using purified viral envelope glycoprotein Gp 71. *Cell* 8. 365-371. 1976.
- 36.- Di Mayorca, G. et al. Malignant transformation of BHK 21 clone 13 cells in vitro by nitrosamines a conditional state. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70. 46-49. 1973.
- 37.- Dougherty, R.H., and Di Stefano, H. Lack of relationship between infection with avian leukosis virus and the presence of COFAL antigen in chick embryos. *Virology* 29. 586-595. 1966.
- 38.- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G.. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-(erb)-B oncogene protein sequences. *Nature* 307. 521-527. 1984.
- 39.- Duesberg, P.H., Retroviruses as carcinogens and pathogens: Expectations and reality. *Cancer Research* 47. 1199-1220. 1987.
- 40.- Epstein, J. Ultraviolet carcinogenesis. *Photophysiology* 5. 235-273. 1970

- 41.- Fenje, P..A rabies vaccine from hamster kidney tissue culture, preparation and evaluation in animals. *Can. J. Microbiology* 6. 605-609. 1960.
- 42.- Fine, D., and Schochetman, G. Type D primate retroviruses: a review. *Cancer Research* 38. 3123-3139. 1978.
- 43.- Fogh, J., Giovanella, B.C.. The nude mouse in experimental and clinical research. 1978. Ed. Academic Press.
- 44.- Freedman, V.H., Shin, S.. Cellular tumorigenicity in nude mouse: correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell*. 3. 355-359. 1974.
- 45.- Fuentes y efectos de la radiación ionizante. Comité Científico de las Naciones Unidas para el Estudio de los Efectos de las Radiaciones Atómicas. Informe a la Asamblea General y anexos. Naciones Unidas 1977.
- 46.- Galloway, D.A. and Mc Dougall, J.K. The oncogene potential of herpes simplex viruses: evidence for a "hit and run" mechanism. *Nature* 302. 21-24. 1983.
- 47.- Giovanella, B.C., Fogh, J..The nude mouse in cancer research. *Advances in cancer research*. 44. 69-120. 1985

- 48.- Glasgow, L.A..Immunosuppression, interferon, and viral infections. Federation Proceedings 30. N⁰ 6. 1846-1851. 1971.
- 49.- Goldie, H., Felix, M.. Growth characteristics of free tumor cells transferred serially in the peritoneal fluid of the mouse. Cancer Research 11. 73-80. 1951.
- 50.- Gotlieb-Stematsky, T. and Shilo, R.. Studies on the tumorigenic properties of selection of high and low tumorigenic clones. Virology 22. 314-322. 1964.
- 51.-Goustin, A.S., Leof, E.B., Shipley, G.D. and Moses, H.L. Growth factors and cancer. Cancer Research 46.1015-1029. 1986
- 52.- Groneberg, J. Morphological revertants of adenovirus type 12-transformed hamster cells. J. Gen. Virol. 40. 635-646. 1978.
- 53.- Gross, L..Oncogenic viruses. Second edition. 1970. Ed. Pergamon Press.
- 54.- Grunwald, D.J., Dale, B., Dudley, J., Lamph, W., Sugden, B., Ozanne, B. and Risser, R. Loss of viral gene expression and retention of tumorigenicity by Abelson lymphoma cells. J. Virol. 43. 92-103. 1982.

- 55.- Hall, J.E.. Radiobiology for the Radiologist. Second Edition. 1978. Harper and Row Eds.
- 56.- Harris, J.D., Blum, H., Scott, J.. Traynor, B., Ventura, P. and Haase, A. Slow virus visna: reproduction in vitro of virus from extrachromosomal DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81. 7212-7215. 1984.
- 57.- Hayward, W.S., Neel, B.G., and Astrin, S.M.. Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. Nature 290. 475-480. 1981.
- 58.- Hirsch, M.S., Black, P. H. and Proffitt, M. R.. Immunosuppression and oncogenic virus infections. Federation Proceedings 30. N^o6 1852-1857. 1971.
- 59.- Holmes, K.V., and Chopin, P.. On the role of the response of the cell membrane in determining virus virulence. J. Exp. Med. 124. 501-520. 1966.
- 60.- Ishii, Y. Quantitative studies of transformation by chemical carcinogens and ultraviolet radiation using a subclone of BHK 21 clone 13 syrian hamster cells. Cancer Res. 37. 2023-2029. 1977.
- 61.- Kalter, S.S. Helnke, R.J. and Hellman, A. C-type particles in normal human placentas. J. Natl. Cancer. Inst. 50. 1081-1084. 1973.

- 62.- Klein, G., Klein, E.. The transformation of a solid transplantable mouse carcinoma into an ascitis tumor. Cancer Research. 466-469. 1951.
- 63.- Klein-Szanto, A.J.P., Conti, C.J., and Mayo, J.. Ultra-morphological features of an experimental hamster sarcoma. 'Z. Krebsforsch. 80. 277-284. 1973.
- 64.- Kribe, M.L.. Immunologic mechanisms in UV radiation carcinogenesis. Advances in cancer research. 34. 69-103. 1981
- 65.- Krontiris, J.G. and Cooper, G.M. Transforming activity of human tumors DNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78. 1181-1184. 1981.
- 66.- Kuff, E.L., Lueders. K.K., Ozer, H.L., Wivel, N.A.. Some structural and antigenic properties of intracisternal A-particles occurring in mouse tumors. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69. 218-222. 1972.
- 67.- Kuff, E.L., Wivel, N.A., Lueders, K.K.. The extraction of intracisternal A-particles from a mouse plasma cell tumor. Cancer Research 28. 2137-2148. 1968.
- 68.- Laemmli, U.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227. 680-685. 1970.

- 69.- Lang, R., Dubouclard, C., Stellmann, C., Leftheriotis, E., Roumiantzeff, M., Petermann, H.G., Fontaine, J., Branche, R.. Emploi des cellules BHK 21 en virologie. Assoc. Fr. Vet. Microbiol., Specialites Mal. Infect. 311-329. 1966.
- 70.- Lesser, J., Lasneret, J., Canivet, M., Emanoil-Ravier, R., Peries, J.. Simultaneous activation by 5-azacitidine of intracisternal R particles and murine intracisternal A particle related sequences in syrian hamster cells. Virology 155. 249-256. 1986.
- 71.- Levy, J.A. Endogenous C-type virus in normal and abnormal cell development. Cancer Research 37. 2957-2968. 1977.
- 72.- Levy, J.A. Murine type C viruses III. Phenotypic mixing with avian leukosis and sarcoma viruses. Virology. 77. 811-825. 1977.
- 73.- Lombardo, J.H., Mayo, J., Abadie, G., Rivenson, S. y Smolko, E.E.. Adaptación del virus aftoso al hamster adulto. Revista de Investigaciones Agropecuarias. INTA Serie 4, Patología Animal 5. 87-93. 1969.
- 74.- Lowy, D.R., Rowe, W.P., Teich, N. and Hartley, J.W. Murine leukemia virus: high frequency activation "in vitro" by 5-iodododeoxyuridine and 5- bromodeoxyuridine. Science (Wash D.C.) 174. 155-156. 1971.

- 75.- Lueders, K.K., Kuff, E.L.. Sequences homologous to retrovirus-like genes of the mouse are present in multiple copies in the Syrian hamster genome. *Nucleic Acids Research* 9. N^o 22. 5917-5930. 1981.
- 76.- Macpherson, I..The characteristic of animal cells transformed in vitro. *Advances in cancer research*. 13. 169-215. Klein, G., Weinhouse, S. and Haddow, A. Eds. Academic Press 1970
- 77.- Mager, D.L. and Henthron, P.S. Identification of a retrovirus-like repetitive element in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81. 7510-7514. 1984
- 78.- Mayo, J., Lombardo, J.L., Klein-Szanto, A.J.P., Conti, C.J. and Moreira, J.L.. An oncogenic virus carried by hamster kidney cells. *Cancer Research* 33. 2273-2277. 1973.
- 79.- Mayo, J.. Carcinogénesis inducidas por radiaciones ionizantes. *Revista Argentina de Cancerología*. 20. 11-17.1982.
- 80.- Mayo, J., Lombardo, J.H., Smolko, E.E., Segura, M., Rivenson, S.. Multiplicación del virus aftoso en roedores adultos previamente irradiados. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 33. 58-69. 1966

- 81.- Mayo, J., Moreira, J.L., Lombardo, J.H., Conti, C.J. and Rivenson, S.. Aszitischer tumor durch BHK-21-Zellen (Klon 13) bei Hamstern nach Rontgenganzkorperbestrahluns. Arch. Exptl. Veterinaermed. 25. 853-862. 1971
- 82.- Mayo, J., Carranza, F.A. and Cabrini, R.L.. Comparative study of the effect of antibiotics, bone marrow and cysteamine in oral lesions produced in hamster by total body irradiation. Experientia. 20. 403-405. 1964.
- 83.- Maxwell, I.H. Poyadenylated virus-specific RNA in baby hamster kidney cells transformed by polyoma virus. J. Gen. Virol. 33. 483-492. 1976.
- 84.- McGrath, M.S., and Weissman, I.L.. AKR leukemogenesis: identification and biological significance of thymic lymphoma receptors for AKR retroviruses. Cell, 17 65-75. 1979.
- 85.- Merril, C., Goldman, D., Sedman, S.A., Ebert, M.H.. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science 221. 1437-1438. 1981.
- 86.- Merwin, R.M., Redmon, L.W.. Induction of plasma cell tumors and sarcomas in mice by diffusion chambers placed in the peritoneal cavity. J. Natl. Cancer Inst. 31. 997-1018. 1963.

- 87.- Merwin, R.M., Algire, G.H..Induction of plasma-cell neoplasms and fibrosarcomas in BALB/c mice carrying diffusion chambers. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 101. 437-439. 1959.
- 88.- Mondal, H. and Hofscheider, P.H. Isolation and characterization of retrovirus-like elements from normal human fetuses. Int. J. Cancer 30. 281-287. 1982.
- 89.- Mussgay, M., Reczko, E., Ahl. R.. Demonstration of virus-like particles in a bovine cell line. J. Gen. Virol. 4. 445-447. 1969.
- 90.- Navarrete, H.D. and Mayo, J.. Neoplastic lesions induced in the hamster by RNA virus. XII International Cancer Congress. Work shop N⁰4. Abstract N⁰ 21. 1. pag 53. 1978.
- 91.- Nelson, J., Leong, J. and Levy, J.A.. Normal human placentas contain virus-like RNA-directed DNA polymerase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75. 6263-6267. 1978.
- 92.- Odajima, T.and Solt, D.B., Detection by electron microscopy of R-type virus-like particles in chemically induced, hamster lingual carcinomas. Archs. Oral.Biol. 27. 1075-1079. 1982.

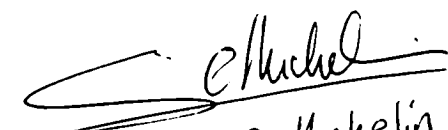
- 93.- Ono, M., Tho, H., Miyata, T. and Awaya, T..Nucleotide sequence of the syrian hamster intracisternal A particle gene: close evolutionary relationship of type A particle gene to types B and D oncovirus genes. Journal of Virology. 55. 387-394. 1985
- 94.- Parker, R.C.. Methods of tissue culture. Edición española. Atika S.A..Madrid 1967.
- 95.- Payment, P., Chgnon, A., Cote, J.R., Ajdukovic, D. and Pavilanis, V.. Morphology of a latent virus associated with hamster cells BHK-21. Canadian Journal of Microbiology 18. 369-371. 1972.
- 96.- Poiesz, B.J., Ruscetti, A.F., Gazdar, P.A., Bunn. P.A., Minna, J.D. and Gallo, R.C.. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77. 7415-7419. 1980.
- 97.- Ponder, B.A.J.. Genetics and Cancer. Biochim. Biophys. Acta 605. 369-410. 1980.
- 98.- Portolani, M. et all.Malignant transformation of kidney cells by BK virus. J. Virol. 15. 420-422. 1975.
- 99.- Radiation Induced Cancer. Proceedings of a Symposium International Atomic Energy Agency. Viena 1969.

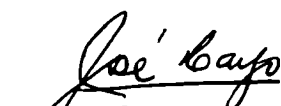
- 100.-Rowe, W.P., Hartley, J.N., Lander, M.r., Pugh, W.E. and Teich, N.. Noninfectious AKR mouse embryo cell lines which each cell has the capacity to be activated to produce infectious murine leukemia virus. *Virology* 46. 866-876. 1971.
- 101.-Rustigian, R., Johnston, P. and Reihart, H.. Infection of monkey kidney tissue cultures with virus-like agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 88. 6-16. 1955.
- 102.-Shiba, T. and Saigo, J.. Retrovirus-like particles containing RNA homologous to the transposable element copia in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 302. 119-124. 1983.
- 103.- Shih, C., Padhy, L.C., Marray, M. and Weinberg, R.A.. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290. 261-264. 1981.
- 104.-Shipman, Ch., Van der Weide, G.C.. Prevalence of type R virus-like particles in clones of BHK 21-cells. *Virology* 38. 707-710. 1971.
- 105.-Sobis, H., Vandeputte, M.. Virus-like particles in hamster embryos, fetuses and tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 61. 891-895. 1978.

- 106.-Sodroski, J.G., Rosen, C.A. and Haseltine, W.A.. Trans-acting Transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells. *Science (Wash DC.)* 225. 381-385. 1984.
- 107.-Stenback, W.A., Van Hoosier, G.L., Trentin, J.J.. Virus particles in hamster tumors as revealed by electron microscopy. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 122. 1219-1223. 1966
- 108.-Stoker, M.G.P., and Macpherson, I. A.. Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus in vitro. *Virology* 14. 359-370. 1961.
- 109.-Stoker, M., Macpherson, I.. Syrian hamster fibroblast cell line BHK 21 and its derivatives. *Nature* 283. 1355-1357. 1964.
- 110.-Suzuki, Y., Kannerstein, M. and Churg, J..Electron microscopy of normal, hiperplastic and neoplastic mesothelium. *Biological Effects of Asbestos* (Bogovski, P. et all ed.) 74-79. I.A.R.C..Publication N⁰ 8 1973.
- 111.-Suzuki, A., Kitasato, H., Kawakami, M., Ono. M..Molecular cloning of retrovirus-like genes present in multiple copies in the syrian hamster genome. *Nucleic Acids Research* 10. N⁰ 19. 5733-5745. 1982.

- 112.-Tasat, D.R. and de Rey, B.M.. Cytotoxic effect of uranium dioxide on rat alveolar macrophages. Environmental research. 44. 1987. (En prensa).
- 113.-Temin, E.M. and Mizutani, S.. RNA dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature 226. 1211-1213. 1970.
- 114.-Travis, L.E.. Radiobiología médica. Serie AC de Oncología. 1979. AC Editores.
- 115.-Ubertini, B., Nardelli, L., Dal Prato, A., Panina, G. and Barei, S..BHK 21 cell culture for the large-scale production of foot-and-mouth disease virus. Zbl. Vet. Med. Reihe B, Bol 14, Heft 5. 432-441. 1967.
- 116.-Veall, N., Vetter, H.. Técnicas con radioisótopos para la investigación y el diagnóstico en clínica. Ed. Eudeba. 1964.
- 117.-Vogt, P.K.. Phenotypic mixing in the avian tumor virus-group. Virology 32. 708-717. 1967.
- 118.-Weiss, R.A., Friis, R.R., Katz, E. and Vogt, P.K.. Induction of avian tumor viruses in normal cells by physical and chemical carcinogens. Virology 46. 920-938. 1971.

- 119.-Weiss, R., Teich, N., Varmus, H., and Coffin, J.. RNA Tumor Viruses. Cold Spring Harbor Laboratory 1985. Second Edition.
- 120.-Wilmer, E.N..Cell and tissue in culture. Academic Press. London New York 1965.
- 121.-Wong-Staal, F., Reitz, M.S., Trainor, C.D., Gallo, R.C.. Murine intracisternal type A particles: a biochemical characterization. Journal of Virology 16. 887-896. 1975.


Severino C. Michelin


JOSE MAYO