18. A. VIOLANTE e D. STEVE-BOCCIARELLI. — **Virus oncogeni al microscopio elettronico: Rivista sintetica e dati sperimentali.**

Riassunto. — Dopo una breve messa a punto dei risultati ottenuti negli ultimi anni sul problema dell'eziologia del cancro, è stata raccolta una vastissima bibliografia degli studi fatti al microscopio elettronico sui virus oncogeni. Se ne discutono i risultati.

Nella seconda parte del lavoro sono riportati i risultati delle ricerche fatte durante quasi due anni al microscopio elettronico sulle cellule del mieloma di Oberling, Guérin e Guérin allo scopo di rivelare la eventuale presenza di particelle virali nelle cellule di questa neoplasia. I risultati sono stati del tutto negativi: difatti solo raramente si notano dei corpicciuoli rotondeggianti, che sono però da ritenersi alterazioni citoplasmatiche prodottesi durante il disfacimento delle cellule.

Summary. — After a short review of the results obtained in the last years in the studies related to the problem of cancer etiology, the extensive literature about the researches of oncogenic viruses at the electron microscope is collected and commented.

In the second part of the work, the results of a research on the Oberling, Guérin and Guérin mieloma, made at the electron microscope, are reported. Aim of this research was to put in evidence the presence of eventual virus particles in these pathological cells. The results were completely disappointing. As a matter of fact, only some roundish little bodies resembling virus particles were rarely seen; but they were recognized as cytoplasmic alterations due to the cell decay.

I - INTRODUZIONE

E' passato più di mezzo secolo da quando la ricerca sperimentale ha cominciato a concentrare la sua attenzione intorno ad uno degli aspetti più tormentati e controversi del problema del cancro: la funzione svolta dai virus nella insorgenza delle neoplasie maligne.

Lo studio su questo argomento è stato condotto con metodologie diverse nei decenni passati e molti dati sono stati accumulati a sostegno o contro la concezione eziopatogenetica « virale » delle neoplasie.

Non è nostro proposito fare una sintesi dettagliata di queste ricer-

che; ci limiteremo alle poche notizie necessarie per introdurre l'argomento oggetto del nostro studio.

I contributi fondamentali a sostegno dell'azione oncogena di alcuni agenti patogeni dotati di caratteristiche che permettono di accostarli ai virus sono stati portati da Ellerman e Bang (1908) ([10]) con la leucemia dei polli, da Rous (1911) ([26]) con il sarcoma del pollo che porta il suo nome, da Shope (1932, 1933) ([29, 30]) con il fibroma e con il papilloma del coniglio, da Lucké (1934) ([24]) con l'adenocarcinoma della rana, da Bittner (1936) ([4, 5]) con l'adenocarcinoma mammario del topo, da Gross (1950, 1951) ([16, 17]) con una leucemia trasmissibile del topo, da Schoolman (1957) ([28]) con una leucosarcomatosi del topo, dalla Friend (1957) ([11]) con una istioleucemia del topo, dalla Stewart (1957, 1958) ([31, 32]) con il polioma, neoplasia quest'ultima di aspetto polimorfo, a localizzazione multipla ed al cui agente patogeno sarebbero sensibili criceti, ratti, conigli, topi.

Tutte le neoplasie sperimentali summenzionate sono naturalmente riproducibili mediante filtrati acellulari, il che ha portato a concludere che gli agenti responsabili dovessero considerarsi del tipo virale.

Su questa massa di lavoro, così brillante nella sua impostazione teorica, si sono però sollevate numerose perplessità legate spesso alla difficoltà di riprodurre le stesse neoplasie mediante i filtrati acellulari, ma ancora di più alle incertezze esistenti sui caratteri da attribuire agli agenti ritenuti responsabili e considerati di natura virale.

Così per il virus della leucemia dei polli e per quello del sarcoma di Rous si è constatata, da alcuni, difficoltà alla coltivazione (Verne e coll. 1936, Furth e Stubbs 1934, Storti e Mezzadra 1938, Atanasiu 1953) ([34, 12, 33, 2]) ed una mal definibile individualità antigenica, come attesta una lunga serie di esperienze che vanno da quelle più antiche di Gye e Purdy (1933) ([15]) e di Knox (1939) ([22]), i quali inoculando tessuti di pollo normale producevano sieri neutralizzanti il virus di Rous, a quelli recentissimi di Bang e Haley (1958) ([3]) i quali trovarono anticorpi anti Rous nel siero di polli normali. Inoltre Gye e Purdy (1931) ([14]) videro che il virus di Rous dava non un solo tumore, bensì una vasta gamma di neoplasie che andavano dalle forme clinicamente benigne a quelle maligne.

Sono di grande importanza, anche per il presente studio, le affermazioni fatte da Oberling e Guérin (1954) ([52]) i quali, di fronte alla frequente difficoltà di ritrovare il virus nel sarcoma di Rous (Rous e Murphy 1914, Gye ed Andrews 1926, Gye e Purdy 1931, Claude e Murphy 1933, Carr 1943) ([27, 13, 41, 7, 6]), ammettevano, in via ipotetica, che il virus potesse esistere in una doppia forma nelle cellule neopla-

stiche: e cioè una libera, facilmente identificabile, ed una mascherata che ne rendeva difficile l'isolamento.

L'importanza dell'azione del virus del latte nella insorgenza dell'adenocarcinoma mammario del topo descritto da Bittner, è stata notevolmente ridimensionata quando si è visto che la sua presenza non è affatto necessaria per l'insorgenza di quella neoplasia (Heston 1950, 1952, 1956) ([19-21]), mentre una maggiore importanza sembrava avere lo stato endocrino delle femmine. Infatti l'incidenza del tumore mammario, in assenza dell'agente virale, andava dal 2% circa nelle vergini al 44% nelle femmine che avevano partorito più volte.

Andervont (1959) ([1]), rendendosi conto delle difficoltà interpretative che presentava la concezione virale del cancro mammario del topo, giungeva ad ammettere che i virus possano interferire indirettamente nel processo di formazione di un tumore, producendo lesioni aspecifiche e di tipo benigno, mentre altri fattori (ambientali, chimici, genetici, ormonici) determinerebbero poi la spinta verso la malignità. A tal proposito è opportuno ricordare le ricerche di Duran-Reynals (1952) ([9]) il quale riusciva ad ottenere nel pollo più rapida insorgenza di tumori da metilcolantrene se, all'azione di questa sostanza, aggiungeva quella del virus del vaiolo dei polli, il quale quindi svolgeva un'azione cocancerogena di tipo del tutto aspecifica.

Gross riuscì, è vero, a trasmettere una leucemia inoculando topi neonati con filtrati di organi di topi affetti da leucemia, ma ottenne uguali risultati anche inoculando i filtrati di organi di topi e cavie normali.

Per ciò che riguarda il polioma della Stewart ed il tumore di Schoolman, uno di noi (Violante e coll. 1958) ([35]), ne ha tentato lungamente la trasmissione mediante inoculazione di filtrati in animali neonati, ma senza mai riuscirvi.

A conclusione di quanto finora esposto può aggiungersi che recenti ricerche hanno dimostrato che anche estratti nucleoproteici purificati di cellule umane leucemiche e normali (De Carvalho 1958, Lacour e collaboratori 1958) ([8, 23]) e di tessuti linfoidi di topi normali (Hays e collaboratori 1957) ([18]) possono indurre sarcomi negli animali di laboratorio; facendo pensare, tutto ciò, ad un'azione tumorigena del tutto aspecifica degli estratti di organo e gettando quindi un'ombra di dubbio su tutto il lavoro fatto per la dimostrazione di agenti virali nei tessuti neoplastici animali.

Uno di noi ha partecipato ad un gruppo di ricerche (Giordano, Nigro, Petrossi, Turrisi, Violante, *La Sintesi*, pagg. 689-713, Vol. I, 1957) tendenti a dimostrare l'esistenza di virus nel plasma leucemico umano, mediante inoculazione in vena in embrioni di pollo. Tali ricerche sono state completamente negative.

II - SUI VIRUS ONCOGENI STUDIATI AL MICROSCOPIO ELETTRONICO

In base a tutto quanto si è scritto sulla esistenza o meno di virus oncogeni, ci è sembrato di notevole interesse avviare uno studio sistematico al microscopio elettronico alla ricerca di formazioni eventualmente riferibili a virus nelle cellule patologiche di una leucemia sperimentale del ratto: il mieloma di Oberling, Guérin e Guérin (Violante e coll. 1958) ([185]).

Prima di esporre i nostri risultati ci sembra però opportuna una messa a punto di quanto è stato fatto finora in questo settore di ricerca. Cercheremo pertanto di sintetizzare i dati bibliografici raccolti sui virus oncogeni che hanno costituito oggetto di studio e di ricerca al microscopio elettronico.

1. — *Leucosi dei polli.*

Sotto questa denominazione sono raggruppate varie forme cliniche di emopatie del pollo: la linfoblastica, la mieloblastica, l'eritroblastica, ciascuna delle quali ha proprie caratteristiche cliniche e morfologiche.

a) *Linfoblastosi.*

Sharp e coll. (1952) ([180]) nel plasma di polli affetti da linfomatosi leucemica, osservarono particelle sferiche con diametro medio di 117 mμ. In tutti gli animali a malattia avanzata furono viste le caratteristiche particelle, ma in un gruppo di 6 animali con malattia non completamente sviluppata il plasma di un solo animale presentava le particelle, le quali peraltro furono viste anche in 1 dei polli normali osservati come controlli. Le particelle avevano un aspetto omogeneo ed erano prive di membrana.

Dmochowski e coll. (1959) ([101]), eseguendo una osservazione sistematica di milze e tumori di polli del ceppo RPL 12 con linfomatosi, trovarono nel citoplasma delle cellule particelle sferoidali di 64-82 mμ formate da un nucleo denso di 30 mμ contornato da doppia membrana.

Questa leucosi del pollo è stata oggetto quindi di ricerche che hanno dato risultati, per certo verso, non del tutto chiari. Infatti Sharp e coll. (1952) ([180]), studiando la linfomatosi del pollo, hanno trovato particelle che hanno ritenuto di natura virale, del tutto diverse da quelle trovate da Dmochowski e coll. (1959) ([101]), sia per dimensioni, sia per struttura. Inoltre Sharp trovò le particelle anche nei controlli.

b) *Mieloblastosi.*

Sharp e coll. (1952) ([180]), con la stessa tecnica usata per lo studio della linfomatosi, hanno osservato preparati di plasma di polli affetti da mieloblastosi trovandovi caratteristiche particelle di 120 mμ.

Nel 1958, Dmochowski e coll. ([97]), hanno trovato particelle virali di 67 mμ di media nella milza e nel fegato di polli affetti da granuloblastosi. Particelle di questo tipo (sebbene non ne indichino le dimensioni) sono state trovate da Parsons e coll. (1958) ([169]) nei mieloblasti circolanti e nella milza, midollo, fegato di polli affetti da mieloblastosi. Le particelle erano viste rarissimamente nel citoplasma cellulare, più frequentemente invece negli spazi extracellulari tra i mieloblasti leucemici di pollo coltivati in vitro.

Ancora Bernhard e coll. (1958) ([62]) trovarono nel plasma di polli affetti da mieloblastosi particelle virali di circa 80 mμ, formate da un nucleo centrale di 40 mμ e circondate da una o due membrane, in tutto simili a quelle viste dagli stessi Autori nel plasma di polli con eritroblastosi.

Ricerche più estese sulla mieloblastosi del pollo sono state fatte da Bonar e coll. nel 1959. Essi osservarono al microscopio elettronico mieloblasti leucemici circolanti o coltivati in vitro per 2, 18, 31 giorni. Come controllo erano osservate le cellule istiocitarie midollari di polli sani.

I mieloblasti prelevati dal sangue ed osservati subito solo infrequentemente presentavano aspetti citoplasmatici riferibili a formazioni virali. Nei mieloblasti coltivati in vitro per 3-4 settimane, invece, vi era un certo numero di corpi di Gray, strutture citoplasmatiche particolari che mostrano di contenere particelle virali; anzi è ritenuto che i corpi di Gray costituiscano la sede di maggiore sintesi delle particelle virali. Nel loro lavoro tuttavia Bonar e coll. non fanno cenno alla grandezza delle particelle osservate.

Polli a cui sia inoculato materiale contenente il virus della mieloblastosi sviluppano frequentemente un adenocarcinoma del rene (Dmochowski, 1960) ([108]). Estratti acellulari di questo tumore renale inducono nel pollo diversi tipi di tumori: adenocarcinomi del rene, linfomatosi, osteopetrosi, mieloblastosi. Al m.e. tutti questi tumori rivelano la presenza di particelle di struttura simile a quella del virus della mieloblastosi, ma di diverse dimensioni, oscillando infatti il diametro tra 60 e 140 mμ.

c) *Eritroblastosi.*

I primi che eseguirono ricerche sulle cellule della eritroblastosi del pollo furono Benedetti e coll. (1958) ([49, 50]) che trovarono corpuscoli

virali di 70 mμ negli spazi extracellulari, nei vacuoli intracitoplasmatici e nei mitocondri alterati delle cellule reticolari ed eritroblastiche.

Nel 1955 Sharp e coll. nell'ultracentrifugato del plasma sanguigno di polli con eritroblastosi osservarono al m.e. corpi sferoidali con diametro medio di 102 mμ. Essi sottolineavano che le dimensioni delle particelle trovate erano diverse da quelle viste nei polli con mieloblastosi e che misuravano 120 mμ (Sharp e coll. 1952) ([181]).

Dmochowski e coll. (1958) ([98]), in sezioni di milza e fegato di polli con eritroblastosi della linea « R 15 » hanno visto corpi sferoidali composti da un nucleo centrale denso di 26 mμ circondato da una membrana meno densa; il tutto formando un corpuscolo di 57-76 mμ con una media di 66 mμ. Nel citoplasma delle cellule osservate nei polli eritroblastosici vi sono corpi osmiofili del tutto simili ai « corpi di Gray », i quali sono spesso circondati da una doppia membrana ed occasionalmente mostrano residui di creste mitocondriali. Questi corpi sono composti di un fine materiale granulare osmiofilo da cui derivano probabilmente le caratteristiche particelle. Lo stesso Dmochowski con i suoi coll. (1959) ([102]) ha osservato le cellule tumorali e spleniche di polli con eritroblastosi del ceppo RPL-12. Nel citoplasma videro particelle virali con diametro oscillante tra i 65-83 mμ con una media di 74 mμ. Queste particelle apparivano più grandi di quelle viste nel ceppo R 15 di cui è detto più sopra. In queste ricerche non è fatta menzione di controlli.

Ricerche su questo stesso argomento sono state fatte da Iwakata (1958) ([148]) e da Iwakata ed Amano (1958) ([149]), che trovarono nei macrofagi di polli eritroblastosici particelle a sede citoplasmatica di 60-90 mμ.

Sul virus purificato della leucosi del pollo hanno lavorato Beard e coll. (1950) ([46]); il virus risultò, alle misure eseguite, di una grandezza tra i 60 ed i 100 mμ.

2. — *Sarcoma di Rous.*

I primi a studiare al m.e. tumori di riconosciuta origine virale furono Claude e coll. (1947) ([84]) i quali rivolsero la loro attenzione alle cellule coltivate in vitro dei tumori 1 e 10 del pollo. Vi trovarono delle particelle, che definirono di natura virale, della grandezza di 67-80 mμ. Tali ricerche non furono però riconfermate da Oberling e coll. (1950) ([166]).

Bernhard e coll. (1953) ([52]) tentarono ancora di studiare il virus di Rous, nonostante non fossero riusciti a vederlo precedentemente (Bernhard e coll. 1953) ([53]) in ben 5 anni di ricerche. Essi arrivarono alla conclusione che il virus dovesse esistere in una forma mascherata nelle cellule neoplastiche: pertanto era invisibile. Pensarono perciò

di attivarlo (1953) ([52]) mediante esposizione a raggi X o sfruttando l'azione radiante dell'alcool marcato aggiunto a frammenti di tumore coltivati su membrana corion-allantoidea di embrioni di pollo. Essi trovarono, nelle cellule così trattate, corpi inclusi densi dai quali sembrava che si dipartissero particelle virali. Tuttavia delle 6.600 cellule osservate solo lo 0,38% presentava tali formazioni, mentre nelle cellule sarcomatose di controllo, e cioè non irradiate, erano presenti in ragione dello 0,13%. Il che portò alla conclusione che le particelle virus simili erano sempre presenti nelle cellule neoplastiche in piccola percentuale.

Queste esperienze furono poi ripetute (Oberling e coll. 1954) ([167]) su cellule di sarcoma di Rous coltivate in goccia pendente e sottoposte all'azione di raggi X (a dosi varianti da 300 a 1200r) e di alcool radioattivo aggiunto al mezzo di cultura. Nelle cellule in citolisi avanzata si distinguevano facilmente corpuscoli di 60-90 mμ. Tali corpuscoli erano solo in piccola quantità nelle cellule di controllo.

Più tardi Bernhard e coll. (1956) ([61]), ritornarono ancora allo studio sul virus di Rous raccogliendo un più vasto materiale: 75 sarcomi di Rous, 7 lesioni ectodermiche della membrana corion-allantoidea, 8 fegati emorragici della malattia di Duran-Reynals dell'embrione di pollo (Yale J. Biol. Med., 13, 61, 1940) ed infine centrifugati di cellule tumorali.

Essi trovarono un numero molto variabile di particelle d'aspetto virale a ridosso della membrana cellulare o più spesso nei vacuoli citoplasmatici. Non poterono però stabilire un rapporto tra il numero di particelle viste al m.e. e l'infettività degli estratti tumorali che non rivelavano in questo senso un parallelismo. Le particelle viste misuravano in media 75 mμ ed erano formate da un nucleo centrale contornato da una o due membrane. Anche però qualche tessuto di pollo considerato normale presentava un certo numero delle caratteristiche particelle.

Successivamente gli stessi Autori (Oberling e coll. 1957) ([168]) trovarono corpuscoli simil-virali in 41 su 54 sarcomi del pollo ed in 13 su 21 tumori cresciuti su membrana corion-allantoidea. I corpuscoli trovati erano di 60-80 mμ composti da un nucleo centrale contornato da doppia membrana. Nel lavoro in questione i ricercatori sottolineavano il fatto che quei corpuscoli furono trovati anche in animali normali ed interpretavano questo fatto ricollegandosi al concetto della probabile esistenza di una forma inattiva del virus.

Nel 1955 Gaylord trovò anch'egli particelle virali in 2 tumori di Rous dei 3 osservati. Le particelle avevano un nucleo centrale denso ed una membrana limitante esterna con un diametro complessivo di 50 mμ, cioè minore delle dimensioni date da tutti gli altri. La dislocazione delle particelle era prevalentemente extracellulare.

Importanti sono state le ricerche di Epstein (1955, 1956, 1957, 1958) ([111, 115]), il quale descrisse particelle virus-simili costituite da un nucleo denso contornato da due membrane concentriche. Le particelle però non furono viste in tutti i tumori esaminati e solo in una piccola percentuale di cellule. Il numero delle cellule con particelle virali variava da 1 su 50 ad 1 su 3000. Forse la variabilità era in rapporto con l'età del tumore. Infatti tumori di pochi giorni dimostravano di avere un maggior numero di cellule con particelle che non i tumori vecchi già di 3-4 settimane. Epstein (1958) ([116]) osservò inoltre il virus di Rous dopo averlo purificato. Le particelle avevano 75 mμ di diametro. Egli dimostrò che il nucleo era costituito di acido ribonucleico; infatti il nucleo scompariva dopo digestione con ribonucleasi.

Haguenau e coll. (1957, 1958) ([132, 133]) iniziarono una ricerca sulla scia dei dati riferiti da Bryan (1955) ([79, 80]), il quale aveva sostenuto con sue esperienze il concetto che dai sarcomi di Rous indotti inoculando piccole quantità di virus nessun virus poteva essere estratto dal tumore costituitosi, mentre dai sarcomi ottenuti inoculando grandi quantità di virus potevano più facilmente rintracciarsi gli agenti patogeni. Haguenau e coll. quindi studiarono al m.e. due tipi di sarcoma di Rous: uno ottenuto con alte dosi di virus ed uno ottenuto con basse dosi di virus. I dati da essi raccolti dimostravano che la concentrazione del virus era in rapporto all'età del tumore (considerando come punto di partenza il momento dell'innesto). Infatti i tumori più giovani contenevano più particelle di quelli vecchi, in questo d'accordo con i dati di Gaylord (1955) ([125]) che trovò anch'egli più abbondanti particelle nei tumori giovani, mentre rarissime erano nei vecchi.

I risultati di Haguenau non coincidevano quindi con quelli di Bryan poichè questi aveva determinato un rapporto con l'età del tumore e non con la quantità di virus inoculato. D'altro canto i dati di Bryan sono in contrasto con quelli di Carr (1943, 1946) ([82]), di Gye e coll. (1926, 1931) ([127, 128]), di Rous (1914) ([175]), di Claude (1933) ([83]), di Rubin (1955) ([176]), che non riuscirono a trovare una correlazione tra sviluppo del tumore di Rous e la sua filtrabilità; ed in contrasto sono anche con i già citati dati di Epstein (1956) ([112]) — che trovò particelle virali in una sola cellula su 3.000 osservate — e di Bernhard e coll. (1956) ([60]) che non trovarono alcun rapporto tra infettività del tumore e numero di particelle viste al m.e.

In appendice ai tumori del pollo c'è da fare cenno ai tumori indotti chimicamente, all'endotelioma di Murray-Begg ed al mixosarcoma di Fujinami.

Sulla filtrabilità dei tumori da idrocarburi cancerogeni esistono pochi dati non significativi. Una ricerca dei virus al m.e. è stata tuttavia

condotta da Friedlaender-Binggeli (1959) ([122]) su 3 esemplari del tumore GRCH/15 ottenuto con dibenzantracene nel pollo. I dati ottenuti sono poco chiari e tutto induce a ritenere negativa la ricerca.

Il tumore di Murray-Begg è stato studiato da Rouiller e collaboratori (1956) ([174]) i quali trovarono particelle simil-virali in tutti i 33 tumori esaminati. Le stesse particelle furono viste anche in culture di fibroblasti di pollo infettati con estratti del tumore.

Le cellule neoplastiche osservate erano prelevate da tumori sviluppatisi su polli o pulcini innestati.

Le particelle viste avevano un diametro di 110 mμ ed erano in gran maggioranza extracellulari, rarissime quelle intracitoplasmatiche. Gli autori, pur notando una somiglianza tra queste particelle e quelle viste nel sarcoma di Rous, non possono affermare che si tratti del virus responsabile del tumore. Non escludono possa trattarsi di un virus da inquinamento; in tal caso, essi dicono, anche il virus trovato nel sarcoma di Rous potrebbe essere dovuto ad inquinamento.

A proposito di questo tumore è da ricordare anche che Horel e coll. [cit. da Bernhard (1954)] ([138]) esaminarono 20.000 cellule dell'endotelioma con risultato interamente negativo.

Il sarcoma di Fujinami, anch'esso trasmissibile mediante filtrati acellulari è stato studiato da Mannweiler e coll. (1958) ([160]). In 12 dei 17 sarcomi osservati furono trovate particelle di 75 mμ, sia nei vacuoli citoplasmatici sia sulla superficie cellulare, del tutto simili alle particelle viste precedentemente in altri tumori o leucemie del pollo.

3 - *Tumori dei conigli.*

Nei conigli Shope descrisse il fibroma (1932) ([29]) ed il papilloma (1933) ([30]) entrambi trasmissibili mediante filtrati acellulari.

Primi ad occuparsi di questi tumori furono Bernhard e coll. (1954) ([54]) i quali studiarono al m.e. 13 tra fibromi e fibrosarcomi di Shope. Essi trovarono con relativa facilità, sia nelle cellule benigne sia in quelle maligne, delle particelle di 200-240 mμ. Le immagini viste permisero loro di pensare che il virus potesse formarsi da una massa omogenea di aspetto finemente granuloso che essi chiamarono « viroplasma ». Questa massa contiene quantità variabili di virus e potrebbe corrispondere — per la sua posizione paranucleare — ai corpi eosinofili visibili al microscopio ottico.

Lloyd e coll. (1955) ([158]) affrontarono anch'essi questo argomento di studio osservando al m.e. il virus del fibroma di Shope dopo averlo

purificato. Le particelle erano viste a fresco o dopo fissaggio. Nel primo caso misuravano 269-310 mμ, nel secondo 244-283 mμ.

In seguito lo studio fu rivolto alla osservazione di fibroblasti di coniglio coltivati in vitro ed infettati con il virus del fibroma (Febvre e coll. 1957) ([119]). Anche in queste cellule si formavano aree Feulgen positive dopo 4 h dalla infezione. In quelle aree si ritrovavano particelle virali costituite da una doppia membrana contenente un nucleo denso, formato dal materiale granuloso proveniente dal viroplasma.

Bernhard e coll. (1958) ([63]) non trovarono differenze nell'aspetto tra le particelle del fibroma benigno e quelle del sarcoma.

Il papilloma del coniglio è stato studiato da Moor e coll. (1959) ([162]). Particelle virali furono viste solo nei papillomi tenuti in glicerina per qualche tempo. Il diametro oscillava tra i 25 ed i 35 mμ.

Lo studio condotto sul papilloma fresco (cioè non conservato in glicerina) ha dato l'impressione che il virus si sviluppi nei nucleoli delle cellule infettate (Stone e coll. 1959) ([184]). Sul papilloma hanno studiato anche Hamamoto e coll. (1958) ([136]). Le foto da essi pubblicate sono poco chiare e di incerto significato.

Williams e coll. hanno pubblicato nel 1960 ([189]) anch'essi un lavoro sul virus del papilloma purificato ottenendo due tipi di particelle: una ritenuta corrispondente al virus incompleto, l'altra al virus maturo.

4 - *Adenocarcinoma renale di Lucké.*

Ad occuparsi dell'adenocarcinoma renale della rana è stato Fawcett nel 1956 ([118]), il quale ha trovato nelle cellule di quel tumore corpuscoli di 90-100 mμ formati da una capsula e da un nucleo denso di 35-40 mμ, spesso eccentrico. Queste particelle si trovano sia nel citoplasma sia nel nucleo. In quest'ultima sede egli notò infatti delle vescicole sferiche, probabilmente forme immature del virus. Nel citoplasma vi erano filamenti densi, forse correlati alla formazione del virus.

5 - *Carcinoma mammario del topo.*

Nel 1948 Porter e coll. ([172]) osservarono cellule di carcinoma mammario del topo coltivate in vitro ed in 3 dei 6 tumori studiati trovarono particelle di aspetto virale localizzate nel citoplasma.

Questi corpicciuoli presentavano un nucleo centrale denso di 75 mμ contornato da una membrana, con un diametro complessivo di 130 mμ. Le cellule che contenevano gran numero delle suddette particelle mostravano segni di profonda degenerazione. Purtuttavia questi dati debbono

essere considerati poco sicuri, poichè a quell'epoca non era ancora in uso la tecnica delle sezioni ultrasottili che permise poi di studiare meglio i corpuscoli virali dell'adenocarcinoma mammario, evidenziandoli sia dentro sia fuori dalle cellule (Dmochowski, 1954) ([93]).

Fu così possibile distinguere due tipi di particelle (Bernhard e coll. 1955) ([56]): una intracitoplasmatica del diametro medio di 65 mμ, i cui ammassi costituiscono con tutta probabilità i corpi di inclusione paranucleari visibili al microscopio ottico e formati da un nucleo centrale contornato da una doppia membrana; l'altra extracellulare del diametro medio di 100 mμ con nucleo eccentrico e dislocato nei canalicoli di escrezione della ghiandola. Queste due particelle furono dette virus A — quelle a sede intracitoplasmatica — e virus B — quelle a sede extracitoplasmatica — (Bernhard, 1958) ([63]). Entrambi i tipi in realtà possono trovarsi dentro e fuori la cellula ed il tipo A può trasformarsi nel tipo B secondo uno schema evolutivo descritto da quei ricercatori.

Che i corpi inclusi paranucleari fossero costituiti da colonie di virus fu dimostrato da Bernhard e coll. (1955) ([57]) che studiarono le zone di inclusione citoplasmatiche al m.e. trovandovi numerosi corpuscoli di aspetto virale delle dimensioni di 65 mμ.

Dmochowski e Grey hanno condotto nel 1957 ([97]) una estesa ricerca sul virus del carcinoma mammario spontaneo del topo. Essi studiarono al m.e. 23 tumori di animali portatori del virus del latte e 33 tumori prelevati ad animali considerati privi del fattore del latte. Le caratteristiche particelle furono viste in 18 dei primi 23 tumori ed in 11 del gruppo dei 33. Questo primo dato e cioè la relativa scarsità di ritrovamento delle particelle era già di per sé ragione di perplessità, data la elevata incidenza tumorale di questi ceppi.

I due ricercatori affiancarono alle osservazioni al m.e. anche delle prove biologiche, assaggiando la capacità infettante degli estratti acellulari dei tumori osservati. Essi non constatarono rispondenza tra ritrovamento delle particelle e capacità infettante degli estratti e viceversa, nella stragrande maggioranza dei casi, cosicchè conclusero che non era possibile stabilire una relazione tra le particelle virus simili viste al m.e. e l'insorgenza dei tumori.

Dobbiamo ricordare che già nel 1952 Dmochowski e Passey ([92]) hanno affermato di aver visto particelle virali di 20-30 mμ negli estratti di tumori mammari insorti spontaneamente od in seguito a trattamento con metilcolantrene. La stessa ricerca fu fatta su tumori mammari umani nei quali sarebbero state trovate particelle lievemente più grandi.

La presenza di particelle virus simili nei tumori mammari del topo fu segnalata da più parti. Bang e coll. (1953, 1956) ([40, 42]) le trovarono sia in tumori mammari spontanei che indotti con metilcolantrene.

Ma, mentre nei tumori di animali appartenenti a ceppi portatori del fattore del latte furono trovate in 14 dei 22 esaminati, le stesse particelle furono trovate praticamente solo in 3 dei 19 tumori prelevati da animali appartenenti a ceppi privi del fattore. Le particelle erano a sede intracellulare (di 60-70 mμ di diametro) ed a sede extracellulare (di 100 mμ). Ancora Bang e coll. (1956) ([43]) potettero distinguere le particelle virali dai corpuscoli del latte costituiti da particelle di caseina e lipoproteine.

Particelle virus simili sono state viste nei tumori mammari di topi appartenenti sia a ceppi portatori del virus del latte, sia a ceppi privi di questo agente, da Suzuki (1957), Pitelka e coll. (1958) ([171]) e da Ichikawa e coll. (1958) ([142]).

Più recentemente particelle simili a quelle descritte nelle cellule dei tumori (Thiéry e coll. 1959) ([186]) sono state viste nei tumori uterini di topi appartenenti a ceppi murini portatori dell'agente del latte.

Lasfargues e coll. (1957, 1959) ([154, 156]) hanno trovato in culture di tessuto di tumore di topo del ceppo R III, che sviluppa 3 tipi di tumore mammario — uno solido, uno fibroso ed uno emorragico — particelle virali, le cui dimensioni corrispondono a quelle dell'agente del latte, disposte prevalentemente in sede extracellulare.

Le dimensioni delle particelle trovate nei tumori mammari misurate con vari metodi hanno dato valori di 100 mμ per alcune e di 20-30 mμ per altre. Anche quest'ultime sono infettanti e probabilmente corrispondono al nucleo del virus, mentre le prime corrisponderebbero al virus intero (Moore e coll. 1959) ([163]).

Nel latte di ceppi murini portatori del virus, dopo aver allontanato caseina e grassi, sono stati trovati nel centrifugato osservato al m.e. caratteristiche particelle simil-virali (Dmochowski e coll. 1959) ([103]).

De Bruyn e coll. (1960) ([86]) hanno condotto uno studio su cellule di un tumore trapiantabile della mammella insorto spontaneamente nel 1952 in un topo femmina appartenente ad un ceppo privo del fattore del latte (DBA).

Le cellule di questo tumore furono coltivate in vitro e, dopo passaggi seriati, furono reinnestate sottocute in topi, ottenendosi così una linea tumorale.

Nel tumore trapiantabile non furono mai trovate particelle virali; nelle cellule coltivate in tubi, invece, furono visti molti elementi virus simili distinti in 3 tipi diversi: *a*) particelle rotonde od ovoidi di 80 mμ composte da un nucleo centrale contornato da doppia membrana; *b*) particelle più grosse, di 120 mμ di diametro, sempre con doppia membrana, ma con nucleo eccentrico; *c*) particelle ancora più grandi, di 160 mμ, nelle quali esisterebbe uno spazio vuoto tra il nucleo centrale e la mem-

brana limitante. Tutte le particelle furono viste esclusivamente negli spazi extracellulari e mai nel citoplasma.

Nelle culture di cellule in fiasche il numero delle particelle viste fu inferiore a quello delle culture in tubi.

Il tipo più piccolo di particelle corrisponderebbe al tipo A, il più grosso al tipo B indicati da Bernhard (1958) ([63]).

Su un tumore mammario trapiantabile hanno lavorato anche Hollman e coll. (1959) ([137]), evidenziando particelle virali di 70 mμ, la cui azione infettante però non fu possibile accertare con prove biologiche (Lacour e coll. 1957) ([153]).

Interessanti furono le ricerche di Lasfargues e coll. (1958) ([155]) che coltivarono su cellule embrionali di topo l'agente virale contenuto nel latte di topi del ceppo R III. Al microscopio ottico si evidenziarono lesioni citologiche dovute certamente all'agente del latte, come dimostravano i tumori indotti nei topi del ceppo $C_{57}Bl$ con i liquidi di coltura. Nelle cellule di tessuti adulti invece l'agente del latte non produceva lesioni. Esso si manteneva in vita, senza moltiplicarsi, per 3 mesi, dopo di che non era più reperibile nelle culture.

Al m.e., sia nelle cellule infettate, sia nei tumori indotti con i liquidi di cultura, erano trovate particelle virali di 100 mμ di diametro.

Rangan (1960) ([173]) studiando al m.e. la morfologia delle cellule del carcinoma mammario del topo, ha trovato casualmente rare particelle virali nel citoplasma delle cellule.

Fawcett e coll. (1955) ([117]) hanno ricercato particelle virali nelle cellule neoplastiche del ceppo murino C_3H nel quale il 90% delle femmine sviluppa il tumore mammario e circa il 25% dei maschi presenta un epatoma tra il 10° ed il 12° mese di vita. Essi studiarono l'epatoma trovandovi particelle virali di 145-170 mμ costituite da un nucleo contornato da membrana e dislocate particolarmente nel citoplasma.

Ferreira (1960) ([121]) si pose invece il problema di ricercare le particelle virali nelle metastasi polmonari date dal tumore mammario del topo. Anche nelle cellule metastatiche i virus compaiono nelle inclusioni eosinofile citoplasmatiche visibili al microscopio ottico, come fu constatato da Bernhard e coll. (1955) ([57]). La membrana cellulare presentava dei microvilli nell'interno dei quali vi erano particelle di 65 mμ. Nel lume degli acini e dei tubuli vi erano invece particelle di 100 mμ.

In una relazione tenuta al IV Congresso Internazionale di Microscopia Elettronica (Berlino, 1958) ([64]) Bernhard avanzava qualche dubbio sulle formazioni ritenute virali viste nelle cellule del carcinoma mammario del topo. La sua perplessità si basava sul fatto che particelle virus simili sono state viste sia in tumori mammari biologicamente privi del-

l'agente del latte (Dmochowski 1956, Bernhard 1956; Bang 1956) ([95, 61, 44]) sia in tumori filtrabili (vedi bibl. citata) e non filtrabili (Selby 1954; Adams e coll. 1957; Fawcett e coll. 1955) ([178, 36, 117]).

6 - *Carcinoma ascite di Ehrlich.*

Sulle cellule del carcinoma ascite di Ehrlich iniziarono la osservazione Friedlander e coll. (1955, 1956) ([123, 124]). Questi ricercatori studiarono l'aspetto del virus del mollusco contagioso coltivato su cellule del tumore ascite di Ehrlich. Ma successivamente (1956) si accorsero che i corpuscoli, da essi attribuiti al mollusco contagioso, erano in realtà presenti anche nelle cellule del tumore di Ehrlich non infettate con il virus del mollusco contagioso.

Le particelle avevano un diametro di 55-65 mμ e presentavano un nucleo centrale contornato da una membrana.

Selby e coll. (1954, 1956) ([178, 179]) videro occasionalmente delle particelle virali nel citoplasma di cellule del tumore ascite di Ehrlich. I virus avevano una grandezza di 58 mμ di media.

Adams e coll. (1957) ([36]) trovarono anch'essi delle formazioni sferiche di 55-70 mμ strettamente unite alle vescicole del reticolo endoplasmico nel citoplasma delle cellule del tumore ascite di Ehrlich. Sulla loro natura essi avanzarono tre ipotesi: che potesse trattarsi di contaminazioni virali; che fossero prodotti di fagocitosi; che si trattasse di normali costituenti citoplasmatici.

Su quest'ultima ipotesi essi si soffermarono di più, affermando che obbiettivamente non vi sono argomenti sufficienti per considerare come virus le particelle da loro osservate.

C'è infine da ricordare che Gieseking e coll. (1955) ([126]) non trovarono formazioni riferibili a virus nelle cellule del tumore di Ehrlich.

7 - *Neoplasie filtrabili del topo.*

Nella parte introduttiva è stato accennato alle varie forme di emopatie e neoplasie del topo che negli ultimi dieci anni sono state isolate, studiate e riconosciute essere trasmissibili mediante filtrati acellulari. Diverse di queste forme neoplastiche sono state studiate al m.e.

Dmochowski e coll. (1956, 1957) ([94, 97]) e Dmochowski (1958) ([100]) si sono occupati di questo argomento osservando nelle cellule neoplastiche corpi osmiofili di differenti grandezze contenenti caratteristiche particelle virus simili le quali erano presenti anche negli spazi extracellulari. Negli

organi dei topi di due ceppi portatori di leucemia spontanea (AKR, C_{58}) essi videro particelle virali negli animali ammalati, ma non le trovarono negli animali di 6-8 settimane degli stessi ceppi, non ammalati. Particelle virus simili sono state osservate anche nei tessuti di topi del ceppo C_3H nei quali la leucemia era stata indotta con estratti acellulari di organi leucemici di un ceppo con alta incidenza della malattia leucemica.

Bernhard e coll. (1958, 1959) ([65, 66]) hanno rivolto la loro attenzione a leucemie murine di tipo linfatico insorte spontaneamente in topi del ceppo AKR ed indotte secondo il metodo di Gross — e cioè con filtrati acellulari di organi di animali leucemici — in topi dei ceppi F, C_3H e $C_{57}Br$. In questi animali, oltre la leucemia, potevano riscontrarsi anche tumori parotidei.

Bernhard e coll. in queste forme morbose descrissero 3 tipi di particelle distinte con le lettere A, B, C.

Il tipo A misurava 75 mμ ed era a sede intracitoplasmatica apparendo costituito da un nucleo contornato da doppia membrana. Il tipo B misurava 80-110 mμ ed era identico al tipo di particelle intracitoplasmatiche descritte a proposito del tumore mammario. Aveva un nucleo contornato da una sola membrana. Il tipo C, con diametro variabile da 60 a 150 mμ, era costituito da particelle molto polimorfe. In nessuno dei due lavori citati era fatto cenno ad osservazioni sui controlli. Gli autori nelle loro conclusioni affermavano la necessità di fare indagini sugli estratti purificati dei tumori per ritrovare le stesse particelle.

Anche nei tumori parotidei indotti con i filtrati acellulari sono stati visti, come abbiamo già accennato, dei corpuscoli virali, anche se infrequentemente (Dmochowski e coll. 1959) ([104]).

Graffi e coll. (1960) ([129]), nelle linfoghiandole di topi portatori di una leucemia mieloide indotta con filtrati acellulari, hanno evidenziato particelle virus-simili di 60-150 mμ di diverso aspetto morfologico. In realtà le immagini esibite mostravano elementi di aspetto disparatissimo che, spesse volte, rendevano problematica la identificazione con un virus.

Tra i virus capaci di indurre neoplasie sperimentali c'è da annoverare il polioma della Stewart di cui è stato fatto cenno nella parte introduttiva della presente esposizione. Questo virus è capace di indurre effetti citopatogeni in cellule coltivate in vitro (Eddy e coll. 1958) ([110]). Un ceppo di cellule embrionali di topo infettate col polioma e studiate al m.e. ha rivelato la presenza di particelle di 27 mμ di diametro secondo Dmochowski e coll. (1959) ([105]) e di 30 mμ secondo Bernhard e coll. (1959) ([67]).

Simili particelle erano viste anche nei tumori parotidei e mammari indotti nel ceppo NIH Swiss con i liquidi delle culture cellulari infettate

ed anche, secondo Bonfield e coll. (1959) ([39]), in cellule di topo infettate con il polioma.

Nelle cellule di cultura si è notata la presenza anche di particelle più grandi delle precedenti e cioè di 50-60 mμ (Dmochowski, 1960) ([108]). Particelle di diversa grandezza e cioè di 40-45 mμ di media furono trovate da Kahler e coll. (1959) ([150]) nei liquidi di cultura di cellule embrionali di topo del ceppo C_3HBi infettate con estratti di parotide o di linfonodi di topi leucemici.

Commentando questi risultati, Dmochowski (1960) ([108]) avanzava l'ipotesi che due o più virus potessero essere presenti nelle culture del virus del polioma o che potessero esservi dei virus di sortita accanto a quello del polioma.

Sul virus polioma hanno studiato anche Howatson e collaboratori (1960) ([140]). Infettando cellule embrionali di topo essi hanno visto che il titolo del virus cresceva fino al V giorno e declinava poi rapidamente dopo il VII tanto che era difficile ritrovarlo. Al m.e. questi dati sono stati confermati.

Le particelle virali furono viste, sia nel nucleo sia nel citoplasma, con un diametro di 28 mμ e costituite da un nucleo centrale contornato da una zona meno densa. Gli stessi Howatson e coll. (1960) ([140]) condussero osservazioni su rene di hamster neonati prelevato ad intervalli dalla inoculazione del polioma. Il virus era ritrovato in maggiore quantità dopo 5-6 giorni dell'inoculo. Alcune particelle mostravano un diametro massimo di 28 ed altre di 60 mμ. Alle forme sferiche erano associate strutture filamentose tubulari. Le particelle virus simili non erano viste nelle cellule prelevate da tumori in pieno sviluppo.

La struttura di questo virus è stata studiata utilizzando virus purificato e sfruttando la tecnica del contrasto negativo. Le particelle, sferiche, avevano un diametro medio di 45 mμ e tutte apparivano fornite di capsula formata da subunità (Wildy e coll. 1960) ([188]).

Infine bisogna ricordare il contributo di Dmochowski e coll. (1960) ([108]) i quali hanno studiato un virus del tipo polioma isolato da un topo del ceppo AK con leucemia spontanea (Negroni e coll. 1959) ([164]).

Lo studio al m.e. su cellule coltivate ed infettate mostrava molte particelle intranucleari di 30-40 mμ e particelle citoplasmatiche, in numero più scarso, di 50-60 mμ, tutte costituite da un nucleo contornato da una membrana esterna.

Un'altra emopatia del topo è stata recentemente isolata da Friend e coll. (1957, ved. Parte I) ([11]).

Fin dal 1958 le cellule patologiche di questa leucemia furono osservate al m.e. (De Harven e coll.) ([88]) e si potettero così evidenziare particelle virali di 78 mμ circa con doppia membrana e localizzate nel cito-

plasma delle cellule. Gli stessi ricercatori riconfermarono più tardi questo studio (De Harven e coll. 1960) ([89]) e precisarono che le particelle virali erano presenti anche negli spazi extracellulari.

Nell'estate del 1960 alla Conferenza Regionale Europea di Microscopia Elettronica (Delft 1960) ([90]) De Harven e Friend precisarono ancora che il loro virus era visibile più facilmente negli spazi extracellulari e solo occasionalmente era trovato nei vacuoli citoplasmatici. Le particelle da loro viste corrispondevano al tipo A descritto da Bernhard e coll. (1958) ([63]). Gli autori hanno studiato a fondo questo argomento ed hanno illustrato anche una ipotesi sulla formazione di questi virus.

8 - *Altre neoplasie del topo.*

Elementi virus-simili sono stati visti in diverse forme di tumori del topo che non hanno dimostrato, alle prove biologiche, di contenere un agente filtrabile.

Infatti particelle virus-simili sono state trovate nel melanoma S/91 (Dalton, 1956) ([85]), nella leucemia mieloide (Dmochowski, 1957) ([96, 97]) ed in una leucemia plasmacellulare (Howatson e coll. 1958) ([139]), entrambe trapiantabili, del topo.

In un linfoma trapiantabile del topo da loro isolato, De Harven e Friend (1960) ([91]), hanno visto particelle di 80 mμ fornite di doppia membrana a sede intracitoplasmatica, del tutto simili a quelle osservate nel carcinoma mammario del topo. I due ricercatori però sottolineavano il fatto (1960) ([90]) che il linfoma in questione non è trasmissibile con i filtrati, per cui è oscura la relazione esistente tra le particelle viste ed il tumore.

Ichikawa (1958) ([142]) ha trovato anch'egli particelle virali di 70-95 mμ negli spazi intracellulari di tessuti di topi leucemici del ceppo SL e di topi con linfosarcomatosi del ceppo AK. Egli però non esclude che le particelle viste nulla abbiano a che fare col tumore.

A completamento di questo elenco c'è da ricordare che Selby e coll. (1956) ([179]) non hanno visto particelle virali nelle cellule del sarcoma 180 del topo.

9 - *Presenza di corpuscoli virali in organi di animali sani.*

Da vari ricercatori è stata segnalata la presenza di particelle di aspetto virale nei tessuti di animali sani, e cioè senza malattie neoplastiche al momento dell'osservazione.

E' questo un argomento di grande rilievo teorico, poichè affronta uno degli aspetti più importanti sottolineati dai sostenitori della eziologia virale delle neoplasie.

La presenza infatti dei virus nei tessuti di organismi sani starebbe a dimostrare l'esistenza di forme latenti di virus oncogeni, i quali inizierebbero la loro azione quando si verificassero le condizioni favorevoli (di ambiente, di età, di sviluppo sessuale) alla loro funzione patogena.

Non si comprende tuttavia come mai le forme latenti del virus si ritrovino nel loro aspetto maturo e con tanta facilità in organismi ancora sani senza dare inizio alla malattia neoplastica di cui sarebbero responsabili, mentre, d'altro canto, non sempre sono state trovate formazioni virali nei tessuti di neoplasie filtrabili.

I primi a segnalare particelle virali nel plasma degli animali di controllo furono, a quanto ci risulta, Sharp e coll. (1952) ([180]). Le stesse particelle furono da loro viste nei polli con linfomatosi avanzata, ma non negli animali con malattia ancora nella fase iniziale.

Diversi altri hanno fatto simili segnalazioni.

Nelle culture di fibroblasti normali di pollo le hanno descritte Bang (1954, 1958) ([41, 45]) e Rouiller e coll. (1956) ([174]); Horel e coll. (1953) ([138]) le trovarono nel plasma di polli normali.

Bernhard e coll. (1956) ([60]), studiando il sarcoma di Rous, trovarono le stesse particelle virali anche in qualche tessuto degli animali di controllo. Uguale constatazione fecero Oberling e coll. (1957) ([168]).

Inoltre Benedetti e coll. (1957, 1958) ([47, 48, 49]) hanno trovato in alta percentuale virus simili a quelli della linfomatosi e della eritroblastosi del pollo, in embrioni di pollo ed in pulcini sani. Febvre e coll. (1958) ([120]) hanno coltivato in vitro cellule embrionali di pollo dei ceppi Leghorn Bruns, immune da linfomatosi e cellule embrionali del ceppo Leghorn Blanc, portatore della malattia. In queste ultime cellule hanno trovato corpuscoli virali ed hanno perciò sostenuto il concetto della latenza dei virus.

10 - *Tumori umani.*

La presenza di eventuali virus è stata indagata anche nei tessuti neoplastici umani. Ne faremo una rapida sintesi allo scopo di completare la nostra esposizione.

Nel 1952 Melnick e coll. trovarono particelle che potevano essere virus nel citoplasma delle cellule di due casi di papilloma benigno umano.

Da una ammalata operata nel 1955 di un mixosarcoma uterino, furono asportate alcune metastasi studiate poi al m.e. da Leplus e coll. (1957) ([157]). Essi avrebbero visto corpi di inclusione citoplasmatica che

ritennero costituiti da un insieme di particelle virali. Le foto pubblicate in verità sono poco esplicative e permettono di sollevare qualche dubbio.

Dmochowski si è occupato anche di questo aspetto del problema (Dmochowski (1958) ([100]); Dmochowski e coll. 1959) ([106]). Egli ed i suoi coll. (1959) ([107]) hanno studiato linfoghiandole di 6 pazienti con leucemia linfatica acuta, 2 con leucemia monocitica, 1 con leucemia mieloide, 2 con linfosarcoma ed 1 con malattia di Hodgkin. Particelle simil-virali di 90 mμ di diametro furono trovate nelle cellule linfonodali di 3 dei 6 pazienti con leucemia mieloide. Gli estratti dei linfonodi di 8 di questi pazienti hanno dato effetti citopatogeni su culture di cellule renali di scimmia. Nessun effetto avevano invece gli stessi estratti su culture di cellule embrionali umane. Il sopranatante di tutte queste culture, inoculato in topi dei ceppi Swiss, C_3Hzb/bi e C_3H/bi non ha determinato la formazione di alcun tumore. Precedentemente Dmochowski e coll. (1957) ([96]) in una rassegna da loro fatta, affermavano che nei linfonodi di un caso di leucemia acuta umana furono trovate particelle virali simili a quelle viste nelle cellule di topi e polli leucemici. Essi dicevano tuttavia che quelle particelle possono anche non avere nulla a che fare con la malattia in atto ed essere invece dei virus di sortita. La documentazione fotografica riportata in quel lavoro è inoltre poco dimostrativa.

Ancora Ito, con una serie di osservazioni sistematiche (1957, 1958, 1959) ([144-147]), ha potuto segnalare la presenza di due tipi di particelle sferiche nel citoplasma di cellule circolanti in alcuni pazienti affetti da forme diverse di emopatie.

Il primo tipo di particelle aveva un diametro medio di 70 mμ, il secondo, di aspetto vescicolare, aveva un diametro di 45 mμ.

Al contrario di quanto ora elencato, un altro gruppo di ricercatori non ha notato la presenza di particelle virus simili nelle cellule di diverse neoplasie umane studiate al m.e.

Haguenau (1959) ([134]) in 91 casi di tumori mammari umani sistematicamente osservati non ha mai trovato elementi virali. Nel citoplasma di quelle cellule Haguenau ha visto frequentemente vacuoli contenenti particelle di 40 mμ, frutto del secreto ghiandolare. Simili particelle di tipo aspecifico sono state viste da Nilsson (1958) ([165]) in uteri di topi normali nella fase dell'estro.

Sono da ricordare inoltre le vaste osservazioni, fatte su leucociti circolanti e su cellule midollari di individui affetti da varie forme di emopatie, da Bernhard e coll. (1955) ([57, 58]), da Bessis (1954, 1956), ([69,75]) da Bessis e coll. (1955) ([70-74]), da Low e coll. (1958) ([159]), da Grey e coll. (1955) ([131]), da Pease (1955) ([170]), da Kautz e coll. (1954, 1955) ([151, 152]), i quali non hanno mai evidenziato elementi riferibili a virus.

Sono infine da ricordare le recentissime ricerche di Braunstein e coll. (1957, 1960) ([71, 78]) che, in una estesa indagine sistematica, hanno osservato casi di leucemie acute e croniche, linfosarcomi, malattie di Hodgkin, per un complesso di 27 casi. Il materiale di studio era costituito da cellule midollari e linfonodulari per un insieme di oltre 100.000 sezioni. Non furono praticamente mai osservati elementi virus simili.

Altri ricercatori (Fox, 1961; Genler e coll. 1948; Gregory, 1960; Hellivis, 1949; Haster, 1952), citati da Bernhard al Congresso europeo di microscopia elettronica del 1954, avrebbero notato corpuscoli virus simili nelle cellule neoplastiche umane, ma il polimorfismo dei granuli segnalati inficiava fortemente la loro specificità e quindi il loro significato.

Conclusioni.

Alcuni rilievi possono farsi a conclusione sulla gran massa di lavoro raccolta intorno all'argomento ora esposto.

Più volte è stata riscontrata, tra i dati riferiti, una diversità di opinione circa la grandezza dei corpuscoli osservati.

Così è stato infatti per la linfomatosi, per la mieloblastosi, per il sarcoma di Rous del pollo. Un notevole polimorfismo è stato anche segnalato da Dmochowski (1960) ([108]) e da Howatson e coll. (1960) ([140]) per il virus polioma e da Moore e coll. (1959) ([163]) per le particelle viste nelle cellule del tumore mammario del topo.

E se tutto ciò potrebbe, secondo alcuni, spiegarsi con le diverse condizioni di ricerca, in realtà bisogna dire che le tecniche usate sono state fondamentalmente le stesse. D'altro canto, lo stesso fatto che alcuni ricercatori hanno potuto fare una classificazione di tipi diversi di particelle virali sta a sottolineare il polimorfismo che in realtà caratterizza i corpuscoli virali osservati. Ed interpretare tali diversità ammettendo un ciclo evolutivo dei virus è indubbiamente un'opinione apprezzabile, ma lontana dall'essere dimostrata.

Tale questione infatti presenta aspetti difficilmente spiegabili. Se i virus oncogeni avessero un ciclo evolutivo, nei tessuti degli animali sani, ma portatori della forma latente del virus, sarebbe logico aspettarsi il ritrovamento dei corpuscoli corrispondenti alle fasi più immature dei virus stessi e non invece le forme perfettamente mature quali ci mostrano le foto esibite dai vari ricercatori che hanno appunto trovato elementi virali nei tessuti di organismi sani.

Il fatto che le particelle virali siano state trovate anche nei tessuti di animali e di embrioni sani ha fatto giustamente pensare alla possibile esistenza di forme latenti del virus. Questo concetto è stato brillan-

temente sottolineato da Bernhard e coll. (1953 ([52]) e da Oberling e coll. (1954) ([167]) che, irradiando cellule neoplastiche, hanno potuto evidenziare le particelle virali prima invisibili.

Ma a queste ricerche sono da contrapporsi varie obbiezioni: innanzi tutto il lavoro di Friedlaender-Binggelli ([122]), negativo per la ricerca di virus in un tumore da dibenzantracene, caso in cui, invece, avrebbe dovuto ottenersi con più facilità una chiara attivazione di un virus eventualmente latente; poi c'è la poco comprensibile circostanza che le particelle sarebbero più facilmente visibili nelle fasi più giovanili del tumore anzichè nelle fasi avanzate di sviluppo (Epstein 1957, Haguenau e coll. 1957, Gaylord 1955), ([113, 114, 132, 133, 125]); ed infine, la questione di maggior rilievo costituita dalla importante circostanza che non è stato possibile stabilire un rapporto tra la infettività degli estratti tumorali ed il numero delle particelle virali trovate nelle cellule dei tumori stessi, come da varie parti è stato segnalato (Dmochowski e Grey 1957, Hollman e coll. 1959, Bernhard e coll., Epstein 1958) ([97, 137, 60, 115]).

D'altro canto non si comprende perchè debba considerarsi latente il virus invisibile nelle cellule delle neoplasie filtrabili ed ugualmente latente il virus visibile presente nelle cellule dei tessuti sani (vedi paragrafo corrispondente) o nelle cellule delle neoplasie non filtrabili (Rouiller e coll. 1956, Dalton 1956, Dmochowski 1957, Howatson e coll. 1958, De Harven e coll. 1960, Ichikawa 1958, Friedländer e collaboratori 1955, 1956, Selby e coll. 1954, 1956, Adams e coll. 1957) ([174, 85, 96, 139, 91, 142, 123, 124, 178, 179, 36]).

Per tutte le ragioni ora esposte, Bernhard (1954, 1958) ([55, 63, 44]) sottolineava i molti dubbi che le particelle osservate sollevavano. Lo esempio su cui egli soffermava maggiormente l'attenzione era costituito dall'assenza di particelle virali nelle ghiandole mammarie di topi di un ceppo ad alta incidenza tumorale e portatore dell'agente del latte (1958) ([64]).

Date le incertezze esistenti ed essendo assolutamente non provata la specificità delle particelle osservate, egli era d'accordo con la definizione di « particelle virus-simili » che era stata prudenzialmente adottata (1958) ([63]).

Questioni di rilievo sollevava anche Amano (1958) ([37]). Egli infatti sosteneva la necessità di distinguere, come entità sostanzialmente diverse, i virus oncogeni dagli altri virus svolgenti azioni citopatogene ed infiammatorie. In altri termini egli sosteneva il concetto che i virus oncogeni non avrebbero la tendenza a proliferare nelle cellule ospiti, poichè questo fatto porterebbe al blocco della funzione cellulare impedendole di

moltiplicarsi. I virus oncogeni si fermerebbero pertanto alla superficie della cellula, al contrario dei virus infiammatori, i quali proliferano in modo da ledere organi importanti della cellula con conseguente distruzione della stessa. Invece i virus oncogeni e le cellule neoplastiche debbono coesistere per permettere la proliferazione cellulare.

Quindi, egli concludeva, i virus che si moltiplicano nel nucleo o nel citoplasma non possono essere gli induttori della malignità nelle cellule, nelle quali invece sarebbero presenti solo le forme immature dei virus.

Per questa ragione Amano sosteneva che le particelle descritte da Fawcett (1956) ([118]) nelle cellule del tumore di Lucké, che portavano a deformazione della cromatina nucleare, debbono considerarsi virus di inquinamento e non gli agenti responsabili della neoplasia. Lo stesso ragionamento deve farsi a proposito del virus della mixomatosi e del fibroma del coniglio che non rientrerebbero nel gruppo dei virus oncogeni, perchè la loro inoculazione si accompagna a reazione infiammatoria nei conigli infettati.

Come esempio di virus oncogeno Amano si riferiva al virus del latte del carcinoma mammario del topo che si formerebbe nell'interno del citoplasma e verrebbe poi espulso nel lume del dotto nella sua forma matura. Un tipo di sviluppo del tutto diverso, quindi, da quello degli altri virus — come ad esempio quello dell'ectromielia — che distruggono le cellule infettate.

Si può perciò concludere dicendo che, se vi sono dati ed immagini che possono far pensare all'esistenza di particelle virali nelle cellule neoplastiche, nulla può escludere che le immagini viste siano da riferire a virus di inquinamento sopravviventi nei tessuti neoplastici attraverso i passaggi seriati. Comunque, un largo margine di dubbio deve essere riservato su tutta questa branca di ricerca.

III - PARTE SPERIMENTALE

Trovandoci a disporre di una leucemia sperimentale del ratto, il mieloma di Oberling, Guérin e Guérin (Violante e coll., 1958) ([187]), abbiamo voluto indagare se nelle cellule di questa neoplasia fossero presenti elementi virali rilevabili al m.e.

Il concetto di ricerca era basato su precedenti lavori condotti su questa neoplasia, lavori che avrebbero dimostrato l'esistenza di un virus nelle cellule del mieloma (Magrassi e coll., 1957) ([192]).

Il virus isolato fu definito CLM, ma ben presto la sua consistenza si rivelò nulla, essendo infatti il CLM un agente patogeno — non filtra-

bile attraverso i comuni filtri da batteriologia — che fu isolato occasionalmente una sola volta da questa neoplasia, rivelandosi così un elemento di sortita.

Purtuttavia, successive ricerche permisero di evidenziare che i filtrati del mieloma svolgevano azione citopatogena su cellule coltivate in vitro e che i liquidi di cultura, inoculati a ratti, avevano la capacità di inibire l'attività di un enzima, la 3-idrossiantranilicoossidasi, nel fegato degli animali trattati (Quagliariello e coll., 1958) ([195]), inibizione in tutto simile a quella riscontrata negli animali portatori del mieloma (Quagliariello e coll., 1957) ([194]).

Si pensò, in realtà senza una ragione fondata, che l'inibizione enzimatica di cui sopra potesse essere legata alla presenza di un virus, sia nelle cellule del mieloma, sia nelle culture di tessuto.

Questa interpretazione appariva arbitraria. Ciononostante, abbiamo fermato la nostra attenzione su questa neoplasia, sembrandoci di notevole rilievo il poter affermare o negare la presenza di elementi virali nelle cellule del mieloma.

La ricerca è stata condotta anche su cellule prelevate dalla massa neoplastica di animali mielomatosi sottoposti a trattamento citostatico con Bis (β-cloroetil) p-aminofenilalanina.

Quest'ultimo tentativo era fatto con la speranza che la lisi cellulare indotta dal citostatico potesse permettere una più facile evidenziazione di virus eventualmente presenti nelle cellule.

RISULTATI

In un periodo di due anni di sistematiche ricerche sono state osservate migliaia di cellule mielomatose, in nessuna delle quali sono state viste immagini riferibili a formazioni virali.

In un precedente lavoro (Steve Bocciarelli, Violante, 1954) ([194]) sono stati descritti i caratteri morfologici delle cellule di questa leucemia del ratto. Si trattava di grosse cellule di 8-10 micron, con un nucleo polimorfo, nucleolato. Il citoplasma, ampio e sfrangiato, è apparso riccamente fornito di reticolo endoplasmico e di apparato mitocondriale. Il primo, evidentissimo, costituito da un sistema lacunare ampio, vacuolare, era abbondantemente fornito di microsomi. I mitocondri, numerosi, presentavano delle alterazioni strutturali.

Per le irregolarità nucleari, per l'aspetto del citoplasma, caratterizzato dalla ricchezza delle formazioni endoplasmiche e mitocondriali, questi elementi cellulari furono considerati di diretta derivazione dalle

DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA

Fig. 1 - Oltre al polimorfismo nucleare, è perfettamente visibile l'abbondanza della sostanza nucleolare (Nl) ed i diversi aspetti che può assumere probabilmente in rapporto a diversi stadi funzionali delle cellule, alcune delle quali sono in fase fagocitante (CF) con un ben evidente corpo fagocitato (f). Sono distinguibili inoltre alcune cellule necrotiche (CN) e residui cellulari.

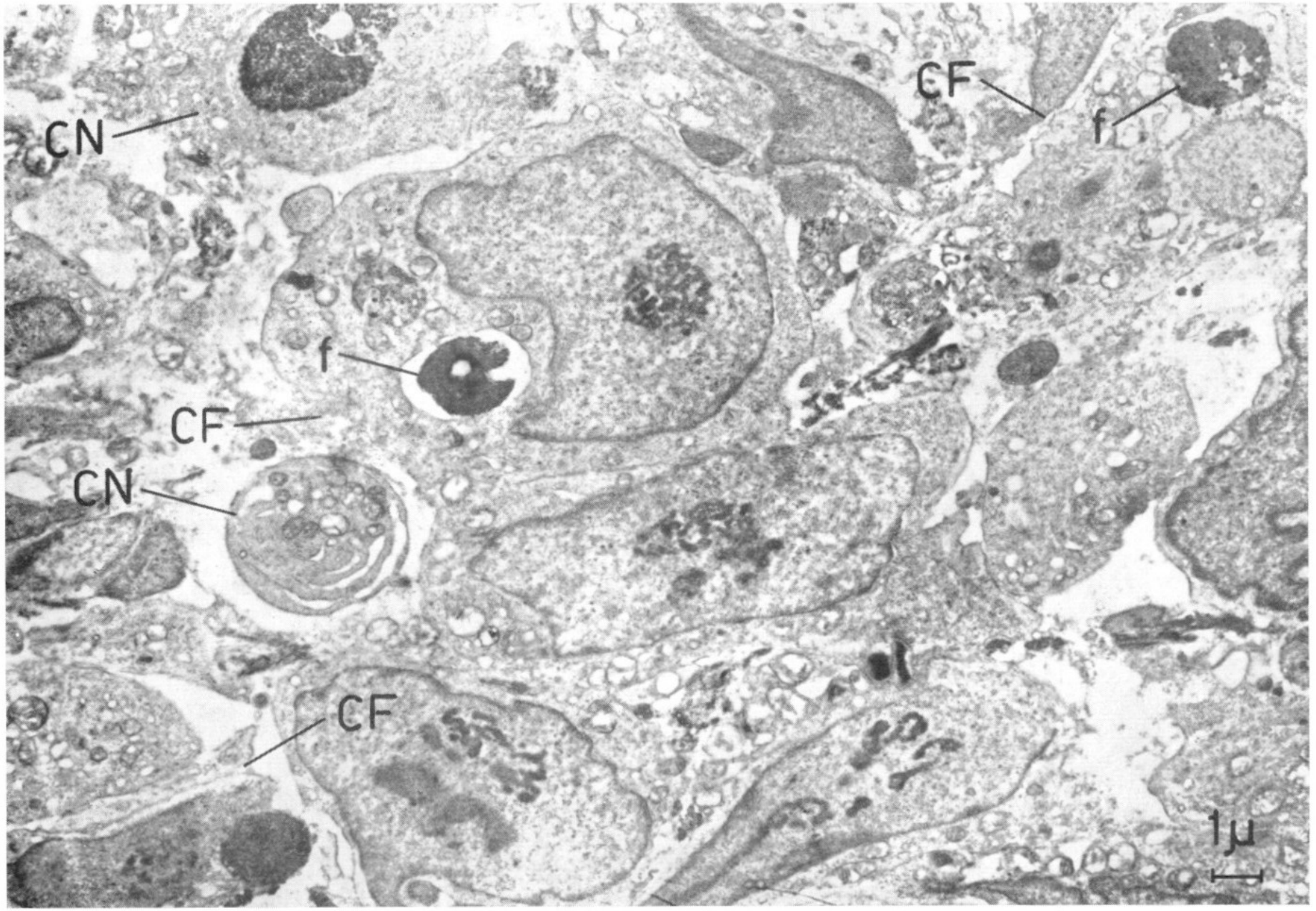

CN
CF
f
f
CF
CN
CF
1μ

Fig. 2 - Sono visibili diverse cellule con aspetti nucleari polimorfi. Il nucleolo è ben visibile (Nl). Alcune cellule sono in attività fagocitante (CF) ed è ben visibile il residuo fagocitato (f). Nel citoplasma di qualcuna sono distinguibili gocciole di grasso (g).

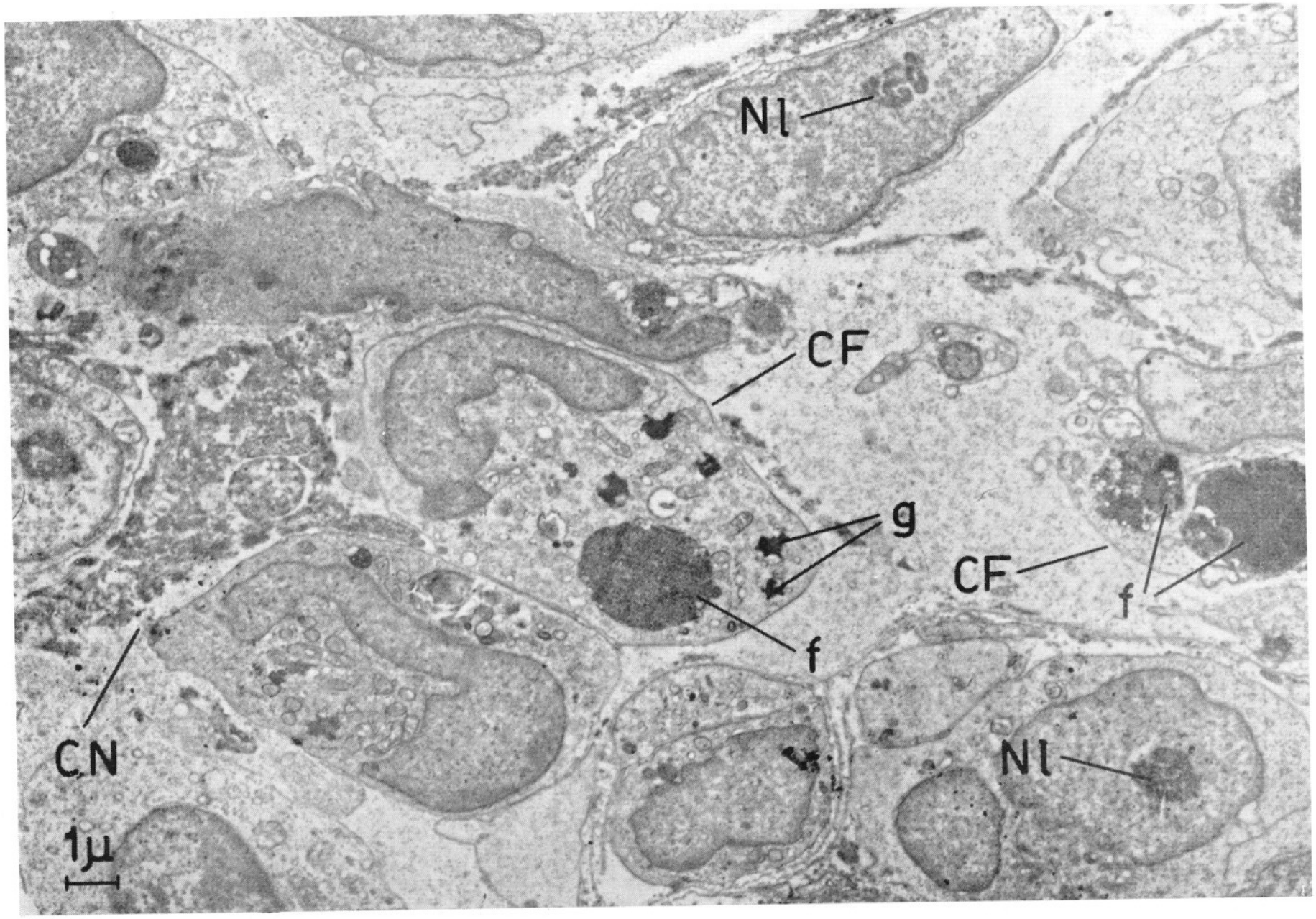

Nl
CF
g
CF
f
f
CN
Nl
1µ

Fig. 3 - Cellula mielomatosa dopo 3 giorni di trattamento citostatico. Il nucleo è addensato e privo di nucleoli, la membrana nucleare è integra. Mitocondri in parte normali, in parte in degenerazione grassa (mig) o jalina (mii). Reticolo endoplasmico disorganizzato (RE).

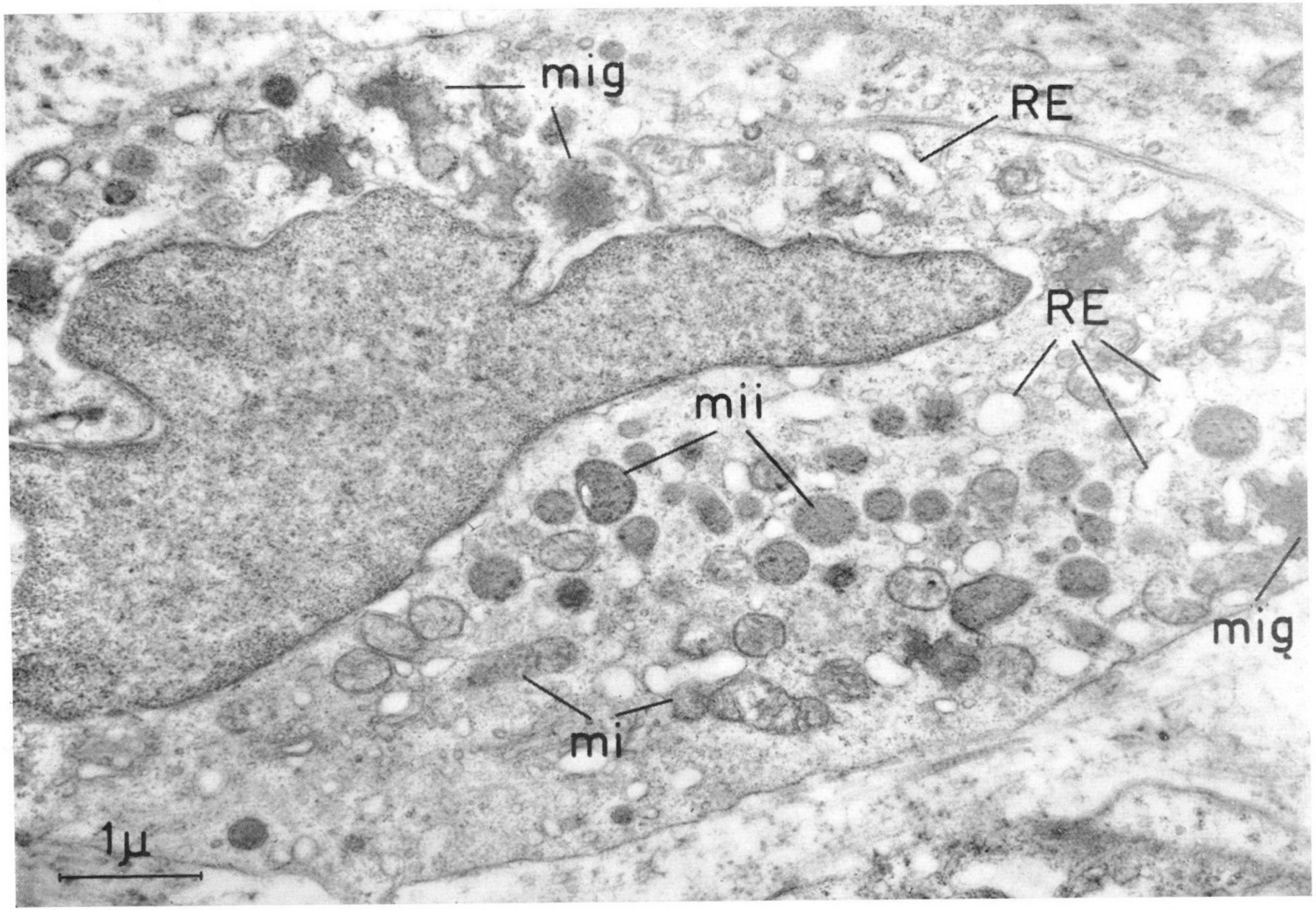

mig
RE
RE
mii
mig
mi
1μ

Fig. 4 - Cellula mielomatosa dopo 3 giorni di trattamento, in fase avanzata di sofferenza. Il reticolo cromatinico nucleare, pur essendo addensato, va perdendo la sua struttura omogenea e presenta una profonda incisura che lo divide quasi in due tronconi. La membrana nucleare è però sempre ben visibile e non presenta soluzioni di continuità. I mitocondri sono tutti alterati. Il reticolo endoplasmico è poco visibile e disorganizzato.

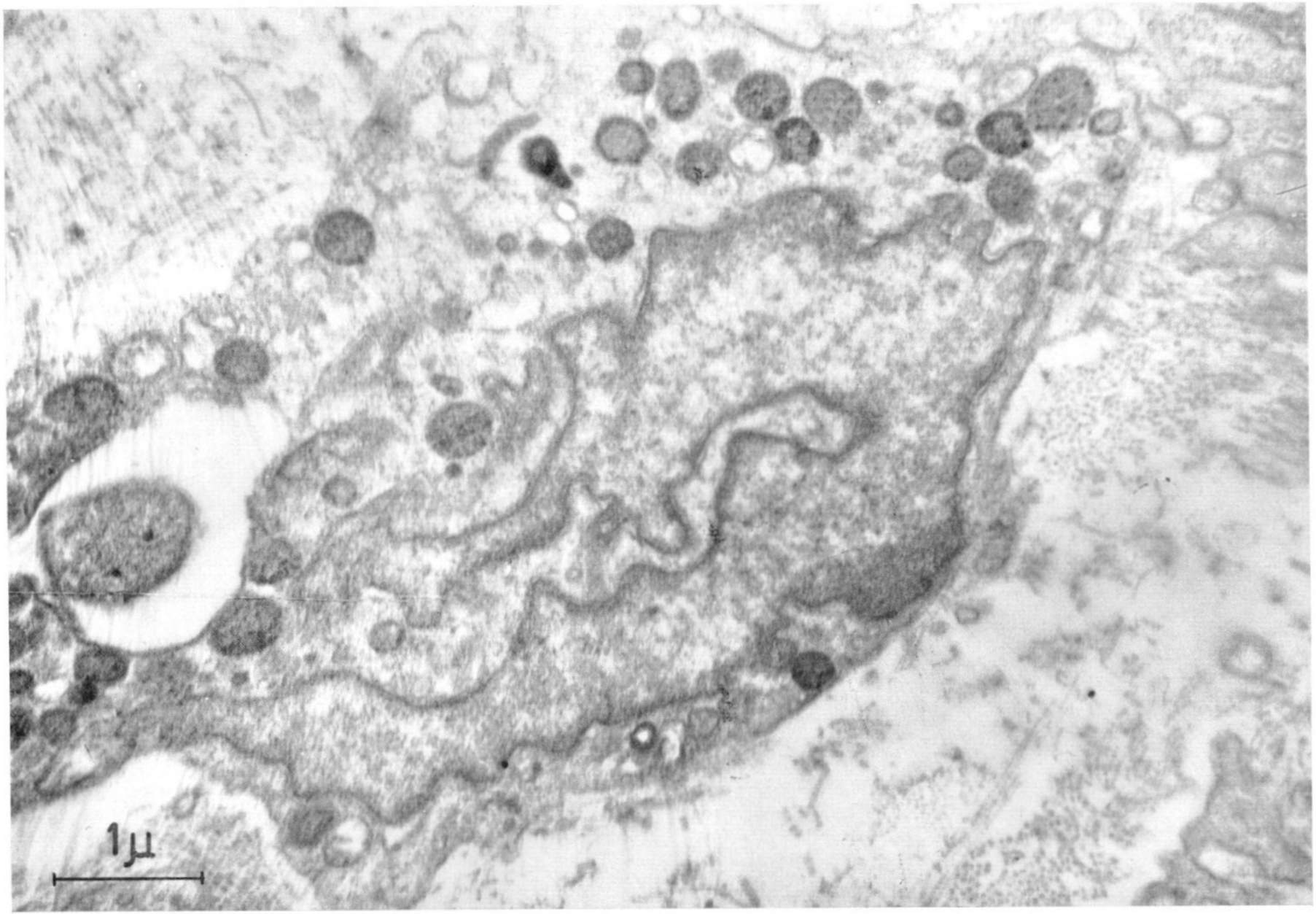

1μ

Fig. 5 - Cellula mielomatosa dopo 3 giorni di trattamento in fase di avanzata disorganizzazione. Il nucleo (N) è segmentato in più frammenti ben distinti. I mitocondri nell'interno delle cellule sono disfatti o ridotti a pallide ombre irriconoscibili (mi). Nelle cellule adiacenti si distinguono mitocondri in degenerazione jalina (mii). Il reticolo endoplasmico è praticamente distrutto.

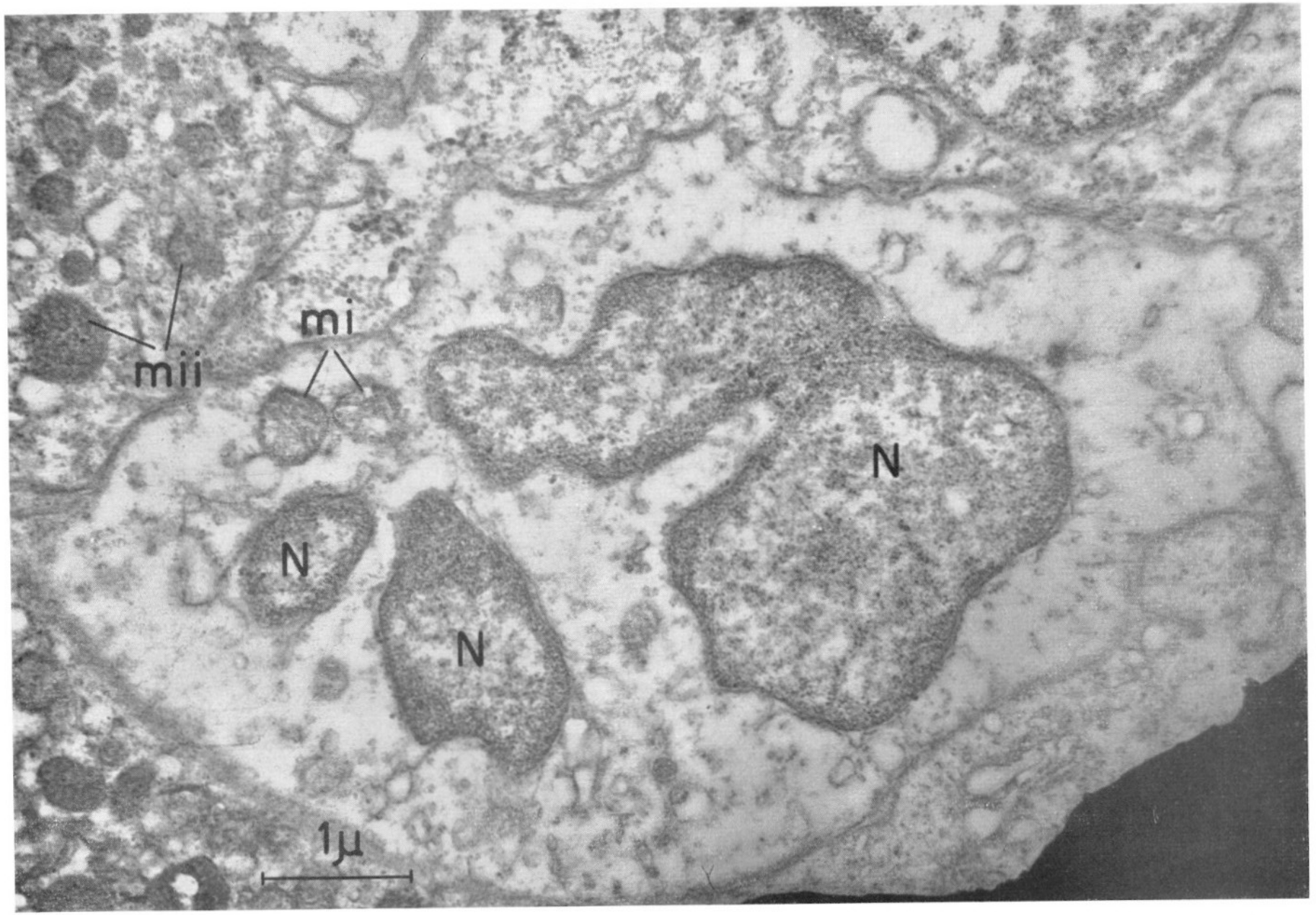

mii
mi
N
N
N
1μ

Fig. 6 - Visione d'insieme a piccolo ingrandimento di cellule leucemiche prelevate ad un ratto mielomatoso sottoposto a tre iniezioni di citostatico. Formazioni nucleolari non sono visibili. Il reticolo cromatinico nucleare mostra una decisa tendenza all'addensamento di cui è possibile distinguere i diversi gradi. Vi è infatti nella cellula indicata col numero 1, un nucleo con l'aspetto pressochè abituale delle cellule mielomatose normali; nelle cellule 2-3-4-5-6 la massa nucleare presenta invece un aspetto che va facendosi più addensato e compatto, modificazione questa che raggiunge la sua massima espressione nei nuclei delle cellule 7-8-9 la cui massa va decisamente omogeneizzandosi. L'apparato mitocondriale mostra, accanto ad elementi con morfologia ancora normale, molti altri in preda a degenerazione grassa (mig) o jalina (mii).

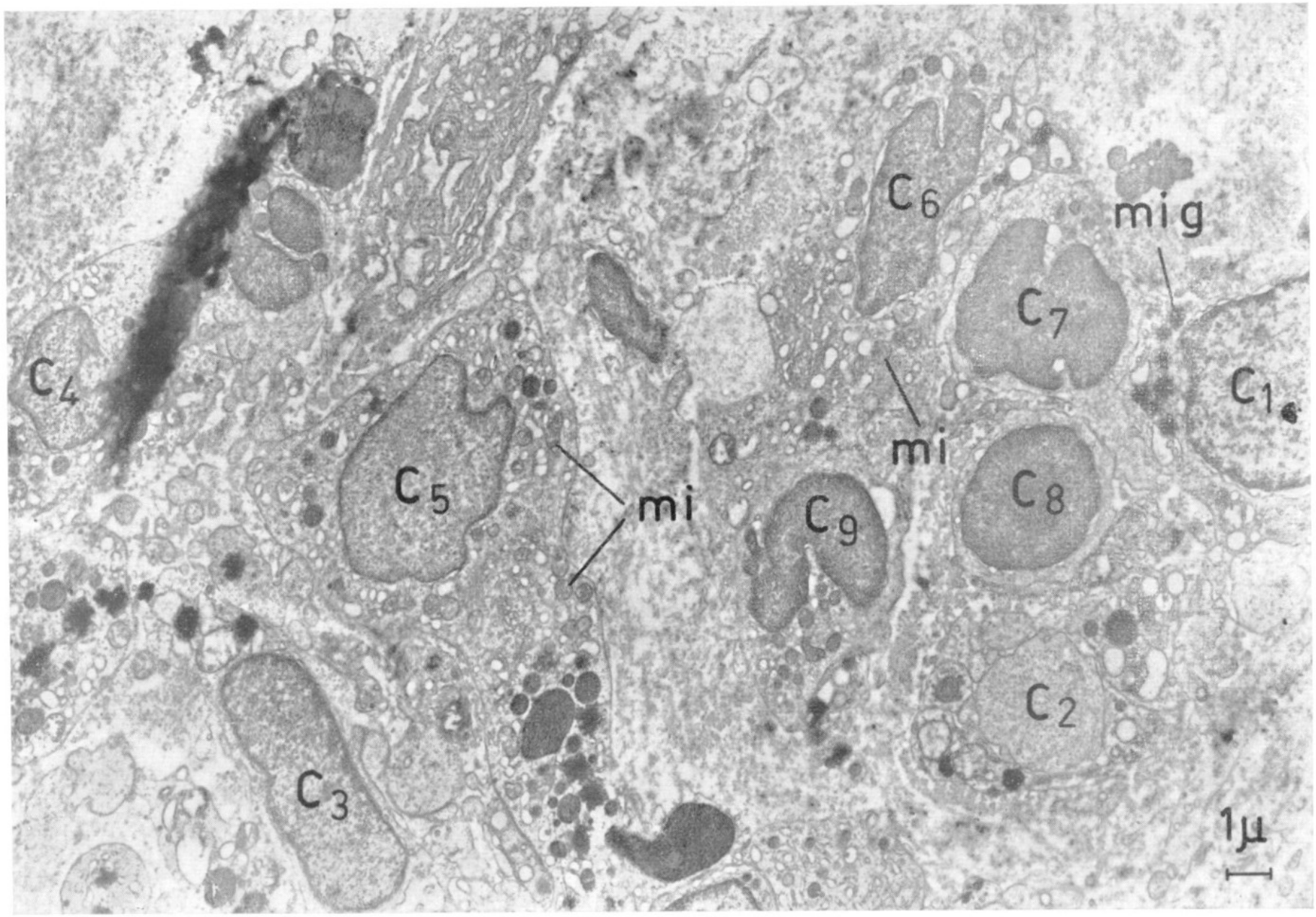

C6
mig
C7
C4
C1
mi
C5
mi
C8
C9
C2
C3
1µ

Fig. 7 - Cellula mielomatosa. E' distinguibile nel citoplasma, nei pressi del nucleo, una struttura vescicolare, probabilmente un mitocondrio, contenente numerosi corpuscoli.

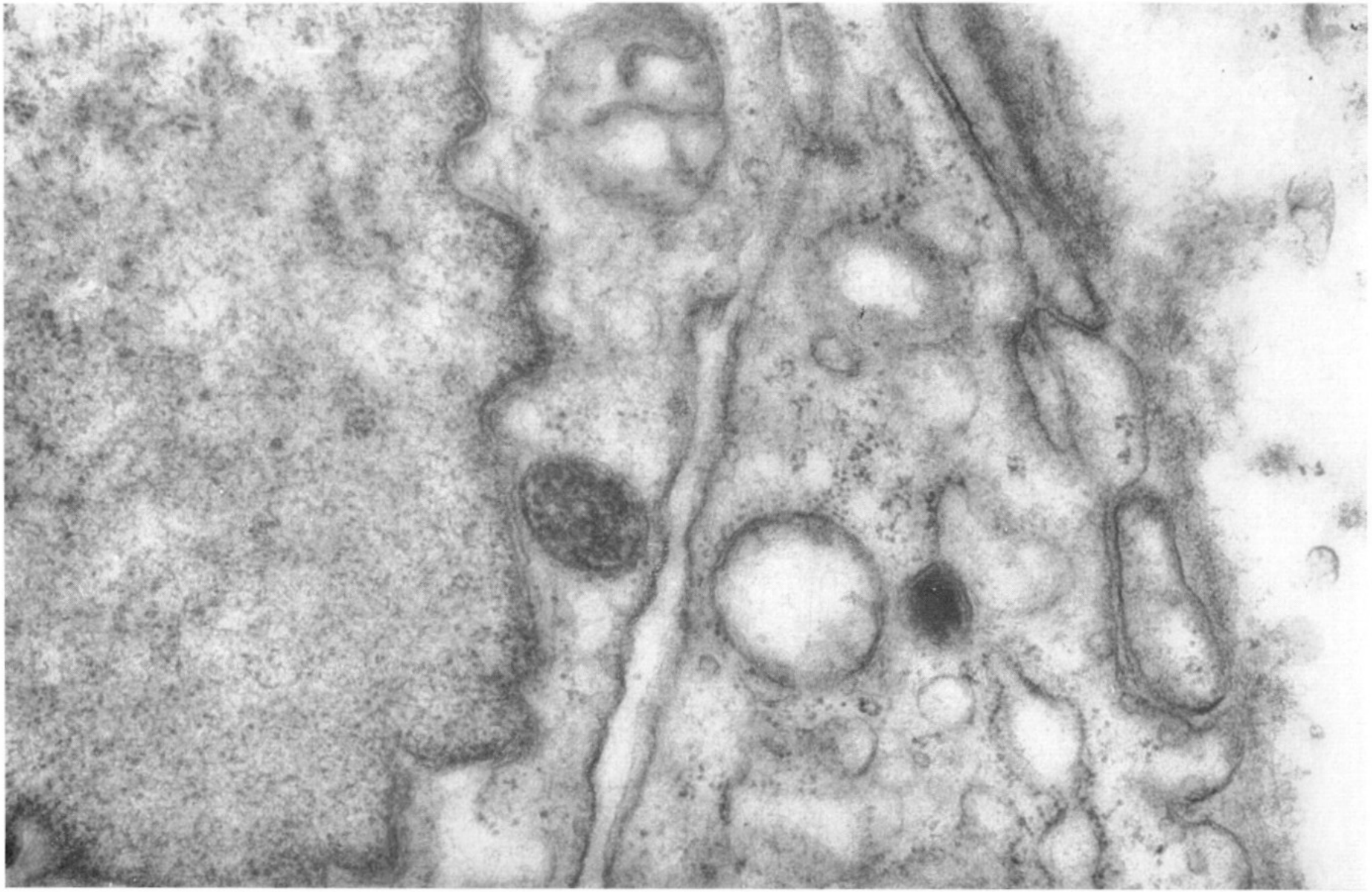


Fig. 8 - Formazione vescicolare, del tipo mostrato nella fig. 7, in via di dissoluzione. Sono visibili nel suo interno frammenti corpuscolati.

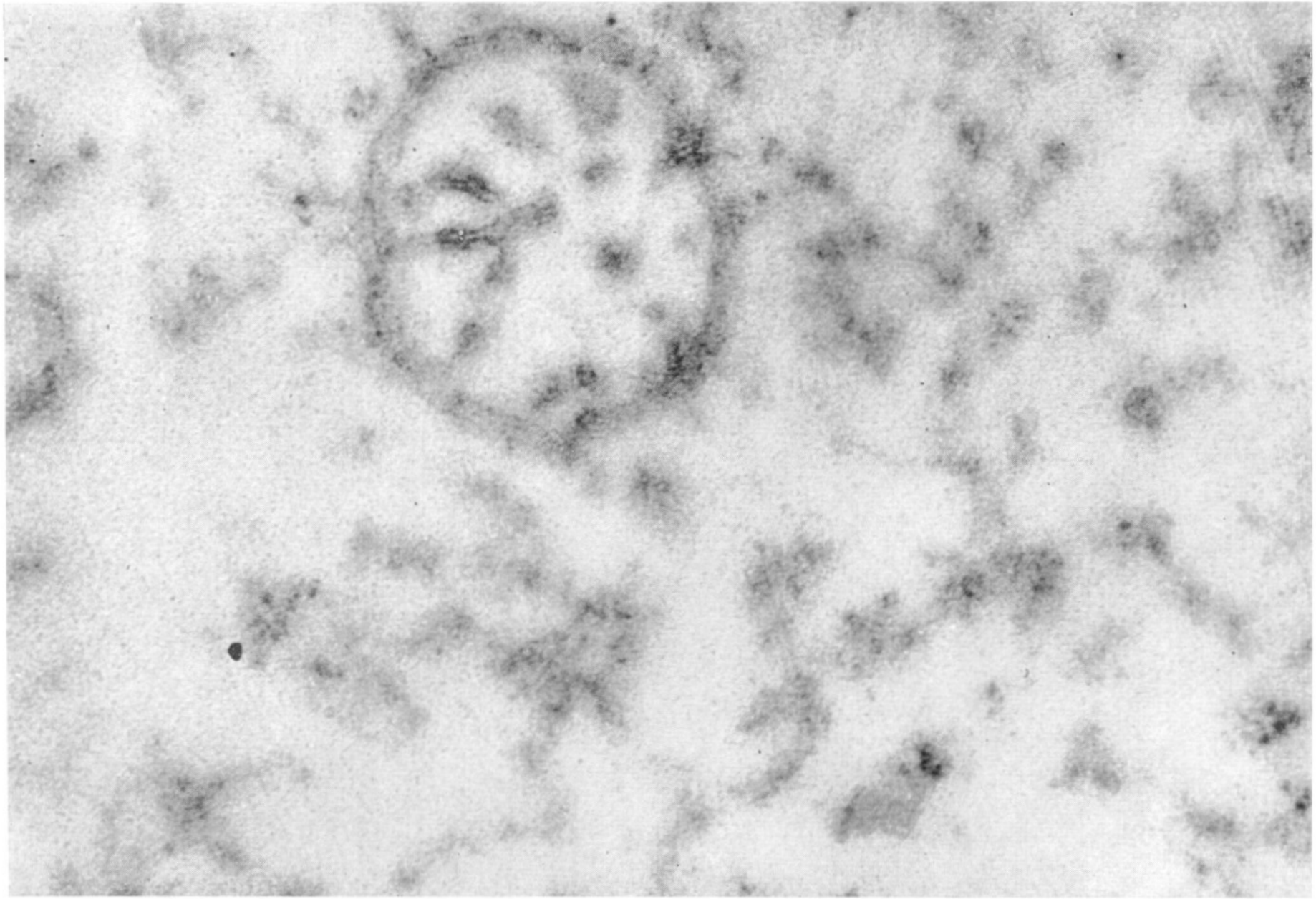


Fig. 9 - Cellula renale di scimmia infettata con virus ECHO 9. E' visibile una formazione vescicolare contenente numerosi corpuscoli pseudovirali.

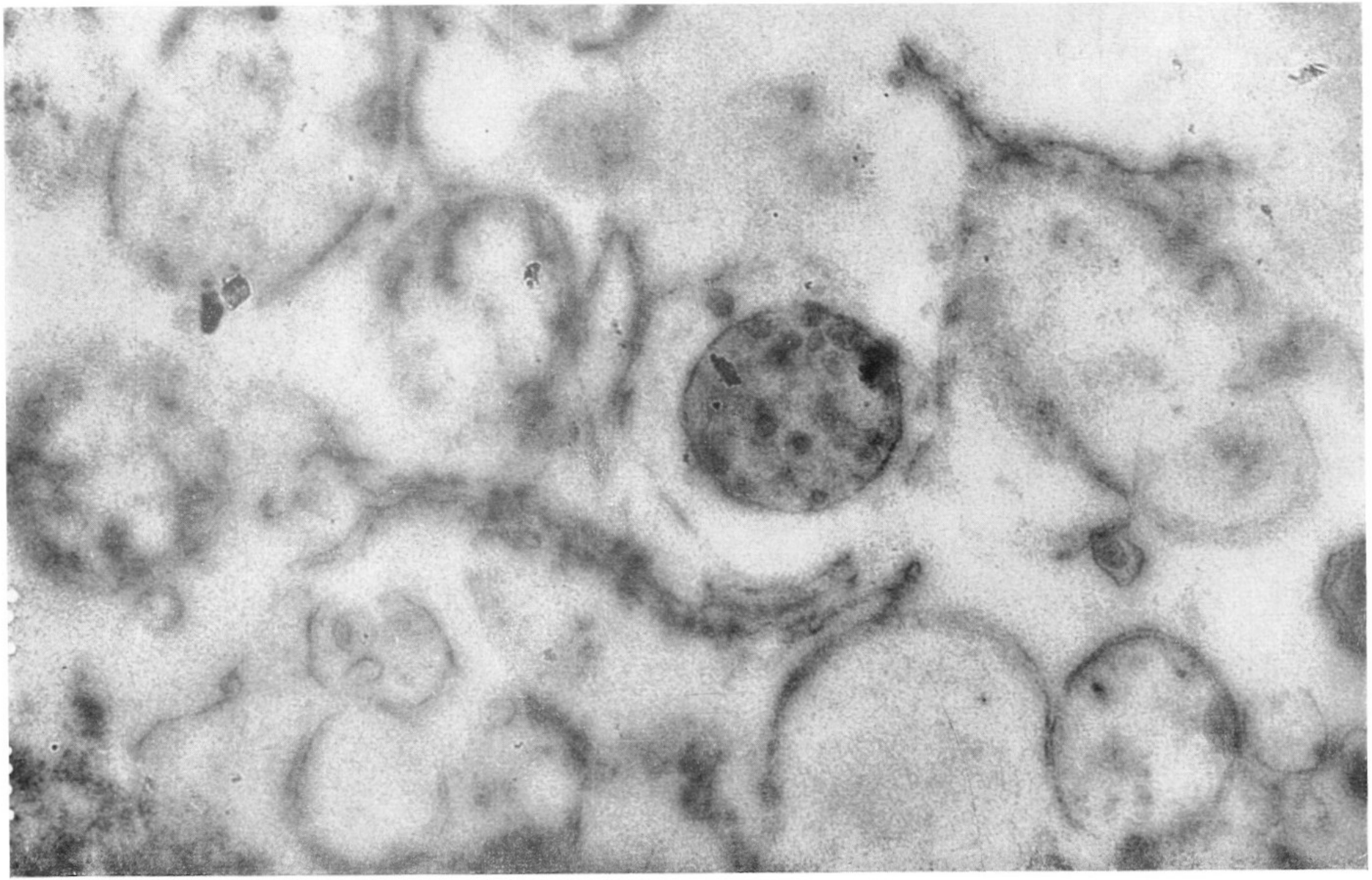


Fig. 10 - Cellule renali di scimmia. Formazioni vescicolari del tipo osservato nella fig. 9, in via di dissoluzione. Nell'interno sono visibili frammenti corpuscolati.

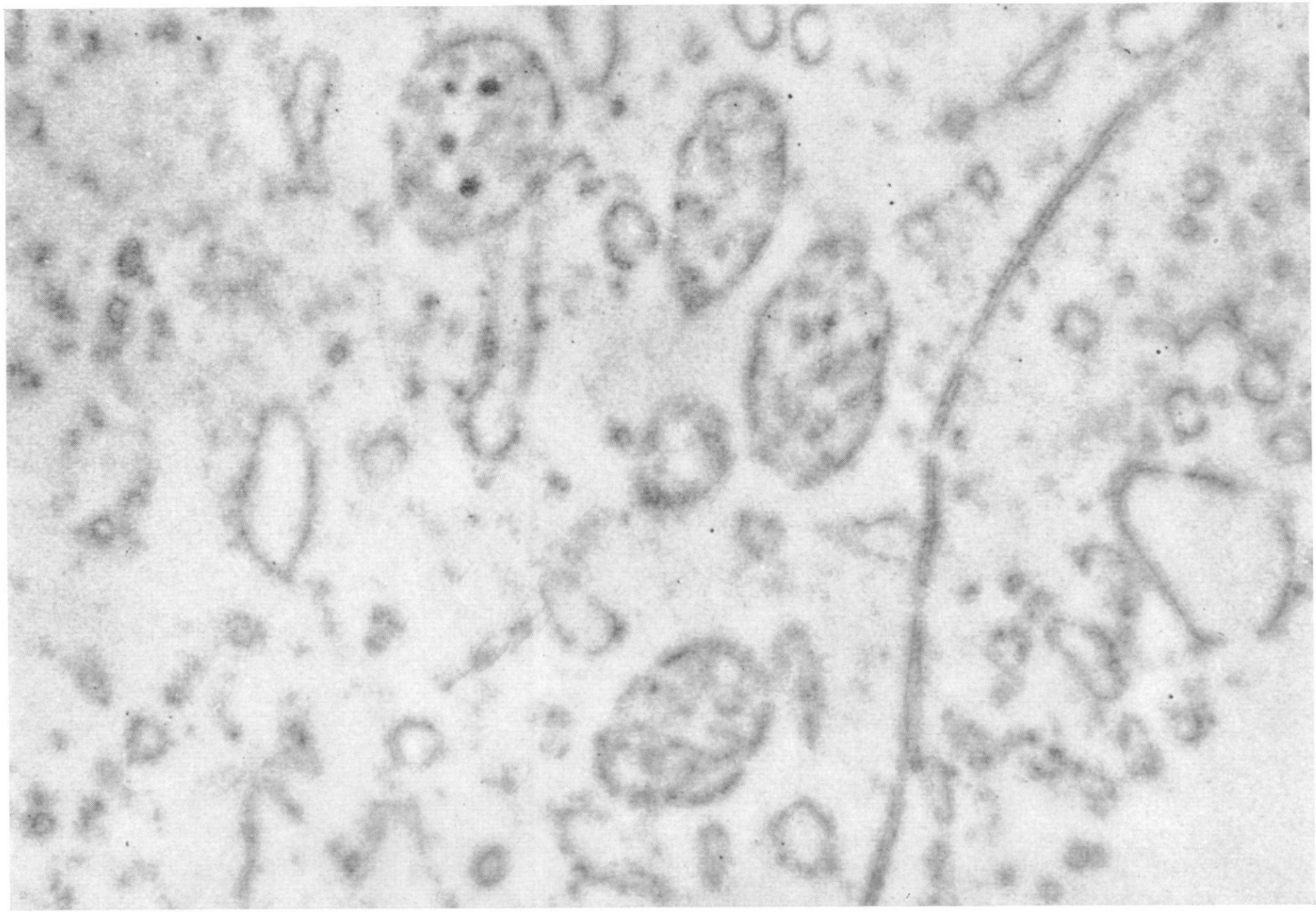


Fig. 11 - Cellule renali di scimmia. Formazioni vescicolari del tipo osservato nella fig. 9, in via di dissoluzione. Nell'interno sono visibili frammenti corpuscolati.

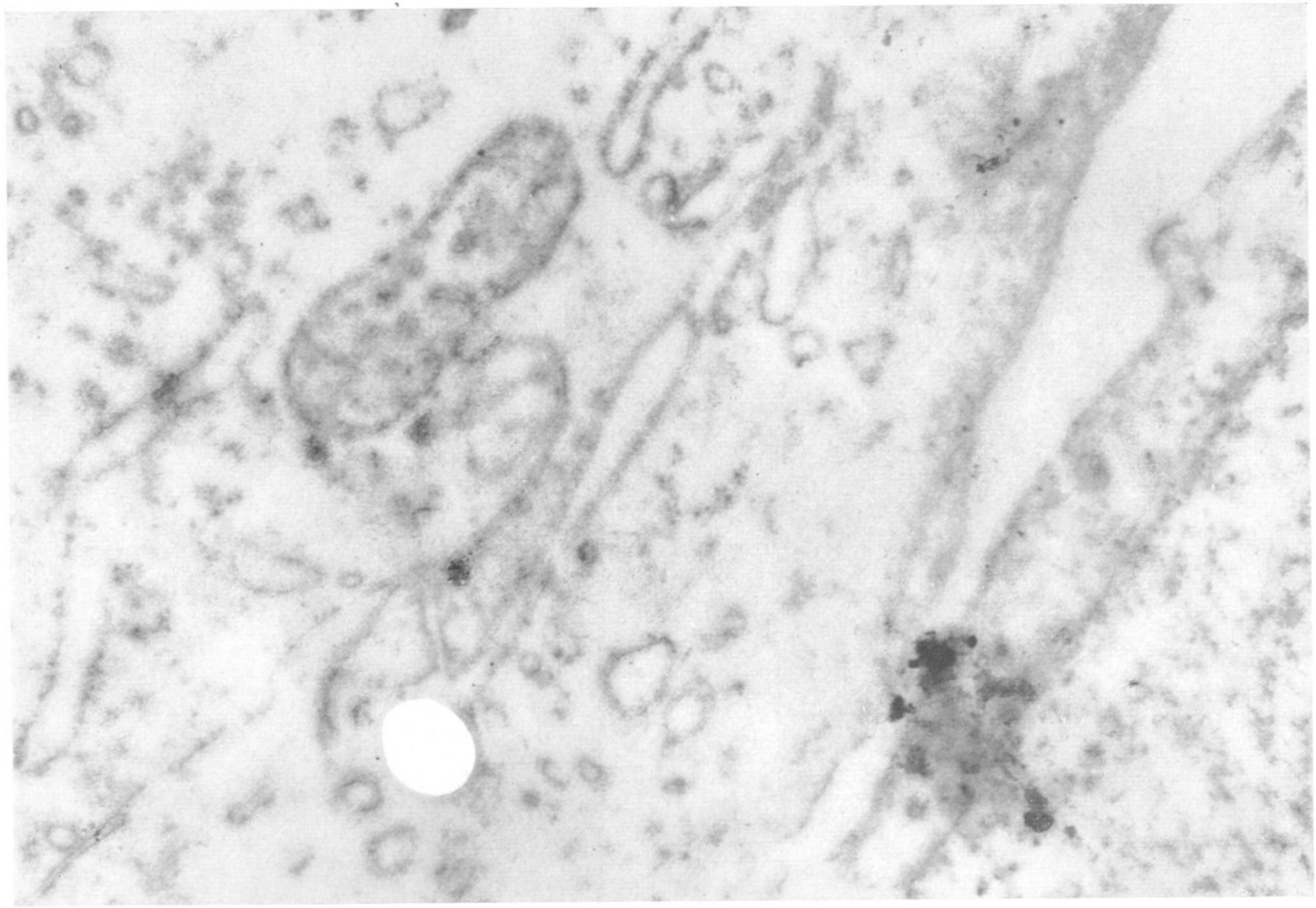


Fig. 12 - Cellula mieloma tosa. Corpo fagocitato a sede intracitoplasmatica.

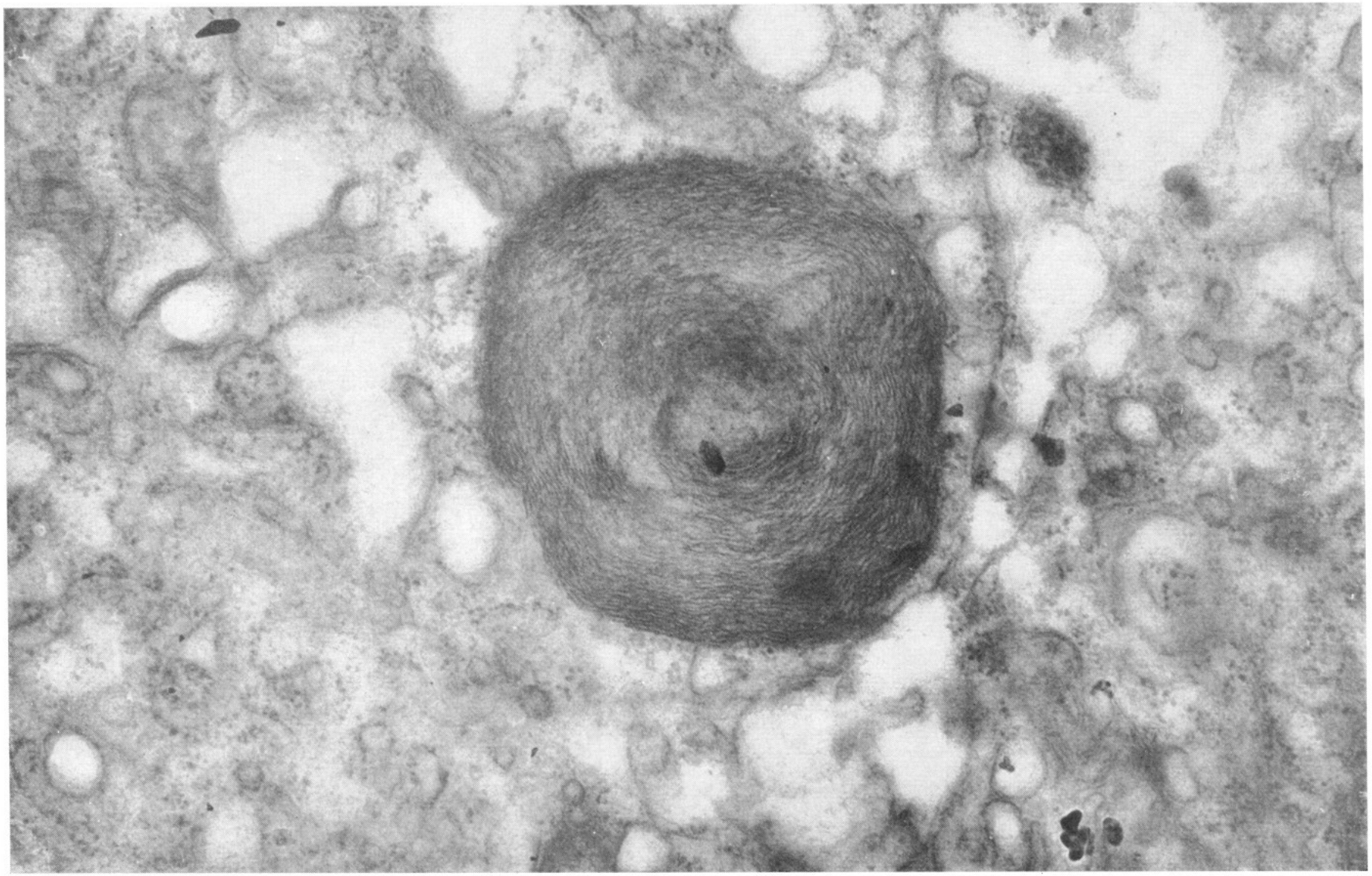


Fig. 13 - Cellula mielomatosa. Corpo fagocitato in via di dissoluzione. La sua massa tende a scomporsi in minuti frammenti di diversa densità.

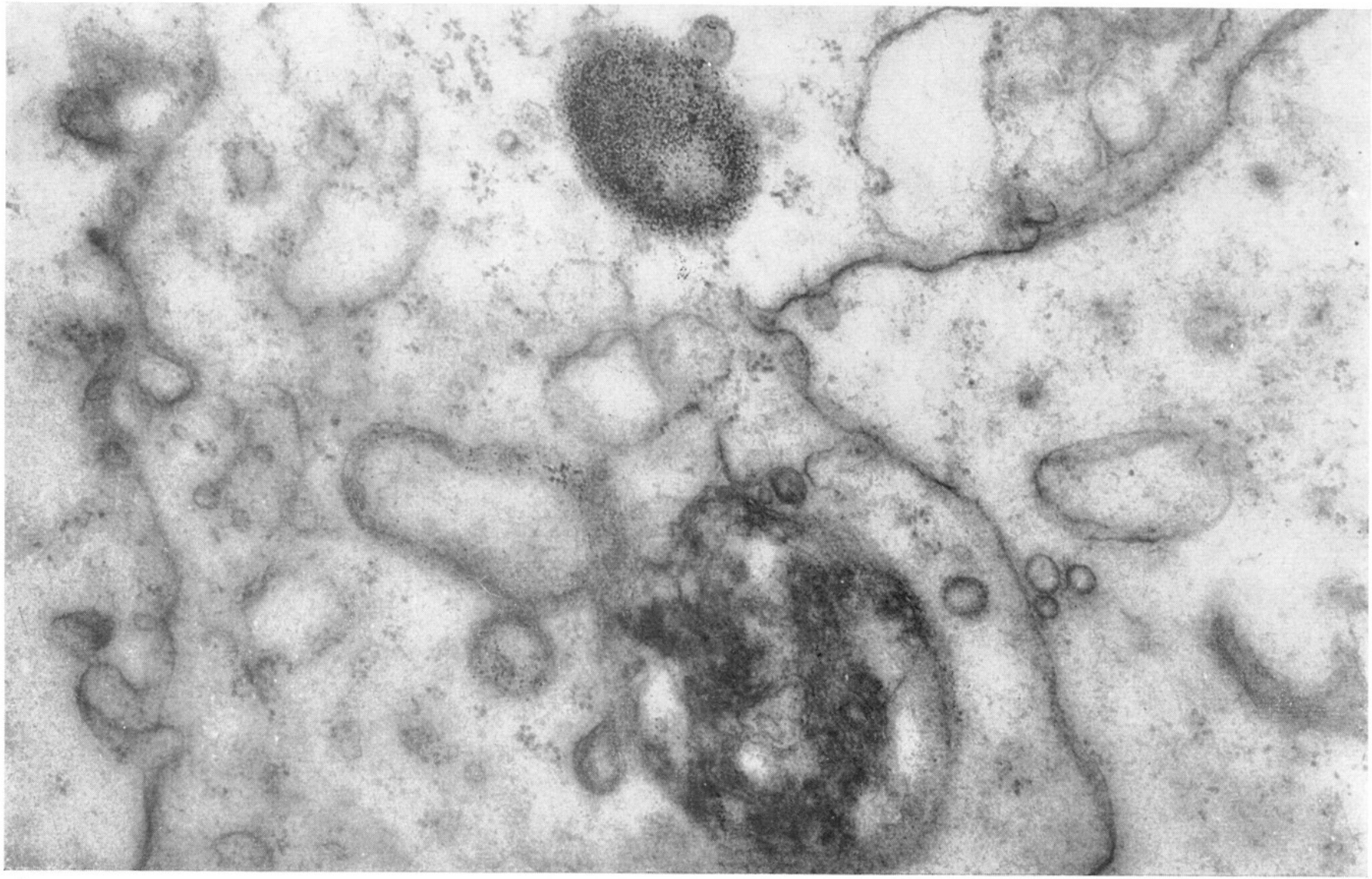
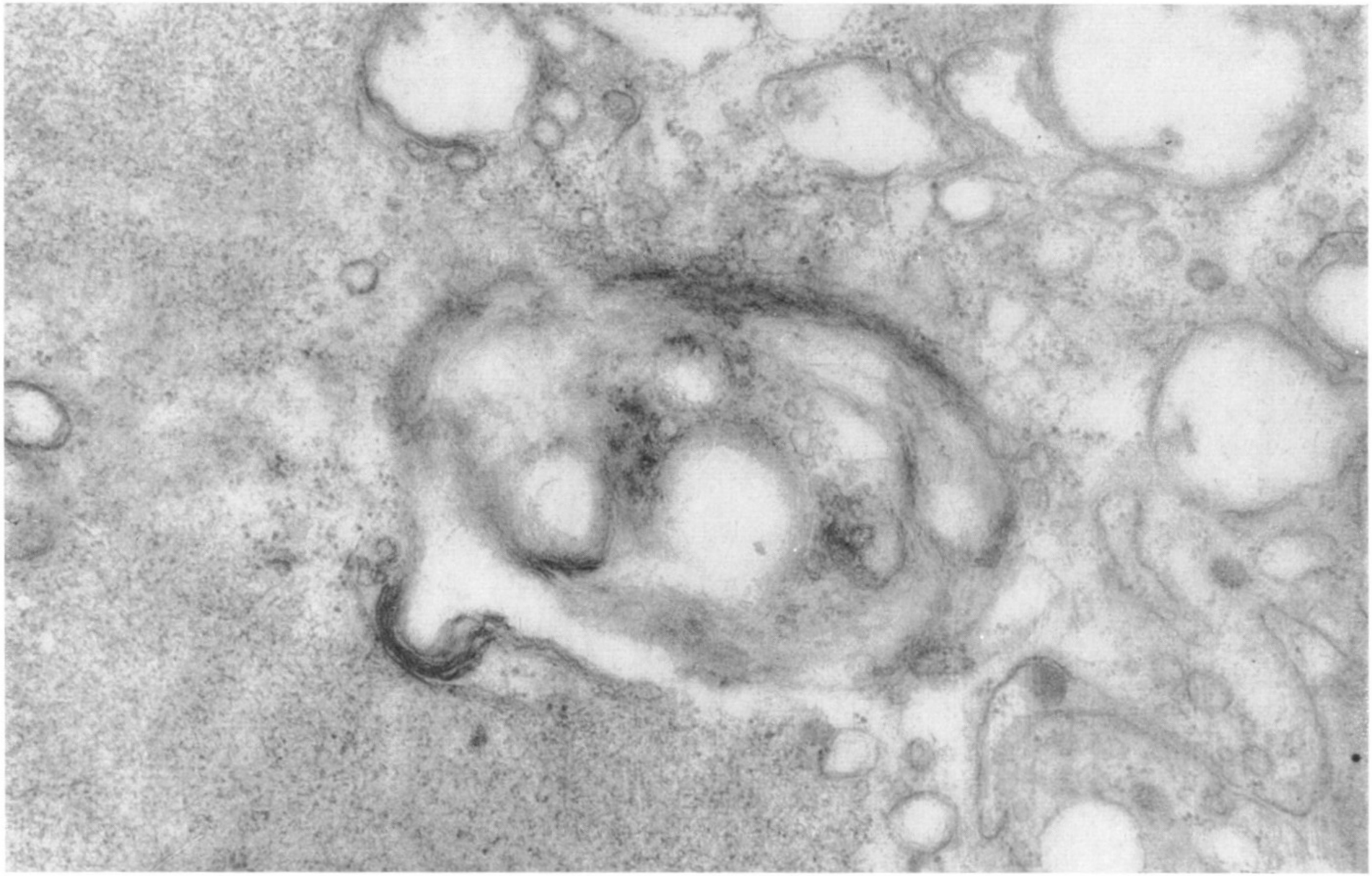


Fig. 14 - Cellula mielomatosa. Residuo di un corpo fagocitato la cui massa è quasi completamente dissolta.



cellule reticolo-istiocitarie ed a queste accostabili anche per la presenza dei grossi nucleoli (foto 1-2).

Come abbiamo già accennato, è stato da noi intrapreso anche lo studio sull'azione di un citostatico, la bis (β-cloroetil) p-aminofenilalanina, sulle cellule mielomatose in vivo (Steve Bocciarelli, Violante, 1960) ([197]). Ratti mielomatosi, giunti al 12° giorno dall'innesto e quindi in fase di pieno sviluppo tumorale, venivano inoculati per 3 giorni di seguito con 5 mg di bis (β-cloroetil) p-aminofenilalanina al giorno per via intramuscolare.

Ai fini del presente lavoro ci ripromettevamo, con tale tecnica, di ottenere la lisi delle cellule neoplastiche, il che ci avrebbe forse permesso di evidenziare meglio la presenza di eventuali virus.

Inoltre lo studio in questione ci ha dato la possibilità di seguire, in via puramente morfologica, le fasi di attacco del citostatico sulle cellule neoplastiche. Queste fasi possono così essere riassunte:

1) le prime modificazioni delle cellule mielomatose sottoposte a trattamento citostatico erano a carico del nucleo e dell'apparato nucleolare, il quale ultimo tendeva a scomparire (foto 3);

2) nel nucleo si notava dapprima un processo di addensamento della massa cromatinica che si mostrava più compatta e più opaca; successivamente comparivano irregolarità dei contorni e quindi frammentazione nelle ultime fasi di sopravvivenza (foto 4-5);

3) le alterazioni a carico dei mitocondri e degli altri organuli citoplasmatici sembravano insorgere in un secondo tempo e forse conseguentemente alle alterazioni nucleari. I mitocondri erano in degenerazione di tipo grassa o jalina, mentre il reticolo endoplasmico appariva sempre disorganizzato (foto 3);

4) nel citoplasma si notava la comparsa di ampie lacune, mentre solo raramente si riscontravano formazioni riferibili a corpi fagocitati. Nella foto 6 sono raccolte un gruppo di cellule che riassumono tutte le varie fasi di alterazioni descritte.

Per ciò che riguarda la ricerca dei virus oncogeni nel tessuto mielomatoso, come abbiamo precedentemente detto, essa è stata completamente negativa. Sia nelle cellule, sia negli spazi extracellulari, non sono state viste particelle virus-simili. Tutto ciò naturalmente aumenta le perplessità sulle presunte « entità virali » precedentemente isolate in questo tumore del ratto (vedi lav. citati).

Interessante invece il reperto di false immagini virali che ci sembra importante sottolineare, poichè il loro reperto investe un più vasto campo di discussione.

Facilmente, nelle cellule di questa leucemia del ratto, i mitocondri sono apparsi profondamente alterati, tanto da mostrare a volte nello interno pseudo corpicciuoli. Su queste formazioni abbiamo posto la nostra attenzione riuscendo così a cogliere aspetti particolari che, in alcuni casi, potevano far pensare a corpuscoli dalla struttura ben definita.

Nella foto n. 7 diamo la dimostrazione di quanto asserito.

Nella serie di immagini esibite è facile seguire l'alterazione mitocondriale in fasi diverse che vanno dalla semplice disorganizzazione strutturale (foto 3) alla configurazione pseudo corpuscolata (foto 7) al disfacimento e rottura del mitocondrio stesso (foto 8).

Recentemente Ichikawa (1959) ([191]) ha svolto un'attenta ricerca sul citoplasma di cellule leucemiche. Accanto a corpuscoli che egli definisce virali, ha descritto alcune formazioni presenti nelle vescicole citoplasmatiche, di aspetto tondeggiante, che facilmente possono trarre in errore trattandosi di corpuscoli non virali e che egli definisce « pseudovirus ».

D'altro canto, che le strutture da noi trovate nelle cellule mielomatose siano delle false immagini virali ce lo dimostra anche la loro presenza in cellule renali di scimmia coltivate in vitro e infettate con un virus ECHO 9.

Anche in queste cellule, durante il loro processo di disfacimento, è possibile vedere formazioni citoplasmatiche di aspetto corpuscolato. Esibiamo al proposito alcune immagini. La prima (foto 9) con le formazioni corpuscolate di aspetto simil-virale e le altre (foto 10-11) corrispondenti a fasi di alterazioni cronologicamente successive, con aspetti di ulteriore disfacimento dei medesimi corpuscoli e delle formazioni vescicolari che li contengono.

Il virus ECHO 9 da noi purificato e studiato al m.e. (Archetti e coll., 1961) ([190]) non è stato mai repertato, nelle vaste osservazioni da noi eseguite, nè nei tessuti degli animali infettati, nè nelle cellule coltivate in vitro ed infettate, per cui le immagini da noi esibite non possono ritenersi che artefatti cellulari. Un'ulteriore conferma alle nostre vedute ci è fornita anche dalla recente ricerca di Rifkind e coll. (1961) ([193]), i quali hanno studiato al m.e. il virus ECHO tipo 9 e lo hanno descritto con aspetti del tutto diversi dalle immagini pseudo corpuscolari da noi occasionalmente riscontrate (vedi foto 9).

In un'altra serie di foto (n. 12-13-14) riportiamo delle immagini accostabili ai corpi di Gray. In queste zone citoplasmatiche alcuni autori avrebbero ravvisato la matrice virale, poichè in quelle compagini avrebbero potuto distinguersi formazioni corpuscolate da essi ritenute virus.

In realtà queste zone, andando incontro ad un processo di disfacimento, possono mostrare, in una determinata fase, un aspetto pseudo corpuscolare che dà adito facilmente a confusioni.

Le considerazioni ora fatte ci inducono a fare molte riserve sui reperti che, forse con troppa facilità, vengono interpretati come formazioni virali nelle cellule neoplastiche studiate al m.e.

CONCLUSIONI

In base alle lunghe osservazioni fatte al microscopio elettronico su cellule leucemiche di ratto, possiamo affermare che non vi è reperibilità di formazioni virus-simili in quelle cellule. Il substrato biologico su cui abbiamo lavorato era costituito dal mieloma di Oberling, Guérin e Guérin, una leucemia trapiantabile del ratto non trasmissibile mediante filtrati. Ciononostante abbiamo ugualmente condotto la ricerca di eventuali particelle virali in questo tumore, sia perchè alcune correnti di pensiero affermano non essere la mancanza di trasmissibilità mediante filtrati un dato sufficiente per escludere l'eziologia virale di una neoplasia, sia perchè, in precedenti ricerche più sopra citate, era stata sostenuta, con metodi diretti (isolamento, coltura su tessuto) ed indiretti (modificazioni metaboliche), l'esistenza di entità virali in questo tumore del ratto.

Le nostre osservazioni escludono, sul piano morfologico, l'esistenza di virus nelle cellule studiate.

La nostra attenzione è stata richiamata invece da false immagini corpuscolari, evidentemente determinate da alterazioni citoplasmatiche, probabilmente mitocondriali.

A nostro parere, infatti, sono le strutture interne dei mitocondri o d'altre formazioni citoplasmatiche che, andando incontro a processi distruttivi, possono assumere, in una determinata fase, l'aspetto pseudo-corpuscolato.

In altre circostanze, sono corpi fortemente osmiofili a sede introcitoplasmatica, la cui presenza è dovuta probabilmente all'attività fagocitante delle cellule. Questi corpi, andando incontro a disfacimento, mostrano in alcuni punti della loro massa, un aspetto pseudo corpuscolato.

I nostri reperti ci hanno fatto ritenere esservi possibilità di cadere in errore in questo tipo di ricerca. Di ciò bisogna tener conto nella valutazione delle osservazioni fatte al microscopio elettronico per la ricerca di virus oncogeni, la cui rarità di reperto e la incostante presenza non solo nella stessa neoplasia, ma perfino nello stesso preparato, debbono, almeno in certi casi, senz'altro far pensare a possibilità di errori legati alla presenza di false immagini.

Ringraziamo A. Chiozzotto, F. Piccirilli, N. Tomassini e F. Valente per la loro valida e intelligente cooperazione.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Fisica.

BIBLIOGRAFIA

PARTE PRIMA

(1) Andervont H. B. - In « The Viruses » - di Burnet F. M., Stanley W. M., Academic Press, N. Y. (1959).

(2) Atanasiu P. - « A propos de la sensibilité de l'embryon de poulet au virus de la leucose aviaire filtré » - Ann. Inst. Pasteur, 85: 1 (1953).

(3) Bang F. B. e Haley R. - « The appearance and disappearance of antibodies to Rous virus in normal chickens » - J. nat. Cancer Inst., 20: 329 1958.

(4) Bittner J. J. - « Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice » - Science, 84: 162 (1936).

(5) Bittner J. J. - « Tumor incidence in reciprocal F_1 Hybrid mice AXD high tumor stocks » - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 34: 42 (1936).

(6) Carr J. G. - « The relation between age, structure, and agent content of Rous n. 1 sarcomas » - Brit. J. exp. Path., 24: 113 (1943).

(7) Claude A. e Murphy J. B. - « Transmissible tumors of the fowl » - Physiol. Rev., 13: 246 (1933).

(8) De Carvalho S. - « Biological properties of a nucleic-acid rich fraction from human leukemic and tumor cells ». Da « Leucemie » - Il Pensiero Scientifico Ed. (1960) p. 15.

(9) Duran-Reynals F. - « Studies on the combined effects of fowl pox virus and methylcholanthrene in chickens » - Ann. N. Y. Acad. Sci., 54: 977 (1952).

(10) Ellerman V. e Bang O. - « Experimentelle Leukemie bei Huhnern » - Zbl. Bakt. Parasitenk. Abt. Orig., 46: 595 (1908).

(11) Friend C. - « Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia » - J. exp. Med., 105: 307 (1957).

(12) Furth J. e Stubs E. L. - « Tissue culture studies on relation of sarcoma to leukosis of chickens » - Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 32: 381 (1934).

(13) Gye W. E. e Andrews C. H. - « A study of the Rous fowl sarcoma n. 1: I - filterability » - Brit. J. exp. Path., 7: 81 (1926).

(14) Gye W. E. e Purdy W. S. - « The cause of cancer » - Cassel and Company, London (1931).

(15) Gye W. E. e Purdy W. J. - « A further investigation by means of antisera to normal tissues » - Brit. J. exp. Path., 14: 250 (1933).

(16) Gross L. - « Susceptibility of newborn mice of one otherwise apparently « resistant » strain to inoculation with leukemie » - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 73: 246 (1950).

(17) Gross L. - « Spontaneous leukemie developing in C_3H mice following inoculation, in infancy, with AK-leukemic extracts of AK-Embryos » - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 76: 27 (1951).

(18) Hays E. F., Simmons N. S. e Beck W. S. - « Induction of mouse leukaemia with purified nucleic acid preparations » - Nature, 180: 1419 (1957).

(19) Heston W. E., Deringer M. K., Dunn T. B. e Levillain W. D. - « Factors in the development of spontaneous mammary gland tumors in agent-free strain C_3H mice » - J. nat. Cancer Inst., 10: 1139 (1950).

(20) Heston W. E. e Deringer M. K. - « Test for a maternal influence in the development of mammary gland tumors in agent-free strain C_3Hb mice » - J. nat. Cancer Inst., 13: 167 (1952).

(21) Heston W. E., Deringer M. K. e Dunn T. B. - « Further studies on the relationship between the genotype and the mammary tumor agent in mice » - J. nat. Cancer Inst., 16: 1309 (1956).

(22) Knox R. - « Neutralization of purified tumor agent suspension by antifowl serum » - Brit. J. exp. Path., 20: 391 (1939).

(23) Lacour F., Lacour J., Harel J. e Huppert J. - « Action cancérigène d'une préparation d'acide ribonucléique de tissus leucémiques humains » - da « Leucemie » - Il Pensiero Scientifico Ed. (1960) pag. 47.

(24) Lucké - « A neoplastic disease of the kidney of the frog, rana pipiens » - Am. J. Cancer, 20: 352 (1934).

(25) Oberling C. e Guérin M. - « The role of viruses in the production of cancer » - Advanc. Cancer Res., 2: 353 (1954).
(26) Rous P. - « A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the cells » - J. exp. Med., 13: 397 (1911).
(27) Rous P. e Murphy J. B. - « On the causation by filterable agents of three distinct chicken tumors » - J. exp. Med., 19: 52 (1914).
(28) Schoolman N. M., Spurier W., Schwartz S. O. e Szanto P. B. - « Studies in leukemia. VII. The induction of leukemia in Swiss mice by means of cell-free filtrates of leukemic mouse brain » - Blood, 12: 694 (1957).
(29) Shope R. E. - « A transmissible tumor-like condition in rabbits » - J. exp. Med., 56: 793 (1932).
(30) Shope R. E. - « Infection papillomatosis of rabbits » - J. exp. Med., 58: 607 (1933).
(31) Stewart S. E., Eddy B. E., Gochenour A. M., Borghese N. G. e Grubbs G. E. - « The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumor by tissue culture » - Virology, 3: 380 (1957).
(32) Stewart S. E., Eddy B. E. e Borghese N. - Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture » - J. nat. Cancer Inst., 20: 1223 (1958).
(33) Storti E. e Mezzadra G. - « Tentatives de culture du virus de la leucémie des poules dans la membrane chorioallantoide » - Sang, 12: 533 (1938).
(34) Verne J., Oberling Ch. e Guérin M. - « Tentatives de culture in vitro de l'agent de la leucémie transmissible des poules » - C.R.; Soc. Biol., 121: 403 (1936).
(35) Violante A. e Scioli C. - « Caratteristiche bio-morfologiche del linfoblastoma di Schoolman-Schwartz » - Sintesi, 2: 481 (1958).

PARTE SECONDA

(36) Adams W. R. e Prince A. M. - « An electron microscope study of the morphology and distribution of the intracytoplasmic « virus-like » particles of Ehrlich ascites tumor cells » - J. biophys. biochem. Cytol., 3: 161 (1957).
(37) Amano S. - « Pathological manifestations caused by cancer viruses. Some considerations on unrestrained cell proliferation based on our electron-microscopical observations » - Ann. Rep. Inst. Virus Res., Kyoto Univ., 1: 253 (1958).
(38) Atanasiu P. e Lepine P. - « Etudes morphologiques en microscopie électronique sur coupes ultra-fines d'un virus présent dans la souche RPL 12 du virus de la leucose aviaire » - Ann. Inst. Pasteur, 98: 915 (1960).
(39) Banfield W. C., Dawe C. J. e Brindley D. C. - « Intracellular and extracellular particles in tissue cultures inoculated with parotid tumor agent (Polyoma virus) » - Proc. 17° Ann. Meeting Electron Microscope Soc. Am. (1959) p. 17.
(40) Bang F. B. e Andervont H. B. - « Detection of the mammary tumor inciter (MTI) in thin sections of spontaneous mouse tumors » - J. appl. Phys., 24: 1418 (1953).
(41) Bang F. B. - « Virus particles in normal chick Embryo cells and their similarity in appearance to the Rous tumor virus particle » - J. appl. Phys., 25: 1462 (1954).
(42) Bang F. B., Andervont H. B. e Vellisto I. - « Electron microscopic evidence concerning the mammary tumor inciter. II. An electron microscopic study of spontaneous and induced mammary tumors of mice » - Bull. Johns Hopk. Hosp., 98: 287 (1956).
(43) Bang F. B., Vellisto I. e Libert R. - « Electron microscopic evidence concerning the mammary tumor inciter (virus) I. A study of normal and malignant cells from the mammary gland of mice » - Bull. Johns Hopk. Hosp., 98: 255 (1956).
(44) Bang F. B., Andervont H. B. e Vellisto I. - « Electron mircoscopic evidence concerning the mammary tumor inciter (virus) » - Bull. Johns Hopk. Hosp., 4: 287 (1956).
(45) Bang F. B. - « Three dilemmas in the study of virus and tumor cells » - Cancer Res., 18: 1004 (1958).
(46) Beard D., Eckert E. A., Csaki T., Sharp D. S. e Beard D. W. - « Particulate component of plasma fowls with avian erythromyeloblastic leucosis » - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 75: 533 (1950).
(47) Benedetti E. L. - « Présence de corpuscules identiques à ceux du virus de l'érythroblastose aviaire chez l'embryon du poulet et les poussins normaux » - Bull. Cancer, 44: 473 (1957).

(48) Benedetti L. e Bernhard W. - « Présence de particules d'aspect virusal dans la rate d'embryons de poulets normaux » - C.R. Acad. Sci., 224: 2204 (1957).
(49) Benedetti E. L. e Bernhard W. - « Recherches ultrastructurales sur le virus de la leucémie érythroblastique du poulet » - J. Ultrastr. Res., 1: 309 (1958).
(50) Benedetti E. L. e Leplus R. - « Cytologie de l'érythroblastose aviaire (étude au microscope électronique) » - Rev. d'Hématol., 13: 199 (1958).
(51) Benedetti L. e Bernhard W. - « Recherches ultrastr. sur le virus de la leucémie érythroblastique du poulet » - J. Ultrastr. Res., 1: 309 (1958).
(52) Bernhard W., Dontcheff A., Oberling Ch. e Vigier P. - « Corpuscules d'aspect virusal dans les cellules du sarcome de Rous » - Bull. Cancer, 40: 311 (1953).
(53) Bernhard W. e Oberling Ch. - « Echec de la mise en évidence de corpuscules-virus dans les cellules du sarcome de Rous examinées au microscope électronique ». - Bull. Cancer, 40: 178 (1953).
(54) Bernhard W., Bauer A., Harel J. e Oberling Ch. - « Les formes intracytoplasmiques du virus fibromateux de Shope. Etude de coupes ultrafines au microscope électronique » - Bull. Cancer, 41: 423 (1954).
(55) Bernhard W., Gautier A. e Harel J. - « Applications de la microscopie électronique à la recherche sur le cancer » - Rapport Européen Congrès Electromicroscopie, 7-10 avril 1954.
(56) Bernhard W., Bauer A., Guérin M. e Oberling Ch. - « Étude au microscope électronique de corpuscules d'aspect virusal dans des épithéliomes mammaires de la souris » - Bull Cancer, 42: 163 (1955).
(57) Bernhard M. W. e Bauer A. - « Mise en évidence de corpuscules d'aspect virusal dans des tumeurs mammaires de la souris. Etude au microscope électronique » - C.R. Acad. Sci., 240: 1380 (1955).
(58) Bernhard W., Haguenau F. e Leplus R. - « Coupes ultrafines d'éléments sanguines et de ganglions lymphatiques étudiés au microscope électronique » - Rev. Hémat., 10: 267 (1955).
(59) Bernhard W. e Leplus R. - « La méthode des coupes ultrafines et son application à l'étude de l'ultrastructure des cellules sanguines » - J. suisse Med., 85: 897 (1955).
(60) Bernhard Ch., Oberling Ch. e Vigier Ph. - « Ultrastructure de virus dans le sarcome de Rous: leur rapport avec le cytoplasme des cellules tumorales » - Bull. Cancer, 43: 407 (1956).
(61) Bernhard W., Guérin M. e Oberling C. - « Mise en évidence de corpuscules d'aspect virusal dans différentes souches de cancers mammaires de la souris » - Acta intern. c. Cancrum, 12: 544 (1956).
(62) Bernhard W., Bonar R. A., Beard D. e Beard J. W. - « Ultrastructure of viruses of Myeloblastosis and erythroblastosis isolated from plasma of leukemic chickens » - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 97: 48 (1958).
(63) Bernhard W. - « Electron Microscopy of tumor cells and tumor viruses. A Review » - Cancer Res., 18: 491 (1958).
(64) Bernhard W. - « L'ultrastructure des virus oncogènes » - IV Congress 10-17 settembre - Berlino 1958.
(65) Bernhard W. e Guérin M. - « Présence de particules d'aspect virusal dans les tissus tumoraux de souris atteintes de leucémie spontanée » - C.R. Acad. Sci. 247: 1802 (1958).
(66) Bernhard W. e Gross L. - « Présence de particules d'aspect virusal dans les tissus tumoraux de souris atteintes de leucémies induites » - C.R. Acad. Sci., 248: 160 (1959).
(67) Bernhard W., Febvre H. L. e Cramer R. - « Mise en évidence au microscope électronique d'un virus dans des cellules infectées in vitro par l'agent du Polyoma » - C.R. Acad Sci., 249: 483 (1959).
(68) Bernhard W. - « The detection and study of tumor viruses with the electron microscope » - Cancer Res., 20: 712 (1960).
(69) Bessis M. - « Traité de cytologie sanguine » - Paris: Masson, 1954.
(70) Bessis M. e Breton-Gorius J. - « Sur des formations particulières observées au microscope électronique dans certaines cellules leucémiques » - C.R. Acad. Sci., 240: 459 (1955).
(71) Bessis M. e Breton-Gorius J. - « Examen au microscope électronique des cellules des leucémies myéloides » - Bull. Microscop., 2: 9 (1955).
(72) Bessis M. e Breton-Gorius J. - « Examen des cellules leucémiques au microscope électronique par la méthode des coupes » - Presse méd., 63: 189 (1955).

(73) Bessis M. e Thiery J. P. - « Ultracentrifugation de leucocytes normaux et leucémiques. Examen au microscope électronique » - Rev. Hémat., 10: 583 (1955).
(74) Bessis M. e Thiery J. P. - « Examen au microscope électronique des cellules leucémiques de souris de souche A K. Effects de l'ultracentrifugation » - Rev. Hémat., 10: 606 (1955).
(75) Bessis M. - « Structures cellulaires découvertes par le microscope électronique dans les leucocytes » - Rev. Hémat., 11: 295 (1956).
(76) Bonar R. A., Parsons D. F., Beaudreau G. S., Becker C. e Beard J. W. - « Ultrastructure of avian myeloblasts in tissue culture » - J. nat. Cancer Inst., 23: 199 (1959).
(77) Braunsteiner H., Fellinger K. e Pakesch F. - « Electron microscopic investigations on sections from lymph nodes and bone marrow in malignant blood diseases - Blood, 12: 278 (1957).
(78) Braunsteiner H., Fellinger K. e Pakesch F. - « On the occurrence of virus - like bodies in human leukemia » - Blood. 15: 476 (1960).
(79) Bryan W. R. - « Biological studies on the Rous sarcoma virus. I. General introduction. II. Review of sources of experimental variation and of methods for their control » - J. nat. Cancer Inst. 16: 285 (1955).
(80) Bryan W. R. - « Biological studies on the Rous sarcoma virus. III. The recovery of virus from experimental tumors in relation to initiating dose » - J. nat. Cancer Inst., 16: 317 (1955).
(81) Carr J. G. - « The relation between age, structure, and agent content of Rous N° 1 sarcomas » - Brit. J. exp. Path., 24: 133 (1943).
(82) Carr J. G. - « On unexplained discrepancy between the actual and expected yeld of virus from avian tumors and its implications » - Proc. Roy. Soc. Edinburg, 62: 243 (1946).
(83) Claude A. e Murphy J. B. - « Transmissible tumors of the fowl » - Physiol. Rev., 13: 246 (1933).
(84) Claude A., Porter K. R. e Pickels E. G. - « Electron microscope study of chicken tumor cells » - Cancer Res., 7: 421 (1947).
(85) Dalton A. Y. e Felix M. D. - « The electron microscopy of normal and malignant cells » - Ann. N. Y. Acad. Sci., 63: 1117 (1956).
(86) De Bruyn W. M. e Benedetti E. L. - « Ultrastructure of virus-like particles found in long-term cultures of mouse » - European Regional Conference on Electron Microscopy - Delft, 1960.
(87) De Groodt M., De Rom F., Lagasse M., Sebruyns M. e Thiery M. - « Remarques complémentaires au sujet des particules d'aspect virusal presentées dans certaines coupes ultra-fines de tumeurs » - Pathol. Biol., 8: 1463 (1960).
(88) De Harven E. e Friend Ch. - « Electron microscope study of a cell-free induced leukemia of the mouse: A preliminary report » - J. biophys. biochem. Cytol., 4: 151 (1958).
(89) De Harven E. e Friend Ch. - « Further electron microscope studies of a mouse leukemia induced by cell-free filtrates » - J. biophys. biochem. Cytol., 7: 447 (1960).
(90) De Harven E. e Friend Ch. - « Electron microscopy of mouse leukemia viruses » Delft. Conf. Regionale Europea di M.E. agosto-settembre 1960.
(91) De Harven E. e Friend C. - in corso di stampa - J. biophys. biochem. Cytol., 1960.
(92) Dmochowski L. e Passey R. D. - « Attempts at tumor virus isolation » - Ann. N. Y. Acad. Sci., 54: 1035 (1952).
(93) Dmochowski L. - « Progress in mammalian genetics and Cancer. Discussion » - J. nat. Cancer Inst., 15: 785 (1954).
(94) Dmochowski L., Grey C. E. e Law L. W. - « An electron microscope study of organs of mice from strains of high incidence of leukemia » - J. appl. Physics, 27: 1393 (1956).
(95) Dmochowski L. - « A biological and biophysical approach to the study of the development of mammary cancer in mice » - Acta Inter. c. Cancrum, 12: 582 (1956).
(96) Dmochowski L. e Grey C. E. - « Electron microscopy of tumors of known and suspected viral etiology » - Texas Rep. Biol. Med., 15: 704 (1957).
(97) Dmochowski L. e Grey C. E. - « Subcellular structures of possible viral origin in some mammalian tumors » - Ann. N. Y. Acad. Sci., 68: 559 (1957).

(98) Dmochowski L., Grey C. E., Burmester B. R. e Fontes A. K. - « Submicroscopic morphology of avian neoplasms. I. Studies on erythroblastosis » - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 98: 662 (1958).

(99) Dmochowski L., Grey C. E., Burmester B. R. e Walter W. G. - « Submicroscopic morphology of avian neoplasms. II. Studies on granuloblastosis » - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 98: 666 (1958).

(100) Dmochowski L. - « Studies on submicroscopic structure of leukemias of known or suspected viral origin: a review » - Blood., 13: 1017 (1958).

(101) Dmochowski L., Grey C. E., Burmester B. R. e Gross M. A. - Submicroscopic morphology of avian neoplasms. III. Studies on visceral limphomatosis » - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 100: 514 (1959).

(102) Dmochowski L., Grey C. E. e Burmester B. R. - « Submicroscopic morphology of avian neoplasms. IV. Studies on erythroblastosis of strain RPL-12 » - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 100: 517 (1959).

(103) Dmochowski L., Grey C. E., Pearson L. O., Ward D. N., Hurbert R. B., Griffin A. L. e Bresson A. L. - « Studies on mammary tumor-inducing virus in mice » - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 102: 174 (1959).

(104) Dmochowski L., Grey C. E. e Gross L. - « Studies on submicroscopic structure of parotid gland tumors of mice » - Acta Intern. c. Cancrum, 15: 791 (1959).

(105) Dmochowski L., Grey C. E. e Masel L. A. - « Studies on a virus (Polyoma) inducing multiple tumors in animals » - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 102: 575 (1959).

(106) Dmochowski L., Sykes J. A., Grey C. E., Shullenberger C. C. e Howe C. D. - « Studies on submicroscopic structure of human leukemic tissues » - Acta Intern. c. Cancrum, 15: 768 (1959).

(107) Dmochowski L., Grey C. E., Sykes J. A., Shullenberger C. C. e Howe C. D. - « Studies on human leukemia » - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 101: 686 (1959).

(108) Dmochowski L. - « Viruses and tumors in the light of electron microscope studies: A review » - Cancer Res., 20: 977 (1960).

(109) Dourmashkin R. R. e Negroni G. - « The cytoplasmic phase of the life cycle of polyoma virus in mouse embryo cell cultures » - Conferenza Europea M. E. Delft, agosto-settembre 1960.

(110) Eddy B. E., Rowe W. P., Hartley J. W., Stewart S. E. e Huebner R. J. - « Hemagglutination with S-E polyoma virus » - Virology, 6: 290 (1958).

(111) Epstein M. A. - « Site of virus-like particles in Rous fowl sarcoma cells » - Nature, 176: 784 (1955).

(112) Epstein M. A. - « The identification of the Rous virus: a morphological and biological study » - Brit. J. Cancer, 10: 33 (1956).

(113) Epstein M. A. - « Observations on the Rous sarcoma virus: Fine structure and relation to cytoplasmic vacuoles » - Brit. J. Cancer, 11: 268 (1957).

(114) Epstein M. A. - « The fine structure of the cells in mouse sarcoma 37 ascitic fluids » - J. biophys. biochem. Cytol., 3: 567 (1957).

(115) Epstein M. A. - « Observations on the Rous virus; purification and identification of the particles from solid tumors » - Brit. J. Cancer, 12: 248 (1958).

(116) Epstein M. A. - « Composition of the Rous virus nucleoid » - Nature, 181: 1808 (1958).

(117) Fawcett D. W. e Wilson W. - « A note on the occurrence of virus-like particles in the spontaneous hepatomas of C_3H mice » - J. nat. Cancer Inst., 15: 1505 (1955).

(118) Fawcett D. W. - « Electron microscope observation on intracellular virus-like particles associated with the cells of the Lucké renal adenocarcinoma » - J. biophys. biochem. Cytol., 2: 725 (1956).

(119) Febvre H., Harel J. e Arnoult J. - « Observation, pendant la phase muette du développement intracellulaire du virus du fibrome de Shope, de corps d'inclusion diffus, sans virus corpusculaires, correspondant avec la présence d'un antigène soluble » - Bull. du Cancer, 44: 92 (1957).

(120) Febvre M. M. H., Benedetti L. e Villaudy J. - « Mise en évidence, grace à la culture de tissus, de particules de virus latentes dans l'embryon de poulet » - Bull. Cancer, 45: 434 (1958).

(121) Ferreira J. F. D. - « A propos de l'observation de corpuscules d'aspect virusal dans des métastases pulmonaires de cancers mammaires de la souris » - Conf. Europea M.E., Delft, agosto-settembre 1960.

(122) Friedlaender-Binggeli M. - « Abnormal intranuclear and cytoplasmic formations associated with a chemically induced, transplantable chicken sarcoma » - J. biophys. biochem. Cytol., 5: 143 (1959).
(123) Friedlaender M., Moore D. H. e Koprowski H. - « Studies with the electron microscope of virus-host relationships in Ehrlich ascites tumor cells. II. The localization and possible development of Anopheles A virus within the endoplasmic reticulum of the host cell » - J. exp. Med., 102: 371 (1955).
(124) Friedlaender M. e Moore D. H. - « Occurrence of bodies within endoplasmic reticulum of Ehrlich ascites tumor cells » - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 92: 828 (1956).
(125) Gaylord W. H. jr. - « Virus-like particles associated with the Rous sarcoma as seen in sections of the tumor » - Cancer Res., 15: 80 (1955).
(126) Gieseking R. e Schummelfeder N. - « Die sublichtmikroskopische Protoplasmastruktur von geschwulste Zellen » - Z. Krebsforsch., 60: 379 (1955).
(127) Gye W. E. e Andrews C. H. - « A study of the Rous fowl sarcoma N° 1. I. filterability » - Brit. J. exp. Path., 7: 81 (1926).
(128) Gye W. E. e Purdy W. Y. - « The cause of Cancer » - London, Cassel and Co. 1931.
(129) Graffi A., Heine U., Helmcke J. G., Bierwolf D. e Randt A. - « Uber den elektromikroskopischen Nachweis von Virus Partikeln bei des myeloischen Leukämie der Maus nach Jnjektion zellfreier Tumorfiltrate » - Klin. Wschr., 38: 254 (1960).
(130) Granboulan N., Rivière M. R. e Bernhard W. - « Présence de particules d'aspect viral dans un sarcome greffable de la souris provoqué par le methylcholanthrène » - Bull. Cancer, 47: 291 (1960).
(131) Grey C. E. e Biesele J. J. - « Thin-section electron microscopy of circulating white blood cells » - Rev. Hémat., 10: 285 (1955).
(132) Haguenau F., Maloney J. B. e Dalton A. J. - « Contrôle au microscope électronique d'extrait de sarcome de Rous hautement purifié » - C.R. Acad. Sci., 245: 2230 (1957).
(133) Haguenau F., Dalton A. J. e Maloney J. B. - « A preliminary report of electron microscopic and bioassay studies on the Rous Sarcoma I virus » - J. nat. Cancer Inst.,20: 633 (1958).
(134) Haguenau F. - « Le cancer mammaire de la souris et de la femme: étude comparative au microscope électronique » - Path Biol. Paris., 7: 989 (1959).
(135) Haguenau F. - « Le rôle de la microscopie électronique dans les recherches sur les virus oncogènes. Une revue à propos de fonts récentes » - Bull. Cancer, 47: 212 (1960).
(136) Hamamoto T. e Iwakata S. - « Intracellular distribution of Shope papilloma viruses as studied by electron microscopy of ultrathin sections. A preliminary report » - Ann. Rep. Inst. Virus Res. Kyoto Univ., 1: 243 (1958).
(137) Hollman K. H. e Rivière M. R. - « Particules d'aspect virusal dans un épithelioma mammaire spontané transplantable du rat. Mise en évidence au microscope électronique » - C.R. Acad. Sci., 248: 2917 (1959).
(138) Horel e coll. - citato da Bernhard W. e coll. (55).
(139) Howatson A. F. e Mc Culloch E. A. - « Virus-like bodies in a transplantable mouse plasma cell tumor » - Nature, 181: 1213 (1958).
(140) Howatson A. F. e Aimeida J. D. - « An electron microscope study of polyoma virus in hamster kidney » - J. biophys. biochem. Cytol., 7: 753 (1960).
(141) Ichikawa Y. e Amano S. A. - « A new type of virus found in a spontaneous mammary tumor of a SL mice and its proliferating modus observed in ultrathin sections under the electron microscope » - Gann, 49: 57 (1958).
(142) Ichikawa Y. - « Electron microscopic observations on leukemia and lymphosarcomatosis in SL and AK strain mice, with special reference to the distribution of viral particles as possible causative agents » - Ann. Rep. Inst. Virus Res., Kyoto Univ., 1 (1958).
(143) Ichikawa T. - « Discrimination of virus and « pseudovirus » particles in SL leukemia and sarcoma observed under the electron microscope » - Acta haemat. Japan, 22: 539 (1959).
(144) Ito T. - « Electron microscopic observation on Auer bodies in acute myeloid leukemic cells » - Acta haemat. Jap., 20: 227 (1957).
(145) Ito T. - « Electron microscopic observation on myeloid leukemic cells, with special reference to the findings resembling virus infection » - Acta haemat. Jap. 21: 631 (1958).

(146) Ito T. - « Supplemental studies on the fine structure of leukemic cells » - Acta Scholae Medic. Gifu., 7: 941 (1959).
(147) Ito T. - « Electron microscopic observation on monocytic leukemic cells » - Acta Sch. med. Gifu., 7: 941 (1959).
(148) Iwakata S. - « Electron microscopic observations of chicken erythroblastosis with special reference to varied features of macrophages as reservoirs of the virus » - Ann. Rep. Inst. Virus Res., 1: 221 (1958).
(149) Iwakata S. e Amano S. - « Causative virus of chicken erythroblastosis observed in ultrathin sections under the electron microscope and the modus of intracellular proliferation of this virus » - Acta heamat. Jap., 21: 60 (1958).
(150) Kahler H., Rowe W. P., Lloyd B. J. e Hartley J. W. - « Electron microscopy of mouse parotid tumor (Polyoma) virus » - J. nat. Cancer Inst., 22: 647 (1959).
(151) Kautz J. e De Marsh Q. B. - « An electron microscope study of sectioned cells of peripheral blood and bone marrow » - Blood, 9: 24 (1954).
(152) Kautz J. e De Marsh Q. B. - « Electron microscopy of sectioned blood and bone marrow elements » - Rev. Hémat., 10: 314 (1955).
(153) Lacour F. e Guérin M. - « Essais de transmission de tumeurs du rat par injection d'extraits acellulaires chez le nouveau-né » - Bull. Cancer, 44: 373 (1957).
(154) Lasfargues E. Y., Murray M. R. e Moore D. H. - « Application of tissue culture and electron microscope techniques to the study of the mouse mammary carcinoma » - II Simp. Int. Sul cancro mammario, Perugia (1957) pag. 719.
(155) Lasfargues E. Y., Moore D. H. e Murray M. R. - « Maintenance of the milk factor in cultures of mouse mammary epithelium » - Cancer Res., 18: 1281 (1958).
(156) Lasfargues E. Y., Moore D. H., Murray M. R., Haagensen C. D. e Pollard E. C. - « Production of the milk agent in cultures of mouse mammary carcinoma » - J. Biophys. Bioch. Cytol., 5: 93 (1959).
(157) Leplus R., Bernhard W. e Oberling C. H. - « Mise en évidence au microscope électronique d'inclusions cytoplasmiques particulières dans un cas de myxosarcome humain » - C.R. Acad. Sci., 244: 2110 (1957).
(158) Lloyd B. J. e Kahler H. - « Electron microscopy of the virus rabbit fibroma » - J. nat. Cancer Inst., 15: 991 (1955).
(159) Low F. N. e Freeman J. H. - « Electron microscopic Atlas of normal and leukemic human blood » - N. Y., Mc Graw-Hill Book Co. (1958).
(160) Mannweiler Kl., e Bernhard W. - « L'ultrastructure du myxosarcome de Fujinami » - Bull. Cancer, 45: 223 (1958).
(161) Melnick J. L., Bunting N., Banfield W. G., Strauss M. J. e Gaylord W. H. - « Electron microscopy of viruses of human papilloma, Molluscum contagiosum, and vaccinia, including observations on the formation of virus within the cell » - Ann. N. Y. Acad. Sci., 54: 1214 (1952).
(162) Moore D. H., Stone R. S., Shope R. E. e Gelber D. - « Ultrastructure and site of formation of rabbit papilloma virus » - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 101: 575 (1959).
(163) Moore D. H., Lasfargues E. Y., Murray M. R., Haagensen C. D. e Pollard E. C. - « Correlation of physical and biological properties of mouse mammary tumor agent » - J. Biophys. Biochem. Cytol., 5: 85 (1959).
(164) Negroni C. e Dourmashkin R. - « The cytoplasmic phase of the life cycle of polyoma virus in mouse embryo cell cultures » - Conf. Europea M.E. Delft, agosto-settembre 1960.
(165) Nilsson O. - « Ultrastructure of mouse uterine surface epithelium under different estrogenic influences. I. Spayed animals and aestrous animals » - J. Ultrastr. Res., 1: 375 (1958).
(166) Oberling Ch., Bernhard W., Guérin M. e Horel J. - « Images de cellules cancéreuses au microscope électronique » - Bull. Cancer, 37: 97 (1950).
(167) Oberling Ch., Bernhard W., Dontcheff A. e Vigier P. - « Observation et étude quantitative de corpuscules d'aspect virusal dans des cultures de sarcome de Rous » - Experientia, 10: 138 (1954).
(168) Oberling Ch., Bernhard W. e Vigier Ph. - « Internal structure of the virus-like particles associated with the Rous sarcoma, and their presence in other neoplastic and normal chicken tissues » - Nature, 180: 386 (1957).
(169) Parsons D. F., Painter J. C., Beaudreau G. S., Becker C. e Beard J. W. - « Tissue culture and circulating myeloblasts of avian leukemia studied in electron micrographs of ultrathin sections » - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 97: 839 (1958).

(170) Pease D. C. - « Marrow cells seen with the electron microscope after ultrathin sectioning » - Rev. Hémat., 10: 300 (1955).
(171) Pitelka D. R., Bern H. A., De Ome K. B., Schooley C. N. e Wellings S. R. - « Virus-like particles in hyperplastic alveolar nodules of the mammary gland in the C_3H/Hc CRGL mouse » - J. Nat. Cancer Inst., 20: 541 (1958).
(172) Porter K. R. e Thompson H. P. - « A particulate body associated with epithelial cells cultured from mammary carcinomas of mice of a milk-factor strain » - J. exp. Med., 88: 15 (1948).
(173) Rangan S. R. S. - « The effect of OsO_4 at two different osmolar concentrations on mouse mammary carcinoma » - J. Ultrastr. Res., 3: 392 (1960).
(174) Rouiller Ch., Haguenau F., Golde A. e Lacour F. - « L'ultrastructure de l'endothélioma de Murray-Begg. Le problème de l'identification de son agent casual » - Bull. Cancer, 43: 10 (1956).
(175) Rous P. e Murphy J. B. - « On the causation by filterable agents of three distinct chicken tumors » - J. exp. Med., 19: 52 (1914).
(176) Rubin H. - « Quantitative relations between causative virus and cell in the Rous n. 1 chicken sarcoma » - Virology, 1: 445 (1955).
(177) Schulz H. - « Electronmikroskopische Untersuchung eines Mammakarcinomas der Ratte » - Oncologie, 10: 307 (1957).
(178) Selby C. C., Grey C. E., Lichtenberg S., Friend C., Moore A. E. e Biesele J. J. - « Submicroscopic cytoplasmic particles occasionally found in the Ehrlich ascites tumor » - Cancer Res., 14: 790 (1954).
(179) Selby C. C., Biesele J. J. e Grey C. E. - « Electron microscope studies of ascites tumor cells » - Ann. Acad. Sci., 63: 748 (1956).
(180) Sharp D. G., Eckert E. A., Burmester B. R. e Beard J. W. - « Particulate component of the plasma of fowls with avian lymphomatosis » - Proc. Soc. exp Biol. Med., 79: 204 (1952).
(181) Sharp D. G., Eckert E. A., Beard D. e Beard J. W. - « Morphology of the virus of avian erythromyeloblastic leukosis and a comparison with the agent of Newcastle disease » - J. Bact., 63: 151 (1952).
(182) Sharp D. G., Beard D. e Beard J. W. - « Morphology of characteristic particles associated with avian erythroblastosis » - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 90: 168 (1955).
(183) Stewart S. E. - « The polyoma virus » - Sci. American, 203: 63 (1960).
(184) Stone R. S., Shope R. E. e Moore D. H. - « Electron microscope study of the development of the papilloma virus in the skin of the rabbit » - J. exp. Med., 110: 543 (1959).
(185) Suzuki T. - « Electron microscopic cyto-histopathology. III. Electron microscopic studies on spontaneous mammary carcinoma of mice » - Gann, 48: 39 (1957).
(186) Thiery M., De Groodt M., De Rom F., Sebruyns F. e Cagasse A. - « Virus-like particles in chemically induced carcinoma of the uterine cervix » - Nature, 183: 694 (1959).
(187) Violante A., Turrisi E e Giordano G. - « Osservazioni cito-istologiche sul mieloma di Oberling, Guérin e Guérin e sulla sua evoluzione in senso leucemico » - Tumori, 44: 198 (1958).
(188) Wildy P., Stoker M. G. P., Macpherson I. A. e Horne R. W. - « The fine structure of polyoma virus » - Virology, 11: 444 (1960).
(189) Williams R. C., Kass S. J. e Knight C. A. - « Structure of Shope papilloma virus particles » - Virology, 12: 48 (1960).

PARTE TERZA

(190) Archetti I., Steve Bocciarelli D. e Violante A. - « Studio al microscopio elettronico della miosite dei topi neonati inoculati con Virus ECHO 9 e osservazioni sulla struttura del virus » - Rend. Ist. sup. Sanità, 1961.
(191) Ichikawa Y. - « Discrimination of virus and pseudovirus particles in SL leukemia and sarcoma observed under the electron microscope » - Acta haemat. Jap., 22: 539 (1959) (vedi parte II).
(192) Magrassi F., Giordano G., Turrisi E. e Violante A. - « Caratteristiche biologiche di un nuovo virus (virus CLM) isolato nel topo partendo da un mieloma del ratto (cloromieloma di Oberling e Guérin) » - Boll. Soc. it. Biol. Sper., 33: 1199 1957.

(193) Rifkind R. A., Godman G. C., Howe C., Morgan C. e Rose H. - Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. VI. ECHO Virus. Type 9 » - J. exp. Med., 114: 1 (1961).

(194) Quagliariello E., Auricchio S., Violante A. e Rinaldi E. - « Sulla conversione acido 3-idrossiantranilico ac. chinolinico in presenza di tessuto epatico di ratti portatori di mieloma di Oberling in fase leucemica » - Boll. Soc. it. Biol. sper., 33: 786 (1957).

(195) Quagliariello E., Auricchio S., Violante A. e Rinaldi E. - « Attività 3-idrossiantranilico-ossidasica del fegato di ratti inoculati con un'entità presumibilmente virale isolata dal mieloma di Oberling, Guérin e Guérin in culture di tessuto » - Boll. Soc. it. Biol. sper., 34: 544 (1958).

(196) Steve Bocciarelli D. e Violante A. - « Una leucemia sperimentale studiata al microscopio elettronico » - Rend. Ist. sup. Sanità, 22: 1068 (1959).

(197) Steve Bocciarelli D. e Violante A. - « Modificazioni morfologiche delle cellule patologiche caratteristiche del mieloma di Oberling, Guérin e Guérin in ratti trattati con Bis (β-cloroetil) p-aminofenilalanina » - Rend. Ist. sup. Sanità. 23: 111 (1960).