

**NUEVAS PERSPECTIVAS para el
CANCER DE MAMA HUMANO a partir
de MODELOS EXPERIMENTALES**

Simposio Internacional
Academia Nacional de Medicina
Buenos Aires, 4 junio 1997

MEDICINA (Buenos Aires) 1997; (Supl II) 57: 21-33

SUPERANTIGENOS Y RETROVIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO

**ISABEL PIAZZON¹, IRENE NEPOMNASCHY¹, VALERIA BUGGIANO², PEDRO BEKINSCHTEIN³,
ALEJANDRA GOLDMAN³, PAULA BERGUER, ADRIANA DEROCHE¹, GABRIELA LOMBARDI**

*División Medicina Experimental, ILEX-CONICET, Instituto de Investigaciones Hematológicas,
Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires*

Resumen El virus del tumor mamario murino (MMTV) se considera actualmente un modelo experimental de interés en el que puede observarse la complejidad de las fuerzas evolutivas actuantes entre los retrovirus y sus huéspedes. El MMTV es un retrovirus de tipo B que se transmite a través de la leche y luego de infectar a su huésped induce la expresión de superantígenos (SAGs). Existen también formas endógenas de estos virus integrados permanentemente en el genoma del ratón, consideradas como el resultado de infecciones ancestrales en células de la línea germinal. La gran mayoría de los virus endógenos no produce partículas virales debido a la existencia de mutaciones en su genoma. Sin embargo, todos ellos mantienen la capacidad de inducir la expresión de SAGs. La expresión de este tipo de moléculas resulta crítica para el ciclo de vida de los MMTV infecciosos. Cuando un MMTV exógeno infecta al huésped, las células B resultan infectadas tempranamente y expresan el SAG viral. Las células T reactivas al SAG se activan y comienzan a proliferar. Colaboran con las células B infectadas las que en consecuencia proliferan y se diferencian. Este hecho facilita la integración del MMTV y el incremento del número de linfocitos infectados, dando lugar a un importante aumento en la carga viral. Los linfocitos transfieren posteriormente al virus a la glándula mamaria completándose así el ciclo de vida de estos patógenos. Se ha hipotetizado que la presencia de provirus del tumor mamario murino endógenos conferiría una ventaja selectiva a la población murina, ya que al inducir la delección clonal temprana de las células T reactivas a los SAGs expresados por los mismos, protegería al huésped de la infección con un virus exógeno que codifique para un SAG con reactividad cruzada. Sin embargo, resultados recientes discutidos en este trabajo sugieren que los provirus endógenos pueden resultar ventajosos además para el patógeno ya que son capaces de recombinar con variantes exógenas que codifiquen para SAGs no relacionados dando lugar a la generación de nuevas partículas virales, ampliando así el rango de huéspedes susceptibles y permitiendo la aparición de variantes virales altamente tumorigénicas.

Palabras clave: superantígeno, MMTV, cáncer de mama murino, retrovirus

Huéspedes y patógenos han coevolucionado durante millones de años, desarrollando múltiples

e íntimas interrelaciones. Los vertebrados, especialmente los mamíferos poseen un sistema inmune complejo que les permite defenderse en general con éxito de las infecciones; sus patógenos descubrieron numerosas formas de eludirlo, y en algunos casos han logrado utilizar los componentes del sistema inmune en su beneficio.

Una de las estrategias desarrolladas por estos patógenos para sobrevivir y propagarse opera mediante la expresión de superantígenos. Las

¹ Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

² Becaria del CONICET

³ Becario de FUNDALEU (Fundación para Combatir la Leucemia)

Dirección postal: Dra. Isabel Piazzon, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Las Heras 3092, 1425 Buenos Aires, Argentina

investigaciones que involucran al virus del tumor mamario murino (MMTV) permitieron comprender los mecanismos por lo cuales la expresión de superantígenos resulta un evento crítico para el ciclo de vida viral.

Superantígenos

El término superantígeno (SAG) se aplica a un grupo de moléculas que —a diferencia de los antígenos convencionales— posee la propiedad de estimular específicamente a un gran número de células T¹.

Los SAGs son producidos por ciertas bacterias y virus. Al igual que los antígenos convencionales, deben asociarse a moléculas de antígenos mayores de histocompatibilidad (MHC) para ser reconocidos por las células T. Sin embargo, se unen a una región poco polimórfica del MHC, por fuera del hueco en el que se presentan los péptidos convencionales, y son presentados casi exclusivamente en el contexto de antígenos mayores de histocompatibilidad de clase II²⁻⁴. El reconocimiento T de los SAGs no está sin embargo restringido por esas moléculas: pueden ser reconocidos en asociación con antígenos MHC de clase II propios, en el contexto de aloantígenos y aun en asociación con moléculas MHC de clase II de otras especies. Sin embargo, algunos SAGs muestran cierta preferencia alélica para su presentación.

La mayoría de los SAGs, como las toxinas bacterianas, son reconocidos sin que medie procesamiento antigénico; los superantígenos expresados como consecuencia de la infección por los virus MMTV sufren sin embargo un procesamiento proteolítico parcial⁵.

La característica más notable de los SAGs consiste en que las células T reconocen al complejo SAG-MHC de clase II sólo con la región variable de una de las dos cadenas que componen su receptor para el antígeno, la región V β . Este tipo de reconocimiento T les otorga uno de sus efectos biológicos más conspicuos, el de activar un gran número de células T. En el reconocimiento del complejo péptido convencional-MHC intervienen todas las regiones variables del receptor T heterodimérico: las regiones V α y V β , la región D β y los segmentos J α y J β . En consecuencia, la frecuencia de células T que recono-

cen específicamente al complejo péptido convencional - MHC propio es muy baja, alrededor de 1 en 10⁵ células T. Por el contrario, el complejo SAG-MHC es reconocido por la mayoría de las células T que expresan una cadena V β apropiada, en forma casi independiente de los otros componentes variables del receptor⁶⁻⁷. Así, la respuesta T al SAG involucra una alta proporción de células T, calculada como 10⁴ veces mayor que la que ocurre frente a un péptido convencional. De este modo, y puesto que muchos de los SAGs conocidos reaccionan con más de una región V β , estas moléculas pueden activar específicamente hasta el 30% del repertorio T periférico.

Hasta el momento, la expresión de SAGs ha sido descrita en asociación a infecciones por bacterias gram positivas como *Streptococcus pyogenes*⁸ y *Staphylococcus aureus*, varias de cuyas enterotoxinas como SEA, SEB, C1, C3, D, E y la toxina del síndrome del shock tóxico TSST1, poseen propiedades superantigénicas⁹. También se encontraron SAGs asociados a *Pseudomonas*, a *Mycobacterium tuberculosis*¹⁰, a *Toxoplasma gondii*¹¹, a *Mycoplasma arthritidis*¹² y a algunos virus. Entre éstos, se encuentran el virus de la rabia¹³, los retrovirus del tumor mamario murino^{14, 15} y herpesvirus como el citomegalovirus. Se discute si el HIV expresa SAGs¹⁶⁻¹⁸.

El virus del tumor mamario murino (MMTV)

Los MMTV exógenos, que se transmiten a través de la leche, poseen como otros retrovirus un genoma dimérico compuesto por dos cadenas positivas de RNA poliadenilado asociadas a la enzima que permite su retrotranscripción, la transcriptasa reversa (TR). En el virión se localizan además algunas proteínas de la cápside y RNA de transferencia del huésped (tRNA^{Lys}) que le sirve como primer para la retrotranscripción¹⁹⁻²¹.

El genoma viral se esquematiza en la Figura 1. El gen *gag* codifica para una poliproteína precursora que subsecuentemente es clivada para dar lugar a las proteínas de la cápside (MA, CA, NC). El gen *pol* codifica para la transcriptasa reversa y una integrasa. El gen *env* para un precursor de las glicoproteínas de envoltura: la de membrana (gp36) y la de superficie (gp52).

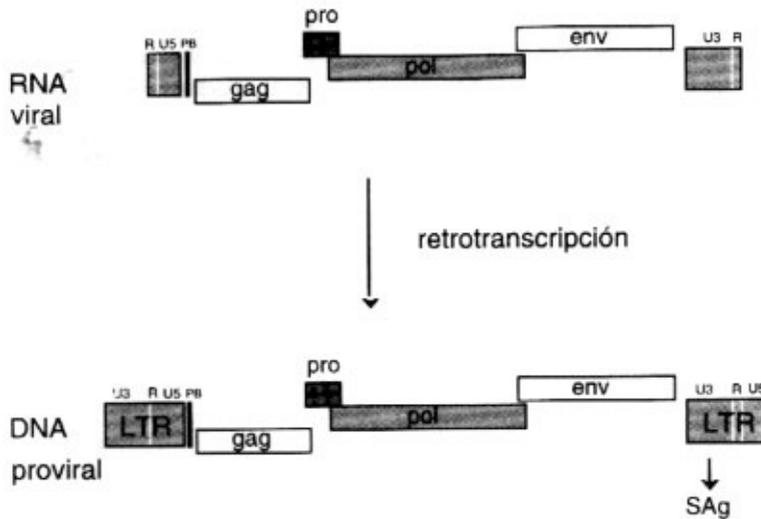


Fig. 1.- Se esquematiza el genoma viral de los MMTV (RNA viral) y el proviral (DNA proviral) surgido como consecuencia de la retrotranscripción.

En el proceso de transcripción reversa se crean dos LTR (uno en cada extremo del DNA proviral) por duplicación de secuencias presentes sólo una vez en el genoma retroviral. El LTR 3' contiene un gen denominado *sag* que codifica para la expresión del SAg.

El mecanismo de la retrotranscripción es complejo y puede interpretarse como la solución a dos problemas inherentes al tipo de replicación de los retrovirus. El primer problema consiste en que el sistema —que utiliza primers RNA— no permitiría la copia de extremo a extremo del genoma, ya que sería imposible copiar la región de unión al primer; el segundo deviene del hecho de que los nuevos genomas virales producidos por la RNA polimerasa II celular requieren de señales apropiadas para dirigir la síntesis de RNA que estén ubicadas upstream del sitio de iniciación de dicha síntesis, fuera de la región que debe ser copiada. La solución para esta paradoja involucra un mecanismo por el cual, mediante cambios de templado de la TR, se sintetiza en cada extremo de la molécula de DNA una copia extra de secuencias presentes sólo una vez en el genoma RNA. Así se forman los LTRs que contienen virtualmente todas las secuencias necesarias para la integración y la expresión del provirus²⁰⁻²².

El ciclo de replicación de los MMTV puede dividirse en dos fases. En la primera se producen:

la unión del virión a su receptor celular (ver Ross y col., en este mismo número), la entrada del core del virión al citoplasma, la síntesis de DNA de doble cadena usando como templado una cadena simple de RNA, la transferencia de la estructura del core-DNA al núcleo y la integración del DNA al genoma, que ocurriría preferencialmente durante el ciclo de replicación celular. Estos pasos están mediados por proteínas del virión y ocurren en ausencia de expresión de genes virales. En la segunda fase, se produce la transcripción del genoma viral completo y de RNAs subgenómicos usados para generar las poliproteínas retrovirales. La transcripción del provirus está mediada por la RNA polimerasa II celular. Posteriormente, el genoma se encapsida, la nucleocápside se asocia con la membrana celular y los nuevos viriones salen de la célula por brotación^{20, 21}.

El LTR 3' del MMTV contiene un marco de lectura abierto (ORF) en el que se encuentra el gen *sag* que codifica para el superantígeno^{23, 24}. El SAg, que se expresa como consecuencia de la infección viral, es una glicoproteína de transmembrana de tipo II, es decir su extremo aminoterminal se ubica hacia el interior de la célula mientras expone su extremo carboxiterminal hacia el exterior. Se ha sugerido recientemente que el gen *sag* tendría un posible origen eucariótico²⁵.

Aunque los SAGs codificados por las diferentes variantes de virus MMTV poseen una homología de alrededor del 85%, existe una región altamente polimórfica en el extremo carboxiterminal de la molécula que es la que determina la especificidad del reconocimiento T por las diferentes regiones V β del receptor. Como puede observarse en la Figura 2, correlacionando con diferencias en la región carboxiterminal del SAG codificado por este gen, las distintas variantes de MMTV expresan SAGs diferentes, afectando así a clones T con distinta especificidad V β ^{15, 26, 27}.

Los MMTV utilizan la expresión de SAGs como una estrategia para asegurar su amplificación

La vía natural de infección de los MMTV exógenos es el amamantamiento²⁸. En los lactantes, el virus interactúa con el sistema inmune en las placas de Peyer, es decir, los linfocitos son sus huéspedes primarios. Mediante la expresión de superantígenos logra amplificarse en estas células para ser luego trasladados por ellas a la glándula mamaria²⁹. La infección de las células del epitelio mamario y la consecuente liberación de viriones a la leche –incrementada marcadamente

bajo la influencia de hormonas esteroideas– determinan la continuidad del ciclo de vida de estos virus. Durante la infección de la glándula mamaria estos retrovirus suelen inducir el desarrollo de adenocarcinomas mamarios al insertarse en el genoma del huésped determinando la activación de oncogenes celulares³⁰⁻³².

El reconocimiento T del SAG expresado por el virus en los linfocitos B, constituye un paso crucial en la infección, dando lugar a la amplificación viral^{29, 33}, ver Acha-Orbea en este volumen). Las primeras fases de la infección afectarían casi exclusivamente a las células B para más tarde abarcar también a la células T. Las células B infectadas expresan el SAG en su superficie asociado a moléculas MHC de clase II³⁴. El complejo SAG-moléculas MHC de clase II estimula a las células T portadoras de una cadena V β apropiada en su receptor³⁵. La interacción de estos clones T reactivos al SAG con las células B infectadas induce su proliferación y diferenciación. Esta proliferación celular daría lugar a la amplificación viral ya que no sólo aumenta el número de células infectadas sino que –como ocurre con otros retrovirus– la infección y replicación de los MMTV sería más eficiente en células en división. Se ha propuesto además que la diferenciación de las

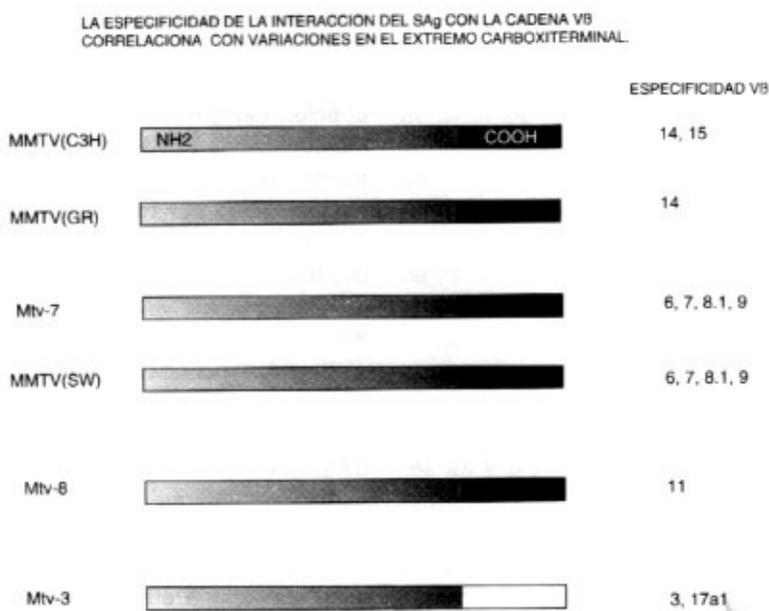


Fig. 2.– Se esquematizan diferentes virus MMTV señalando que la especificidad de interacción con las cadenas V β del receptor T está determinada por variaciones en la secuencia del extremo carboxiterminal del superantígeno.

células B infectadas contribuiría a mantener la cronicidad de la infección. Posteriormente, las células T reactivas entran en un estado de inactivación funcional y/o son progresivamente delecionadas^{1, 14, 36, 38}. Veremos más adelante que esta instancia de amplificación viral resulta esencial en el ciclo de vida de estos virus.

Virus endógenos del tumor mamario murino

Los virus del tumor mamario murino no sólo existen como virus infecciosos exógenos, sino que también puede encontrárselos como provirus endógenos integrados en forma estable en el genoma del ratón y por lo tanto heredados en forma mendeliana^{27, 37}. Estos virus endógenos (Mtv) se consideran provenientes de integraciones ancestrales de virus MMTV infecciosos en células de la línea germinal. Se han podido identificar numerosas variantes de virus Mtv endógenos tanto en ratones de laboratorio como en poblaciones salvajes. Las cepas endocriadas de ratones poseen de 2 a 8 integraciones provirales diferentes^{27, 29}. La mayoría de los Mtv endógenos no producen partículas virales. Esto se debe a la existencia de mutaciones en sus regiones codificantes para proteínas estructurales o en regiones regulatorias de la transcripción. La permanencia en el genoma de estos virus Mtv endógenos a lo largo del tiempo y el hecho de que todos ellos sean capaces de expresar SAGs, ha llevado a hipotetizar que su retención durante millones de años conllevaría ventajas selectivas para el huésped.

La posesión de virus Mtv endógenos protege al huésped de la infección con MMTV que codifican para SAGs con reactividad cruzada

Al expresar su SAG como un antígeno propio los Mtv endógenos inducen la casi completa deleción de las células T reactivas al mismo durante los primeros días de vida, dando forma así al repertorio T del individuo. Se ha hipotetizado que la eliminación temprana de estos clones conferiría una ventaja selectiva a los huéspedes frente a la infección con virus que expresan SAGs con reactividad cruzada.

Efectivamente, se ha demostrado que la transmisión de virus MMTV infecciosos se encuentra severamente impedida cuando en el huésped están ausentes las células T capaces de reconocer al SAG que este virus expresa. La ausencia de estos clones ocurre naturalmente cuando el huésped expresa un virus Mtv endógeno que codifica para un SAG con la misma especificidad a la codificada por el virus infeccioso. En estas circunstancias, las células B infectadas se ven privadas de la interacción con los linfocitos T reactivos al SAG y por lo tanto, de una instancia proliferativa que incrementa la carga viral. La infección resulta entonces ineficiente y la cantidad de virus que llega a la glándula mamaria es significativamente menor, de modo tal que la transmisión viral se ve significativamente disminuida^{34, 38}.

Estos hallazgos han permitido postular la hipótesis de que la integración de los virus MMTV en la línea germinal, es decir, la adquisición y permanencia de los virus Mtv endógenos, otorga una ventaja selectiva al huésped. En otras palabras, las fuerzas evolutivas habrían trabajado durante millones de años de manera de retener en el genoma del ratón a los virus Mtv endógenos, ya que su presencia los protegería de la infección con MMTV exógenos cuyos genomas codifiquen para Sags con reactividad cruzada.

Recombinación entre virus MMTV exógenos y endógenos

Resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que la presencia de los virus endógenos podría sin embargo derivar en desventajas para el huésped cuando éste es infectado con un virus exógeno capaz de inducir la expresión de SAGs con una especificidad diferente. El virus infeccioso podría en este caso no sólo amplificarse utilizando el sistema inmune del huésped, sino también recombinar con los virus endógenos dando lugar a la aparición de nuevas variantes virales.

Analizando el repertorio T de ratones de la cepa BALB/c de nuestro criadero utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos a diferentes regiones V β s y técnicas citofluorométricas, pudimos observar que una sublínea de estos mostraba una frecuencia significativamente disminuida de sus

células T V β 2+ y 14+³⁹⁻⁴⁰. El amamantamiento de estos ratones con nodrizas libres de virus MMTV restauraba los niveles normales de los clones delecionados. Estos resultados y el hecho de que los ratones de esta línea mostraran una incidencia significativa de tumores de mama en los que mediante técnicas de Southern Blott se detectó la presencia de nuevas integraciones virales, sugería la presencia de virus MMTV exógenos. Experimentos posteriores permitieron demostrar la presencia de dos variantes exógenas de virus MMTV, a las que denominamos BALB 2 y BALB14⁴¹. La sublínea de ratones BALB/c portadora de estas dos variantes virales fue denominada BALB/cT.

Hembras BALB/cT infectadas con estos dos variantes de MMTV exógenos fueron cruzadas con machos de la cepa AKR, de modo de obtener híbridos F1 (BALB/cTxAKR). Estos híbridos son portadores tanto de los virus infecciosos MMTV BALB2 y 14 como de los virus endógenos heredados de las cepas parentales que son defectivos para la producción de partículas virales. Utilizamos estas nodrizas F1 para amamantar ratones BALB/c recién nacidos y —una vez adultos— analizar en ellos el repertorio T. Además de las alteraciones atribuibles a la infección con los virus MMTV BALB2 y BALB14, es decir, deleción de clones T V β 2+ y 14+, observamos la deleción progresiva de clones portadores de otras cadenas V β , las cadenas V β 6 y 8.1 (Figura 3). Estos resultados demostraban la transmisión por leche de un nuevo SAg y por lo tanto sugerían que en las nodrizas se generaban nuevos virus exógenos con especificidad superantigénica diferente a la de los virus BALB2 y BALB14.

Puesto que las nodrizas F1 utilizadas portan en su genoma un Mtv endógeno heredado de la cepa AKR denominado Mtv-7 que expresa un SAg que interactúa con los clones T V β 6 + y 8.1+, se llevaron a cabo experimentos para investigar si la transmisión del nuevo SAg^{42, 43} correlacionaba con la presencia del virus Mtv-7 endógeno en las nodrizas F1. En efecto, la transmisión del nuevo SAg se detectaba sólo cuando las nodrizas estaban infectadas con los MMTV BALB2 y BALB14 y eran portadoras del provirus endógeno Mtv-7.

Con el objeto de caracterizar e investigar el origen del SAg Mtv-7 -like desarrollamos una línea de ratones a partir de una hembra BALB/c amamantada por una nodriza F1 (BALB/cTxAKR),

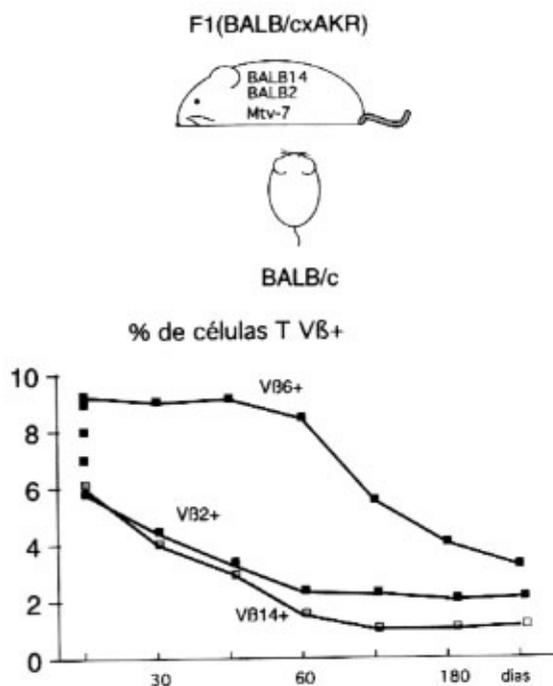


Fig. 3. – Modelo experimental. Se amamantaron ratones de la cepa BALB/c recién nacidos con nodrizas F1 (BALB/c TxAKR) infectadas con los MMTV exógenos BALB2 y BALB14 y portadoras del provirus endógeno no productivo Mtv-7. Utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos a diferentes regiones V β del receptor T y técnicas citofluorométricas se pudo detectar que los ratones amamantados por las nodrizas F1 mostraron una temprana deleción de clones T V β 2+ y V β 14+. Luego de los 2 meses de vida comenzaba a detectarse la deleción de clones T V β 6+, lo que mostraba que dichas nodrizas F1 eran capaces de transmitir un nuevo SAg con reactividad similar a la codificada por el provirus endógeno Mtv-7.

a la que denominamos Línea A (Figura 4). La hembra fundadora de esta línea mostró una temprana deleción de los clones T V β 2+ y V β 14+; a los 180 días comenzó a observarse una disminución progresiva en la frecuencia de sus células T CD4+ V β 6+. Después de dos generaciones de cruzamiento entre hermanos, la deleción de los clones V β 6+ podía detectarse muy tempranamente en el 100% de los individuos.

Mediante ensayos de protección de RNasa T1 utilizando RNA extraído de leche y glándula mamaria de ratones de esta línea y sondas específicas para la región hipervariable de los ORFs de los virus BALB2, BALB14 y del provirus Mtv-7, se pudo demostrar que un nuevo virus exógeno

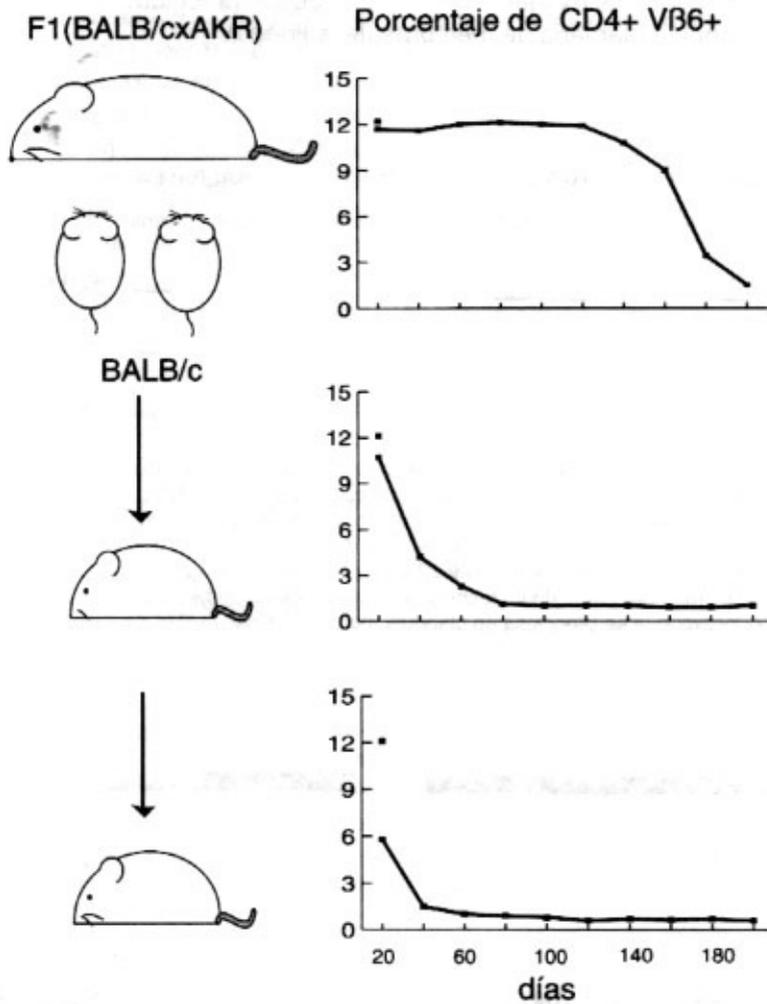


Fig. 4.- Se esquematiza la generación de una línea de ratones BALB/c (Línea A), a partir del cruzamiento de una hembra BALB/c que había sido amamantada por una nodriza F1(BALB/c TxAKR). Se muestra la cinética de deleción de los clones T CD4+ Vβ6+ en la hembra fundadora de la línea A y en los hijos de las dos generaciones siguientes.

Mtv-7-like –al que denominamos MMTVLA– se expresaba en leche y en glándula mamaria en contraste con su contraparte endógena que es silenciosa en este tejido (Figura 5).

Se secuenció posteriormente el ORF de este nuevo virus y se determinó que la región hipervariable del gen *sag* derivaba del Mtv-7 y la secuencia LTR upstream de esta región, del virus BALB14. Estos datos indicaron entonces que el nuevo virus exógeno surgía por recombinación entre el MMTV BALB14 y un provirus endógeno no productor de partículas virales y no expresado en glándula mamaria, el Mtv-7. (Figura 6).

La utilización de técnicas de RT-PCR permitió detectar en glándula mamaria y leche de las nodrizas F1(BALB/c T xAKR) distintos virus recombinantes que expresaban la región carboxiterminal del SAg del Mtv-7 endógeno y la aminoterminal del virus MMTV BALB14 (Figura 7). Los puntos de ruptura de las recombinaciones en las diferentes variantes virales estaban ubicados entre los nucleótidos 524 y 861. No pudieron detectarse virus recombinantes con puntos de ruptura ubicados upstream del nucleótido 524, lo que sugería que la secuencia comprendida entre este punto y el extremo 5' del LTR del virus BALB14 era

Un nuevo virus exógeno Mtv-7-like pudo ser detectado en leche y glándula mamaria de hembras de la línea A.

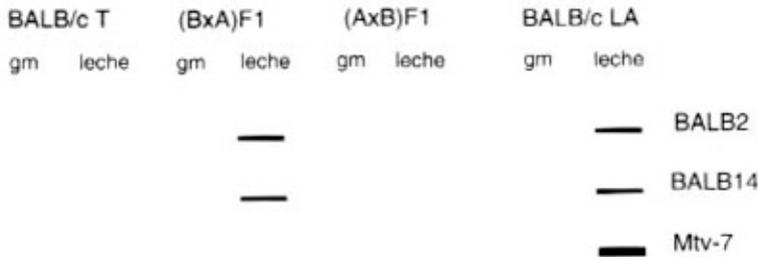


Fig. 5.- Con el objeto de determinar qué virus se expresaban en glándula mamaria y eran producidos en leche de ratones BALB/c T (calles 1 y 2), F1(BALB/c TxAKR) (calles 3 y 4), F1(AKRxBALB/c T) (calles 5 y 6) y BALB/c de la línea A (calles 7 y 8), se realizaron ensayos de protección de RNasa T1 utilizando RNA obtenido de dichos ratones y sondas específicas para la región hipervariable del LTR de los virus BALB2, BALB14 y el provirus Mtv-7. La Figura esquematiza los resultados obtenidos⁴¹ en los que se observó protección total con la sonda específica para el Mtv-7 sólo con RNA obtenido de leche y glándula mamaria de hembras de la línea A, en contraste con su contraparte endógena que es silenciosa en glándula mamaria. (BxA):F1(BALB/cTxAKR);(AxB):F1(AKRxBALB/cT);LA: línea A.



Fig. 6.- Esquema del gen sag del virus recombinante LA. Se esquematizan los resultados obtenidos luego de la clonación y secuenciación del LTR del nuevo MMTV aislado en ratones de la línea A⁴¹. Como se observa, éste resulta de la recombinación entre el BALB14 exógeno y el provirus Mtv-7. La zona rayada señala los posibles puntos de ruptura de la recombinación (nt 721 a 789). El nt 720 es específico del MMTV BALB14 y el 790 del Mtv-7.

Fig. 7.- Se esquematizan los diferentes virus recombinantes aislados en leche o glándula mamaria de ratones F1(BALB/cTxAKR)⁴¹. La zona rayada señala los posibles puntos de ruptura de la recombinación.

retenida selectivamente. Ross et al demostraron posteriormente que un cambio en sólo un par de bases en la posición 520 determina el patrón de expresión de los virus del tumor mamario murino en los diferentes tejidos (41, Ross y col, pág. 34)

¿Cuáles podrían haber sido los mecanismos para la aparición de estas variantes virales

recombinantes que codifican para el SAg del Mtv-7? La Figura 8 esquematiza uno de los mecanismos probables. Si bien el Mtv-7 endógeno no es capaz de producir partículas virales infecciosas, el DNA proviral se transcribe en las células linfocíticas. Transcritos del Mtv-7 podrían empaquetarse con el RNA del virus exógeno BALB14 del mismo modo que recientemente se reportara para el virus MMTV exógeno de C3H y el provirus Mtv-1⁴. Cuando este virión heterólogo infecta una nueva célula y se retrotranscribe, la transcriptasa inversa podría cambiar de templado, como hace normalmente durante la retrotranscripción viral. Si saltara de una cadena de RNA a la otra, se generaría un DNA proviral recombinante y en consecuencia se producirían variantes virales nuevas.

Amplificación del virus recombinante en huéspedes susceptibles

Los virus recombinantes que habían adquirido el SAg del provirus endógeno Mtv-7 se generaban en los híbridos F1 pero estaban presentes en estos huéspedes en muy bajo título. Sin embargo, cuando eran transmitidos por leche a huéspedes susceptibles, la carga viral aumentaba significativamente. Estos resultados sugerían

que el virus recombinante era capaz de amplificarse en dichos huéspedes.

Con el objetivo de investigar si la amplificación viral podría atribuirse a la actividad superantigénica del virus, se inoculó leche de hembras de la Línea A en la almohadilla plantar de ratones adultos BALB/c libres de virus MMTV. Esta ruta de infección permite cuantificar la respuesta inmune frente al virus, la que se hace evidente en los ganglios linfáticos drenantes del inóculo.

Pudimos establecer que el porcentaje de clones T CD4+ Vβ6+ aumenta dramáticamente en los ganglios linfáticos, llegando a constituir el 35% de las células T CD4+ a los 5 días de la inoculación del virus (Figura 9).

A los 3 días de la inoculación del virus un 18% de las células T Vβ6+ se encontraban en las fases de síntesis o mitosis, mientras que el porcentaje de proliferación en clones T no relacionados no superaba el 0,8%. El porcentaje de células B en proliferación se encontraba también significativamente aumentado. Pudimos además detectar alteraciones en el tráfico linfocítico que daban lugar a una acumulación selectiva de células T Vβ6+ y linfocitos B IgG+ en los ganglios drenantes del inóculo viral.

A diferencia de lo reportado por otros autores, la respuesta inmune frente al SAg codificado por

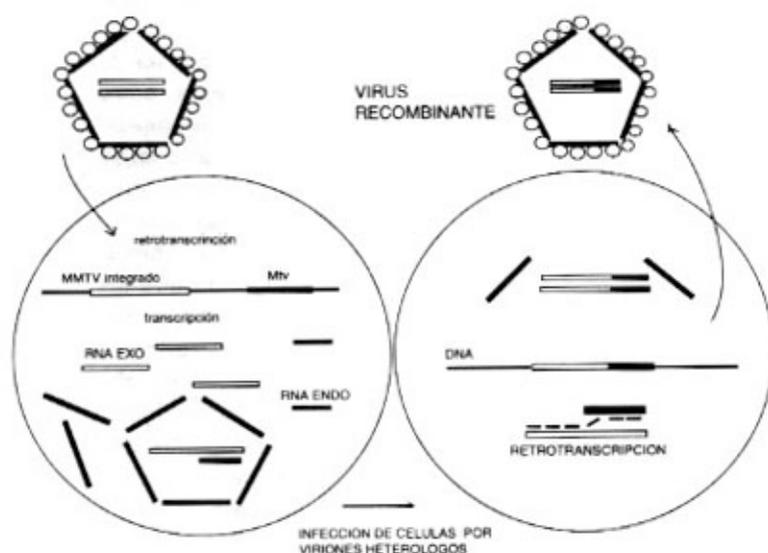


Fig. 8 - El virus exógeno BALB14 recombina con el provirus endógeno Mtv-7: surge una nueva variante viral que codifica para un SAg Mtv-7-like. Se esquematiza uno de los mecanismos probables que habrían permitido el surgimiento de las variantes virales recombinantes.

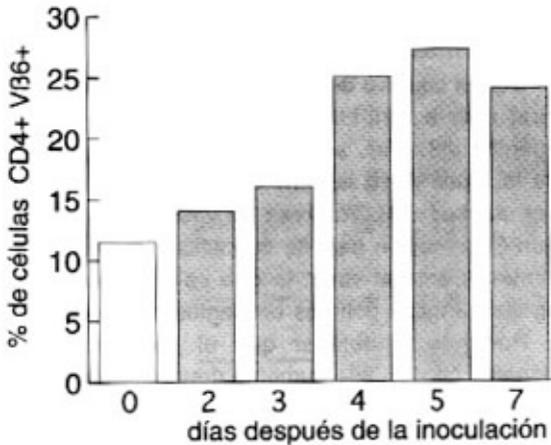


Fig. 9.- Actividad superantigénica del virus recombinante. Se inocularon 10ul de leche proveniente de hembras de la línea A en la almohadilla plantar de ratones BALB/c libres de virus. A diferentes tiempos de la inoculación se determinó el porcentaje de células T CD4+ Vβ6+ en los ganglios poplíteos drenantes del inóculo viral, mediante el uso de anticuerpos monoclonales y técnicas citofluorométricas.

el virus recombinante LA incluyó además una temprana respuesta inmune sistémica. En el bazo el porcentaje de células T CD4+ Vβ6+ alcanzó al 36% al día 5, porcentaje significativamente mayor al registrado en ratones controles inoculados con leche proveniente de ratones BALB/c libres de virus.

El conjunto de estos resultados muestra que el virus LA recombinante posee una muy fuerte actividad superantigénica, lo que permitiría explicar la gran amplificación viral que ocurre cuando esta variante infecta un huésped que expresa clones T Vβ6+.

El virus recombinante es altamente tumorigénico

Los ratones BALB/c T infectados con los MMTV BALB2 y BALB14 muestran una incidencia del 35 - 40% de adenocarcinomas mamarios. Al año de vida 72 de 202 hembras multíparas desarrollaron tumores de mama. Las hembras vírgenes mostraron una baja incidencia tumoral (5%), indicando la dependencia de la preñez para su inducción. Los tumores mostraron además un crecimiento hormono-dependiente en las primeras etapas; se detectaban durante la preñez y regresaban luego de finalizada la misma, hasta que luego de varias preñeces perdían la depen-

dencia hormonal. Las hembras multíparas de la línea A mostraron una incidencia tumoral significativamente mayor (85%; 50/59 animales). Estos tumores mostraron también un comportamiento preñez dependiente tanto para su inducción como para su crecimiento.

Para determinar qué virus se expresan en los tumores de la Línea A, se desarrollaron ensayos de protección de RNasa T1 con sondas específicas para la región hipervariable del ORF de los virus BALB2, BALB14 y BALB-LA. Diez de 11 tumores expresaban el virus LA. En 6 de éstos, sólo se encontró expresado este virus. Dos tumores expresaban el MMTV LA y el BALB2; 2 tumores lo expresaban junto con el BALB14, mientras que un tumor expresaba únicamente el BALB14. Estos resultados sugieren fuertemente que la capacidad tumorigénica del virus recombinante LA es mayor que la del virus parental BALB14⁴¹.

En conclusión, la presencia de provirus endógenos no productivos en el genoma, que ha sido considerada como protectora frente a la infección con virus MMTV exógenos, podría además ofrecer ventajas selectivas a la población viral. A través de mecanismos de recombinación pueden generarse nuevas variantes virales cuyas características biológicas incluyan la capacidad de amplificación viral en huéspedes susceptibles y una patogenicidad mayor que la de la cepa viral parental.

Entre el 0,5 y el 1% del genoma de los vertebrados está compuesto de secuencias retrovirales endógenas⁴⁵⁻⁴⁶. La permanencia de estos provirus a lo largo de la escala zoológica ha llamado poderosamente la atención y se ha sugerido la existencia de ventajas selectivas para su retención. Resultados experimentales previos habían sugerido que las secuencias provirales endógenas protegerían a los huéspedes de la infección con retrovirus relacionados por bloqueo por proteínas de envoltura del receptor para la entrada de los patógenos. El hecho de que los provirus endógenos del MMTV protejan a sus huéspedes de la infección con virus exógenos que codifiquen para un SAg con reactividad cruzada, ha apoyado la hipótesis de la existencia de ventajas selectivas en la retención de estas secuencias retrovirales. En base a estas observaciones se ha sugerido recientemente que la falta de detección de virus infecciosos humanos relaciona-

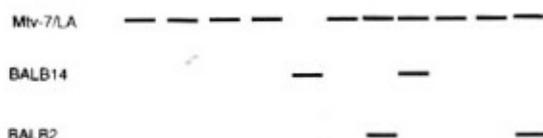


Fig. 10.— Expresión del virus la recombinante en tumores de mama. Se realizaron ensayos de protección RNasa T1 para determinar los niveles relativos de expresión de los diferentes virus en 11 tumores de la línea A, utilizando sondas específicas para las regiones hipervariables de los ORF de los MMTV BALB2, BALB14 y Mtv-7.

dos a los HERVs (secuencias retrovirales endógenas humanas) podría deberse a la extinción de las variantes exógenas como consecuencia de la adquisición evolutiva de estos provirus. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la presencia de secuencias provirales endógenas puede otorgar además ventajas al patógeno. Cabe resaltar, sin embargo, que a diferencia de lo observado en el hombre en el que no se han detectado hasta el momento variaciones mayores en el número de copias y los sitios de integración de los HERVs —sugiriendo la existencia de un balance evolutivo estable— el virus MMTV parecería estar en plena evolución, ya que existen fuertes diferencias en el número de integraciones retrovirales dentro de la especie³. Las interacciones entre el virus MMTV y su huésped pueden entonces considerarse como un interesante modelo experimental en el que puede observarse la complejidad de las fuerzas evolutivas actuantes entre los vertebrados y sus patógenos.

Agradecimientos: Agradecemos la excelente asistencia técnica de Juan José Portaluppi y Antonio Morales. A la Fundación de la Hemofilia por haber facilitado el uso del citómetro de flujo. A FUNDALEU, por su colaboración permanente con nuestro grupo de trabajo a través del otorgamiento de becas. Al CONICET y a la Fundación Antorchas por los subsidios que permitieron la realización de este trabajo.

Summary

Superantigens and murine mammary tumor retrovirus

Hosts and their pathogens have co-evolved for millions of years, developing multiple and intimate

interactions. Vertebrates have evolved a very complex immune system which pathogens have often been able to circumvent, in some cases even managing to appropriate some of its components for their own purpose. Among the pathogens which do use components of the immune system to survive and propagate, those coding for the expression of superantigens (SAGs) are now under intense scrutiny. Investigations concerning one of these pathogens, the mouse mammary tumor virus (MMTV), led to the understanding of how the expression of such components is a critical step in their life cycle. A number of milk-borne exogenous MMTV infect mice shortly after birth and, when expressed, produce superantigens. Herein, we describe the biological effects of new variants of MMTV. Two of these, BALB14 and BALB2 encoding SAGs with V β 14+ and V β 2+ specificities, respectively, were present in BALB/c mice of our colony (BALB/cT); a third variant, termed MMTV LA, originated in (BALB/cTxAKR)F1 mice from recombination between BALB14 and Mtv-7 endogenous provirus. The recombinant LA virus induces the deletion of V β 6+ and V β 8.1+ T cells as a consequence of the acquisition of SAG hypervariable coding region of Mtv-7. The SAG encoded by MMTV LA strongly stimulates cognate T cells in vivo leading to a very effective amplification of lymphoid cells in BALB/c mice, correlating with a high incidence of mammary tumors. These results suggest that the presence of non-productive endogenous proviruses —generally considered to confer a selective advantage to the host by protecting it from infection with exogenous MMTVs encoding cross-reactive SAGs— could also be advantageous for the pathogen by increasing its variability, thus broadening the host range and allowing the expansion of highly tumorigenic variants.

Bibliografía

1. Chatila T, Geha RS. Superantigens. *Curr Opin Immunol* 1992; 4: 74-8.
2. Pullen AM, Wade T, Marrack P, Kappler JW. Identification of the Region of T Cell Receptor Beta Chain that Interacts with Self-superantigen Mls-1a. *Cell* 1990; 61: 1365-74.
3. Lafon M, Lafage M, Martinez-Arends A, Ramirez R, Vuillier F, Charron D, Lotteau V, Scott-Algara D. Evidence for a viral superantigen in humans. *Nature* 1992; 358: 507-10.
4. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Chi Y, et al. Three dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with Sag. *Nature* 1994; 368: 711-8.
5. Winslow GM, Marrack P, Kappler JW. Processing and major histocompatibility complex binding of the

- MTV7 superantigen. *Immunity* 1994; 1: 23-33.
6. Gascoigne NR, Ames KT. Direct Binding of Secreted T cell Receptor Beta Chain to Superantigen Associated with Class II Major Histocompatibility Complex Protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 613-6.
 7. Happ MP, Woodland DL, Palmer E. A third T cell receptor V β gene encodes reactivity to Mls-1a gene products. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 6293-6.
 8. Tomai M, Kotb M, Majumdar G, Beachey. Superantigenicity of Streptococcal M protein. *J Exp Med* 1990; 172: 359-62.
 9. Marrack P, Kappler J. The Staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990; 248: 705-11.
 10. Ohmen JD, Barnes PF, Grisso CL, Bloom BR, Modlin RL. Evidence for a Superantigen in Human Tuberculosis. *Immunity* 1994; 1: 35-40.
 11. Denker EY, Caspar P, Hieny S, Sher A. Toxoplasma gondii infection induces specific non-responsiveness in lymphocytes bearing the V β 5 chain of the mouse T cell receptor. *J Immunol* 1996; 156: 1089-94.
 12. Cole BC, Karchner DR, Wells DJ. Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from Mycoplasma arthritidis (MAM). VIII. Selective activation of T cells expressing distinct V β T cell receptors from various strains of mice by the 'superantigen' MAM. *J Immunol* 1990; 144: 425-31.
 13. Laffon M, Scott-Algara D, Marche PN, Cazenave P-A, Jouvin-Marche E. Neonatal deletion and selective expansion of mouse T cells by exposure to rabies virus nucleocapsid superantigen. *J Exp Med* 1994; 180: 1207.
 14. Marrack P, Kushnir E, Kappler J. 1991. A Maternally Inherited Superantigen Encoded by a Mammary Tumor Virus. *Nature* 349: 524-6.
 15. Held W, Shakhov A, Waanders G, Scarpellino L, Luethy R, Kraehenbuhl J-P, MacDonald HR, Acha-Orbea H. 1992. An exogenous mouse mammary tumor virus with properties of Mls-1a (Mtv-7) *J Exp Med* 175: 1623-33.
 16. Imberti L, Sottini A, Bettinardi A, Puoti M, Primi D. Selective depletion in HIV infection of T cells that bear specific T cell receptor V β sequences. *Science* 1991; 254: 862.
 17. Laurence J, Hodge A, Posnett D. Superantigen implicated in dependence of HIV-1 replication in T cells on TCR V β expression. *Nature* 1992; 358: 255.
 18. Dadaglio G, Garcia S, Moutaigner L, Gougeon M-L. Selective Anergy of V β 8+ T Cells in Human Immunodeficiency Virus-infected Individuals. *J Exp Med* 1994; 179: 413.
 19. Coffin JM. In: Fields Virology, BN Fields et al (eds) Philadelphia: Lippincott-Raven 1996; 1767-1847.
 20. Coffin JM. In: Virology, Second Edition, BN Fields, DM Knipe, et al, (eds) New York: Raven Press 1990; 1437.
 21. Coffin JM (Introduction to Retroviruses) In: *AIDS and other manifestations of HIV infection*. Second Edition, P Wormser (ed), New York: 1992; 37.
 22. Hu W, Termin HM. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* 1990, 250: 1227-33.
 23. Choy Y, Kappler JW, Marrack P. A superantigen encoded in the open reading frame of the 3' long terminal repeat of mouse mammary tumor virus. *Nature* 1991 350: 203-07.
 24. Pullen AM, Choy Y, Kushnir E, Kappler J, Marrack P. The open reading frames in the 3' long terminal repeats of several mouse mammary tumor virus integrants encode V β 3-specific superantigen. *J Exp Med* 1992; 175: 41-7.
 25. Arroyo J, Winchester E, McLellan BS, Huber BT. Shared promoter elements between a viral superantigen and the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain. *J Virol* 1997; 71: 1237-45.
 26. Luther S, Shakhov AN, Xenarios I, Haga S, Imai S, Acha-Orbea. New infectious mammary tumor virus superantigen with V β specificity identical to bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB). *Eur J Immunol* 1994; 24: 1757-64.
 27. Brand-Carlson C, Butel JS, Wheeler D. Phylogenetic and structural analysis of MMTV LTR ORF sequences of exogenous and endogenous origins. *Virology* 1993; 185: 171-85.
 28. Bittner JJ. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 1936; 84: 162-9.
 29. Acha-Orbea H and MacDonald HR. Superantigens of mouse mammary tumor virus. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 459-86.
 30. Varmus HE. Recent evidence of oncogenesis by insertional mutagenesis. *Cancer Surv* 1982; 1: 309.
 31. Kordon E, Smith GH, Callaghan R, Gallaham DA. J. A novel non-mouse mammary tumor virus activation of the int-3 gene in a spontaneous mouse mammary tumor. *J Virol* 1996; 69: 8066-9.
 32. Callhan R. MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors: their potential relevance to human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 39: 33-44.
 33. Held W, Acha-Orbea H, MacDonald HR, Waanders GA. Superantigens and retroviral infection: insights from mouse mammary tumor virus. *Immunol Today* 1994; 15: 184-90.
 34. Held W, Waanders G, Shakhov AN, Scarpellino L, Acha-Orbea H, MacDonald HR. Superantigen-induced immune stimulation amplifies mouse mammary tumor virus infection and allows virus transmission. *Cell* 74: 529-40.
 35. Chervonsky AV, Xu J, Barlow AK, Khery M, Flavell RA, Janeway CA Jr. Direct physical interaction involving CD40 ligand on T cells and CD40 on B cells is required to propagate MMTV. *Immunity* 1995; 3: 139-46.
 36. Webb SR, Sprent J. T-cell responses and tolerance to Mls-1^a determinants. *Immunol Rev* 1989; 107: 141: 58.
 37. Nusse R and Varmus HE. Wnt Genes. *Cell* 1992; 69: 1073-87.
 38. Golovkina TV, Chervonsky A, Dudley JP, Ross SR. Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* 1992; 69: 637-45.
 39. Goldman A, Buggiano V, Franco M, Deroche A, Nepomnashy I, Piazzon I. A maternally-inherited alteration in the T cell repertoire of BALB/c mice. *Medicina (Buenos Aires)* 1995; 55: 45-8.

40. Nepomnaschy I, Buggiano V, Goldman A, Piazzon I. Mecanismos coevolutivos entre los retrovirus y sus huéspedes. El modelo del tumor mamario murino. *Medicina (Buenos Aires)* 1996; 56: 235-44.
41. Golovkina T, Piazzon I, Nepomnaschy I, Buggiano V, de Olano Vela M, Ross SR. Generation of a tumorigenic milk-borne mouse mammary tumor virus by recombination between endogenous and exogenous viruses. *J Virol* 1997; 71: 3895-903.
42. Piazzon I, Goldman A, Torello S, Nepomnaschy I, Deroche A, Dran G. Transmission of an Mls-1a-like superantigen to BALB/c mice by foster-nursing on F1 Mls-1bxa mothers. *J Immunol* 1994; 153: 1553-62.
43. Goldman A, Buggiano V, Torello S, Nepomnaschy I, Deroche A, Piazzon I. Longlasting functional unresponsiveness induced by a milk transmitted Mls-1^a-like superantigen. *Immunol Lett* 1995; 48: 81-7.
44. Golovkina TV, Jaffe AB, Ross SR. Coexpression of exogenous and endogenous mouse mammary tumor virus RNA in vivo results in viral recombination and broadens the virus host range. *J Virol* 1994; 68: 5019-25.
45. Temin HM. Reverse transcription in the eukaryotic genome: retroviruses, pararetroviruses, retro transposons, and retotranscripts. *Mol Biol Evol* 1985; 6: 455-68.
46. Temin HM. *in: The Retroviridae*, JA Levy ed, New York: Plenum, 1992; 1-18.

La ciencia es precisamente lo más democrático que hay. Está abierta a todos los que digan la verdad. Los trabajos y los descubrimientos más arduos de un sabio, pasan a ser caudal de todo el mundo, sin que él obtenga casi nunca lucro o recompensa.

Bernardo A. Houssay (1887-1971)

Ciencia y Técnica 1959; 127: 183-193