



La historia inicial de la virología tumoral: Rous, RIF y RAV

*The early history of tumor virology:
Rous, RIF, and RAV*

■ Harry Rubin*

■ Hace cien años que Peyton Rous aisló un virus de un sarcoma de pollo, ahora conocido como virus del sarcoma de Rous (RSV), que reprodujo todas las características del tumor al ser inoculado a otros animales similares. Esto fue seguido por el aislamiento de virus en cuatro tumores entre más de 60 de diferente morfología también en pollos. Los estudios posteriores de la biología del primer RSV aislado progresaron lentamente durante 45 años, hasta que se dispuso de un ensayo de placas ectodérmicas en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo. Las insuficiencias del ensayo se resolvieron con la producción de focos transformados en cultivos de fibroblastos de pollo, a lo que se siguió un período productivo en la dinámica de la infección por RSV. En algunos embriones se encontró un virus de la leucosis aviaria (ALV), que fue llamado «factor inductor de resistencia» (RIF), ya que interfiere con RSV y se describe su epidemiología en pollos. Otro ALV fue encontrado en «stocks» de RSV, al que se llamó «virus asociado al Rous» (RAV). Las células previamente infectadas con RAV son refractarias a la infección por RSV, pero RSV no produce virus infeccioso a menos que se añada RAV durante o después de la infección por RSV. El RAV proporciona la cubierta infecciosa para el, por otra parte, «defectivo» RSV. La cubierta determina la antigenicidad, la gama de huéspedes y la tasa de maduración del RSV. Las partículas de RSV transportan una transcriptasa inversa, un enzima que convierte su ARN en ADN y permite la integración en el ADN de la célula, donde funciona como un gen celular. Este fue

* El autor es profesor emérito de Biología celular y del Desarrollo, Departamento de Biología Molecular y Celular, Life Sciences Addition, University of California, Berkeley, CA 94720. El presente artículo (Rubin H. The early story of tumor virology: Rous, RIF, and RAV. Proc Natl Acad Sci. 2011;108:14389-14396) se reproduce traducido del inglés tras solicitarse las debidas autorizaciones. La traducción es de J. Rodríguez Otero.

el puente de unión entre la era biológica y la era molecular. Se discute su relación con oncogenes y cáncer humano.



Hace cien años, Peyton Rous [1879–1970] publicó un artículo que iba a constituir el hito fundacional de la virología tumoral (1). Comunicó el aislamiento de un «agente filtrable» a partir de un sarcoma en el músculo de la pechuga de una gallina Plymouth Rock. Este «agente» fue llamado más tarde virus del sarcoma de Rous (*Rous sarcoma Virus*, RSV). Aunque RSV fue el primer virus aislado de un tumor sólido que podía transmitir cáncer cuando era inoculado en serie a otros pollos, no fue en realidad el primer virus aislado de una neoplasia. Ese honor le corresponde a dos daneses, Ellermann y Bang, que aislaron un agente filtrable de las células sanguíneas de pollos con leucemia eritro-mieloblástica aguda (2). En aquellos años, la leucemia no era considerada cáncer, de manera que se prestó poca atención al informe de su transmisión por un agente filtrable. En algunos de los pollos inoculados, el cuadro sanguíneo permanecía esencialmente no leucémico, pero desarrollaban infiltración de los órganos internos con células leucémicas sin proliferación de las propias células tisulares. Sin embargo, el aspecto de los sarcomas inducidos por RSV era el típico de los tumores de tejido conectivo de mamíferos, aunque algunos cuestionaron su relevancia para el cáncer humano porque de ellos se aislaba un agente (o agentes) transmisible del complejo de la leucosis aviar (*avian leukosis complex*, ALV), sólo relevante para los pollos*. Posteriormente se demostró que RSV y ALV estaban estrechamente relacionados entre sí. Por estas razones y otras que se considerarán más adelante, la continuación del estudio del ALV fue descuidado en gran medida, pero Rous y sus colegas continuaron trabajando intensamente con el RSV y otros dos tumores inducidos por virus en los años que siguieron a su descubrimiento. Mucho más tarde se descubrieron otros tipos de virus oncogénicos, y el campo de la virología tumoral creció enormemente. Sin embargo, este artículo se limita a los primeros trabajos de Rous y a la biología de RSV y ALV, con énfasis en los estudios cuantitativos en embriones de pollo y cultivos celulares desde mediados los años 50 hasta mediados los 70, que condujeron a la era molecular. Se hará más hincapié en la dinámica de la infección por virus de la leucosis aviar de la que se muestra en la mayoría de las revisiones recientes. Se tendrá en cuenta la relevancia de estos estudios para la regulación del crecimiento celular y el cáncer humano.

* *Nota del Traductor (N. del T).*- El relativo desinterés sobre el tema se demuestra por el hecho de que Rous recibió el Premio Nobel en 1966, a los 85 años, nada menos que 55 años después de su descubrimiento.

Transmisión celular del sarcoma de pollo y su relación causal con agentes filtrables



FIGURA 1.—Francis Peyton Rous, 1879-1970. Esta imagen no es la que aparece originalmente en el artículo (cortesía de la National Library of Medicine, portrait no. 5831).

Peyton Rous (figura 1) se incorporó al Instituto Rockefeller dos años después de graduarse en la facultad de medicina (3). Fue encargado del laboratorio para la investigación del cáncer y pronto recibió una gallina de unos 15 meses de edad con un tumor en su pechuga derecha que había aparecido dos meses antes (4). En la autopsia se observó una necrosis generalizada en el centro del tumor, con un tejido translúcido finamente estriado en el borde. Con un trócar se implantaron pequeños trozos de tejido en la pechuga izquierda y en la cavidad peritoneal de la misma ave. Además, se hicieron implantes similares en dos gallinas jóvenes del mismo grupo. El tumor original fue identificado como un sarcoma de células fusiformes con mitosis frecuentes en el borde y células con dos a cinco núcleos donde comenzaba la necrosis. Ésta era debida a la isquemia y a hemorragia de pequeños vasos. La gallina murió 25 días después por el crecimiento del implante en la cavidad peritoneal.

Una de las dos gallinas inoculadas desarrolló tumores similares al original. Fue

el primer trasplante con éxito de un tumor en aves de corral (tumor nº 1). El tumor se trasplantó en serie cuatro veces en gallinas del mismo grupo, pero sólo la cuarta parte de los trasplantes tuvieron éxito (figura 2). El trasplante no tuvo éxito en ninguno de los pollos Plymouth comprados en el mercado, así como tampoco en razas mezcladas. En aves de menos de 3 meses se observó regresión después de crecimiento transitorio, pero en aves adultas no hubo señales de crecimiento.

Hacia el sexto trasplante en serie, los tumores crecieron rápidamente y fueron muy malignos, con producción de metástasis generalizadas (1). Se trituraron con arena trozos de tumores en la solución de Ringer y se centrifugaron dos veces a baja velocidad. Se recogió el sobrenadante, se pasó a través de un filtro Berkefeld, capaz de retener bacterias, y se inyectó en una de las pechugas de pollos del mismo grupo Plymouth Rock original, mientras que un fragmento de tumor se trasplantó en la otra. Todos las inoculaciones con fragmentos desarrollaron tumores en el

sitio de implante; el mismo tipo de crecimiento apareció más lentamente en el punto donde se inyectó el líquido filtrado, presumiblemente libre de células.

Cuando se inyectó sólo el filtrado del tumor, sólo una pequeña proporción de los pollos desarrolló un mínimo crecimiento en el trayecto de la aguja (5), pero cuando se inyectó tejido tumoral seco y en polvo, el sarcoma apareció como una masa difusa en muchas de las aves (más tarde se comprobó que estaba compuesto por muchos nódulos) (6). Parecía que el agente filtrable causante requería para su acción una alteración o proliferación celular, tal como la producida por el pinchazo de la aguja, o bien la presencia de tejido seco. Cuando se añadió al filtrado la tierra de diatomeas en polvo conocida como Kieselguhr, compuesta del mismo material que los filtros Berkefeld, se produjo una reacción local y el tumor resultante apareció antes, en más sitios y se expandió más rápidamente (5,6). Por lo tanto, se añadió dicha tierra en la mayoría de los casos descritos posteriormente.

En los 10 meses siguientes sólo 2 entre más de 30 tumores de diferentes gallinas de la línea endogámica fueron trasplantables. El primero de estos (el n° 7) era un gran tumor constituido de hueso genuino y cartílago, conocido como osteocondrosarcoma (7). Los tumores originados a partir de los trasplantes se componían de tejido conectivo a cuyo alrededor se depositaba el cartílago, seguido en muchos casos de hueso con médula ósea, como en el tumor original. En la sexta generación de trasplante se inyectó un filtrado en pollos de la misma línea, que desarrollaron osteocondrosarcomas similares a los trasplantes. Un tercer tumor trasplantable (el n° 18) se localizó en el músculo por encima y por debajo de la articulación de la rodilla (8). El tumor primario estaba probablemente en la molleja y metastató en hígado y músculo. Fue un sarcoma de células fusiformes, fisurado y subdividido por senos aplanados sin sangre. Del tumor generado en uno de los últimos trasplantes seriados se aisló un virus que produjo tumores de las mismas características histológicas que el tumor primario, aunque tendían a parecerse al tumor n° 1 después de varias inoculaciones seriadas. Es difícil reconstruir, un siglo más tarde, cómo el trasplante de tumores promovió el descubrimiento de virus tumorales activos; se puede especular que el virus surgió en el curso del trasplante, o que virus preexis-

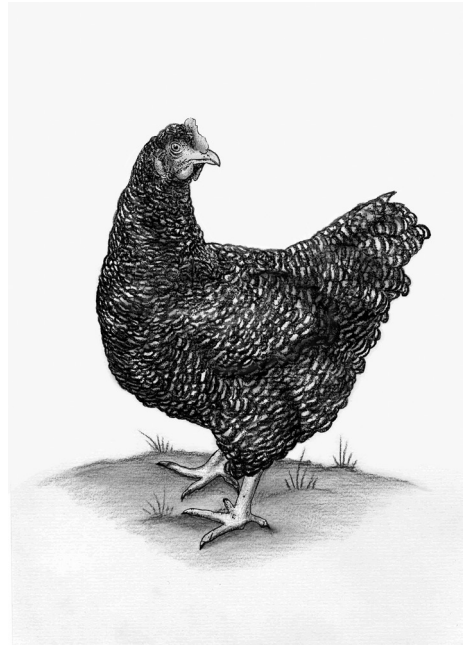


FIGURA 2.—Gallina Plymouth. Esta imagen no es la que aparece originalmente en el artículo (ilustración de ©Paz Rodero).

tentes fueron seleccionados durante el trasplante en serie. La filtración diferencial indicó que los virus fueron de aproximadamente el mismo tamaño. Se aislaron virus de sarcoma de otros dos tumores, de un total de 60, pero no fueron tan estudiados como los mencionados antes (9).

La cuantificación de RSV por formación de placas en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo

Hasta los años 1950 la titulación de RSV se hacía por inyección de diluciones seriadas en pollos para determinar su período de latencia y su incidencia (10). Esto requería la observación y mantenimiento de muchos animales durante largos períodos de tiempo, lo que resultaba caro y necesitaba mucho espacio. Yo llegué en 1953 con una beca posdoctoral al laboratorio de Renato Dulbecco, en el Instituto de Tecnología de California, con la intención de desarrollar un método de cultivo celular para el ensayo de RSV. La idea era modificar el ensayo de Dulbecco de formación de placas en cultivo celular por los virus citocidas para permitir la formación de focos transformados por el RSV. Me presenté con muestras de RSV obtenidas del mismo Rous y con la cepa de alto título de RSV de Ray Bryan, del Instituto Nacional del Cáncer. Mis intentos iniciales en el ensayo de producción de focos de transformación no tuvieron éxito, por lo que decidí probar con un ensayo *in vivo* en la membrana corioalantoidea (*chorioallantoic membrane*, CAM) del embrión de pollo, en la que Keogh había demostrado la producción de pequeños tumores ectodérmicos que podían ser cuantificados (11). El método tenía sus irregularidades, pero era adecuado para la estimación de la tasa de producción de virus por las células sarcomatosas, así como el número de células productoras de virus (12). Los experimentos mostraron que las células del sarcoma liberaban RSV en el medio muy lentamente y que las unidades infecciosas del virus producían placas individuales en la CAM. Los virus de los tumores ectodérmicos dieron lugar a sarcomas en el mesodermo subyacente, lo que contrastaba con la estricta especificidad del virus por el tejido conectivo que se observa en los pollitos después de la eclosión (13). Las células continuaron liberando virus durante muchas horas sin ser visiblemente dañadas, lo que permitió su multiplicación. Esto sugirió una relación con las bacterias lisogénicas portadoras de bacteriófagos atemperados, pero existían diferencias suficientes como para plantear preguntas acerca de la analogía. La más llamativa, el genoma de RSV era ARN (14,15) en vez del ADN del bacteriófago, y se producía continuamente, mientras que la bacteria lisogénica se lisaba y liberaba un gran número de partículas de bacteriófago. La persistencia de la producción de virus en las células del sarcoma sugirió que el virus jugaba un papel directo y continuo en la perpetuación del estado de malignidad de la célula y de sus descendientes.

El ensayo en la CAM fue posteriormente mejorado (16) y fue utilizado por Fred Prince en una serie de experimentos sobre la infección por RSV. Comprobó que

la resistencia ocasional de la CAM a la infección es una propiedad heredable controlada por un único par de alelos (17). La infección masiva de la CAM dio lugar a nuevos virus infecciosos en unas 15 horas, seguido de un aumento exponencial que se estabilizó después de varios días (18). Las células ectodérmicas empezaron a proliferar alrededor de un día después de la infección y se observó proliferación de las células del mesodermo subyacente aproximadamente a los dos días. La proliferación ectodérmica alcanzó su máximo en poco más de tres días, después de lo cual se estableció una necrosis masiva. Al mismo tiempo se observó el aumento rápido del número de células mesodérmicas, dando lugar en 7 días a una gran masa sarcomatosa sin necrosis.

Prince siguió investigando sobre la observación de Bryan de que algunos de los sarcomas producidos en pollos por bajas concentraciones de RSV no contenían virus infeccioso (19). Estos tumores fueron trasplantados en serie por Prince, que ensayó periódicamente la producción de virus infeccioso en la CAM (20). Algunos de los tumores no infecciosos se redujeron al cabo de un largo período, mientras que la mayoría de los productores de virus continuaron creciendo, señal de que para perpetuar el crecimiento tumoral era necesaria la propagación del virus a nuevas células.

La cuantificación de RSV en cultivo de fibroblastos de pollo

En 1956 revisé para *Virology* una nota de Manaker y Groupé sobre la producción de focos transformados por RSV en cultivo celular (21). Una diferencia significativa con relación a lo que yo mismo había intentado, era la adición de caldo triptosa-fosfato al medio. Incorporé a Howard Temin, un estudiante graduado de primer año en embriología, para colaborar en la adaptación de la prueba de placas de RSV al ensayo de Dulbecco para virus citocidas en monocapas (22). Una diferencia importante con el método de Manaker y Groupé fue utilizar una capa de agar para evitar la infección secundaria de las células a distancia por el RSV liberado de las células infectadas originalmente. Parte del incentivo para Temin era que tras la consecución del ensayo modificado podría trabajar con el virus que Rous había aislado del tumor nº 7, que transformaba las células del tejido conectivo en hueso. Reduciendo la densidad de células sembradas y añadiendo caldo triptosa-fosfato al medio, fue posible producir una cantidad cuantificable de focos transformados en la monocapa (23). El número de focos fue proporcional a un amplio rango de concentración de virus, lo que indicaba que cada foco era iniciado por una unidad infecciosa de virus que entraba en la célula y luego se multiplicaba durante 5-7 días para formar un foco transformado multicelular.

Había un número de variables en el ensayo que tenían que ser consideradas para aumentar su reproductibilidad. Los focos transformados no se producían de forma fiable si la inoculación del virus sobre la monocapa se retrasaba hasta 2 días después de la siembra de las células. Se conseguía una eficiencia máxima si se inoculaba

el virus al mismo tiempo que se sembraban las células (24). Las concentraciones convencionales (5-10%) de suero bovino fetal (FBS) impedían la formación de focos transformados, pero no afectaron a la producción y liberación de virus (25). La formación de focos se suprimía a mayores concentraciones de FBS (15%), por lo que se decidió utilizar regularmente una concentración óptima de 5%.

Cuando se utilizaron concentraciones suficientemente altas de la cepa de RSV de alto título de Bryan para transformar todas las células de una determinada población, éstas dejaron de multiplicarse si se hacía un pase cuando la transformación ya había empezado (26). El medio líquido tomado de uno de estos cultivos dañaba las células normales, lo que sugería algún tipo de escape de las células sarcomatosas que podía jugar algún papel en su transformación. Eso podía estar relacionado con la observación de que las células ectodérmicas de la CAM masivamente infectadas con RSV se necrotizaron después de que alcanzaron la proliferación máxima (18). También se observó que ciertas cepas de RSV formaban placas citocidas en cultivo celular, después de haber hecho inicialmente focos, si se mantenía el cultivo el tiempo suficiente a temperaturas superiores a 37°C (27-29). EL mismo Rous llamó la atención sobre ciertas cepas del virus vaccinia que hacían que las células se multiplicaran y murieran poco después (30). Estos resultados plantean la posibilidad de que los efectos transformantes del RSV imiten las etapas iniciales de algunos virus citocidas.

Estudios de radiación en la infección por RSV

El ensayo de cultivo celular del RSV se utilizó para explorar la radiosensibilidad del virus y la capacidad de la célula para establecer y perpetuar la infección. Se llevaron a cabo estudios paralelos con el virus de la enfermedad de Newcastle (*Newcastle disease virus*, NDV), parecido al RSV en tamaño y contenido de RNA. Ambos virus fueron similares en su sensibilidad a los rayos X, pero el RSV fue mucho más resistente que el NDV a la inactivación por UV (31,32). La resistencia relativa de RSV a los UV fue similar a la del fago atemperado comparado con el virulento (33). Sin embargo, la capacidad de las células para mantener la infección ya iniciada por VRS fue mucho más sensible que el NDV a los rayos UV y a los rayos X. Sin embargo, una vez que comenzó la producción de RSV, la radiorresistencia de las células para continuar produciendo virus fue comparable a la de las células productoras de NDV. La sensibilidad a la radiación de las células para iniciar la infección por RSV fue similar a su capacidad de división. La similitud de los patrones de radiosensibilidad de RSV con los de bacteriófagos atemperados sugirió que el RSV podía reparar el daño producido por los UV mediante recombinación con secuencias relacionadas del ADN celular y que necesitaba la replicación del ADN celular para la integración. Sin embargo, la naturaleza ARN del genoma de RSV indicaba que el mecanismo de integración era diferente. Más adelante se considerarán diferentes hallazgos, tanto en contra como a favor de este concepto.

Factor inductor de resistencia: un virus en embriones de pollo que induce resistencia a la infección por el RSV en cultivo

La formación de focos por parte de RSV bajo condiciones controladas solía reproducirse, pero en ocasiones se reducía hasta 100 veces en las células de un lote combinado de embriones. Comprobé que esta resistencia a la infección por RSV podía ser transferida a células susceptibles añadiendo el medio de cultivo de las células resistentes, lo que indicaba que la resistencia era inducida por un agente infeccioso que no producía cambios histopatológicos (34). El agente infeccioso fue llamado factor inductor de resistencia (*resistance-inducing factor*, RIF). Se demostró que se trataba de una cepa de virus de la leucosis aviar (ALV) que había sido introducido por accidente en los cultivos, procedente de alguno de los embriones que habían sido combinados para conseguir el cultivo celular de trabajo. Aparentemente, ese embrión había sido infectado congénitamente con el RIF y la infección se había extendido en pocos días a las células de los demás embriones, induciendo así resistencia en todo el cultivo. A partir de entonces, se ensayó sistemáticamente la resistencia a la infección por RSV de los cultivos celulares procedentes de embriones individuales, y los positivos fueron descartados. El RIF fue morfológica y físicamente indistinguible de RSV (35). RIF y RSV estaban relacionados antigénicamente, pero no resultaron idénticos cuando se compararon mediante inhibición de la infectividad por el antisuero anti-RSV. Sin embargo, RIF fue antigénicamente indistinguible de RPL12, una cepa clásica del virus de la linfomatosis visceral, y produjo linfomatosis y eritroblastosis cuando se inoculó a pollos.

El RIF fue titulado sembrándolo en diluciones seriadas sobre células susceptibles y enfrentándolas con RSV, después de pases seriados de las células para determinar el punto final de la resistencia. Su relación con el ALV fue sustentada inoculando cultivos susceptibles con varias cepas de ALV y produciendo resistencia a la infección por RSV. Este RIF-test demostró ser una forma eficaz de detectar el ALV en estudios epidemiológicos de las bandadas de pollos, de lo que se tratará a continuación. Posteriormente se demostró que la resistencia a la superinfección por RSV de las células infectadas con RIF se debía a que la glicoproteína de la envoltura viral del RIF-ALV ocupaba los receptores para el virus presente en la superficie celular.

Aislamiento del virus asociado al Rous a partir de stocks de RSV

A partir de células transformadas por RSV y de cultivos celulares expuestos a «stocks» de RSV, diluidos más allá de los puntos finales de formación de focos transformados, se aisló un virus no citopático que fue llamado virus asociado al Rous (*Rous-associated Virus*, RAV) (36). El RAV pudo ser detectado por su fuerte interferencia con la infección por RSV, e indujo resistencia a la infección por RSV más rápida y poderosamente que el RIF. Los anticuerpos fluorescentes permitie-

ron localizar la maduración RAV en la membrana celular, igual que RSV y RIF. Antigénicamente, RAV fue indistinguible de RSV y, por tanto, resultó estar más relacionado inmunológicamente con RSV que RIF. No dio lugar a tumores en el sitio de inoculación, pero produjo una eritroblastosis fatal después de inoculación (i.v.) en pollos. Estas características justifican la clasificación de RAV como un miembro de la familia ALV.

Epidemiología de la infección por RIF-ALV en una bandada de pollos

RIF fue indistinguible de RPL12, una cepa clásica de ALV. Se iniciaron estudios con RIF como modelo para la transmisión congénita, la propagación del ALV y la respuesta en anticuerpos a la infección, utilizando la interferencia con RSV como ensayo de titulación (37,38). Aproximadamente el 20% de las gallinas tenían una viremia persistente a título elevado de RIF, y todas ellas transmitían el virus a través del huevo. En los embriones resultantes se objetivó viremia y eran transmisores congénitos. A su vez, los gallos virémicos, que habían recibido la infección por vía congénita desde gallinas virémicas, no transmitían la infección por esa vía. Una minoría de gallinas no virémicas fueron transmisoras congénitas, pero más erráticamente que las virémicas. No se encontraron anticuerpos en gallinas o gallos virémicos, por lo que parecían ser inmunológicamente tolerantes para el virus. La ausencia de transmisión congénita por parte de los gallos virémicos suscitó dudas sobre la integración del genoma viral en el ADN del huésped, lo que se tratará más adelante.

La infección congénita por el RIF se extendió horizontalmente desde la progenie de gallinas virémicas a la progenie de gallinas no virémicas. Estas últimas mostraron viremia baja o moderada, manifestada a los 2 meses tras a la eclosión, afectó a aproximadamente el 40% de la población a los 3 meses y se redujo a cero hacia los 5 meses. Aproximadamente en una tercera parte de la progenie de las gallinas no virémicas se demostraron anticuerpos frente a RIF derivados de la madre unas 2 semanas después de la eclosión, pero perdieron esos anticuerpos hacia la cuarta semana y comenzaron a producir sus propios anticuerpos en la octava semana. La proporción de gallinas con anticuerpos aumentó hasta 80-90% a las 18 semanas y se mantuvo en ese nivel durante muchos meses. La presencia de anticuerpos podría explicar la reducción del título de virus en la sangre de estas aves a partir de las 8 semanas y su acusado descenso después de 14 semanas. Cuando la progenie de las gallinas no transmisoras se crió en condiciones de aislamiento, ninguna de las aves desarrolló viremia o anticuerpos anti-RIF, lo que demostraba que la infección se debía al contacto con las aves virémicas.

La linfomatosis visceral fue unas seis veces más frecuente en las aves con infección congénita que en las infectadas por contacto. En la autopsia se diagnosticó entre 4 y 14 meses después de la eclosión, con un promedio de aproximadamente 8 meses en aves tanto congénita como horizontalmente infectadas.

El complejo viral de la leucemia murina y el sarcoma

Los pollos carecen de los ganglios linfáticos periféricos habituales en ratones y humanos (39). Por lo tanto, en los casos avanzados de linfomatosis visceral en pollos, no puede haber adenopatías, características de la leucemia linfática humana y murina. El timo es importante en ciertas formas de leucemia humana y de ratón, pero no juega un papel importante en las formas comunes de la leucemia aviar. Por estas y otras razones, intentamos detectar los virus causales de las leucemias de ratones que podrían aplicarse a la comprensión de las leucemias humanas.

Los intentos iniciales para aislar virus en leucemia de ratón no dieron resultados (39). Se desarrollaron estirpes de ratones consanguíneos en los que la incidencia de leucemia era elevada, y los trasplantes en serie de células leucémicas tuvieron éxito. No lo tuvo la transmisión de la enfermedad inoculando filtrados de los extractos de las células, hasta que los extractos se inocularon en ratones recién nacidos de una estirpe con baja incidencia de leucemia (40). En un sarcoma trasplantable de rata también se encontró virus con el test de fijación del complemento, que detectó anticuerpos específicos (41). Este mismo test para el virus de la leucemia murina se aplicó con éxito a cultivos infectados de fibroblastos de embrión de ratón. También detectó virus activado en un sarcoma inducido en hámster por un virus de sarcoma de ratón. Estudios posteriores pusieron de manifiesto «certainas similitudes notables entre estos virus y los del complejo de la leucosis aviar y del sarcoma de Rous» (41). Entre estas similitudes se incluía la detección de los virus de la leucemia murina por interferencia con el virus de sarcoma de ratón y la aparición de formas defectivas de este último, que podían ser activadas por la superinfección con el virus de la leucemia de ratón. Que yo sepa, no se ha hecho ningún estudio sistemático de la epidemiología del virus de la leucemia de ratón como el que se hizo en pollos.

Defectividad del RSV*

Como ya se mencionó, tanto Bryan como Prince comprobaron que algunos tumores inducidos en los pollos por dosis muy bajas de RSV no daban lugar a la producción de virus infecciosos (19, 20, 42). También Temin hizo hallazgos similares trabajando con focos individuales de células transformadas por RSV en cultivo (43). En este último caso, la adición del ALV virus inducía la producción de RSV a partir de los focos «no productores». Los pases en serie de tumores no infecciosos a veces dieron lugar a la producción de virus (20, 42), como ocurrió con el cultivo

* *N. del T.*- Un virus «defectivo» no consigue multiplicarse sin la ayuda de otro al que llamamos «auxiliar», que suple las funciones replicativas de las que carece el virus defectivo. Por ejemplo, el virus hepatitis «delta» es un virus defectivo que requiere la presencia de su «auxiliar», el virus de la hepatitis B. No puede haber hepatitis delta sin hepatitis B.

prolongado de clones no productores de focos transformados inducidos por dosis muy bajas de RSV (44).

Como también se ha señalado previamente, encontramos un ALV-RAV en nuestro stock de la cepa RSV de elevado título de Bryan (36) y solicité a un nuevo compañero posdoctoral, Hidesaburo Hanafusa, que intentara aislar focos transformados libres de RAV a partir de cultivos infectados con muy bajas dosis de RSV (45). Comprobó que la mayoría de los focos no producían ni RSV ni RAV al ser pasados en serie, por lo que se les llamó focos no productores (NP). Las células intactas de los focos NP dieron lugar a focos cuando se sembraron en fibroblastos normales de pollo en exceso. La adición de RAV a los cultivos NP dió lugar a RSV. Otros virus no transformantes del complejo ALV, incluyendo RIF, indujeron también la producción de RSV infeccioso a partir de cultivos NP. La curva de crecimiento de RSV obtenido de células NP activadas por RAV, al que llamamos RSV(RAV), fue paralela a la de RAV, lo que era coherente con que la tasa de producción del virus infeccioso RSV(RAV) implicaba un proceso de maduración dependiente de un virus auxiliar.

Las células NP fueron incapaces de absorber anticuerpos neutralizantes del RSV a partir de antiseros o de estimular la síntesis de anticuerpos neutralizantes al ser inoculados en pollos, lo que indicaba que la proteína de la cubierta específica era la del virus auxiliar (46). La posible presencia de antígeno de la cubierta viral se ensayó también mediante la inoculación de células NP a pollos para producir tumores, buscando después anticuerpos neutralizantes. La inoculación de un número relativamente pequeño de células NP intactas en pollos indujo tumores visibles en no más de 5 días, que continuaron creciendo durante unos 12 días para regresar después (46). La regresión de los tumores NP es presumiblemente el resultado de una reacción inmunológica contra los antígenos de las células tumorales. De las biopsias de los tumores se obtuvieron células que crecieron en cultivo con las características de las células de sarcoma de Rous. Ninguno de los tumores NP produjo virus espontáneamente, pero en todos ellos, la producción de RSV pudo ser activada por RAV.

Los pollos que habían sufrido tumores NP desarrollaron nuevos tumores al ser inoculados con el RSV, mientras que los pollos inoculados con RAV fueron resistentes a la inoculación con RSV. Los resultados globales mostraron que no había antígenos específicos de la cubierta del virus en las células NP, y que el RSV defectivo dependía totalmente del virus auxiliar para madurar como partícula infecciosa (46).

Un nuevo virus auxiliar, llamado RAV-2, también fue aislado del stock de la cepa Bryan de elevado título de RSV (47). RAV-2 no estaba relacionado antigénicamente con el RAV-1, que se encontró en el mismo stock de RSV. RAV-2 no crecía en las células de algunos embriones de pollo que soportaban el crecimiento de RAV-1, pero otros embriones permitían el crecimiento de ambos virus auxiliares. Cada uno de los dos virus auxiliares confiere sus propiedades en cuanto a variedad de huésped al RSV activado por ese auxiliar. El RSV activado por RAV-2 [es decir, RSV (RAV2)] no es susceptible a la interferencia inducida por el RAV-1. Tanto el

rango de huéspedes de RSV como la antigenicidad del virus y su susceptibilidad a la interferencia son determinados por el virus auxiliar, que proporciona la cubierta del virus. Las curvas de crecimiento de RSV infeccioso en células NP activadas por virus auxiliares de diferentes tasas de crecimiento, revelaron que el virus auxiliar fue el factor regulador (48). También se hicieron experimentos en los que se añadió RSV a las células previamente infectadas con virus auxiliares que, por lo tanto, estaban en fase de plena producción de cubiertas virales. En este último caso se incluyó la superinfección con RSV(RAV-2). La tasa de producción de RSV fue independiente del virus auxiliar, porque una gran cantidad de cubiertas virales ya estaba disponible. Por lo tanto, todas las propiedades de RSV evaluadas, excepto la transformación, eran controladas por la cubierta del virus auxiliar (49). Las diferentes cubiertas virales con el mismo genoma transformante son denominadas pseudotipos, pudiéndose comparar a un lobo con piel de oveja.

Los virus de las leucosis agudas, como las mieloblastosis y eritroblastosis, son también defectivos (50,51). Estos virus letales infectan productivamente muchos tipos de células, pero sólo transforman sus células hematopoyéticas afines (52,53).

Partículas virales en células NP

Algunos resultados de otros laboratorios no fueron plenamente coherentes con los descritos anteriormente. El examen al microscopio electrónico de las células NP de pollo, llevado a cabo por Dougherty y Di Stefano (54), reveló la presencia de partículas extracelulares con morfología de ALV. Se estimó que el número de partículas de virus en las células era alrededor de la décima o centésima parte de las halladas en el cultivo de células de sarcoma de Rous que liberaban virus infeccioso. La morfología de las células NP en el microscopio electrónico fue similar a la de las células que liberaban partículas infecciosas de RSV (55). El fracaso de las células NP para producir virus infeccioso indicó que la transformación dependía sólo de la infección por RSV. El marcaje de las células con NP con ^3H -uridina y la posterior purificación de las partículas virales marcadas, reveló que tenían las mismas características de sedimentación que el RSV obtenido de células NP activadas por RAV-1, pero que se hallaban en una cantidad mucho menor. El ARN de las partículas virales obtenidas de células NP marcadas con ^{32}P tenía la misma composición de bases que RSV (RAV-1) y RAV-1.

Vogt comprobó que las partículas NP no eran infecciosas para las células C/B habitualmente usadas, que son susceptibles a virus como el RAV-1 y su pseudotipo RSV (RAV-1) (56). Por el contrario, las células tipo C/A, resistentes a la infección por RAV-1 y sus pseudotipos pero susceptibles a la infección por RAV-2 y sus pseudotipos, también fueron susceptibles a la infección por las partículas de las células NP (56). Las partículas NP también infectaron y transformaron células de codorniz. Por lo tanto, estas partículas fueron llamadas RSV(0), virus que pueden infectar

ciertos tipos de células aviares pero no eran detectables en la mayoría de los sistemas de ensayo. Sin embargo, incluso el mayor título de infectividad RSV(0) encontrado en cultivos NP fue 1000 veces más bajo que los títulos de RSV dependiente de virus auxiliar producidos por las mismas células después de superinfección con un ALV. Por lo tanto, el RSV (0) es *cuantitativamente* deficiente en la capacidad para producir una progenie viral funcional. Las observaciones básicas que sostienen el concepto de virus defectivos del sarcoma aviar, es decir, la activación de las células NP y el control sobre la envoltura por parte de los virus auxiliares, siguen siendo válidas, pero el énfasis se ha desplazado de una defectividad absoluta a una relativa (56). Posteriormente se demostró que la envoltura del RSV(0) infeccioso era proporcionada por un RAV(0) endógeno (transmitido genéticamente) o por virus defectivos endógenos parecidos (57-59).

La gran mayoría de las líneas NP produjeron virus de un título relativamente bajo que era capaz de infectar a C/A (células resistentes a la clase A de RSV) y células de codorniz, tal como se ha descrito antes para el RSV(0) (60). Sin embargo, una minoría de las líneas NP no produjo virus infeccioso detectable en ninguna línea celular, aunque la presencia física de partículas de virus fue detectada mediante marcaje con ³H-uridina y centrifugación en gradiente de densidad. La adición de RAV-1 a estas células NP produjo el virus infeccioso de dos tipos, de acuerdo con su rango de huésped.

Se contempló el problema de la defectividad con un enfoque diferente usando RSV-29, una cepa de RSV que había sufrido el menor número de pases después de su aislamiento del tumor de pollo nº 1 entre todas las disponibles (61). Su caracterización biológica indicó que era defectivo para la producción de virus infeccioso maduro. Tenía las propiedades físicas del RSV, así como todos los genes, excepto el preciso para producir la proteína de la envoltura imprescindible para la infección (62). Esto sugirió que el RSV original era un virus defectivo transformante que dio lugar a otros virus defectivos, como la cepa de alto título de Bryan y a virus no defectivos, como la cepa Praga. También se propuso que todos los virus transformantes eran inicialmente defectivos para la replicación, y que las cepas capaces de replicarse eran generadas por recombinación posterior con un virus auxiliar (61,63,64). La importancia de la defectividad para la replicación sólo se hizo evidente mucho más tarde, cuando se descubrió que era resultado de la sustitución de genes replicativos virales por secuencias derivadas de la célula huésped importantes para la transformación (64). Es de destacar que la cepa Praga de RSV, que es competente para la replicación viral, transforma células de mamífero, pero no produce virus a menos que las células se fusionen con células de pollo (65).

Genética de la susceptibilidad y resistencia a RSV

Los estudios genéticos de los RSV inoculados por diversas vías en varias líneas muy

endogámicas de pollos apoyaron los resultados de Prince (17); es decir, predomina la susceptibilidad y para expresarse depende de un solo par de genes autosómicos (66). Se obtuvieron resultados similares en un conjunto diferente de líneas endogámicas de pollos en los que RSV se inoculó a la CAM o a cultivos celulares y se cuantificó, respectivamente, por placas en la CAM y/o focos transformados, así como por la producción de virus en cultivo celular (67). Anteriormente se había demostrado que estos métodos de ensayo proporcionaban los mismos resultados que los obtenidos por producción de tumores en pollos inoculados después de la eclosión (68).

Estos estudios demostraron que la resistencia a las variantes del RSV era controlada por un solo gen, pero podrían no estar considerando la posibilidad de que diferentes proteínas de envoltura virus-específicas determinen la gama de huéspedes de RSV, ya que ni la defectividad de RSV ni la naturaleza de su virus auxiliar eran conocidas en ese momento (47). El rango de huéspedes también depende de los receptores celulares determinados por el genoma de las células. El más importante virus auxiliar en el «stock» RSV de alto título de Bryan es RAV-1, que proporciona la envoltura virus-específica necesaria para la infectividad del RSV defectivo designado como RSV (RAV-1). Produjo focos en cultivos celulares derivados de los embriones normales de todas las cepas de pollos Kimber Farms White Leghorn probados en mi laboratorio. Sin embargo, RSV (RAV-2), no logró producir focos en una pequeña fracción de los embriones de este mismo origen. Por lo tanto, se usó RSV (RAV-2) para determinar la base genética de la resistencia y susceptibilidad de las células a la infección (69). Los resultados de la sensibilidad a RSV (RAV-2) mostraron que estaba determinada por un único par de genes autosómicos y que la susceptibilidad es dominante sobre la resistencia. El gen no influye en la susceptibilidad de las células a la infección por RSV (RAV-1) o por RAV-1 sembrados aisladamente. Debido a que la expresión del gen de la susceptibilidad celular está supeditada a la naturaleza de la capa exterior del virus infectante, parece probable que el gen controle un componente de la superficie celular implicado en la adsorción del virus o en su penetración. Se obtuvieron resultados y conclusiones similares sobre la relación entre la susceptibilidad celular a RSV y la envoltura viral en otras líneas de pollos infectados por pseudotipos de RSV y RSV no defectivo (70, 71). Previamente habían sido descritos cinco grupos de susceptibilidad a los diferentes tipos de RSV (72, 73), que deben ser consultados en los artículos originales para su caracterización detallada.

La cepa Bryan de RSV no suele infectar a los mamíferos, pero la cepa Schmidt-Ruppín de RSV, sí (74). Produce sarcomas en hamsters, ratas, ratones y cobayas, aunque con lesiones regresivas en conejos. Antigénicamente es distinta del RSV (RAV-1) componente de la cepa Bryan. Por tanto, es probable que la capacidad de la cepa Schmidt-Ruppín para infectar mamíferos esté relacionada con las características propias de su cubierta y con su unión a un receptor en la membrana celular de los mamíferos (69). La capacidad de las cepas de RSV Schmidt-Ruppín y Praga, derivadas del RSV original, probablemente refleja las condiciones locales selectivas

que favorecen a ciertos serotipos (72). La resistencia de las líneas de pollo a ciertos subgrupos, así como la naturaleza de la flora viral indígena del tumor del huésped animal, pueden ser factores importantes en esa selección.

Las mutantes de transformación

Temin (75) publicó la primera mutación que alteraba la morfología de las células en los focos transformados. A diferencia del redondeamiento de las células en casi todos los focos producido por el «stock» original de la cepa Bryan de RSV en unos 7 días, aproximadamente el 1% de los focos hacia los 9 días se componía de células largas y fusiformes o mezclas de células fusiformes redondeadas y cortas. El virus aislado de estos focos transformaba células con el mismo fenotipo morfológico. Los resultados mostraron que la morfología de las células transformadas dependía del genoma del virus y se transmitía fielmente a las células de la progenie durante su proliferación. El análisis estadístico de la producción de mutantes del virus durante el desarrollo de clones transformados demostró que las mutaciones virales ocurrían durante la multiplicación en las células y no en el momento de la infección. Además, se produjo otra clase de mutantes a partir de cepas de RSV competentes para la replicación (76,77); y esas mutantes, que eran completamente defectivas para la transformación, jugaron un papel significativo en la identificación física del gen transformante *src* de RSV.

Las primeras mutantes de RSV sensibles a la temperatura fueron aisladas de la cepa B77 (78). Sin embargo, su utilidad fue limitada ya que las células en las que se originaba la mutante eran incapaces de crecer a la temperatura no permisiva. Posteriormente, Steve Martin (79) trató a la cepa Schmidt-Ruppin de RSV con el mutágeno MNNG (nitroguanidina) y ensayó la capacidad de los clones de las células supervivientes infectadas para producir la transformación a 41°C. Alrededor del 2% de los clones no fueron capaces de transformar las células a esa temperatura elevada, pero produjeron virus con el mismo título que las células infectadas con el virus no mutado. Las células transformadas por el virus mutante a 36°C recuperaron su morfología normal en unas 4 horas cuando se volvieron a incubar a 41°C y volvieron otra vez al estado transformado en unos 2 días cuando se incubaron de nuevo a 36°C. La pérdida reversible a 41°C del estado transformado indicó que el papel de la mutante era necesario para mantener las alteraciones morfológicas propias de la transformación, pero no para la replicación del virus.

Hipótesis del ADN proviral

Por diferentes motivos Fred Prince y yo, independientemente, introdujimos la idea

de que la infección por VRS podría ser similar a la del bacteriófago atemperado y las bacterias lisogénicas (12,42). Los resultados obtenidos en los experimentos de radiación de RSV y en las primeras etapas de la infección de células de embrión de pollo concordaban con la integración del genoma del RSV en el ADN de la célula huésped (31,33). Me quedé con esa idea hasta que el patrón de transmisión congénita de ALV demostró que, si bien todas las gallinas virémicas transmitían el virus a sus embriones, los gallos virémicos no lo hacían (37). Cinco de los 10 gallos de este estudio eran virémicos, lo que indicaba que varios cientos de embriones deberían estar congénitamente infectados si el virus estuviera integrado en el ADN de los espermatozoides de los gallos virémicos (38).

Estos resultados no impidieron que Temin persistiera en su convicción de que el genoma del RSV estaba integrado en el genoma de la célula huésped*, basado en parte en la herencia estable del virus en las células transformadas que no producían virus infeccioso (63). Esto era originalmente una hipótesis genética que no contenía ninguna implicación sobre la naturaleza molecular del provirus. Sin embargo, los estudios con inhibidores de la síntesis de ácido nucleico indicaron que la síntesis de ADN era esencial en las primeras etapas de la infección por RSV (80,81) y su virus auxiliar (82). La hipótesis del ADN proviral fue propuesta por primera vez por Temin basándose en los efectos inhibitorios de la actinomicina D sobre la producción de RSV (63). Temin reconoció que la actinomicina D también inhibía el crecimiento del virus de la gripe, que no está integrado en el ADN de la célula huésped (83). Sin embargo, afirmó que la producción de virus de la influenza solo era inhibida por un tratamiento precoz con actinomicina D, mientras que la producción de RSV no estaba tan restringida. La revisión del artículo en el que se basa esta afirmación (84) no confirma esta proposición, ni tampoco tiene en cuenta que el período de latencia de RSV es mucho mayor que el del virus de la influenza. John Bader atribuyó la inhibición de la producción de RSV por la actinomicina D (82) a un efecto general sobre el ADN en la síntesis de virus, pero se demostró un efecto específico por la acción directa de citosina-arabinósido sobre la síntesis de ADN.

Hubo dudas para aceptar la hipótesis del ADN proviral (63) posiblemente por tres razones: *a*) el dogma central de la biología postulaba una transferencia unidireccional de la información del ADN al ARN, *b*) no quedaba clara la interpretación de algunos de los experimentos con inhibidores, y *c*) no había transmisión congénita de RIF (que está estrechamente relacionado con RSV) por los gallos virémicos. Este escepticismo continuó durante varios años a pesar de la demostración de que la síntesis inicial de ADN era virus-específica (82). Sin embargo, la hipótesis del ADN proviral fue ampliamente aceptada con la demostración por Temin y Mizutani (85) de un enzima presente en el virión al que llamaron «síntesis endógena de ADN dependiente de ARN» y el descubrimiento independiente por Baltimore (86) del

* *N. del T.*- Las relaciones entre el autor de este artículo, Harry Rubin, y su compañero/discípulo Howard Temin eran tensas precisamente por esta razón (ver referencia 100). Rubin creía que era imprudente y prematuro decir esto. Finalmente, se demostró que Temin tenía razón.

mismo enzima al que llamaron «ARN polimerasa viral dependiente de ADN» y que más tarde se convertiría en la «transcriptasa inversa». Estos resultados superaron las objeciones de una transmisión unidireccional de la información del ADN al ARN y remacharon en la mente de todos, menos unos pocos inconformistas, la hipótesis del ADN proviral (81). Si quedaba alguna duda, fue resuelta por la demostración de que el ADN celular obtenido tras la infección de células de rata transformadas por RSV, pero no productoras de virus, era infeccioso (87). Este fue el resultado obtenido de la infección de ratas recién nacidas con la cepa Praga de RSV, propagada en Checoslovaquia (88).

Con notable presciencia Temin propuso también que «el sarcoma de Rous apareció antes que el RSV. Otros eventos que no implican la presencia de un virus condujeron a la formación de genes para el cáncer y al sarcoma de pollo. El sarcoma fue presumiblemente infectado por un ALV, y el RSV fue formado por una combinación poco común»* (63). Esta propuesta se confirmó después por la evidencia molecular de que el RSV original era defectivo para la replicación (61,64), pero la explicación de todo esto está más allá del alcance de esta historia premolecular de la virología tumoral. Cabe señalar, sin embargo, que fueron los estudios sobre RSV los que condujeron a la identificación de los oncogenes celulares (89).

Retrospectiva y prospectiva

En los cinco años que siguieron al éxito del trasplante de los sarcomas de pollo y el aislamiento del RSV a partir de los tumores, Rous llevó a cabo un intenso estudio de varios sarcomas de esas aves, como se deduce de las numerosas referencias a su obra citadas aquí. En ese lapso de tiempo, publicó otros tantos artículos subsidiarios sobre esos sarcomas, lo que da una idea de la amplitud y productividad de sus investigaciones. Más tarde dirigió su interés hacia el virus del papiloma de Shope en el conejo, el primer agente bien estudiado conocido por causar tumores epiteliales en mamíferos (90). Estaba particularmente interesado en la progresión de papiloma a carcinoma (91) y compaginó estos estudios con los de los efectos de los hidrocarburos cancerígenos, en los que descubrió y dio nombre a los procesos de iniciación y promoción (92). Se acepta generalmente que la iniciación es un acontecimiento genético. Pero a pesar de ser un gran científico, se opuso ardientemente a la «hipótesis de la mutación somática» de la carcinogénesis, que era generalmente aceptada (30). Esto no sorprende demasiado teniendo en cuenta que Albert Einstein,

* *N. del T.*- Esto quedó demostrado cuando se descubrió que un oncogén similar al *src* del RSV estaba en realidad también presente en las células normales, no cancerosas. Es su mutación o hiperexpresión lo que da lugar al sarcoma. Cuando un ALV, relativamente frecuente en pollos, infecta a células sarcomatosas y se integra en su genoma, puede «robar» el *src* celular, y así, por puro azar, se generó el virus del sarcoma de Rous. Por tanto el RSV no es más que el mismo ALV con un gen suplementario de origen celular, *src*, que es el responsable de la malignización.

el arquitecto de las teorías de la relatividad general y especial, rechazó la mecánica cuántica, a pesar de que es el fundamento rigurosamente probado de la moderna física atómica (93). Estos dos ejemplos muestran que ni siquiera los más grandes científicos son infalibles.

Tuve la oportunidad de visitar a Rous en 1953 en el Instituto Rockefeller cuando estaba iniciando mi trabajo con el RSV. Era un anfitrión alegre y cordial, que me invitó a almorzar en el augusto comedor del Instituto y luego me presentó a Richard Shope en el laboratorio de éste. Shope estaba solo en una mesa de trabajo (parece que en aquellos tiempos los biólogos hacían sus experimentos con sus propias manos). Rous me dio una colección encuadrada de sus trabajos sobre los sarcomas de pollo y sus virus. También me dio dos ampollas selladas de tejido tumoral liofilizado que contenían virus del osteocondrosarcoma (7). Los usé para atraer a un estudiante graduado, Howard Temin, y retirarle de la embriología para unirle al esfuerzo de desarrollo de un ensayo práctico de cultivo celular de RSV, con la promesa de que podría trabajar con el virus del osteocondrosarcoma del tumor nº 7 en cuanto el ensayo de RSV estuviera listo (22). El problema retrospectivo de ese esfuerzo de reclutamiento fue que, aunque el ensayo de RSV quedó establecido (23,94), el contenido viral de las ampollas del osteocondrosarcoma ya no estaba activo. Sin embargo, se ha dicho que «el ensayo de focos revolucionó el estudio de RSV permitiendo estudiar la interacción de una sola célula con una sola partícula de virus», y el desarrollo de este ensayo propició avances rápidos en el campo de la retrovirología*, que comenzaron en la década de 1960 (95).

Dejé de trabajar con RSV hacia 1970 para estudiar la regulación del crecimiento celular, en la seguridad de que mis antiguos asociados Temin, Hanafusa, Vogt y Martin sacarían adelante el trabajo con RSV y ALV sin mí, lo que realmente hicieron. Mi aportación principal en el campo de la regulación del crecimiento celular fue que el nivel de magnesio libre activado en la membrana jugaba un papel clave en el control de la coordinación de la proliferación normal de las células por su efecto directo sobre la tasa global de la síntesis de proteínas, que a su vez determina la tasa de inicio de la síntesis de ADN varias horas más tarde (96). La evidencia obtenida de la transformación de los fibroblastos humanos sugiere que han perdido su capacidad de regular el magnesio (97). Privando a las células transformadas del suministro adecuado de magnesio externo se normaliza su morfología y su crecimiento (98). Sería interesante comprobar si esto es cierto también en células de pollo transformadas por RSV. Hay otras preguntas sobre la biología de la infección por VRS y ALV que aún están sin resolver, tales como las siguientes: a) ¿Se produce

* *N. del T.*- Los «virus ARN tumorales» pasaron a llamarse «retrovirus» cuando el descubrimiento de la «transcriptasa inversa» (Nobel para Temin y Baltimore en 1975) demostró que era posible transcribir ADN a partir del ARN viral, «retrocediendo» así en la «única» dirección posible postulada por el hasta entonces «dogma central de la Biología molecular», que sólo aceptaba la transcripción de ARN a partir de ADN. El VIH, en principio no productor de tumores (de forma directa) y no portador de oncogenes, contiene una transcriptasa inversa: es un retrovirus.

algún virus en los sarcomas de pollo que aparecen en condiciones naturales antes de ser sometidos a trasplantes en serie que incrementen la malignidad? *b*) ¿Cuál es el material presente en el medio de los cultivos masivamente infectados por RSV que inhibe el crecimiento de las células normales y transformadas? *c*) Dado que los genomas retrovirales se integran en el ADN celular, ¿por qué los gallos virémicos no transmiten congénitamente RIF (es decir, ALV), mientras que sí lo transmiten todas las gallinas virémicas? (38)

Es evidente que los estudios *in vitro* de la biología y la genética molecular del RSV han tenido un impacto enorme en nuestra comprensión de los oncogenes y la transformación neoplásica de las células (95,99,100). La llegada a esta conclusión se vio facilitada por la simplicidad del sistema en el que un solo gen del virus determina la transformación neoplásica de una célula individual y sus descendientes en el plazo de unos pocos días, sin pasos intermedios. Sin embargo, esta misma simplicidad plantea dudas sobre su idoneidad para caracterizar el complejo desarrollo del cáncer humano. La historia natural de los cánceres humanos sólidos abarca varias décadas y supone etapas progresivas, preneoplásicas y neoplásicas, de desarrollo (101). Estudios recientes de genómica indican que hay entre 1.000 y 10.000 sustituciones somáticas en la mayoría de los cánceres humanos de adultos y hasta 100.000 en el cáncer de pulmón y el melanoma (102). Además, hay otros tipos de cambios genéticos y epigenéticos que incrementan la complejidad del proceso. Igual que en el caso del RSV, la comprensión del cáncer humano sería más fácil con un modelo de cultivo celular cuantitativo que mostrara todas las etapas del proceso. Un modelo de este tipo está representado en la transformación progresiva espontánea de las células NIH 3T3 conforme se dan pases en serie con una alta densidad de población en cada pase y bajas concentraciones de suero bovino (103). La selección seriada de células con aumento de la capacidad para escapar de la inhibición por contacto, valorada cuantitativamente por los incrementos pequeños pero significativos en la densidad de saturación, ilustra las etapas iniciales de la cancerización en condiciones naturales que preceden a la evidencia visual de la transformación neoplásica. Existe una gran heterogeneidad en la población de partida en cuanto a la capacidad celular para seguir proliferando en cultivos que ya son confluentes. Estas variantes preexistentes de bajo «fitness» son las primeras candidatas a la selección, dando lugar a crecimientos hiperplásicos que generan a su vez nuevas mutaciones. Estas tienen la capacidad de producir focos transformados de tamaño y densidad creciente, que conduce a la capacidad para la génesis tumoral. Este modelo gana credibilidad ante la evidencia reciente de que la fuerza motriz en el cáncer humano es la selección (104,105), igual que lo es en la transformación espontánea en cultivo. Los modelos de cultivo celular de transformación por RSV y de transformación espontánea se complementan entre sí y proporcionan una comprensión más completa del cáncer humano. Lo que Rous inició hace un siglo ha tenido y seguirá teniendo repercusiones en la biología tumoral durante mucho tiempo.

Agradecimientos

Doy las gracias a Dorothy M. Rubin por la transcripción y edición del manuscrito a través de todas sus etapas, y a Steve Martin por sus valiosos comentarios.

Referencias

1. Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med.* 1911; 13: 397-411.
2. Ellermann V, Bang O. Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Centralbl J Bakt Abt 1 (Orig)* 1908; 46: 595-609.
3. Van Epps HL. Peyton Rous: Father of the tumor virus. *J Exp Med.* 2005; 201: 320.
4. Rous P. A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl) *J Exp Med.* 1910; 12: 696-705.
5. Rous P, Murphy JB, Tytler WH. The role of injury in the production of a chicken sarcoma by a filterable agent. *JAMA.* 1912; LVIII: 1751-1753.
6. Rous P, Murphy JB. Causation by filterable agents of three distinct chicken tumors. *J Exp Med.* 1914; 19:52-68.
7. Rous P, Murphy JB, Tytler WH. A filterable agent the cause of a second chicken-tumor, an osteochondrosarcoma. *JAMA.* 1912; 59: 1793-1794.
8. Rous P, Lange LB. The characters of a third transplantable chicken tumor due to a filterable cause. A sarcoma of intracanalicular pattern. *J Exp Med.* 1913; 18: 651-664.
9. Rous P. Comment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1967; 58: 843-845.
10. Bryan WR. Quantitative studies on the latent period of tumors induced with subcutaneous injections of the agent of chicken tumor I; curve relating dosage of agent and chicken response. *J Natl Cancer Inst.* 1946; 6: 225-237.
11. Keogh EV. Ectodermal lesions produced by the virus of Rous sarcoma. *Br J Exp Pathol.* 1938; 19: 1-9.
12. Rubin H. Quantitative relations between causative virus and cell in the Rous no. 1 chicken sarcoma. *Virology.* 1955; 1: 445-473.
13. Rubin H. The production of virus by Rous sarcoma cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1957; 68: 459-472.
14. Bather R. The nucleic acid of partially purified Rous No. 1 sarcoma virus. *Br J Cancer.* 1957; 11:611-619.
15. Robinson WS, Pitkanen A, Rubin H. The nucleic acid of the Bryan strain of Rous sarcoma virus: Purification of the virus and isolation of the nucleic acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1965; 54: 137-144.
16. Prince AM. Quantitative studies on Rous sarcoma virus. I. The titration of Rous sarcoma virus on the chorio-allantoic membrane of the chick embryo. *J Natl Cancer Inst.* 1958; 20: 147-159.
17. Prince AM. Quantitative studies on Rous sarcoma virus. II. Mechanism of resistance of chick embryos to chorio-allantoic inoculation of Rous sarcoma virus. *J Natl Cancer Inst.* 1958; 20: 843-850.
18. Prince AM. Quantitative studies on Rous sarcoma virus. III. Virus multiplication and cellular response following infection of the chorioallantoic membrane of the chick embryo. *Virology.* 1958; 5: 435-457.
19. Bryan WR, Calnan D, Moloney JB. Biological studies on the Rous sarcoma virus. III. The recovery of virus from experimental tumors in relation to initiating dose. *J Natl Cancer Inst.* 1955; 16: 317-335.
20. Prince AM. Quantitative studies on Rous sarcoma virus. IV. An investigation of the nature of «non-infective» tumors induced by low doses of virus. *J Natl Cancer Inst.* 1959; 23: 1361-1381.
21. Manaker RA, Groupé V. Discrete foci of altered chicken embryo cells associated with Rous sarcoma virus in tissue culture. *Virology.* 1956; 2: 838-840.
22. Temin H. Neoplastic transformation in cell culture: Citation Classic. *Current Contents.* 1990; 33: 15.
23. Temin HM, Rubin H. Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture. *Virology.* 1958; 6: 669-688.

24. Rubin H. An analysis of the assay of Rous sarcoma cells *in vitro* by the infective center technique. *Virology*. 1960; 10: 29-49.
25. Rubin H. The suppression of morphological alterations in cells infected with Rous sarcoma virus. *Virology*. 1960; 12: 14-31.
26. Rubin H. The inhibition of chick embryo cell growth by medium obtained from cultures of Rous sarcoma cells. *Exp Cell Res*. 1966; 41: 149-161.
27. Dougherty RM, Rasmussen R. Properties of a strain of Rous sarcoma virus that infects mammals. *Nat Cancer Inst Monogr*. 1964; 17: 337-350.
28. Hanafusa H. Rapid transformation of cells by Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1969; 63: 318-325.
29. Kawai S, Hanafusa H. Plaque assay for some strains of avian leukosis virus. *Virology*. 1972; 48: 126-135.
30. Rous P. Surmise and fact on the nature of cancer. *Nature*. 1959; 183: 1357-1361.
31. Rubin H, Temin HM. A radiological study of cell-virus interaction in the Rous sarcoma. *Virology*. 1959; 7: 75-91.
32. Rubin H. Growth of Rous sarcoma virus in chick embryo cells following irradiation of host cells or free virus. *Virology*. 1960; 11: 28-47.
33. Garen A, Zinder ND. Radiological evidence for partial genetic homology between bacteriophage and host bacteria. *Virology*. 1955; 1: 347-376.
34. Rubin H. A virus in chick embryos which induces resistance *in vitro* to infection with Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1960; 46: 1105-1119.
35. Friesen B, Rubin H. Some physicochemical and immunological properties of an avian leukosis virus (RIF) *Virology*. 1961; 15: 387-396.
36. Rubin H, Vogt PK. An avian leukosis virus associated with stocks of Rous sarcoma virus. *Virology*. 1962; 17: 184-194.
37. Rubin H, Cornelius A, Fanshier L. The pattern of congenital transmission of an avian leukosis virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1961; 47: 1058-1069.
38. Rubin H, Fanshier L, Cornelius A, Hughes WF. Tolerance and immunity in chickens after congenital and contact infection with an avian leukosis virus. *Virology*. 1962; 17: 143-156.
39. Gross L. *Oncogenic Viruses*. New York: Pergamon Press; 1961.
40. Gross L. «Spontaneous» leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-embryos. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1951; 76: 27-32.
41. Huebner RJ. The murine leukemia-sarcoma virus complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1967; 58: 835-842.
42. Prince AM. Quantitative studies on Rous sarcoma virus. VI. Clonal analysis of *in vitro* infections. *Virology*. 1960; 11: 400-424.
43. Temin HM. Separation of morphological conversion and virus production in Rous sarcoma virus infection. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1962; 27: 407-414.
44. Temin HM. Further evidence for a converted, non-virus-producing state of Rous sarcoma virus-infected cells. *Virology*. 1963; 20: 235-245.
45. Hanafusa H, Hanafusa T, Rubin H. The defectiveness of Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1963; 49: 572-580.
46. Hanafusa H, Hanafusa T, Rubin H. Analysis of the defectiveness of Rous sarcoma virus. II. Specification of RSV antigenicity by helper virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1964; 51: 41-48.
47. Hanafusa H. Analysis of the defectiveness of Rous sarcoma virus. III. Determining influence of a new helper virus on the host range and susceptibility to interference of RSV. *Virology*. 1965; 25: 248-255.
48. Hanafusa H, Hanafusa T. Analysis of defectiveness of Rous sarcoma virus. IV. Kinetics of RSV production. *Virology*. 1966; 28: 369-378.
49. Rubin H. Virus defectiveness and cell transformation in the Rous sarcoma. *J Cell Physiol*. 1964; 64(Suppl 1): 173-179.
50. Hayman MJ, Beug H. Avian erythroblastosis: A model system to study oncogene co-operation in leukemia. *Cancer Surv*. 1992; 15: 53-68.

51. Lipsick JS, Wang DM. Transformation by v-Myb. *Oncogene*. 1999; 18:3047-3055.
52. Beaudreau GS, et al. Virus of avian myeloblastosis. XIV. Neoplastic response of normal chicken bone marrow treated with the virus in tissue culture. *J Natl Cancer Inst*. 1960; 24: 395-415.
53. Lagerlöf B. Studies of fowl erythro leukemia induced by intact cells or virus. 1. The fate of transplanted erythro leukemia cells, as revealed by histo-pathological and quantitative cytological investigations. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1960;49:438-454.
54. Dougherty RM, Di Stefano HS. Virus particles associated with «nonproducer» Rous sarcoma cells. *Virology*. 1965; 27: 351-359.
55. Di Stefano HS, Dougherty RM. Cytological observations of «nonproducer» Rous sarcoma cells. *Virology*. 1965; 27: 360-377.
56. Vogt PK. A virus released by «nonproducing» Rous sarcoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1967; 58: 801-808.
57. Hanafusa H, Miyamoto T, Hanafusa T. A cell-associated factor essential for formation of an infectious form of Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1970; 66: 314-321.
58. Weiss RA, Payne LN. The heritable nature of the factor in chicken cells which acts as a helper virus for Rous sarcoma virus. *Virology*. 1971; 45: 508-515.
59. Astrin SM, et al. Ten genetic loci in the chicken that contain structural genes for endogenous avian leukemia viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1980; 44: 1105-1109.
60. Hanafusa H, Hanafusa T. Further studies on RSV production from transformed cells. *Virology*. 1968; 34: 630-636.
61. Dutta AA, Wang L-H, Hanafusa T, Hanafusa H. Partial nucleotide sequence of Rous sarcoma virus-29 provides evidence that the original Rous sarcoma virus was replication defective. *J Virol*. 1985; 55: 728-735.
62. Duesberg PH, et al. RNA of replication-defective strains of Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975;72:1569-1573.
63. Temin HM. The DNA provirus hypothesis. *Science*. 1976; 192: 1075-1080.
64. Lerner TL, Hanafusa H. DNA sequence of the Bryan high-titer strain of Rous sarcoma virus: Extent of *env* deletion and possible genealogical relationship with other viral strains. *J Virol*. 1984; 49: 549-556.
65. Svoboda J, Dourmashkin R. Rescue of Rous sarcoma virus from virogenic mammalian cells associated with chicken cells and treated with Sendai virus. *J Gen Virol*. 1969; 4: 523-529.
66. Waters NF, Burmester BR. Mode of inheritance of resistance to Rous sarcoma virus in chickens. *J Natl Cancer Inst*. 1961; 27: 655-661.
67. Payne LN, Biggs PM. Differences between highly inbred lines of chickens in the response to Rous sarcoma virus of the chorioallantoic membrane and of embryonic cells in tissue culture. *Virology*. 1964; 24: 610-616.
68. Crittenden LB, Okazaki W, Reamer R. Genetic resistance to Rous sarcoma virus in embryo cell cultures and embryos. *Virology*. 1963; 20: 541-544.
69. Rubin H. Genetic control of cellular susceptibility to pseudotypes of Rous sarcoma virus. *Virology*. 1965;26: 270-276.
70. Vogt PK, Ishizaki R. Reciprocal patterns of genetic resistance to avian tumor viruses in two lines of chickens. *Virology*. 1965; 26: 664-672.
71. Payne LN, Biggs PM. Genetic basis of cellular susceptibility to the Schmidt-Ruppin and Harris strains of Rous sarcoma virus. *Virology*. 1966; 29: 190-198.
72. Duff RG, Vogt PK. Characteristics of two new avian tumor virus subgroups. *Virology*. 1969; 39: 18-30.
73. Vogt PK, Friis RR. An avian leukemia virus related to RSV(O): Properties and evidence for helper activity. *Virology*. 1971; 43: 223-234.
74. Ahlström CG, Forsby N. Sarcomas in hamsters after injection with Rous chicken tumor material. *J Exp Med*. 1962; 115: 839-852.
75. Temin HM. The control of cellular morphology in embryonic cells infected with rous sarcoma virus in vitro. *Virology*. 1960; 10:182-197.

76. Goldé A. Radio-induced mutants of the Schmidt-Ruppin strain of rous sarcoma virus. *Virology*.1970;40:1022-1029.
77. Toyoshima K, Friis RR, Vogt PK. The reproductive and cell-transforming capacities of avian sarcoma virus B77: Inactivation with UV light. *Virology*. 1970; 42: 163-170.
78. Toyoshima K, Vogt PK. Temperature sensitive mutants of an avian sarcoma virus. *Virology*.1969; 39: 930-931.
79. Martin GS. Rous sarcoma virus: A function required for the maintenance of the transformed state. *Nature*. 1970; 227: 1021-1023.
80. Bader JP. The role of deoxyribonucleic acid in the synthesis of Rous sarcoma virus. *Virology*.1964; 22: 462-468.
81. Temin HM. The participation of DNA in Rous sarcoma virus production. *Virology*. 1964; 23: 486-494.
82. Bader JP. The requirement for DNA synthesis in the growth of Rous sarcoma and Rous-associated viruses. *Virology*. 1965; 26: 253-261.
83. Barry RD, Ives DR, Cruickshank JG. Participation of deoxyribonucleic acid in the multiplication of influenza virus. *Nature*. 1962; 194: 1139-1140.
84. Temin HM. The effects of actinomycin D on growth of Rous sarcoma virus in vitro. *Virology*.1963; 20: 577-582.
85. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*.1970; 226: 1211-1213.
86. Baltimore D. Viral RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*.1970; 226: 1209-1211.
87. Hill M, Hillova J. Virus recovery in chicken cells tested with Rous sarcoma cell DNA. *Nat New Biol*.1972; 237: 35-39.
88. Svoboda J. Malignant interaction of Rous sarcoma virus with mammalian cells in vivo and vitro. *Nat Cancer Inst Monogr*. 1964; 17: 277-294.
89. Stéhelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*. 1976;260:170-173.
90. Shope RE, Hurst EW. Infectious papillomatosis of rabbits. *J Exp Med*. 1933; 58: 607-624.
91. Rous P, Beard JW. The progression to carcinoma of virus-induced papillomas (Shope) *J Exp Med*.1935; 62: 523-548.
92. Friedewald WF, Rous P. The initiating and promoting elements in tumor production. *J Exp Med*. 1944; 80: 101-126.
93. Isaacson W. Einstein: His Life and Universe. New York: Simon and Schuster; 2007.
94. Rubin H, Temin HM. Infection with the Rous sarcoma virus in vitro. *Fed Proc*. 1958; 17: 994-1003.
95. Martin GS. The road to Src. *Oncogene*. 2004; 23: 7910-7917.
96. Rubin AH, Terasaki M, Sanui H. Major intracellular cations and growth control: Correspondence among magnesium content, protein synthesis, and the onset of DNA synthesis in BALB/c3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76: 3917-3921.
97. McKeehan WL, Ham RG. Calcium and magnesium ions and the regulation of multiplication in normal and transformed cells. *Nature*. 1978; 275: 756-758.
98. Rubin H, Vidair C, Sanui H. Restoration of normal appearance, growth behavior, and calcium content to transformed 3T3 cells by magnesium deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78 :2350-2354.
99. Martin GS. The hunting of the Src. *Nat Rev*. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2: 467-475.
100. Vogt PK. Oncogenes and the revolution in cancer research: Homage to Hidesaburo Hanafusa (1929-2009) *Genes Cancer*. 2010; 1: 6-11.
101. Farber E. The multistep nature of cancer development. *Cancer Res*. 1984; 44: 4217-4223.
102. Stratton MR. Exploring the genomes of cancer cells: Progress and promise. *Science*. 2011; 331: 1553-1558.
103. Rubin H. Fields and field cancerization: The preneoplastic origins of cancer: Asymptomatic hyperplastic fields are precursors of neoplasia, and their progression to tumors can be tracked by saturation density in culture. *Bioessays*. 2011; 33: 224-231.

104. Bozic I, et al. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107: 18545-18550.
105. Schöllnberger H, Beerenwinkel N, Hoogenveen R, Vineis P. Cell selection as driving force in lung and colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 2010; 70: 6797-6803.