

## SUPERANTIGENOS E INFECCIONES RETROVIRALES

## AUMENTO DE LA TUMORIGENICIDAD MAMARIA POR RECOMBINACION ENTRE VIRUS MMTV EXOGENOS Y ENDOGENOS

IRENE NEPOMNASCHY\*, VALERIA BUGGIANO\*\*, ALEJANDRA GOLDMAN\*\*, ADRIANA DEROCHE\*,  
P. BEKINSCHTEIN\*\*\*, PAULA BERGUER, ISABEL PIAZZON\*

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

**Resumen** En este trabajo se describen los efectos biológicos de nuevas variantes virales de MMTV exógenos. Una de ellas denominada BALB14 está presente en la cepa BALB/c e induce un bajo porcentaje de adenocarcinomas mamarios. Otra de ellas, (MMTV-7) se originó por recombinación entre BALB14 y transcriptos derivados del provirus endógeno Mtv-7. El desarrollo de una línea de ratones BALB/c infectada con ambas variantes virales a través del amamantamiento con una nodriza F1 (BALB/cxAKR) en la que surge el MMTV-7, permitió demostrar que el virus recombinante —que expresa el SAg del provirus endógeno— es amplificado en los huéspedes BALB/c y resulta en ellos altamente tumorigénico. Se discute el rol de la adquisición de superantígenos estimuladores en la amplificación del virus recombinante. Los resultados obtenidos permiten hipotetizar que la presencia en el genoma del ratón de provirus endógenos no productivos —considerada hasta ahora como protectora frente a la infección con virus MMTV exógenos— ofrecería además ventajas selectivas para el virus al aumentar su variabilidad poblacional, permitiendo así la ampliación del rango de huéspedes susceptibles y la expansión de variantes con alta patogenicidad.

**Palabras clave:** superantígenos, virus del tumor de mama murino, cáncer de mama en ratón

Los virus exógenos del tumor mamario murino (MMTV) son retrovirus de tipo B que se transmiten a través de la leche e inducen adenocarcinomas mamarios en su huésped<sup>1</sup>. Además de los virus MMTV exógenos, existen numerosos virus endógenos, la mayoría de los cuales no son patógenos y no producen partículas virales, debido a la presencia de mutaciones en sus genes regulatorios o estructurales<sup>2</sup>. Tanto los

MMTV exógenos como los Mtv endógenos poseen un marco de lectura abierto (ORF) en su LTR que codifica para la expresión de un superantígeno (SAg)<sup>3,4</sup>. A diferencia de los antígenos convencionales, los superantígenos son capaces de estimular un alto número de células T, ya que para su reconocimiento sólo es necesaria la interacción con un elemento variable beta (V $\beta$ ) determinado del receptor T, independientemente de la cadena alfa que éste posee<sup>5</sup>. Las variantes de los virus MMTV codifican para distintos SAg, dependiendo su especificidad de variaciones en la secuencia aminoacídica en la región carboxiterminal del mismo<sup>3</sup>. Estas diferencias determinan que los distintos virus MMTV exógenos y endógenos interaccionen con clones T portadores de cadenas V $\beta$  distintas. Los SAg juegan un rol

Recibido: 26-II-1997

Aceptado: 23-III-1997

\* Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET

\*\* Becario del CONICET

\*\*\* Becario de FUNDALEU

**Dirección postal:** Dra. Irene Nepomnaschy, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, P. Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina



crítico en el ciclo de vida de los MMTV infecciosos<sup>6</sup>. Una vez infectado el recién nacido mediante el amamantamiento, sus linfocitos, especialmente las células B, son el primer blanco de este virus. Los linfocitos B infectados expresan el SAg en la superficie celular, asociado a moléculas de antígenos mayores de histocompatibilidad de clase 2, pero fuera del hueco en el que se presenta el antígeno convencional. La expresión del superantígeno, estimula la proliferación de las células T que posean cadenas V $\beta$  reactivas al mismo y como resultado de esta proliferación, otras células, fundamentalmente las B, proliferan también. Como ocurre con otros retrovirus el MMTV infecta preferentemente células activadas, por lo que estos eventos permiten la amplificación viral y el posterior traslado del virus a la glándula mamaria, su órgano blanco final. Las células T reactivas al SAg son luego deletionadas en forma progresiva. La transmisión *in vivo* de virus MMTV que no expresan SAgS funcionales o que infectan huéspedes que no poseen clones T reactivos a su SAg, se ve severamente impedida y suele perderse en pocas generaciones. Se ha postulado recientemente que la posesión de virus endógenos del tumor mamario murino protege al huésped de infecciones con virus MMTV exógenos que expresen SAgS con reactividad cruzada<sup>6</sup>. Este efecto se atribuye al hecho de que la presencia del SAg expresado por el virus endógeno induce la deletión intratímica perinatal de los clones T reactivos. Al nacimiento el número de estos clones en la periferia es casi nulo. El virus infeccioso se vería así privado de la amplificación derivada del reconocimiento T del SAg y en consecuencia la infección se vería severamente perturbada.

Los virus MMTV causan carcinomas mamarios si bien no codifican para un oncogen. La tumorigénesis mamaria ocurre como consecuencia de la inserción de DNA proviral cerca —o dentro— de protooncogenes celulares como el *int-1*, *int-2*, *int-3*, *int-6* etc. activándolos o induciendo la aparición de productos truncados de los mismos<sup>7, 8</sup>.

El estudio de estos virus reviste actualmente gran interés no sólo debido a su capacidad para expresar superantígenos sino también a la luz de trabajos recientes en los que se involucra la participación de secuencias génicas altamente homólogas a estos retrovirus en la carcinogénesis mamaria en el hombre<sup>9, 10</sup>.

En trabajos anteriores demostramos que los ratones de la cepa BALB/c de nuestro bioterio estaban infectados con dos nuevas variantes de virus MMTV exógenos, descritos recientemente en nuestro laboratorio, denominados BALB14 y BALB2, los que inducen la deletión de clones T V $\beta$ 14<sup>+</sup> y V $\beta$ 2<sup>+</sup> respectivamente y poseen una capacidad tumorigénica baja<sup>11</sup>. El virus BALB14 recombina con secuencias provirales endógenas no productivas e incapaces de expresarse en mama, dando lugar a una variante recombinante que codifica para el SAg del provirus endógeno<sup>12</sup>. A lo largo de este trabajo se demuestra que dicho virus recombinante resulta fuertemente amplificado cuando se transmite por leche a ratones poseedores de clones T reactivos al SAg adquirido, siendo en ellos significativamente más patogénico que la variante parental que le diera origen.

El virus exógeno MMTV BALB14 representa una variante infecciosa que posee interesantes diferencias con otras variantes de MMTV descritas. Es capaz de inducir la deletión progresiva de los clones T CD4<sup>+</sup> V $\beta$ 14<sup>+</sup> al igual que el virus MMTV de C3H. La región carboxiterminal del SAg presenta sin embargo algunas variaciones en su secuencia aminoacídica. Por otra parte —a diferencia del MMTV C3H— induce tumores de mama dependientes de la preñez y con una incidencia significativamente menor, que no supera el 35% en huéspedes BALB/c (Tabla 1).

Cuando el MMTV BALB14 infecta híbridos F1 (BALB/cxAKR) es capaz de recombinar con el provirus endógeno no productivo *Mtv-7*, dando origen a un virus infeccioso que denominamos MMTV-7<sup>12</sup>. El amamantamiento de ratones BALB/c con estas nodrizas F1 induce la deletión clonal progresiva de células T CD4<sup>+</sup> V $\beta$ 6<sup>+</sup> y 8.1<sup>+</sup> en el 50% de la cría<sup>13</sup> y la anergia clonal temprana de estas mismas células en prácticamente el 100% de los ratones<sup>14</sup>, lo que demostró que estas nodrizas F1 eran capaces de transmitir por leche un SAg *Mtv-7-like*.

Desarrollamos una línea de ratones BALB/c (línea A) a partir de una hembra amamantada por una nodriza F1 (BALB/cxAKR) infectada con los virus BALB2 y BALB14. La hembra fundadora de esta sublínea mostró una deletión temprana de clones T V $\beta$ 14<sup>+</sup><sup>14</sup> y V $\beta$ 2<sup>+</sup>; a los 6 meses de vida comenzó a deletionar células T CD4<sup>+</sup> y V $\beta$ 6<sup>+</sup> en forma progresiva. Luego de 3 generaciones, la



TABLA 1.— Incidencia de adenocarcinomas mamarios en ratones BALB/c de distintas líneas infectadas con los MMTV, BALB2, BALB14 y MMTV-7.

MMTV	deleción de clones CD4 <sup>+</sup>			% tumores <sup>a</sup>	
	Vβ2 <sup>+</sup>	Vβ14 <sup>+</sup>	Vβ6 <sup>+</sup>	vírgenes	múltiparas
BALB14	-	+	-	5 (3/60) <sup>b</sup>	29 (29/100)
BALB2	+	-	-	4 (3/75)	32 (32/100)
BALB2					
BALB14	+	+	-	4,7 (3/64)	34,5 (77/223)
BALB2					
BALB14					
MMTV-7	+	+	+	6 (2/33)	84,7 (50/59)*
—	-	-	-	2 (1/50)	3,3 (1/30)

<sup>a</sup> incidencia de adenocarcinomas de mama al año de vida, diagnosticado mediante estudios histológicos.

<sup>b</sup> número de ratones con tumor/número de ratones total.

\*  $p < 0,001$  respecto de todos los grupos (Test de Fisher).

deleción de los clones Vβ6<sup>+</sup> podía detectarse muy tempranamente en el 100% de los animales: entre los 15 y 20 días de vida el porcentaje de estos clones en sangre periférica no superó el 3,2% (rango: 2,3%-3,2%,  $n=40$ ). Además, pudo observarse que los clones T CD4<sup>+</sup>Vβ6<sup>+</sup> eran delecionados más rápidamente que los clones T CD4<sup>+</sup>Vβ14<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>Vβ2<sup>+</sup>. En la Figura 1 se muestra un ejemplo representativo de la cinética de deleción observada en ganglios linfáticos. En trabajos realizados en colaboración con la Dra. S. Ross<sup>12</sup> se secuenció el ORF del virus recombinante MMTV-7 presente en la leche de las hembras de la sublínea A. Se determinó que la región hipervariable del gen *sag* del virus recombinante derivaba del Mtv-7 y la secuencia LTR upstream de dicha región del virus BALB14. Utilizando ensayos de protección de RNasa T1 demostramos que 10 de 11 adenocarcinomas mamarios provenientes de hembras múltiparas de la línea A expresaban el virus MMTV-7 recombinante, siendo éste el único presente en 7 de éstos<sup>12</sup>.

Investigamos entonces la incidencia de adenocarcinomas mamarios en hembras múltiparas y vírgenes de la línea A. Las hembras múltiparas mostraron una incidencia tumoral del 85%, la que resultó significativamente mayor a la observada tanto en ratones BALB/c infectados con el MMTV BALB14 cuanto en aquellos infectados con los

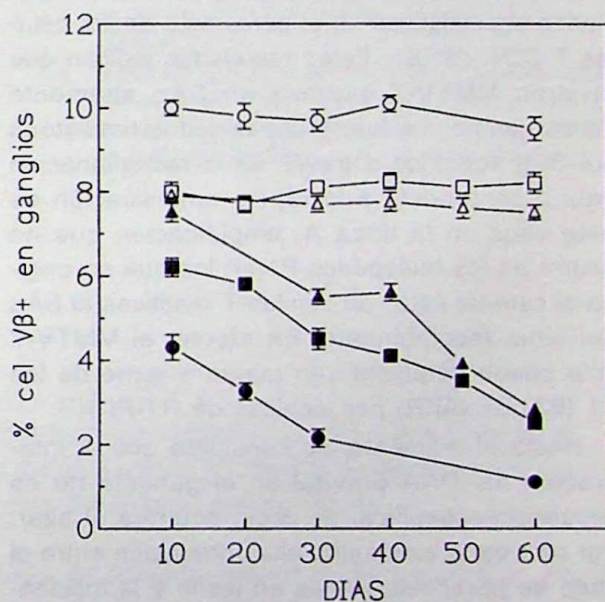


Fig. 1.— Células de ganglios linfáticos inguinales de hembras de la línea A (símbolos llenos) y de BALB/c libres de virus (símbolos vacíos) a diferentes días luego del nacimiento fueron tratadas con anticuerpos monoclonales anti-Vβ6 (●), anti-Vβ14 (■) o anti-Vβ2 (▲) fluoresceinados y anti-CD4 acoplado a ficoeritrina y analizadas por citometría de flujo. La Figura es un ejemplo representativo de 4 experimentos. Cada punto de las curvas representa el valor promedio de 3-4 animales testeados individualmente. Resultados similares fueron obtenidos con machos.

MMTV BALB14 y BALB2 (Tabla 1). El importante incremento en la incidencia tumoral detectado en la línea A, junto con la observación de que la mayoría de estos tumores expresa el MMTV-7 en



forma exclusiva, sugiere fuertemente que la capacidad tumorigénica del virus recombinante es mayor que la del virus parental.

Investigamos finalmente la capacidad estimuladora del virus recombinante presente en la leche de hembras de la línea A. Para esto, inoculamos leche de hembras de la línea A en la almohadilla plantar de ratones BALB/c libres de virus. Cuatro días más tarde, se investigó el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> Vβ14<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>Vβ6<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>Vβ10b<sup>+</sup> (control de especificidad) en los ganglios poplíteos drenantes del inóculo. Los resultados obtenidos mostraron un importante aumento en el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup>Vβ6<sup>+</sup> ( $25,8 \pm 0,1\%$ , n=3 vs  $10,2 \pm 0,12\%$ , n=3 en ratones inoculados con leche de BALB/c libres de virus). El aumento en el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup>Vβ14<sup>+</sup> fue menos marcado:  $13,7 \pm 0,16$ , n = 3 vs  $9,2 \pm 0,10$ , n=3. No se observaron alteraciones significativas en el porcentaje de las células T CD4<sup>+</sup>Vβ10b<sup>+</sup>. Estos resultados indican que el virus MMTV-7 expresa un SAg altamente estimulador. La fuerte capacidad estimuladora del SAg adquirido a través de la recombinación habría contribuido a la rápida amplificación de este virus en la línea A, amplificación que no ocurre en los huéspedes F1 en los que se origina al carecer éstos de células T reactivas al SAg del virus recombinante. En efecto, el MMTV-7 sólo puede detectarse en mama o leche de los F1 (BALB/cxAKR) por técnicas de RT-PCR<sup>12</sup>.

Hasta el momento, se considera que la integración del DNA proviral en el genoma no es secuencia-específica, es decir, ocurriría al azar. Por otra parte existe una alta correlación entre el título de partículas virales en leche y la incidencia de tumores. Si bien no es posible descartar otros mecanismos, podría hipotetizarse que los virus MMTV que expresen un superantígeno fuertemente estimulador y por lo tanto induzcan una importante proliferación de células T con el consiguiente aumento de la carga viral, serían seleccionados favorablemente en huéspedes susceptibles, aumentando así la probabilidad de inducir carcinomas mamarios.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la recombinación entre un MMTV exógeno con patogenicidad moderada y transcritos de virus endógenos no productivos e incapaces de expresarse en mama, puede originar variantes virales que muestran una alta tumori-

genicidad cuando infectan huéspedes susceptibles. Se ha postulado que la integración de provirus Mtv endógenos en el genoma del ratón constituiría una ventaja selectiva para la población ya que protegería a los individuos de la infección con virus MMTV exógenos que expresen SAGs con reactividad cruzada<sup>6</sup>. La detección de variantes recombinantes como las descritas en este trabajo sugiere la existencia de una complejidad mayor aún en la interacción entre virus y huésped. La adquisición de virus endógenos no sólo ofrecería ventajas selectivas para el huésped sino también para el virus, al aumentar la variabilidad poblacional del patógeno, permitiendo así la amplificación del rango de huéspedes susceptibles y la expansión de variantes con alta patogenicidad.

**Agradecimientos:** Agradecemos a la Dra. Christiane Dosne Pasqualini la discusión de los resultados obtenidos; a Juan José Portaluppi, Antonio Morales y al Dr. Fernando Benavidez por su excelente asistencia técnica. A la Fundación de la Hemofilia por haber facilitado el uso del citómetro de flujo. Este trabajo se llevó a cabo con subsidios del CONICET, de la Fundación Roemmers y de la Fundación Antorchas.

## Summary

*Superantigens and retroviral infections. Increase of mammary tumorigenicity due to recombination between exogenous and endogenous MMTV viruses*

A number of milk-borne exogenous mouse mammary tumor viruses (MMTV) infect mice shortly after birth and, when expressed, produce superantigens. Herein we describe the biological effects of new variants of exogenous MMTV: one of them (BALB14) present in BALB/c mice and showing a low ability to induce mammary tumors, and the other (MMTV-7) being the result of recombination between the BALB14 and the Mtv-7 endogenous provirus. The recombinant virus which has the SAg-specificity of Mtv-7 was amplified in BALB/c mice this fact correlating with a high incidence of mammary tumors. The role of strong SAGs in the mechanism by which the recombinant virus increases its title in a susceptible host is discussed. The results obtained suggest that the presence of non-productive endogenous proviruses —considered as conferring a selective advantage to the mouse population by protecting it from infection with exogenous



MMTV— should also be advantageous to the pathogen by increasing its variability, thus broadening the host range and allowing the expansion of highly tumorigenic variants.

## Bibliografía

1. Bittner JJ. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 1936; 84: 162-8.
2. Nusse R, Varmus HE. Wnt genes. *Cell* 1992; 69: 1063-5.
3. 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: 203-6.
4. Acha-Orbea H, Shakhov AN, Scarpellino I, et al. Clonal Deletion of V $\beta$ 14-bearing T Cells in Mice Transgenic for Mammary Tumor Virus. *Nature* 1991; 350: 207-10.
5. Happ MP, Woodland DL, Palmer E. A third T cell receptor V $\beta$  gene encodes reactivity to Mls-1a gene products. *Proc Natl Acad Sc* 1989; 86: 6293-8.
6. Golovkina TV, Chervonsky A, Dudley JP, Ross Sr. Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* 1992; 69: 637-45.
7. Varmus HE. Recent evidence of oncogenesis by insertional mutagenesis. *Cancer Surv* 1982; 1: 309-16.
8. Callahan R. MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors: their potential relevance to human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 39: 33-44.
9. Wang Y, Holland JF, Bleiweiss IJ, et al. Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 5173-9.
10. Ono M, Yasunaga T, Miyata T, Ushikubo H. Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol* 1986; 60: 589-94.
11. Goldman A, Buggiano V, Franco M, Deroche A, Nepomnaschy I, Piazzon I. A maternally-inherited alteration in the T cell repertoire of BALB/c mice. *Medicina (Buenos Aires)* 1995; 55: 45-7.
12. Golovkina TV, Piazzon I, Nepomnaschy I, Buggiano V, Olano Vela M, Ross S. *J Virology* 1997; 71: 3895-903.
13. 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.
14. Goldman A, Buggiano V, Torello S, Nepomnaschy I, Deroche A, Piazzon I. Long-lasting functional unresponsiveness induced by a milk transmitted Mls-1a-like superantigen. *Immunol Lett* 1995; 48: 81-9.

- - -

*Though a little one, the master-word looms large in meaning. It is the open sesame to every portal, the great equalizer in the world, the true philosopher's stone, which transmutes all the base metal of humanity into gold... And the master-word is Work.*

A pesar de su pequeñez, la palabra-maestra se proyecta grande en su significado. Es el abre sésamo de todos los portales, el gran estabilizador del mundo, la verdadera piedra filosofal, que transforma toda la escoria de la humanidad en oro... Y esa palabra-maestra es *Trabajo*.

Sir William Osler (1849-1919)

*Aequanimitas: The Master-Word in Medicine.*