

Tesis de Posgrado

Transmisión de un superantígeno Mls-la Like a través del amamantamiento

Goldman, Alejandra

1994

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

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

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

Cita tipo APA:

Goldman, Alejandra. (1994). Transmisión de un superantígeno Mls-la Like a través del amamantamiento. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2657_Goldman.pdf

Cita tipo Chicago:

Goldman, Alejandra. "Transmisión de un superantígeno Mls-la Like a través del amamantamiento". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2657_Goldman.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TRANSMISION DE UN SUPERANTIGENO MIs-1^a-LIKE
A TRAVES DEL AMAMANTAMIENTO

Autora: ALEJANDRA GOLDMAN

Directora: Dra. M. ISABEL PIAZZON

lugar de trabajo:
División Medicina Experimental
Instituto de Investigaciones Hematológicas
ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

Tesis presentada para optar al título de:
Dra. en Ciencias Biológicas

BUENOS AIRES 1994

tesis
2657
22/8

AGRADECIMIENTOS

Al cabo de todos estos años son muchas las personas a quienes me gustaría agradecer.

A la Dra. Isabel Piazzon, Directora de esta Tesis, porque siempre estuvo al lado mío, codo a codo y dispuesta a escucharme;

A Irene Nepomnaschy y Adriana Déroche por su afecto y ganas de compartir todo lo que me sucedió a lo largo de estos años; a Sandra Torello, porque además de ser la mejor compañera de trabajo, terminó siendo una gran amiga

A todo el puro grupo por el cariño y en especial, por la infinita paciencia que me tuvieron en esta última etapa de la Tesis.

A la Dra. Christiane Dosne Pasqualini, por haber permitido mi ingreso a la División Medicina Experimental, y por la confianza que depositó en mí.

A la Colo, simplemente por ser mi amiga, y a cada uno de mis compañeros de trabajo, por el apoyo que me brindaron siempre.

A Juan Portaluppi y Antonio Morales, por su cariño e invaluable ayuda técnica.

A la gente del primero, Mirta, Marina, Jorge, Mónica, siempre dispuestos a ayudarme en cualquier cosa que necesitara.

Al personal técnico y de apoyo de la División Medicina Experimental, quienes con

su tarea permitieron la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, que al otorgarme sus becas posibilitaron la realización de esta Tesis.

A mis amigos de la Facu -muchos de ellos esparcidos a lo largo del mundo-, que también, de alguna manera, hicieron posible que yo llegara a este momento.

Y muy especialmente a Javi, por su apoyo constante, su tremenda paciencia y la última noche en vela.

INTRODUCCION	1
1. EL RECEPTOR T	2
1.a. Estructura y expresión de los polipéptidos del receptor T	2
1.b. Organización genética y diversidad	4
2. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (CMH)	7
2.a. Organización genética	8
2.b. Moléculas del CMH	10
Estructura primaria y secundaria	10
Estructura terciaria y cuaternaria	12
3. SUPERANTIGENOS	15
3.a. Superantígenos endógenos y exógenos	17
Superantígenos endógenos	17
Superantígenos exógenos	18
3.b. Superantígenos codificados por retrovirus	19
3.c. Presentación de los superantígenos	22
Presentación de superantígenos endógenos	22
Presentación de superantígenos exógenos	24
3.d. Respuesta T a superantígenos	27
3.d.1. Reconocimiento de superantígenos por células T CD4+ y CD8-	27
3.d.2. Regiones del TCR implicadas en el reconocimiento de superantígenos	29
3.e. Superantígenos endógenos y repertorio T	30
3.f. Superantígenos en enfermedades autoinmunes	32
4. MECANISMOS DE TOLERANCIA	33
4.a. Selección del repertorio T	33
4.a.1. Maduración de los linfocitos T	33
4.a.2. Selección positiva	34
4.a.3. Selección negativa	37
Delección clonal intratímica	38
Anergia intratímica	44
4.b. Mecanismos de tolerancia periférica	46
Anergia periférica	46
Delección clonal periférica	48
Supresión T	50
5. MECANISMOS DE SUPRESION DE ANERGLIA	52
Estado de diferenciación	53
Afinidad/avidez	53
Segunda señal	54
6. ANTECEDENTES	59

OBJETIVO Y MODELO EXPERIMENTAL	61
MATERIALES Y METODOS	62
1. ANIMALES	62
1.a. Cepas utilizadas	62
1.b. Amamentamiento con nodrizas F1	62
2. ANTICUERPOS MONOCLONALES	63
3. SUSPENSIONES CELULARES	63
4. ANALISIS CITOFUOROMETRICO	64
5. RECOLECCION DE LECHE Y DETECCION DE VIRUS	65
6. REACCIONES DE INJERTO CONTRA HUESPED (GvH)	65
7. REACCIONES DE CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS ALOGENEICO (CMLA)	66
8. ENSAYOS DE PROLIFERACION T IN VITRO FRENTE ANTIGENOS CONVENCIONALES	67
8.a. Inmunización	67
8.b. Ensayos de proliferación T	68
9. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD T	68
10. TRATAMIENTO DE LAS SUSPECIONES CELULARES CON ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CD8	70
10.a. Ensayos de proliferación	70
11. PRESENTACION DE LOS RESULTADOS	71
12. ESTADISTICA	71
RESULTADOS	180
1. EFECTO DEL AMAMANTAMIENTO DE RATONES BALB/c (Mls-1 ^b) CON NODRIZAS F1(BALB/cxAKR/J) Y F1(BALB/cxDBA/2), PORTADORAS DE SUPERANTIGENOS Mls-1 ^a SOBRE EL REPERTORIO T	72
1.a. Frecuencia de clones T VB6+ en ganglio y timo de ratones BALB/c de nuestra colonia amantados normalmente	72

1.b. Frecuencia de clones T V β 6+ en ganglios linfáticos de ratones BALB/c amamantados con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1 ^a	75
1.c. Frecuencia de linfocitos T CD4+V β 6+ y CD8+V β 6+ en ganglios linfáticos de ratones BALB/c amamantados con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1 ^a	92
1.d. Frecuencia de clones T V β 8.1+ en ganglios linfáticos de ratones BALB/c amamantados con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1 ^a	96
1.e. Frecuencia de timocitos V β 6+ en ratones BALB/c amamantados por nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1 ^a	96
1.f. Presencia de virus MMTV exógeno en la leche de las nodrizas F1(BALB/cxAKR/J)	102
2. EFECTO DEL AMAMANTAMIENTO CON NODRIZAS PORTADORAS DE SUPERANTIGENOS Mls-1^a SOBRE LA REACTIVIDAD T DE LA CRIA	106
2.a. Reactividad T frente a antígenos de histocompatibilidad expresados por la nodriza	108
2.a.1. Reacciones locales de injerto contra huésped (GvH)	108
2.a.2. Cultivo mixto de linfocitos	113
2.a.3. Reacciones de citotoxicidad T	119
2.b. Reactividad T frente a antígenos convencionales	121
2.c. Inactivación funcional de células T CD4+	123
2.c.1. Proliferación de células T CD4+ frente a anticuerpos monoclonales anti-V β 6	127
2.c.2. Proliferación de células T CD4+ frente a AKR/J y DBA/2	127
DISCUSION	132
RESUMEN	151
REFERENCIAS	154
ABREVIATURAS	170

El timo es el responsable de generar las células T maduras funcionales con un set diverso de receptores T (TCRs) para el reconocimiento de antígenos extraños. Estos antígenos son reconocidos como péptidos asociados a las moléculas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). El CMH es un grupo de genes que codifican para moléculas cuya función es unir péptidos extraños para ser presentados a los linfocitos T. El TCR está compuesto por un heterodímero ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$). Cada heterodímero está unido no covalentemente al complejo CD3 compuesto por cinco moléculas proteicas involucradas en la transducción de señales. Como parte del complejo TCR también participan otras moléculas accesorias, CD4 y CD8, que son capaces de aumentar la avidéz del receptor por el péptido extraño, al unirse directamente a porciones no polimórficas de las moléculas codificadas por el CMH (antígenos mayores de histocompatibilidad, AMH).

Dentro del timo tienen lugar eventos selectivos que dan forma al repertorio final de los TCR de tal manera que, una vez en la periferia, sólo serán reconocidos aquellos péptidos no propios unidos a AMH propios.

Este repertorio, seleccionado positivamente para reconocer antígenos extraños asociados a AMH propios, incluirá en alguna etapa de la ontogenia células con receptores capaces de reconocer antígenos propios. Se han propuesto tres mecanismos para explicar el logro y mantenimiento de la tolerancia frente a lo propio: la delección clonal, o eliminación de estos clones T autorreactivos; la anergia clonal, o falta de respuesta de clones T autorreactivos; y la supresión específica de dichos clones T autorreactivos por otras células T.

1. EL RECEPTOR T

La principal característica común a todos los linfocitos T maduros es la expresión del receptor T (TCR), una glicoproteína capaz de unir antígenos y AMH específicamente.

1.a. Estructura y expresión de los polipéptidos del receptor T (TCR)

Se pueden distinguir dos isotipos de TCR: α/β y γ/δ . La mayoría de los linfocitos T expresan el TCR α/β y son específicos para los complejos formados por los péptidos derivados del procesamiento antigénico y las moléculas de histocompatibilidad (Ag/AMH). Una proporción menor de los linfocitos (entre el 1 y el 10% de los linfocitos T periféricos) expresan el TCR γ/δ ; su rol fisiológico no está aún totalmente comprendido (1). En ambos isotipos los heterodímeros (α/β o γ/δ) se hallan unidos no covalentemente al complejo CD3 no polimórfico, compuesto por cinco polipéptidos integrales de membrana (γ , δ , ϵ , ζ y p21). Este complejo interviene en la transducción de señales (2).

Las diferentes especificidades del TCR son creadas por recombinación somática de un gran número de elementos variables durante la maduración de las células T en el timo.

Los cuatro polipéptidos ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) que forman los dos tipos de heterodímeros (α/β y γ/δ) son similares entre sí. Dos de ellos, β y δ son consecuencia de la unión de segmentos V, D, J y C, y los otros dos, α y γ , de la unión de segmentos V, J y C. Los elementos V, D, y J poseen una gran homología con sus contrapartes en las inmunoglobulinas, a pesar de

que las regiones J son un poco más largas (18-20 contra 13-18 residuos). Aunque el número exacto de regiones hipervariables es controvertido (3-6), la diversidad es muy evidente en las regiones equivalentes a las tres regiones hipervariables clásicas de las inmunoglobulinas. En las inmunoglobulinas, estos aminoácidos forman los puntos de contacto principales con el antígeno y por lo tanto son referidas como regiones determinantes complementarias (CDRs) (7-10). Como en el caso de las inmunoglobulinas, las regiones CDR1 y 2 en el TCR están codificadas dentro del gen V mismo, mientras que la región CDR3 está formada por la unión de un elemento V y uno J (en TCR α o γ), o por V, D, y J (en TCR β y δ). Las CDR1 y CDR2 interaccionan probablemente con las dos hélices α de las moléculas de histocompatibilidad donde se encaja el péptido antigénico; la CDR3 interacciona preferentemente con el propio péptido antigénico (11). Se discute la existencia de un cuarto CDR localizado en la región V de la cadena β .

Las porciones constantes del TCR tienen entre 138 y 179 aminoácidos de largo, y son divisibles en cuatro regiones funcionales que se encuentran generalmente en exones separados. La primera de éstas la constituye un dominio similar a la región C de las inmunoglobulinas, de 90 a 100 aminoácidos; contiene dos residuos cisteína que probablemente unan dos láminas β plegadas en la forma característica de las inmunoglobulinas. Los cuatro polipéptidos ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) tienen regiones hidrofóbicas con un residuo de lisina altamente conservado en la mitad de la región. La lisina le aporta carga positiva la cual se postula de importancia en las interacciones con los polipéptidos CD3, cuatro de los cuales tienen una carga negativa conservada (Asp o Glu) en sus regiones de transmembrana (12-13).

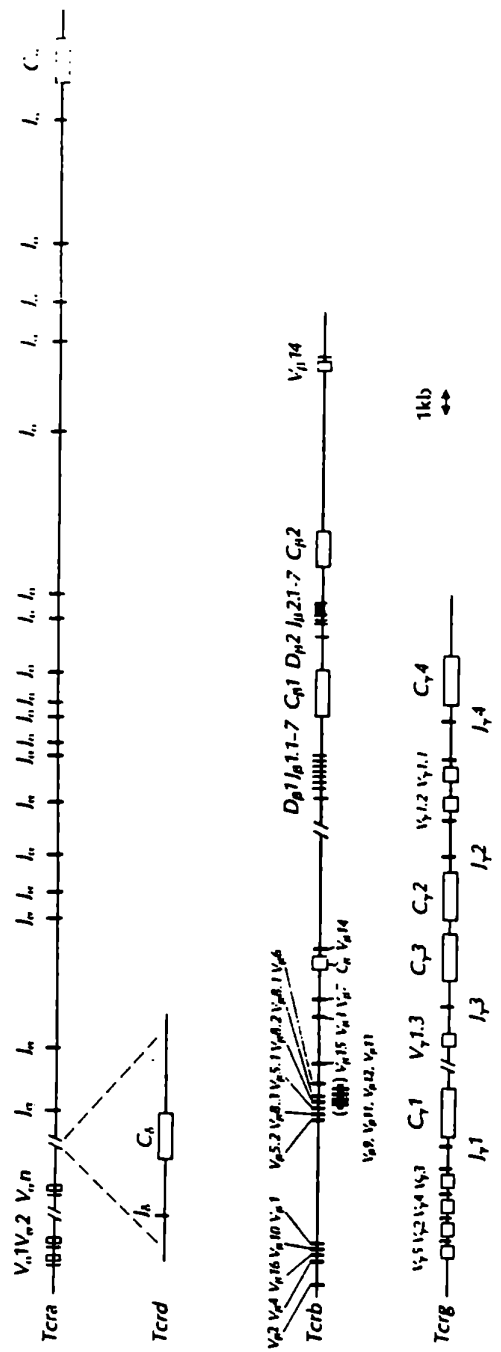
Los genes que codifican el TCR se rearreglan y expresan en el timo durante los estadios más tempranos de la diferenciación T. Los genes de las cadenas β, γ y δ son

rearrreglados primero, seguidos por los genes que codifican para la cadena α (14-18). La aparición de los heterodímeros γ/δ precede por uno o dos días en la ontogenia fetal a la expresión de los α/β (15).

1.b. Organización genética y diversidad

Como las inmunoglobulinas, los genes del TCR están divididos en segmentos codificantes intercambiables, esparcidos a lo largo del ADN (Esquema 1). Los segmentos V, D (en el caso de β y δ) y J se unen para formar un dominio variable codificante que se encuentra adyacente a una región C particular. Los rearrreglos parecen estar mediados por secuencias similares a aquellas que controlan el rearrreglo de los segmentos génicos de las inmunoglobulinas (secuencias de heptámeros y nonámeros espaciadas por 12 ó 23 nucleótidos) (19,20). El proceso de recombinación de los elementos génicos incluye eventos de looping-out y delección (21-24) e inversión (25,26), dependiendo de la orientación de las secuencias que van a ser unidas. El agregado al azar de nucleótidos entre los segmentos génicos V, D, y J (adición en la región N) crea una diversidad adicional.

El locus TCR β fue el primer locus extenso de receptor mapeado. En la mayoría de las cepas de ratones abarca de 700 a 800 kilobases (27,28). Dos regiones C casi idénticas - funcionalmente equivalentes- se encuentran dispuestas en tandem con un elemento D y un cluster de seis elementos J hacia el extremo 5' de cada región C (29). Un elemento V β se localiza hacia el extremo 3' de los elementos DJC y se rearrregla por inversión (25). Las otras 20 a 30 (4,30) regiones V β están en el extremo 5', y parecen rearrreglarse por looping-out y delección de la secuencia de ADN interviniente (23,24,27,28). Existen cepas de ratones que



ESQUEMA 1

Organización de los genes del TCR.

tienen delecionada una extensa fracción (aproximadamente 10) de los segmentos VB (31) o uno de los clusters JB (32,33) y sin embargo parecen ser inmunológicamente normales.

El locus TCR γ es menos diverso, con tres loci funcionales $J\gamma$ - $C\gamma$ diferentes en la mayor parte de las cepas de ratones (34,35). Hasta el momento se han identificado sólo siete segmentos génicos $V\gamma$ (34-37). No se sabe si las distintas secuencias $C\gamma$ son funcionalmente equivalentes.

El locus TCR α , δ es único en el sentido de que muchos de los segmentos codificantes del TCR δ están localizados entre los segmentos V y J del gen α (38) y están delecionados *en la mayoría* de las líneas celulares T que portan el TCR α/β (39). A pesar de que hay alguna superposición en el uso de la región V, los segmentos génicos V usados para las cadenas α y δ son muy distintos (38). Se han identificado entre 75 y 100 regiones V para la cadena α del TCR (6,29), pero sólo alrededor de 10 segmentos V para la cadena δ , y estos últimos parecen eliminarse entre el estado fetal y el adulto (38). A pesar de que un número de regiones codificantes $V\delta$ fetales pueden estar localizadas hacia el extremo 3' de las secuencias $V\alpha$, otras secuencias $V\delta$ parecen estar esparcidas entre las mismas $V\alpha$ s (38). Similarmente al caso del locus TCR β , se observa un segmento génico $V\delta$ hacia el extremo 3' del $C\delta$ y en la orientación transcripcional opuesta, indicando que el TCR δ también usa tanto el looping-out y la deleción como la inversión en sus rearreglos (26). Otra característica interesante de este locus es que el gen α del TCR excede mucho en el número de segmentos J (> 50) al δ (o cualquier otro gen que codifique para un receptor antigénico) (5). El TCR δ posee dos segmentos génicos D y dos J (40).

Cada linfocito expresa varios receptores con una única especificidad determinada por la combinación particular de distintos segmentos génicos (V, D, J y C). Estos receptores

poseen dos cadenas polipeptídicas (α y β). Ambas cadenas están unidas covalentemente e insertadas en la membrana plasmática formando así el TCR. Este es capaz de unir, de manera específica, y a través de las regiones CDR, al complejo antígeno-AMH. Las CDR1 y CDR2 interaccionan probablemente con las dos hélices α de las moléculas de histocompatibilidad donde se encaja el péptido antigénico; la CDR3 interacciona preferentemente con el propio péptido antigénico. Esto significa que, en el caso de los antígenos convencionales, todos los elementos variables de ambas cadenas α y β contribuyen a la interacción del TCR con el complejo péptido-AMH.

2. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Se denomina complejo mayor de histocompatibilidad a un grupo de genes íntimamente ligados que intervienen en el reconocimiento de lo propio-no propio, constituyéndose en uno de los principales mecanismos de regulación de la respuesta inmune (41-44). Codifican para glicoproteínas de la membrana celular, que son los antígenos mayores de histocompatibilidad (AMH). El rol fisiológico de dichas moléculas es la presentación de antígenos a los linfocitos T en la superficie de una célula presentadora. De esta manera, el TCR reconoce al antígeno extraño junto con el AMH: lo no propio es reconocido así en el contexto de lo propio.

CMH es un nombre genérico; para cada especie el CMH recibe un nombre particular: HLA en el humano y H-2 en el ratón. A continuación se describirá el CMH del ratón. El complejo H-2 se encuentra ubicado en el cromosoma 17 (41), posee una longitud de 1600 centimorgans y contiene 3×10^9 pares de bases (42,43). Los loci del H-2 se dividen en dos clases, I y II; cada una de estas clases se divide a su vez en dos subclases denominadas α y

β , y algunas de las subclases, en familias y subfamilias, designadas por letras mayúsculas.

2.a. Organización genética

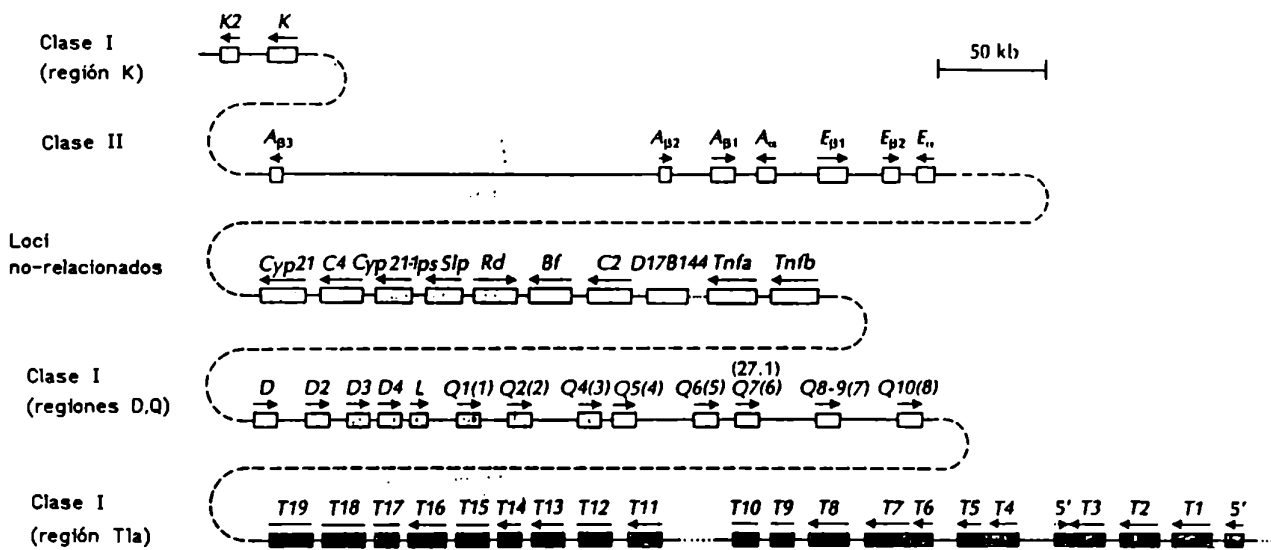
Los polipéptidos α y β de clase I se asocian para formar las moléculas de clase I que se expresan en todas las células nucleadas de ratón. De manera similar, los polipéptidos α y β de clase II se asocian para formar las moléculas de clase II que se expresan en todas las células del linaje B y monocítico.

La subclase β de clase I del H-2 es un set aparte de los otros loci del H-2 en varios aspectos. Se sitúa en un cromosoma diferente (cromosoma 2) y es un único locus en lugar de un grupo de loci. Su producto no se encuentra solamente asociado con la cadena α en la superficie celular, sino que también se halla en forma libre en los fluidos corporales. Es estructuralmente diferente, su producto -la β_2 -microglobulina- fue encontrado por primera vez en el suero por su tamaño y su movilidad característica en un campo eléctrico.

La organización de los genes en el cromosoma es la que se muestra en la Esquema 2.

El genoma también contiene otro gen que no forma parte del CMH a pesar de que su producto -la cadena γ - interacciona con algunos productos del CMH. Esta cadena se asocia con las cadenas α y β de clase II en el citoplasma, pero no en la superficie celular. El locus que codifica para la cadena γ no muestra ninguna similitud estructural o funcional con los loci de clase II.

Las familias del loci α de clase I están pobremente definidas. Existen dos familias, Qa y Tla. Los genes funcionales α de clase I, designados H-2K y H-2D, parecen ser miembros de la familia Qa (45). El segmento cromosómico ocupado por los loci de clase II



ESQUEMA 2

Organización de los genes del CMH en el cromosoma 17.

es algunas veces referido como la región I (abreviatura de región de respuesta inmune). Esta región consta de dos subregiones: I-A e I-E.

Cada uno de los genes de clase I y II consta de numerosos alelos. Para referirse a los alelos del H-2 se utilizan letras minúsculas en supraíndice (por ejemplo H-2A^b, H-2E^h). Una combinación particular de alelos en un único cromosoma conforma el haplotipo CMH. Este es designado por letras minúsculas (supraíndice), por ejemplo, el haplotipo H-2^k corresponde a K^k,A^k,A^k,E^k,E^k,D^k. Se han identificado y caracterizado aproximadamente 300 haplotipos H-2 diferentes; en las poblaciones naturales de ratones deben existir miles de ellos. En una cepa endocriada, todos los individuos son homocigotas y genéticamente idénticos o casi idénticos. Se han desarrollado cepas congénicas las cuales difieren una de la otra sólo en el H-2 o partes menores de éste y loci muy ligados.

2.b. Moléculas del CMH

Estructura primaria y secundaria

Las moléculas de clase I son heterodímeros compuestos por una cadena α y otra β .

La cadena β , denominada β_2 -microglobulina, es una proteína soluble cuyo su peso molecular es de 11500 daltons. Consta de 99 aminoácidos y contiene dos residuos de cisteína y un único puente disulfuro. La estructura primaria está altamente conservada entre las especies, de tal manera que la β_2m de una especie puede sustituir a la de otra especie.

Las cadenas α de clase I son glicoproteínas de aproximadamente 44000 daltons. La

cadena polipeptídica consta de alrededor de 350 aminoácidos. Puede ser dividida en tres regiones funcionales: externa, de transmembrana, y citoplasmática. La región externa consta de tres dominios: $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$. Las regiones y dominios están generalmente codificados en exones separados del gen de clase I. Las regiones $\alpha 2$ y $\alpha 3$ contienen residuos de cisteína capaces de formar puentes disulfuros intracatenarios. La región de transmembrana, que atraviesa la bicapa lipídica de la membrana plasmática, está compuesta principalmente por aminoácidos hidrofóbicos dispuestos en α -hélice. Se ha sugerido que la región citoplasmática tendría la capacidad de interactuar con elementos del citoesqueleto, aunque no existe evidencia convincente de que esto ocurra. Cada cadena α contiene dos o tres cadenas de carbohidratos en las posiciones 86, 176 y 256. El dominio $\alpha 3$ de la región externa de la cadena α interactúa no covalentemente con la β_2m formando el dímero funcional en la superficie celular.

Las moléculas de clase II son heterodímeros compuestos por una cadena α y una cadena β . Ambas cadenas son glicoproteínas de peso molecular de 34000 y 28000 daltons respectivamente. El largo total de la cadena α varía entre 229 a 233 aminoácidos; la cadena β consta de 225 a 238 residuos, dependiendo del locus que la controla. Ambas cadenas presentan una región externa, un péptido conectante, una región de transmembrana, y una cola citoplasmática. La región externa está compuesta por dos dominios, $\alpha 1$ y $\alpha 2$ o $\beta 1$ y $\beta 2$. Todos los dominios externos salvo el $\alpha 1$, contienen por lo menos dos residuos de cisteína y por lo tanto una unión disulfuro. El péptido conectante de 13 y 9 residuos de largo en las cadenas α y β respectivamente, conecta el segundo dominio con la región de transmembrana. Cada cadena α lleva dos carbohidratos y cada cadena β , uno. Ambas cadenas se asocian de manera no covalente, probablemente mediante interacciones entre los segundos dominios externos.

Las cadenas α y β se sintetizan separadamente. Inmediatamente después de su síntesis, se asocian con una tercera cadena, la cadena γ . Esta asociación sólo se mantiene dentro del citoplasma: en cuanto el complejo de las tres cadenas llega a la membrana plasmática, la cadena γ se disocia dejando al complejo α,β expresado en la superficie celular.

Estructura terciaria y cuaternaria

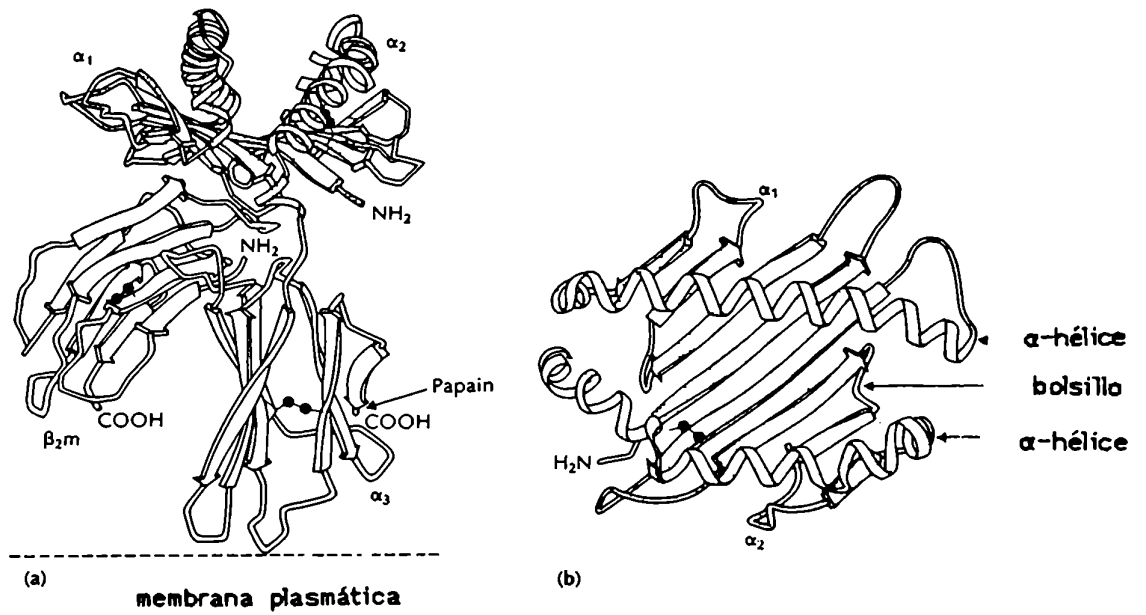
La región extracelular de las moléculas de clase I consiste en dos pares de dominios estructuralmente similares: el dominio α_1 tiene una estructura terciaria similar al α_2 , mientras que el dominio α_3 es estructuralmente similar a la β_2m . El par $\alpha_3-\beta_2m$ es el más cercano a la membrana plasmática, mientras que el par $\alpha_1-\alpha_2$ forma la parte superior de la molécula. La región extracelular mide aproximadamente 70 Å de largo. Los dominios α_3 y β_2m están compuestos por dos láminas β plegadas antiparalelas, una de las cuales está compuesta por cuatro hebras β y la otra por tres. Las láminas están conectadas por un puente disulfuro. Los dos dominios se contactan entre sí por sus láminas de cuatro hebras, pero se encuentran rotados en 146° uno respecto del otro (Esquema 3a).

Los dominios α_1 y α_2 constan de cuatro hebras β y dos (α_1) o tres (α_2) α -hélices (Esquema 3b). Los dos dominios están conectados de tal manera que cada uno de ellos forma la mitad de una estructura más grande, estando las mitades simétricamente dispuestas alrededor de un eje bivalente. El resultado de este arreglo (la dimerización intramolecular) es que las cuatro hebras β de cada dominio forman una única lámina β plegada antiparalela con ocho hebras. La lámina forma el piso donde se elevan dos paredes, cada una formada por el set de α -hélices aportadas por un dominio. Las paredes están separadas por un hueco o

bolsillo que sería la lámina β (Esquema 3b). El hueco es de aproximadamente 25 Å de largo, 10 Å de ancho y 11 Å de profundidad. La mayor parte de los aminoácidos polimórficos se encuentran localizados dentro del hueco y la mayor parte de los residuos que son críticos para el reconocimiento de las moléculas de clase I por los linfocitos T, se encuentran localizados alrededor del hueco. Se cree que el hueco funciona como lugar de unión para los péptidos producidos por el procesamiento del antígeno.

Las moléculas de clase II tienen una estructura de dominio similar a las de clase I, pero los cuatro dominios de clase II están provistos de dos cadenas polipeptídicas ancladas en la membrana. Los dominios $\alpha 2$ - $\beta 2$ están cercanos a la membrana plasmática, mientras los dominios $\alpha 1$ - $\beta 1$ están en la parte superior de la molécula. Está ampliamente aceptado que los dominios $\alpha 2$ - $\beta 2$ tienen una estructura similar a la de las inmunoglobulinas (sandwich de dos láminas β plegadas), mientras que los dominios $\alpha 1$ - $\beta 1$ forman un hueco similar al formado por los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 2$ de la molécula de clase I. Si esto fuera así, el hueco en las moléculas de clase II se formaría por dimerización intramolecular, donde una mitad de la estructura estaría aportada por el dominio $\alpha 1$ y la otra por el dominio $\beta 1$. Como en el caso de las moléculas de clase I, el hueco postulado para las moléculas de clase II serviría como sitio de unión de los antígenos procesados.

El hecho de que un linfocito T, reconozca antígenos mayores de histocompatibilidad de clase I o de clase II y que se torne helper o citotóxico, no está determinado por su TCR sino por moléculas accesorias expresadas en la superficie de los linfocitos T, las moléculas CD4 y CD8. La molécula CD4 se expresa principalmente en los linfocitos T que reconocen el antígeno en contexto de los antígenos de histocompatibilidad de clase II, siendo la mayor parte de estos linfocitos células T helper. La molécula CD8, por otro lado, está presente,



ESQUEMA 3

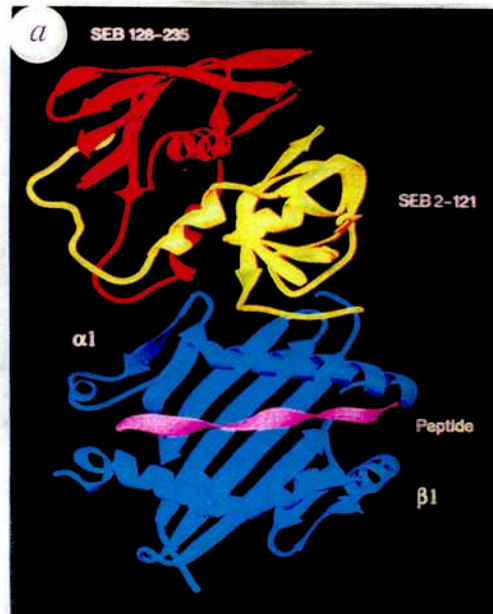
Representación esquemática de la estructura de una molécula de CMH de clase I. (a) vista de los cuatro dominios extracelulares (b) vista desde arriba del bolsillo formado por los dominios α_1 y α_2 .

principalmente en los que reconocen al antígeno en contexto de clase I, siendo la mayor parte de estas células citotóxicas. La molécula CD4 interacciona directamente con los AMH de clase II, mientras que la CD8 interacciona con los AMH de clase I.

3. SUPERANTIGENOS

El término superantígeno se aplica a un grupo de moléculas que, unidas a moléculas de histocompatibilidad de clase II, estimulan células T que portan un receptor T VB particular o en algunos casos, elementos V γ . Este hecho hace que posean una muy potente actividad estimuladora de los linfocitos T (46), ya que sólo es necesaria la interacción con un elemento VB determinado del receptor T, independientemente de la cadena α que éste posea.

Los superantígenos difieren de los péptidos antigénicos convencionales en su interacción con el TCR. En el caso de los péptidos antigénicos convencionales, todos los elementos variables de ambas cadenas α y β (V α , J α , V β , D β , J β) contribuyen a la interacción del TCR con el complejo péptido-AMH. Los complejos superantígeno-AMH clase II, en contraposición, interaccionan exclusivamente con el elemento VB del TCR en una región de la cara lateral que no está involucrada normalmente en el reconocimiento de los antígenos convencionales (Esquema 4). Como consecuencia del gran número de posibles combinaciones de todos los elementos variables de las cadenas α y β del TCR, la frecuencia de los linfocitos T que reconocen a un determinado péptido antigénico convencional es por lo general muy baja (10^{-4} a 10^{-6}). Cada superantígeno, por su parte, es capaz de ser reconocido por uno o más de un número limitado de productos de genes VB (aproximadamente 20 en ratones y 50 en humanos) y de estimular a todas las células T que



ESQUEMA 4

Representación esquemática de la presentación de antígenos convencionales y superantígenos exógenos (SEB) en contexto de moléculas de CMH de clase II. Vista desde arriba de los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ (azul); los residuos 2-121 del extremo N-terminal de SEB se muestran en amarillo y los residuos 127-235 del extremo C-terminal en rojo; el péptido convencional se muestra en rosado.
Nature, 1994. 368:711.

posean dichos productos VB. Como consecuencia de este tipo de interacción un gran número de células T puede ser estimulada por cada superantígeno; así, algunos superantígenos son capaces de afectar hasta el 30% del total de la población T (47).

Otra gran diferencia entre antígenos convencionales y superantígenos es que mientras el reconocimiento de péptidos antigénicos por el TCR está restringido por el alelo del CMH que codifica para la molécula presentadora (48,49), para la mayor parte de los superantígenos, su reconocimiento está sólo marginalmente afectado por el alelo CMH presentador.

Finalmente, a diferencia de los péptidos antigénicos convencionales, se ha demostrado que los superantígenos exógenos no requieren de procesamiento previo a la presentación por las moléculas CMH de clase II y se unen a dichas moléculas en sitios diferentes del hueco en que se presenta el antígeno convencional. En cuanto a los superantígenos endógenos, todavía no está claro si su presentación requiere de procesamiento previo.

3.a. Superantígenos endógenos y exógenos

Superantígenos endógenos

Dentro de este grupo se encuentran los antígenos murinos del sistema menor de estimulación linfocitaria (Mls). Estos fueron descritos originalmente en ratones, por su capacidad de estimular fuertemente la proliferación de células con el mismo haplotipo CMH en reacciones de cultivo mixto de linfocitos (50). En estas reacciones, un gran número de células T vírgenes responden al estímulo de los antígenos Mls (presentados en la superficie

de distintas células presentadoras). En un primer momento, se pensó que estaban codificados en un locus con distintos alelos, pero ahora se sabe que existen varios loci, cada uno con un alelo estimulador (designado a) y un alelo nulo (designado b) (51).

La nomenclatura para los distintos superantígenos Mls varía según la literatura. Mls-1^a corresponde a Mls^a, Mls-2/3^a a Mls^c, Mls^d a la coexpresión de Mls-1^a y 2/3^a, y Mls^b designa la presencia de los alelos b en todos los loci Mls. A pesar de que los alelos a (en particular el Mls-1^a) de los Mls inducen una vigorosa proliferación y producción de linfoquinas por células T *in vitro*, no generan rechazos de trasplantes o reacciones letales de injerto contra huésped (GvH).

Recientemente se han identificado éstos y otros superantígenos endógenos, como los productos de genes de distintos retrovirus endógenos, los Mtv (virus de tumor mamario murino) (52-54).

Hasta el momento no se ha documentado la existencia de superantígenos endógenos en humanos, sin embargo Paliard y col. (55) en un trabajo acerca de superantígenos en artritis reumatoidea reportaron la existencia de importantes diferencias en el uso de elementos V β entre individuos diferentes, hecho que concuerda con el moldeo del repertorio V β por superantígenos propios.

Superantígenos exógenos

Los superantígenos exógenos son producidos por una variedad de microorganismos tales como las bacterias gram-positivas *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*,

como por *Mycoplasma arthritidis* (46,56,57). Los superantígenos exógenos mejor caracterizados son las enterotoxinas de *S.aureus* (SEs). Se conocen siete SEs (designadas SEA, B, C1, C2, C3, D y E) que comparten secuencias homólogas en distintos grados. Tienen pesos moleculares que oscilan entre 24 y 30 kDa y un puente disulfuro intracatenario característico, localizado cerca del centro de la molécula (46,58)

Dentro de los superantígenos exógenos, también se incluyen los virus exógenos de tumor mamario murino (MMTV). Estos se presentan como virus infecciosos que normalmente son transmitidos a la cría a través de la leche materna (59,60). Esta clase de superantígenos, así como los Mtv endógenos, se describirá en mayor detalle en el siguiente punto.

Ambos tipos de superantígenos (endógenos y exógenos) inducen in vitro una intensa proliferación de las células T que expresen los productos Vβ correspondientes; pero una continua exposición in vivo a cualquiera de los dos tipos de superantígenos induce la eliminación o inactivación de dichas células T.

3.b. Superantígenos codificados por retrovirus

Se han publicado recientemente trabajos que demuestran el fuerte ligamiento existente entre superantígenos propios y retrovirus endógenos. Frankel y col. (52) demostraron una perfecta concordancia entre la presencia de virus endógenos Mtv y la expresión de productos de superantígenos Mls. El retrovirus Mtv-7 cosegregó con el superantígeno Mls-1^a en el cromosoma 1, el Mtv-6 con el superantígeno Mls-3^a en el cromosoma 16, el Mtv-13 con Mls-2^a y el producto del Mls-2^a like cosegregó con el Mtv-1 en el cromosoma 7. Otros

superantígenos endógenos también cosegregaron con integrantes de retrovirus Mtv: Woodland y col. (61) demostraron que el superantígeno propio DVb11-2 (también conocido como Etc-1), cosegregaba con el Mtv-9. Dyson y col. (62) también demostraron una concordancia entre el DVb-11-2 y el Mtv-9, y además demostraron que los dos superantígenos propios relacionados, DVb11-1 y DVb11-3, cosegregaban con los Mtv-8 y Mtv-11 respectivamente.

Los MMTV exógenos presentes por ejemplo en la cepa de ratones C3H, también codifican para un superantígeno que puede ser transmitido verticalmente por la leche de ratones infectados por el virus, el cual induce la deleción de las células T VB14+ (8). Dos grupos han demostrado que este superantígeno está codificado por un gen del ORF (marco de lectura abierto) del LTR 3' (long terminal repeat) del MMTV. Choi y col. (53) reportaron que una línea celular de linfoma B transfectada con un vector de expresión que contiene el ORF (codificado en el LTR), era efectiva en la estimulación de clones T VB14+. Acha Orbea y col. (63) demostraron que existe deleción de células T VB14+ en ratones transgénicos para el virus MMTV(C3H) entero o para el LTR (que incluye el ORF). El análisis de secuencias ORF de los LTR de distintos Mtv asociados a la deleción de células T VB11+ reveló un alto grado de homología en la región carboxi-terminal, pero marcadas diferencias en la región amino-terminal, sugiriendo que la especificidad para el reconocimiento de las células T a través de los VB está determinada por la región carboxi-terminal. Esto es apoyado por la observación de que una variante de MMTV exógeno que difiere del virus salvaje en los 32 aminoácidos carboxi-terminales del ORF del LTR, fue incapaz de inducir la deleción de células T VB14+.

Papiernik M y col. (64) demostraron que una colonia de ratones de la cepa BALB/c (H-2^d, Mls-1^b) (BALB/c IC) modifica progresivamente su repertorio T, delecionando las

células T V β 6+ y V β 8.1+. La delección clonal ocurre sólo en el 50% de los ratones entre las 27 y 43 semanas de edad, en células T de timo, bazo, y ganglios linfáticos. El fenómeno es progresivo y parece afectar casi todos los timos entre las 14 y 19 semanas de edad. Las células T maduras CD4+CD8- se encuentran más afectadas que las CD4-CD8+. La delección ocurre en el timo afectando a las células T inmaduras J11d+ que expresan altos niveles de V β 6, mientras que las células que expresan J11d+ con bajos niveles de V β 6, no se encuentran modificadas. Held y col. (60) demostraron que la delección observada por Papiernik y col. se debía a la presencia de un MMTV exógeno (MMTV (SW)) en la leche de los ratones de la colonia BALB/cIC.

En cuanto al ligamiento existente entre otros retrovirus y superantígenos, Hugin y col. (65) han sugerido que un virus de leucemia murino que induce una enfermedad en ratones similar a la de inmunodeficiencia adquirida (MAIDS) también codificaría para un superantígeno específico para células T V β 5+. Linfomas B que expresan la proteína de fusión viral gagp30 fueron capaces de estimular células T V β 5+, y anticuerpos anti-gagp30 inhibían esta estimulación.

En cuanto a la existencia de superantígenos virales involucrados en patologías humanas, se ha reportado que pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida eliminan selectivamente células T con determinados V β , lo cual sugeriría la respuesta a un superantígeno codificado por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) (66). Este podría iniciar la expansión de células T portadoras elementos V β s apropiados y luego inducir la tolerancia o delección de estas mismas células T. Tal secuencia de eventos podría jugar un rol crítico en la disfunción y disminución de las células T asociadas con la infección por el virus HIV (67).

También se ha reportado que la nucleocápside del virus de la rabia sería un superantígeno exógeno específico para los linfocitos T humanos V β 8+. Este superantígeno no requiere de un procesamiento previo para su presentación y es capaz de unirse a la cadena α del AMH (68).

3.c. Presentación de los superantígenos

Presentación de superantígenos endógenos

Todos los superantígenos caracterizados hasta el presente son presentados por células que portan AMH de clase II.

Una línea de evidencia que confirma el rol crucial de los AMH de clase II en la presentación de superantígenos Mls-1^a, es la inhibición de la respuesta T a dicho superantígeno por anticuerpos monoclonales anti-AMH de clase II (69). La capacidad inhibitoria de los anticuerpos monoclonales específicos para moléculas I-E es mayor que la de aquellos específicos para I-A, y la combinación de ambos anticuerpos, inhibe totalmente la respuesta a Mls-1^a en reacciones de cultivo mixto, a pesar de que algunos autores consiguen una inhibición total de la misma con sólo uno u otro de los anticuerpos (70). Algunos superantígenos endógenos, como los estimuladores de células T V β 5, 11, 12, y 17a, sólo pueden ser presentados en el contexto de moléculas I-E.

El hecho de que se atribuya a los AMH de clase II un rol importante en la presentación de superantígenos endógenos proviene además de la observación de que existen diferencias en la intensidad de estimulación de células T frente al superantígeno Mls-1^a

cuando éste es presentado en el contexto de distintos alelos de los AMH de clase II. Los haplotipos de cepas I-E positivas presentan bien el determinante Mls-1^a, las cepas I-E negativas que portan I-A^{b,f,s,k,g} p son de mediana eficiencia, y las cepas I-A^q lo presentan marginalmente o no lo presentan (51,71). La jerarquía entre los alelos presentadores de Mls-1^a potentes y débiles, puede ser detectada in vitro en ensayos de cultivo mixto de linfocitos e in vivo, por los distintos grados de deleción intratímica de los clones T reactivos a superantígenos Mls-1^a propios. Los alelos más potentes son aquellos que inducen una proliferación mayor de las células T in vitro y un mayor porcentaje de deleción clonal de las células T reactivas al superantígeno propio.

Los superantígenos endógenos difieren de los péptidos antigénicos convencionales en su capacidad de ser reconocidos incluso cuando son presentados por AMH alogeneicos. Esto se ha observado en reacciones de cultivo mixto de linfocitos en las cuales las poblaciones respondedoras y estimuladoras difieren tanto en los alelos Mls-1 como en los AMH. Puede observarse en estas condiciones, que -al igual que ocurre en el contexto de lo propio- son estimuladas preferencialmente las células T VB6+ y VB8.1+ específicas para dicho superantígeno (72,73).

Un requerimiento importante para la presentación de péptidos antigénicos convencionales es su fragmentación proteolítica (procesamiento antigénico). No se sabe si ésto también ocurre con los superantígenos endógenos. Winslow y col. (74) han demostrado que el superantígeno Mls-1^a es sintetizado como una glicoproteína precursora de transmembrana de 45 kd, pero sufre una fragmentación proteolítica dando una proteína de superficie de 18.5 kd la cual sugieren es la forma funcional del superantígeno. Una característica interesante de la presentación de superantígenos Mls es que cualquier manipulación que afecte la integridad de la membrana de la célula presentadora -tal como la fijación con bajas dosis de

formaldehído- parece alterar funcionalmente el determinante Mls-1^a. Se ha sugerido que la composición de la membrana o la interacción de las moléculas del CMH de clase II con los componentes de la membrana serían críticos para la presentación de superantígenos endógenos (75-76).

No todas las células portadoras de AMH de clase II son capaces sin embargo de presentar superantígenos endógenos. Se desconoce si este hecho es debido a la falta de expresión génica o a algún requerimiento especial para la presentación de determinantes superantigénicos en la superficie celular. Las células B in vitro y algunas líneas celulares B expresan determinantes superantigénicos, pero otras células presentadoras de antígenos como por ejemplo macrófagos o células dendríticas, no los expresan (77,70).

Por el contrario, existe evidencia que muestra que algunas células que no expresan AMH de clase II son, sin embargo, capaces de presentar determinantes Mls-1^a. Webb y Sprent (78) demostraron que la inoculación de células T CD8⁺ altamente purificadas en ratones recién nacidos, induce la delección de los clones T reactivos a Mls-1^a.

Presentación de superantígenos exógenos

A diferencia de los superantígenos endógenos, la presentación de superantígenos exógenos (en particular las toxinas bacterianas) está mucho mejor estudiada. Los superantígenos exógenos se unen a los AMH de clase II en la superficie celular o en lisados de detergentes con una afinidad relativamente alta (K_d mayor de 10^{-8} M) (79-83). El reconocimiento T de estos superantígenos exógenos no requeriría de procesamiento, ya que SE y MAM pueden ser presentados por AMH de clase II purificadas e inmobilizadas y por

células presentadoras de antígeno fijadas (84,85). Por el contrario, los fragmentos proteolíticos de SEA no son capaces de estimular a las células T (80).

En cuanto al sitio de interacción de los superantígenos con los AMH se encontraron diferencias importantes entre la presentación de antígenos convencionales y superantígenos exógenos al utilizarse células L transfectadas con variantes I-A^k. Cuando se sustituyeron en la molécula I-A^k residuos localizados en el sitio de unión hipotético para el antígeno convencional, se afectaba el reconocimiento del mismo (péptido de la lisozima de huevo de gallina) pero no el del superantígeno exógeno (SEB). Por el contrario, cuando se mutaban residuos fuera del posible sitio de unión del péptido convencional, disminuía la presentación del superantígeno pero no la del antígeno (86). A pesar de no existir una prueba directa, estos hallazgos concuerdan con el concepto de que ambos ligandos se unen a sitios diferentes en los AMH de clase II.

Por otra parte, se ha visto que distintas exotoxinas de *Staphylococcus* se unen a sitios diferentes en los AMH de clase II (87). En estudios recientes, se ha demostrado que el dominio $\alpha 1$ de la cadena α del HLA-DR resulta crítico para la unión de la toxina estafilocócica-1 del síndrome de shock tóxico (TSST) (88). Más recientemente, Pontzer y col. (89) han usado péptidos sintéticos para mapear los sitios de unión de otras exotoxinas estafilocócicas. Utilizando esta técnica, mostraron que un péptido correspondiente a los residuos 65-85 de la cadena I-A_{bb} era capaz de inhibir la unión de la exotoxina de *Staphylococcus A* (SEA), pero no la de TSST-1. Karp y col. (90) también demostraron que la cadena β del AMH de clase II tiene un rol crítico para la unión de SEA y exotoxina E de *Staphylococcus* (SEE). El sitio de unión para estas dos toxinas fue localizado en los residuos 59-94 de la cadena β , en la porción α hélice del dominio $\beta 1$.

Al igual que para los superantígenos endógenos, la eficiencia de presentación de los

superantígenos exógenos varía con el isotipo (epitopes compartidos por toda una clase, subclase o familia) y alotipo (diferentes alelos) del AMH de clase II. El ejemplo más llamativo en cuanto a la variación en la eficiencia de presentación según el isotipo presentador, es el de MAM, el cual es presentado sólo por células portadoras de I-E (91). Estas diferencias en el reconocimiento de superantígenos exógenos reflejarían, por lo menos en forma parcial, distintas propiedades de unión del AMH de clase II a dichos superantígenos. Por ejemplo, en los extractos de detergente de la línea de linfoma B humano RAJI, las moléculas DR se unen más eficientemente a SEA, y las DQ a SE C1, 2, y 3, pero todas las SE se unen muy débilmente a las moléculas DP (82).

A pesar de que los AMH de clase II presentan los superantígenos exógenos de manera muy eficiente, se han reportado casos de reconocimiento independiente de la presentación en el contexto de los mismos. Primero, se demostró que las toxinas SEA y SEB solubles inducen el flujo de calcio en clones de células Jurkat (leucemia T humana). También se observó la existencia de proliferación dependiente de SEB en clones T de ratón, en ausencia de células accesorias (92,93). Segundo, otras toxinas inmobilizadas fueron capaces de estimular linfocitos humanos en presencia de coestímulos, como por ejemplo PMA (phorbol myristate acetate) (94). Estos dos experimentos han sido interpretados como una evidencia de la existencia de unión de baja afinidad de los superantígenos exógenos libres al TCR. Finalmente, se ha demostrado la existencia de clones citotóxicos CD8+ capaces de efectuar la lisis dependiente de SEB de células posiblemente negativas para AMH de clase II. Se ha sugerido que estos resultados podrían indicar la expresión de una molécula presentadora de superantígenos exógenos diferente a los AMH de clase II (95,96).

3.d. Respuesta T a superantígenos

3.d.1. Reconocimiento de superantígenos por células T CD4+ y CD8+

Existe evidencia de que el complejo AMH-superantígeno es reconocido a través del TCR (97,98), fundamentalmente a través de la región V β .

Los superantígenos exógenos, tales como SE y MAM, son capaces de activar tanto células CD4+ cuanto CD8+ (92,99).

La transfección de hibridomas T murinos CD4- con moléculas CD4 no afecta la respuesta de los mismos a superantígenos bacterianos (100). El hecho de que la estimulación T por superantígenos bacterianos pueda ser independiente de la molécula CD4, ha sido interpretado como un reflejo de la alta afinidad de la interacción entre el complejo CMH de clase II-toxina bacteriana y el TCR, ya que la molécula CD4 refuerza las interacciones antígeno-TCR de baja afinidad pero no las de alta afinidad (101). Un estudio detallado de la respuesta T del ratón hacia SEB (102), mostró que dicho superantígeno era capaz de estimular en la misma proporción a las células T V β 8+ CD4+ y CD8+. Más aún, las células T CD8+ primadas con SEB lisaban células blanco que portaban moléculas del CMH de clase II de manera dependiente de SEB.

En cuanto a la respuesta T hacia el superantígeno endógeno Mls-1^a, históricamente se la ha considerado limitada a la subpoblación de células T CD4+: 1) en reacciones de cultivo mixto de linfocitos, el superantígeno Mls-1^a es capaz de estimular la proliferación de células CD4+ pero no la de las CD8+ (47); 2) la respuesta de clones e hibridomas específicos para

Mls-1^a puede ser inhibida por anticuerpos monoclonales anti-CD4 (98); 3) la administración neonatal a ratones portadores de Mls-1^a, de anticuerpos monoclonales anti-CD4 previene la delección clonal tanto de timocitos CD4⁺ como CD8⁺ Vβ6⁺, hecho que -por otra parte- permite sugerir que la molécula CD4 pero no la CD8 es necesaria para el reconocimiento de Mls-1^a por los timocitos inmaduros CD4⁺ CD8⁺ (103)

Sin embargo, se ha reportado la existencia de un clon CTL CD8⁺ capaz de responder a Mls-1^a (104). Experimentos más recientes en los cuales células T CD8⁺ Vβ8.1⁺ y Vβ6⁺ se estimulan con linfocitos B Mls-1^a, demostraron que las células CD8⁺ también pueden reconocer el determinante Mls-1^a, a pesar de que este reconocimiento ocurriría en menor grado. MacDonald y col.(72) y Webb y col.(105) obtuvieron resultados similares en experimentos realizados in vivo. La reactividad de las células CD8⁺ a superantígenos endógenos, no es una particularidad del sistema Mls-1^a ya que se han obtenido resultados similares en experimentos in vivo donde células T Vβ11⁺ CD4⁺ y CD8⁺ responden a un superantígeno endógeno dependiente de I-E (106).

Se ha demostrado que las células T CD8⁺ ven al determinante Mls-1^a en el contexto de los AMH de clase II. Tanto la activación de células T CD4⁺ cuanto la de las CD8⁺ reactivas a Mls-1^a pudo ser inhibida por anticuerpos específicos para AMH de clase II pero no aquellos dirigidos a moléculas de clase I (107). La respuesta Mls-1^a de las células T CD8⁺ sería sin embargo más débil que la de las células T CD4⁺.

4.d.2. Regiones del TCR implicadas en el reconocimiento de superantígenos

Estudios recientes han comenzado a aportar datos acerca de los detalles de la interacción entre los superantígenos, el receptor T y los AMH de clase II. Gascoigne y col. (108) demostraron que un producto de la cadena β del TCR era capaz de interactuar directamente con superantígenos presentados en células portadoras de AMH de clase II. Esta interacción era dependiente de la expresión de los AMH de clase II por las células presentadoras, podía ser inhibida específicamente por anticuerpos dirigidos hacia los mismos o hacia los superantígenos, y ocurría inclusive en ausencia de la cadena α del TCR. Estos resultados, sumados al hecho de que todos los linfocitos T que portan una determinada región V β en el receptor T reaccionan con un determinado superantígeno -por ejemplo, los clones T V β 6+ reaccionan con el superantígeno Mls-1^a- casi independientemente de la cadena α que posean (109), sugieren que los determinantes de ambas moléculas (superantígeno y AMH de clase II) interactúan con la región V β del TCR.

En estudios realizados por Kappler y col (110,111) se había demostrado que el sitio de interacción para superantígenos propios y extraños en los elementos V β del TCR mapeaba en una región lámina β plegada que se encuentra fuera del sitio de reconocimiento del antígeno convencional y del AMH. Cazenave y col.(112) llegaron a una conclusión similar estudiando variantes del receptor T V β 17a que habían perdido la capacidad de reaccionar con superantígenos propios más I-E. El examen de estas mutantes reveló la existencia de dos sustituciones de aminoácidos en un área que se superpone con la implicada en el reconocimiento de superantígenos. Más recientemente Pullen y col. (113) analizaron también

la interacción de los elementos V β con superantígenos. Confirmaron que el sitio de reconocimiento para el superantígeno Mls-1^a se encuentra en la región V β .

3.e. Superantígenos endógenos y repertorio T

Los superantígenos, al igual que los antígenos de histocompatibilidad dan forma al repertorio T inmaduro. La existencia de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia la región V β del receptor T han permitido estudiar -como se verá en el punto 4- los mecanismos involucrados en el establecimiento de la tolerancia frente a lo propio.

La capacidad de los superantígenos endógenos de dar forma al repertorio T, por medio de la delección clonal de las células con reactividad hacia los mismos y la existencia de reactividad cruzada entre superantígenos endógenos y exógenos (114), han permitido hipotetizar que los superantígenos endógenos poseerían una función fisiológica. El número de regiones V β involucrados en el repertorio T en el ratón puede ser reducido drásticamente no sólo por mecanismos genéticos (por ejemplo delección génica o mutación), los que pueden afectar hasta 13 elementos V β , sino también por selección negativa en el timo. Por este último mecanismo, un ratón que expresara al mismo tiempo los superantígenos Mls-1^a, Mls-2/3^a y los superantígenos endógenos Dvb11 restringidos por I-E tendría delecionados hasta 9 elementos V β . Al evaluar la importancia de tal dramática reducción en el repertorio T, se debe tener en cuenta que el número de especificidades T puede ser generado teóricamente con los elementos variables restantes y todavía excedería en varios órdenes de magnitud el número de linfocitos T encontrados en el ratón. Más aún, la existencia de delección de elementos V β

(debida a mecanismos genéticos o a selección negativa) entre ratones salvajes, sugiere que tales eventos no son desventajosos para el sistema inmune (115,116). La eliminación de elementos VB del repertorio T maduro por selección negativa, determinada por los superantígenos endógenos, permitiría excluir elementos VB manteniendo los genes correspondientes. Esto posibilitaría una más rápida adaptación del repertorio T a las condiciones ambientales cambiantes (115,116).

Una de las hipótesis que adjudican un rol fisiológico a la deleción de elementos VB del repertorio T por superantígenos endógenos postula que ésta constituye un mecanismo para reducir el número de células T reactivas a superantígenos exógenos (93). Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que algunas patologías inducidas por los superantígenos exógenos (toxinas) están ligadas a la producción masiva de linfoquinas por las células T luego de la estimulación con superantígenos exógenos (117). De todas maneras hay que mencionar que otros efectos patológicos de exotoxinas de estafilococos parecen ser independientes de las células T (58,118). También se ha postulado que la deleción de elementos VB por virus endógenos Mtv disminuye significativamente el transporte del virus MMTV exógeno por las células T desde el tracto digestivo hacia la mama. Ratones C3H transgénicos para la región ORF del virus MMTV(C3H) delecionan tempranamente las células T VB14 reactivas al superantígeno codificado por dicha región. Se ha podido demostrar que la deleción de estas células correlaciona con la dismunución de la expresión del virus infeccioso en mama (119). Los autores sugieren que la presencia de virus Mtv endógeno sería beneficioso para el ratón, ya que resulta en la pérdida de susceptibilidad a la infección por el virus MMTV(C3H) exógeno.

Otra de las hipótesis se basa en estudios de utilización de elementos VB de clones T que inducen enfermedades autoinmunes. En el caso de la encefalitis alérgica experimental,

se reportó un uso preferencial de elementos V β 8.2 (y V α 4) por los clones patogénicos; el tratamiento de los ratones con anticuerpos monoclonales anti-V β 8 era capaz de curar la enfermedad (120,121). Estos hallazgos sugieren fuertemente que la delección de los elementos V β del repertorio T por superantígenos endógenos podría reducir el riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes.

Ya que ambas hipótesis se basan en la observación de que los superantígenos endógenos dan forma al repertorio T en ratones, sería importante saber si ésto es también verdad para otras especies. Hasta el presente no se ha encontrado tal evidencia, posiblemente debido a las siguientes razones: 1) no existen suficientes anticuerpos monoclonales específicos para regiones V β disponibles para sistemas humanos y de rata. 2) Los superantígenos endógenos muestran poco polimorfismo, o bien el polimorfismo es difícil de detectar ya que varios superantígenos endógenos distribuidos en la población podrían deleccionar con alta frecuencia el mismo elemento V β . Esta última situación llevaría a una falta funcional del polimorfismo. En ambos casos la selección negativa intratímica de ciertos elementos V β no sería detectada por comparación del repertorio T periférico de individuos diferentes.

3.f. Superantígenos en enfermedades autoinmunes

La capacidad de los superantígenos de romper las barreras de la restricción por el CMH para activar grandes números de linfocitos T y B ha llevado a la hipótesis de que puedan activar clones T y B autorreactivos iniciando así y/o acentuando enfermedades autoinmunes. Esta hipótesis se ve apoyada por la ocurrencia aumentada de sinovitis y artritis en pacientes con síndrome de shock tóxico (122); por la capacidad de productos bacterianos

implicados en la patogénesis de enfermedades autoinmunes, tales como el mitógeno de *Mycoplasma arthritidis* y la proteína M de *Streptococcus* de actuar como superantígenos, y por la inducción de reacciones inflamatorias luego de la inyección intra-articular de superantígenos (123).

Como un acercamiento en establecer el rol de los superantígenos en una enfermedad autoinmune idiopática se han intentado hallar evidencias de una expresión restringida por elementos V β de los linfocitos infiltrantes en la lesión. Así, Paliard y col.(55) han descrito una expresión preferencial de V β 14 en los linfocitos aislados de flúidos sinoviales de pacientes con artritis reumatoidea.

4. MECANISMOS DE TOLERANCIA

4.a. Selección del repertorio T

4.a.1 Maduración de los linfocitos T

La especificidad de las células T se determina durante su maduración en el timo. Los precursores de los linfocitos T provienen de la médula ósea y colonizan el timo -en el ratón- alrededor del día 11 de gestación, aunque a lo largo de la vida adulta continúan migrando hacia este órgano. Al ingresar al timo, los precursores de los linfocitos T, todavía no expresan ni el receptor T (TCR) ni los marcadores CD4 y CD8 y suele denominárselos timocitos doble negativos. La cadena β del receptor sólo se expresa una vez que se ha producido el rearreglo y unión de los segmentos génicos variable (V), diversidad (D) y unión

(J). Este evento es seguido por el rearrreglo V-J en el locus α , culminando con la expresión de las cadenas $\alpha\beta$ del receptor T en la superficie del timocito inmaduro al día 17 de gestación (124). La expresión del receptor $\alpha\beta$ es precedida por la expresión del TCR gama-delta, al día 14-15 de gestación. Estas constituyen un linaje separado de linfocitos T.

Los timocitos $\alpha\beta$ inmaduros expresan en un comienzo bajas cantidades de receptor T, 50 a 100 veces menos que los linfocitos T maduros periféricos (125) y coexpresan los marcadores CD4 y CD8 (126) (timocitos doble positivos). A medida que van madurando pierden uno de estos marcadores (estado simple positivo) y aumenta la expresión del receptor T, llegando a expresar 20000 a 40000 moléculas por célula.

La recombinación al azar de los segmentos génicos en los loci α ($V\alpha J\alpha$) y β ($V\beta J\beta D\beta$), la contribución de la región N creada por la unión imprecisa de los segmentos génicos, sumada a la asociación azarosa de las dos cadenas, genera la posibilidad de al menos 10^9 especificidades diferentes de receptores T en cada individuo, constituyendo el repertorio T "sin seleccionar". Sin embargo, este gran repertorio de células T no se expresa en la periferia ya que está sujeto a dos eventos de selección tímica: la selección positiva y la selección negativa.

4.a.2. Selección positiva

Poco tiempo después del descubrimiento del reconocimiento T restringido por el CMH (127) se vio que éste ocurría casi exclusivamente en el contexto de los AMH propios (128,129). Esta propiedad de reconocer los péptidos antigénicos en asociación con AMH propios es "aprendida" durante la maduración de los linfocitos T en el timo. Si un ratón

híbrido F1(H-2^k x H-2^b) es inmunizado con un antígeno, las células T serán capaces de reconocer a dicho antígeno en células presentadoras cuyo haplotipo sea H-2^k o H-2^b. Sin embargo, si se inoculan células provenientes de médula ósea de un híbrido F1(H-2^k x H-2^b) en un ratón adulto F1 que es timectomizado, luego irradiado e injertado con un timo H-2^k, las células T sólo podrán reconocer al antígeno en el contexto H-2^k. Así, es el fenotipo del timo el que determina la restricción H-2 en las células T, siendo las células epiteliales tímicas las que llevan a cabo esta función. La participación de las células del epitelio tímico en la determinación de la restricción en las células T, se demostró mediante experimentos en los cuales el timo injertado se incubaba previamente con deoxyguanosina, de manera de destruir las células del linaje macrofágico y dendrítico. Se observó que, con este pretratamiento, las células T siguen reconociendo al antígeno en el contexto de los AMH propios (130).

Este proceso de aprendizaje tímico se ha denominado selección positiva para indicar que los timocitos que portan receptores capaces de interactuar con AMH propios en el epitelio tímico reciben una señal positiva que lleva a la maduración de estos clones.

En una serie de experimentos en los cuales se examinó la selección positiva de células T VB6+ o VB3+ por moléculas I-E en ratones transgénicos manipulados de tal manera que expresaban estas moléculas en zonas específicas del timo, se observó que ésta ocurría cuando los antígenos I-E se expresaban en el epitelio de la corteza tímica, pero no cuando se expresaban en las células epiteliales de la médula tímica, confirmando que el epitelio cortical tímico es el tipo celular que controla la selección positiva (131,132).

Se ha demostrado que durante este proceso de selección positiva es necesaria la existencia de una interacción directa entre el TCR y los AMH. La inoculación de anticuerpos anti-TCR o anti-AMH en ratones recién nacidos o el agregado de dichos anticuerpos a cultivos de órganos de timo fetal interfiere con el desarrollo de células maduras con la

especificidad del TCR o AMH correspondiente (133-136).

En cuanto al estadio en el que ocurriría la selección positiva, se demostró que el reconocimiento de los AMH expresadas en las células epiteliales tímicas ocurriría en el estadio doble positivo (CD4+ CD8+), siendo entonces seleccionadas positivamente para diferenciarse en células T CD4+CD8- o CD4-CD8+. La evidencia de este hecho proviene de experimentos realizados con ratones transgénicos. Se introdujeron en un ratón SCID (incapaz de reordenar sus genes variables), genes que codifican para las cadenas α y β de un receptor T proveniente de un clon citotóxico que reconoce específicamente el antígeno H-Y en asociación con el haplotipo H-2D^b. Dichos ratones, expresaron solamente los receptores T de la especificidad del transgen. Cuando el haplotipo de las hembras SCID utilizadas era H-2^{dnb}, se generaron solamente precursores de T citotóxicos CD8+ con especificidad H-2^b/H-Y, mientras que si se utilizaban ratones SCID con haplotipo H-2^{dnb}, se producían timocitos inmaduros CD4+CD8+, pero no timocitos maduros simple positivos (137). Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó un transgen proveniente de un clon CD4+ (138). En este caso se obtienen predominantemente células CD4+. Estos experimentos indican que la interacción de las células T con los AMH durante la selección positiva involucra también las moléculas CD4+ o CD8+. Estas moléculas accesorias actuarían como co-receptores, aumentando la fuerza de interacción entre el TCR y los AMH; las moléculas CD4 refuerzan la unión a los AMH de clase II, mientras que las moléculas CD8 refuerzan la unión a los AMH de clase I.

Se presume que la selección positiva aportaría una señal de "supervivencia" (139,140). Esta señal, además de promover la diferenciación, permitiría a las células T evitar su destrucción. La mayor parte de las células T CD4+CD8+ no reciben esta señal y como consecuencia mueren presumiblemente por apoptosis (141), aunque no existe evidencia directa

sobre este último punto.

En síntesis, la selección positiva involucra la interacción, en el timocito en desarrollo, del TCR, de AMH, y moléculas accesorias (CD4 y CD8). Si bien existen evidencias de que otros genes podrían también intervenir en el proceso de selección T, los ligandos y los mecanismos involucrados no están aún caracterizados (142,143). La selección positiva -de esta manera- ocurre en la corteza tímica, en el estadio inmaduro doble positivo del timocito en desarrollo. El resultado final de este proceso es un repertorio periférico dirigido hacia el reconocimiento de antígenos extraños presentados en el contexto de los AMH propios.

4.a.3. Selección negativa

Un principio central del sistema inmune es el establecimiento de la tolerancia frente a antígenos propios. El repertorio azaroso germinal, seleccionado positivamente para reconocer antígenos extraños asociados a AMH propios, incluirá también receptores autorreactivos, los que estarían sujetos a procesos de selección negativa. Se han propuesto tres mecanismos para explicar el logro y mantenimiento de la tolerancia frente a lo propio: la delección clonal, o eliminación de clones T autorreactivos; la anergia clonal, o falta de respuesta de clones T autorreactivos; y la supresión específica de dichos clones T autorreactivos por otros clones de células T.

Delección clonal intratímica

La demostración de la existencia del mecanismo de delección clonal fue posible gracias al descubrimiento de los superantígenos, a la existencia de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia los mismos, y a la utilización de ratones transgénicos.

La delección clonal fue demostrada por primera vez en forma directa al determinarse que la expresión de ciertos superantígenos correlacionaba con la ausencia de clones T capaces de reconocerlos. Así, los linfocitos V β 17a+ que reconocen específicamente un antígeno codificado por un Mtv endógeno que se asocia preferentemente con moléculas I-E, se encontraban ausentes en la periferia de aquellos ratones que expresaban dicha molécula (144,145). El estudio de la expresión de los TCR en el timo de estos animales mostró que la delección clonal ocurría durante la maduración del timocito. Mientras que se observaba un porcentaje significativo de clones T con receptores autorreactivos en el pool de timocitos inmaduros, éstos estaban prácticamente ausentes en la población medular de timocitos maduros.

La delección clonal intratímica específica para V β fue posteriormente demostrada para otros casos de reconocimiento de superantígenos propios. Kappler y col. (146) y MacDonald y col. (147) demostraron que ratones que expresan determinantes Mls-1^a eliminan intratímicamente las células T portadoras de receptores con las regiones variables V β 8.1 y V β 6, es decir se delecionan los clones que tienen la capacidad de reconocer a los determinantes Mls-1^a. Pullen (115) demostró asimismo que las células T V β 3+ estaban ausentes en animales que expresaban antígenos Mls-2^a o Mls-3^a. También se demostró la

existencia de delección de clones VB5+ y VB11+ -además de las células que expresan VB17a+- en la mayoría de las cepas de animales I-E+ (144,145,148,149)

La identidad de las células tímicas capaces de inducir delección clonal aún no está completamente resuelta, aunque la mayoría de los autores concuerdan en que la selección negativa tendría lugar en la médula tímica y estaría bajo el control de las células derivadas de médula ósea, en particular macrófagos y células dendríticas. De todas maneras, no son éstas las únicas capaces de inducir la delección clonal. Ratones que expresaban o no antígenos I-E fueron irradiados y reconstituídos con células de médula ósea que a su vez expresaran o no antígenos I-E, de tal manera de obtener ratones que expresaran I-E en distintas zonas del timo. Luego se estudió el porcentaje de timocitos maduros e inmaduros VB17a+, reactivos a I-E. Se demostró que, además de las células derivadas de la médula ósea situadas en la zona medular tímica, las células derivadas de la médula ósea, macrófagos, células B, o células dendríticas situadas en la corteza tímica también podían causar la eliminación clonal de algunos timocitos inmaduros. Las células epiteliales medulares del timo, pueden también llevar a la delección clonal (150).

A diferencia de la región medular tímica, la corteza es relativamente impermeable a la circulación de antígenos y células derivadas de médula ósea, especialmente células dendríticas (151). Por esta razón se duda de que la corteza contribuya de manera substancial a la inducción de tolerancia, por lo menos bajo condiciones fisiológicas (152).

Como se discutirá en los próximos puntos, la delección clonal de células T maduras fuera del timo, parece ser precedida por una respuesta proliferativa fuerte (153). No existe evidencia de que esto mismo suceda en el timo. Aquí, parecería que el contacto de los linfocitos T inmaduros con el antígeno llevaría a la muerte celular de los mismos por apoptosis (141). Este proceso se caracteriza por la aparición de proyecciones citoplasmáticas,

condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN (154). La célula luego se desintegra y es rápidamente fagocitada por macrófagos sin inducir inflamación. El proceso bioquímico involucra la síntesis de RNA y proteínas y lleva a la activación de endonucleasas dependientes de calcio, las cuales clivan al ADN a nivel de los nucleosomas. Los eventos bioquímicos tempranos todavía no están claramente comprendidos. Los ionóforos de calcio pueden inducir el proceso en algunos sistemas experimentales, sugiriendo que el aumento de calcio intracelular derivado de la señalización a través del TCR debe ser importante (155).

Se ha sugerido que la selección negativa ocurriría en el estadio doble positivo. Kiesielow y col. han demostrado que en ratones transgénicos para el TCR (156) el número de timocitos doble positivos específicos para el antígeno H-Y se encontraba fuertemente reducido en los machos, mientras que en las hembras, que no expresan el antígeno H-Y, el número de timocitos doble positivos no se encontraba modificado.

Además, se ha determinado que tanto las células T CD4+ como las CD8+ que portan la región V β 17a - que es reactiva frente a I-E - son eliminadas en ratones que expresan I-E, a pesar de que en la periferia solamente la población de células T CD4+ V β 17a+ es reactiva a I-E (144,145); en segundo lugar, el tratamiento de timos en desarrollo con anticuerpos bloqueantes anti-CD4 permite el desarrollo de linfocitos T CD8+ V β 17a+ en animales que expresan I-E (157); finalmente, también se ha demostrado que ratones Mls-1^a tratados al nacimiento con anticuerpos anti-CD4 presentan células T maduras V β 6+ CD8+ (158). El conjunto de estos resultados sugiere que la selección clonal ocurre en el estadio doble positivo.

Por el contrario, otros experimentos sugieren que ésta también puede tener lugar en el estadio simple positivo. MacDonald y Lees (159) demostraron que el timo neonatal de ratones BALB.D2.Mls^a (Mls^a) contiene una población significativa de células T CD4+CD8-V β 6+. Cuando éstas fueron cultivadas in vitro, una gran proporción (60%) de las células

autorreactivas murieron por apoptosis. Los autores han sugerido que estos timocitos CD4+CD8- podrían ser un subconjunto relativamente inmaduro que ya haya recibido una señal de muerte irreversible en el estadio CD4+CD8+. En el mismo sentido, la adición de superantígenos bacterianos a cultivos de órgano de timo fetal (160,161) determinó la eliminación de timocitos maduros que expresan la región variable β reactiva a dichos superantígenos.

Hasta el presente, entonces, no existe consenso acerca del estadio en el cual ocurriría la selección negativa.

Se ha sugerido que la observación de que en los ratones transgénicos se delecta la mayor parte de los timocitos inmaduros (doble positivos), sea el resultado de una expresión temprana del TCR de alta densidad en los timocitos inmaduros por la preexistencia de los genes α y β ya rearrreglados. En este sentido, se demostró que en ratones transgénicos para la cadena β , en los que la expresión del TCR en los timocitos en desarrollo sigue un curso normal puesto que su aparición en la superficie celular debe esperar el rearrreglo endógeno del locus que codifica para la cadena α , la delectación ocurre en el estadio simple positivo (162).

Se ha propuesto que el momento en el que ocurre la delectación clonal estaría determinado por el grado de afinidad entre el TCR y el antígeno. En estudios realizados con ratones transgénicos para las cadenas α y β con especificidad dual (para el superantígeno Mls-1^a y para el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) en asociación con H-2D^b) se ha demostrado (163,164) que la expresión de estos dos antígenos (Mls-1^a o LCMV, más H-2D^b) causa la delectación de timocitos en diferentes estadios del desarrollo. La interacción del receptor T con un antígeno para el cual tiene alta afinidad (LCMV + D^b) causa una delectación más temprana que la interacción de los receptores T con antígenos hacia los cuales tienen más baja

afinidad (Mls-1^a). Alternativamente, es posible que otros factores, tales como un retardo en el comienzo de la expresión de Mls-1^a, o el confinamiento de la expresión de Mls-1^a a células específicas dentro del timo, puedan ser responsables del tiempo de deleción más tardío de los timocitos reactivos a Mls-1^a (150).

En resumen, los resultados muestran que los timocitos serían vulnerables a la deleción tímica a partir del momento en que comienzan a expresar el TCR. La tolerancia puede ser inducida en los timocitos por el contacto de sus receptores con ligandos expresados en células derivadas de la médula ósea situadas tanto en la corteza cuanto en la médula tímica. La eliminación clonal también puede ocurrir como resultado de la interacción entre los receptores del timocito y los ligandos en el epitelio medular del timo.

El timocito en desarrollo debe ser capaz de distinguir entre las interacciones del receptor que inducen la selección positiva - dadas por las células epiteliales de la corteza tímica - y aquellas que inducen la deleción clonal. Para comprender esto se han propuesto dos hipótesis. La primera se basa en un efecto de afinidad y la segunda en la idea de que los AMH en las células epiteliales corticales tímicas podrían no ser idénticas a aquellas expresadas en otros sitios anatómicos.

La hipótesis de afinidad propone que mientras que los timocitos con receptores de alta y baja afinidad serían positivamente seleccionados frente a los antígenos de histocompatibilidad propios, sólo los de alta afinidad serían subsecuentemente delecionados (165). Así, los clones con baja afinidad frente a los antígenos de histocompatibilidad propios sobrevivirían a la deleción tímica, constituyendo el repertorio periférico para péptidos extraños unidos a moléculas del MHC propio. Esta hipótesis no requiere de ninguna nueva propiedad

para las células epiteliales corticales, sólo es necesaria la capacidad de interaccionar con timocitos que expresen receptores con baja afinidad frente a antígenos de histocompatibilidad propios. De acuerdo a este modelo, luego de la selección positiva, la susceptibilidad de las células T a la selección negativa refleja un balance delicado entre (a) un incremento en la avidéz en la unión entre el TCR y los AMH como resultado de un aumento en la expresión de los TCR (y probablemente de moléculas de adhesión) y (b) una progresiva disminución en la sensibilidad a las señales negativas como resultado de la diferenciación a un estado más maduro del linfocito (152).

En cuanto a la segunda hipótesis, denominada hipótesis de ligando alterado, propone que pueden crearse variaciones en los AMH por la asociación de estas moléculas con distintos péptidos propios. Se han propuesto varias formas de la hipótesis del ligando alterado (166), pero todas se basan en la idea de que las células epiteliales de la corteza tímica pueden expresar AMH unidos a una colección de péptidos que no se encuentran en ninguna otra ubicación anatómica. Según esta hipótesis, tales células no podrían inducir delección clonal, lo cual explicaría cómo puede ocurrir tanto la selección positiva (en el epitelio cortical tímico) como la negativa (en células derivadas de la médula ósea), y llevar a la producción de células T maduras capaces de reconocer el complejo antígeno/AMH propio. Distintos experimentos apoyan esta hipótesis y sugieren que los antígenos del CMH en las células epiteliales de la corteza tímica no son exactamente iguales que aquellos expresados en otras zonas (167,168).

El estado de diferenciación del linfocito podría también determinar su suerte. Se postula que la delección clonal de los timocitos es causada por la interacción del receptor con los AMH, la que llevaría a un aumento en los niveles de Ca^{2+} libre intracelular, constituyendo una señal suicida para el timocito inmaduro (169). Por otra parte, se ha visto que el timocito inmaduro que expresa el TCR puede existir en dos estados diferentes en

cuanto a su sensibilidad a la delección clonal. En uno de estos estados, el reconocimiento dado por el receptor no causa un aumento del Ca^{2+} intracelular, y tales células no mueren cuando se unen al antígeno. En otro estado, probablemente más tardío, el reconocimiento llevaría a niveles más altos de Ca^{2+} intracelular y muerte (160). La característica que distingue entre estos dos estados parece ser el acoplamiento del receptor $\alpha\beta$ al CD3, ya que anticuerpos anti-CD3 causan un aumento de nivel del Ca^{2+} intracelular y muerte en ambas poblaciones de timocitos (160,169). Suponiendo que estas dos poblaciones de timocitos inmaduros existan, podría postularse que la primera población, que no puede ser eliminada por la interacción del TCR-AMH, sea la población sobre la cual actúa la selección positiva (150).

En resumen, factores tales como la forma de antígeno que es reconocida (ligando alterado), las diferencias de afinidad del receptor con su ligando, el sitio del timo en el que las células encuentran al antígeno (corteza o médula), la clase de células presentadoras (células epiteliales tímicas o derivadas de médula ósea), y el momento en que el timocito en desarrollo se encuentra con el antígeno (estado de maduración del timocito) parecerían jugar un rol en el tipo de selección actuante.

Anergia intratímica

Además de su rol decisivo en la inducción de delección clonal, el timo parece ser también extremadamente eficiente en la inducción de otro mecanismo alternativo de tolerancia, la anergia clonal o inactivación funcional de las células T.

Utilizando ratones F1 irradiados y reconstituídos con células de una de las cepas

parentales, Ramsdell y col. (170) han determinado que la expresión del superantígeno Mls-1^a y de AMH en células del estroma tímico radioresistente es capaz de inducir anergia en células T reactivas frente a los mismos. Utilizando el mismo modelo experimental, Roberts y col. (171) han demostrado que los timocitos en estado anérgico expresan receptores para IL-2 pero son incapaces de proliferar en respuesta a células que expresan el superantígeno Mls-1^a o a anticuerpos anti-Vβ6; luego maduran y migran hacia la periferia. Speiser y col. (172) confirmaron los resultados anteriores y demostraron que las células T de las quimeras presentan variabilidad en cuanto a su reactividad T in vitro hacia el superantígeno Mls-1^a, dependiendo del haplotipo H-2 de la célula stem utilizada para la reconstitución del ratón irradiado. En quimeras reconstituidas con células cuyo haplotipo era H-2^a, los linfocitos maduros Vβ6+ presentes no respondían al superantígeno Mls-1^a in vitro, es decir se encontraban anérgicos. Por el contrario, cuando las quimeras se habían reconstituido con células de médula ósea cuyo haplotipo era H-2^b, las células T Vβ6+ presentes respondían fuertemente a dicho superantígeno. Los autores sugieren que la inducción de anergia en las células Vβ6+ reactivas a Mls-1^a puede estar controlada por la afinidad del receptor T hacia las células derivadas de médula ósea presentes en el timo, dependiendo dicha afinidad de los AMH involucrados.

Posteriormente, Hammerling y col. (173) utilizando un modelo de ratones transgénicos que expresaban el antígeno H-2K^b en una fracción de las células epiteliales de la médula tímica demostraron que la expresión del mismo en dichas células era capaz de inducir anergia clonal, siendo suficiente que una pequeña fracción de estas células lo expresara.

4.b. Mecanismos de tolerancia periférica

La mayoría de los autores concuerdan en que la deleción clonal o la anergia intratímica no serían los únicos mecanismos capaces de silenciar a las células autorreactivas. La deleción en el timo es un evento estocástico que probablemente no elimine el 100% de las células T autorreactivas. Por otro lado, existirían antígenos propios no expresados en el timo. Se ha postulado entonces que deberían existir mecanismos capaces de mantener la tolerancia frente a aquellos antígenos no expresados constitutivamente en el timo. Algunos autores han propuesto que los antígenos propios no expresados anatómicamente en el timo podrían entrar a la circulación y ser capturados por las células tímicas residentes y/o presentadoras de antígeno, lo que resultaría en el escenario normal de la deleción clonal tímica. También se ha sugerido que los antígenos pueden ser transportados al timo por células presentadoras circulantes (174).

Otros autores, en cambio, han propuesto distintos mecanismos de tolerancia periférica:

- inactivación clonal (anergia) periférica.
- deleción clonal periférica.
- inmunosupresión mediada por células T (Ts).

Anergia periférica

Experimentos recientes sugieren que la inactivación funcional, o anergia clonal, es un

mecanismo capaz de establecer tolerancia periférica para antígenos propios que no están expresados en órganos linfoides primarios (175) o para células que escapan a la delección clonal (176).

La anergia periférica ha sido demostrada experimentalmente in vivo. Las células T CD4⁺ de ratones que expresan un transgen que codifica para AMH de clase II sólo en las células β del páncreas, se tornan tolerantes al producto del transgen por un mecanismo de anergia (177). Esto es, las células que expresan un TCR específico para los AMH transgénicos están presentes pero no proliferan ni en respuesta al AMH expresado en esplenocitos ni frente a anticuerpos anti-TCR. Estudios in vitro demostraron que las células purificadas que expresaban el transgen no sólo no estimulaban a los clones T específicos, sino que los volvían anérgicos (11). Se ha podido demostrar también que las células β del páncreas que portan un transgen que codifica para moléculas de histocompatibilidad de clase I son capaces de inducir anergia en clones CD8⁺ (175).

Se ha demostrado que ratones de la cepa BALB/c -que normalmente delecionan las células T V β 11+- timectomizados al día tres luego del nacimiento, no son capaces de delecionar dichos clones T; lo mismo ocurre en el caso de ratones de la cepa DBA/2 respecto de los clones T V β 6+. Sin embargo, estas células potencialmente autorreactivas, se tornan anérgicas a juzgar por su incapacidad de responder frente a los anticuerpos anti-V β apropiados o frente a células que expresan los respectivos superantígenos. Se ha postulado que la inducción del estado de anergia sería extratímica, puesto que el timo neonatal (fuente de los linfocitos T periféricos) contiene células T autorreactivas funcionales (179).

Blackman y col. (176) estudiaron los mecanismos de tolerancia que operan en ratones transgénicos para el TCR V β 8.1 y que expresan el ligando para este TCR (Mtv- γ). A pesar de que algunas células T V β 8.1 son delecionadas en el timo, muchas escapan hacia la

periferia donde están presentes en estado anérgico. En este caso, las células T Vβ8.1 transgénicas no proliferan en respuesta a IL-2 exógena y no incrementan sus niveles de Ca²⁺ intracelular cuando son estimuladas a través del TCR. Los autores sugieren que las células T Vβ8.1 CD4+ se tornarían anérgicas en la periferia (17).

Sumado a lo descripto anteriormente, se ha sabido por muchos años que se puede inducir la no respuesta de células T CD4+ en individuos adultos cuando son inoculados por vía endovenosa u oralmente con antígenos en forma degradada (180), o acoplados con un cross-linker químico a células linfoides (181). También se puede inducir anergia clonal específica para AMH extraños al inocular por vía endovenosa células alogeneicas de sangre periférica (182) o esplenocitos deplecionados de células adherentes (183) por vía endovenosa en animales normales adultos.

La inoculación endovenosa de superantígenos, incluyendo exotoxinas bacterianas y esplenocitos portadores de Mls extraños también induce anergia clonal, la que es precedida por una expansión clonal (153,184). La inoculación de células estimuladoras Mls-1^a en ratones Mls-1^b induce una fuerte estimulación de células T Vβ6+ que luego es seguida por la desaparición de gran parte de las células reactivas al antígeno. Las células que no sufren deleción son incapaces de responder in vitro al superantígeno (153). Este tipo de anergia se ha denominado "agotamiento clonal" (clonal exhaustion) (185).

Deleción clonal periférica

Por mucho tiempo, se consideró que la inducción de tolerancia intratímica ocurría exclusivamente por mecanismos de deleción clonal, y se pensaba que en la periferia operaban

mecanismos alternativos. Estos dogmas han sido recientemente desterrados. A pesar de ser verdad que las células T inmaduras requieren dosis relativamente bajas de antígeno para la inducción de deleción (186,187), la susceptibilidad a la muerte celular programada (apoptosis) no sería prerrogativa de las células T inmaduras, sino que puede ser también inducida en timocitos maduros (CD3+ CD4+ CD8- o CD3+ CD4- CD8+) (188) y también en células T periféricas (184,189-191).

Las células T en desarrollo deben pasar un filtro inicial en el timo, donde la mayor parte de las células T que reconocen superantígenos propios (150) o péptidos propios presentados por AMH propios (192) son eliminadas físicamente. Sin embargo, la eliminación clonal de células T específicas frente a lo propio puede detectarse también en la periferia, como demostraron Jones y col. y Webb y col. al determinar la ausencia de células T VB6+ en ratones adultos timectomizados portadores de Mls-1^a (153,193).

Moss y col.(194) fueron los primeros en demostrar que el reconocimiento de una célula T por otra célula T puede llevar a la muerte celular por apoptosis, en lugar de servir meramente como target de citotoxicidad. La apoptosis es disparada si una célula T que ha recibido una señal a través de su TCR, también recibe una señal a través del dominio $\alpha 3$ del AMH de clase I presente en su membrana. Suryprakash y col. (195) han demostrado que dicha señal puede ser aportada por una molécula CD8 -que reconoce el dominio $\alpha 3$ - presente en un CTL o por anticuerpos dirigidos hacia ese dominio e inducir la muerte en los precursores de CTL y de células T helper.

Supresión T

Gershon y Kondo (196) en 1971 mostraron que la transferencia adoptiva de esplenocitos era capaz de inhibir específicamente la inmunidad humoral. Se vio que las células que mediaban este efecto derivaban del timo y eran antígeno específicas, y más tarde fueron denominadas células T supresoras (Ts) (197). Estudios in vitro mostraron que las células Ts también regulaban negativamente en forma específica las respuestas proliferativas T (197). La demostración de que las células Ts podían tornar a otros linfocitos no respondedores al antígeno sugiere la existencia de un mecanismo alternativo a la delección clonal y a la anergia, para el mantenimiento de la tolerancia frente a lo propio, y da lugar a la posibilidad de que las células Ts jueguen un rol importante en la inmunorregulación (198). Estudios subsecuentes realizados en numerosos laboratorios han documentado el fenómeno de supresión antígeno-específica mediada por células T (199-201).

A pesar de que a principios de los ochenta comenzó a existir cierto escepticismo acerca de las células Ts y su rol fisiológico (202), se han hecho progresos significativos para entender la fenomenología de las células Ts (203-205). Los mayores avances han surgido de la caracterización molecular de los receptores utilizados por las células Ts, de los factores que producen estas células y del entendimiento de los mecanismos operantes.

A diferencia de los mecanismos de delección y anergia clonal, los cuales se disparan a través del TCR de la célula tolerizada e involucran la eliminación física o inactivación funcional de la célula tolerizada, las células Ts inhiben la actividad de otras células tales como células T, B y macrófagos (206,207). Esta inhibición se ejercería través de una gran

variedad de formas. Estas incluyen:

a) mecanismos citotóxicos, los cuales requieren de un reconocimiento específico del complejo antígeno-AMH presente en una célula T, B o macrófago y se ejercen por mecanismos efectores específicos (mediados por células) o no específicos (mediados por citoquinas) (208,209).

b) la liberación de citoquinas inhibitorias no citotóxicas: las células Ts liberan citoquinas inhibitorias antígeno no-específicas luego del reconocimiento del complejo antígeno/AMH en la célula presentadora. Estas citoquinas abarcan moléculas tales como IFN- γ (210), TGF- β (211), que suprime la proliferación T in vitro, y la IL-10 que inhibe la producción de IL-2 por las T helper (212).

c) mecanismos no citotóxicos que operan por contacto célula-célula. La célula Ts reconoce a otras células T o a células presentadoras a través de su TCR y envía señales negativas no citolíticas (que no incluyen factores solubles) hacia dichas células blanco vía AMH o moléculas accesorias (213).

Varios grupos de trabajo han demostrado que la mayor parte de las células Ts utilizan los TCRs $\alpha\beta$ convencionales (212) y se ha visto que reconocen y responden a péptidos presentados por AMH de clase I o II (214). Existe la posibilidad de que algunas células Ts utilicen otros tipos de receptores antígeno específicos, tales como TCR $\gamma\delta$ o un nuevo TCR (TCR $\gamma\alpha$) (215).

Algunos factores supresores antígeno-específicos son codificados, al menos en parte, por los genes que codifican para las cadenas α o β del TCR y parecen representar alguna forma de TCR soluble. La naturaleza molecular de estos factores, y particularmente la de las moléculas con las cuales ellos se pueden asociar (por ejemplo moléculas I-J), así como el mecanismo por el cual estos factores antígeno específicos suprimen una respuesta inmune,

quedan aun por dilucidarse (216,217).

Desde su descubrimiento, se ha discutido si las células Ts representan un linaje aparte de células T (203,205). La evidencia acumulada sugiere que las células Ts serían heterogéneas y que por lo menos algunas células Ts pueden ser Th tipo 1, Th tipo 2 o CTLs convencionales o modificadas. En muchos sistemas, tanto los linfocitos $\alpha\beta$ TCR+ CD4+ como CD8+ pueden funcionar como células Ts.

Aún no está claro hasta qué punto las células Ts juegan un rol en el mantenimiento de la tolerancia hacia antígenos propios y en la regulación de la respuesta inmune hacia antígenos extraños. Estudios realizados en varios sistemas aportan evidencia acerca de un rol importante en la prevención de patologías autoinmunes, como por ejemplo la encefalomiелitis autoinmune experimental (211), y en la regulación de las respuestas mediadas por anticuerpos, tales como la IgE (218).

5. MECANISMOS DE INDUCCION DE ANERGIA

Se han descripto tres mecanismos posibles para explicar el hecho de que una célula T en desarrollo sea seleccionada negativamente por delección clonal o bien inducida a tornarse anérgica: el estado de diferenciación del timocito, el grado de afinidad o avidéz por el ligando y la participación de señales secundarias. Aunque estos mecanismos serán tratados por separado, es probable que el sistema inmune los utilice de manera simultánea. Además, el tipo de tolerancia inducida puede variar de situación en situación, dependiendo del tipo de antígeno, ruta de inmunización, etc.

Estado de diferenciación

No existen aún datos definitivos que demuestren que el estado de diferenciación determine si un timocito es plausible de ser deleciónado o inactivado funcionalmente.

No está claro en qué punto de la diferenciación los timocitos son susceptibles a la inducción de anergia. Utilizando un modelo experimental de quimeras de médula ósea, Ramsdell y Fowlkes (219) reportaron que tanto los timocitos CD4+ como los CD8+ simple positivos que expresaban un TCR específico para MIs eran no respondedores al superantígeno. Los intentos de bloquear la inducción de anergia con anticuerpos anti-CD4 fueron poco exitosos. Si bien este resultado no diferencia si la inducción de anergia ocurre en el estado simple positivo o doble positivo, implicaría que -a diferencia de los requerimientos para la deleción clonal-, la molécula CD4 no sería necesaria para la inducción de anergia intratímica.

Afinidad/avidez

El segundo mecanismo propuesto para la inducción alternativa de deleción o anergia clonal, es la avidez de la interacción entre la célula T y las células presentadoras de antígeno ya sean intratímicas o periféricas. La avidez de la interacción no puede ser medida directamente, y puede incluir distintas interacciones: la afinidad de interacción entre el TCR y el complejo AMH/antígeno y las interacciones con las moléculas accesorias. Además, la

avidez de interacción entre las células T y la célula presentadora está afectada tanto por el número de TCR como por los AMH involucrados.

Con respecto al grado de afinidad de la interacción entre el TCR y el complejo AMH/antígeno, Blackman y col.(176), utilizando un modelo de ratón transgénico para el TCR V β 8.1, sugirieron que la respuesta hacia el superantígeno Mls-1^a depende en cierto grado de la expresión de la cadena α . Se encontraron altos niveles de células T CD8⁺ y una delección clonal parcial de timocitos CD4⁺ en ratones que expresan Mls-1^a. Aquellas células T CD4⁺ que escapaban a la delección clonal y migraban a la periferia no respondían al superantígeno. Los timocitos inmaduros no mostraron una disminución de la reactividad, lo cual indicaría que la anergia es inducida en la periferia, o que las células se tornan anérgicas en un estadio muy tardío del timocito (simple positivo) en desarrollo y rápidamente migran hacia la periferia. La cadena β utilizada no sería fuertemente reactiva a Mls-1^a, y dependería de la cadena α para su reactividad, resultando posiblemente en un espectro de afinidades. Los autores sugieren que los clones de muy alta afinidad son delecionados, mientras que los de afinidad más baja escapan a la delección y son inactivados en la periferia.

Segunda señal

Este modelo fue propuesto por primera vez por Bretscher y Cohn (220) para explicar la inducción de tolerancia en linfocitos B. Establece que la ocupación del receptor antigénico solo induce anergia, mientras que la ocupación del receptor antigénico más una segunda señal induce inmunidad. Este modelo se ha estudiado más profundamente in vitro analizando la inducción de anergia en clones T antígeno-específicos (221).

A pesar de ser necesaria, la sola ocupación del TCR no induce la proliferación de células T normales. La interleuquina 1 (IL-1) sirve de co-estímulo para algunos clones T CD4+ productores de IL-4 (clones T_H2) permitiendo a las células responder a la IL-4 que ellas producen en forma autocrina (222). Por el contrario, la señal co-estimuladora para los clones productores de IL-2 (clones T_H1) no sería provista por citoquinas; en este caso la segunda señal sería aportada por una molécula de superficie de la célula presentadora (APC) (223). Las evidencias del requerimiento de esta señal co-estimuladora provienen del hecho de que clones T productores de IL-2 no proliferan o producen IL-2 en respuesta a APC presentadoras de péptidos si éstas están metabólicamente inactivas o si el antígeno es presentado por AMH purificados en membranas artificiales (223). En esta situación, esta función puede ser suplida por esplenocitos viables cuyos AMH no puedan ser reconocidos por el TCR de las células T, restableciéndose la proliferación T y la producción de IL-2 (223).

Experimentos recientes indican que la interacción entre el antígeno CD28 -expresado en los linfocitos T- con su ligando B7 -expresado en las células presentadoras- podría aportar la segunda señal postulada. Así, un anticuerpo monoclonal dirigido al CD28 (224), o células transfectadas que expresan el marcador B7 proveen el tipo de estimulación dada por la APC, sugiriendo que estas moléculas juegan algún rol. La observación de que las células B activadas expresan más moléculas B7 que las arrestadas, es consistente con esta idea (225). Otras moléculas que pueden dar señales de activación a las células T como la molécula asociada a la función linfocitaria 1 (LFA-1) y el CD2 podrían también estar involucradas (226), a pesar de que es difícil excluir la posibilidad de que estas moléculas sólo aumenten la función T primariamente, mejorando la adhesión con las APCs.

Se ha observado que no es posible inducir anergia en un medio libre de Ca²⁺ o en presencia de ciclosporina A (223), una droga que parece inhibir señales de transducción

mediadas por Ca^{2+} a través del TCR en un estadio tardío (227); estos resultados sugieren que la anergia es inducida activamente por un aumento en el Ca^{2+} intracelular. La cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica, también bloquea la inducción de anergia (223), lo que implicaría que se deben sintetizar nuevas proteínas para establecer el estado de inactivación funcional.

Una vez inducida, la anergia se mantendría por un defecto en la acumulación de ARN mensajero para la IL-2 y no por pérdida de la expresión del TCR, CD4, moléculas de adhesión, o del receptor de superficie para la IL-2 (223,228).

Estos resultados han llevado a Mueller y col. (223) a postular el siguiente modelo de dos señales para la inducción de anergia. Las células T_H1 que reconocen al complejo péptido-AMH en una APC profesional recibirían determinadas señales a través del TCR (incluyendo un aumento de Ca^{2+} intracelular y la activación la tirosin-kinasa y protein-kinasa C) y de receptores co-estimulatorios (CSRs); estas señales serían requeridas para la producción de reguladores positivos de la transcripción de IL-2 (por ejemplo NFAT-1, AP-1 y Oct-1). El ARN mensajero para IL-2 y las proteínas serían sintetizados transitoriamente (quizás porque la ocupación del TCR es transitoria) y las células T proliferarían en respuesta a la IL-2 que ellas secretan. Por otra parte, en este modelo se propone que las señales generadas por los CSRs también impiden la síntesis de ciertas proteínas denominadas anérgicas. Si las células T_H1 reciben una señal a través del TCR sin señales co-estimulatorias, se producirían las 'proteínas anérgicas'. Estas proteínas inhibirían la subsecuente transcripción de IL-2, quizás interfiriendo con la acción de los factores positivos para la transcripción.

Se ha observado que en algunos casos, el estado anérgico puede ser revertido por la

adición de IL-2 (229,230). No está claro si la reversión se debe a la señalización a través del receptor para IL-2 o al proceso mismo de división celular. Distintos experimentos (231) sugieren que la inducción de anergia parece depender fuertemente de la falta de proliferación. Así, la activación de clones T puede llevar a la inducción de un estado de anergia si la IL-2 es retirada de los cultivos celulares (229) o si se agrega anticuerpos anti-IL-2 o anti-receptor para IL-2 (232). La coestimulación prevendría la inducción de anergia al sinergizar con la señalización a través del TCR para producir IL-2, y la división causada por la IL-2 diluiría cualquier proteína inhibitoria que se haya formado. La acción sinérgica de la coestimulación parece mediar a través de la estabilización del ARN mensajero para la IL-2 (233) y/o a través de un aumento en la transcripción del gen de IL-2 (234).

Como se vio anteriormente hay varios experimentos que podrían apoyar el modelo de las dos señales. En cuanto a la inducción de anergia periférica, los resultados obtenidos cuando los AMH de clase II son expresadas sólo en las células β del páncreas (177), son consistentes con la hipótesis de que las células presentadoras de antígeno 'no profesionales' tales como las células β pancreáticas, podrían ser capaces de inducir tolerancia periférica (anergia) al presentar antígenos en ausencia de señales co-estimulatorias.

Los resultados obtenidos por Blackman y col. (176) también podrían explicarse por el modelo de la ausencia de la segunda señal suponiendo que las células VB8.1 pueden tornarse anérgicas al enfrentarse con linfocitos B arrestados que expresan el Mtv-7 pero aportan pocas señales coestimulatorias.

Cuando se induce anergia al inocular antígenos acoplados a células linfocíticas con un cross-linker químico (181), el fenómeno podría también ser explicado por el hecho de que los cross-linker químicos usados en estos estudios inhibirían el aporte de señales

coestimuladoras dadas por las APCs (223)

En cuanto a la inducción de anergia intratímica, el modelo de la segunda señal es apoyado por experimentos en los cuales la tolerancia es examinada en quimeras para médula ósea. Varios investigadores han demostrado que el Mls expresado en células derivadas de la médula ósea en el contexto de un haplotipo CMH permisivo (es decir que sea capaz de presentar el superantígeno Mls) resulta en la delección específica de los linfocitos T que reconocen al superantígeno (170,171,235). Si, por el contrario, el complejo Mls/AMH es presentado por el componente epitelial del timo, cuyas células no son capaces de aportar la señal co-estimuladora (236), las células escapan a la delección clonal pero serían tolerizadas a través de la inducción de anergia. Estos datos podrían apoyar el modelo de la ausencia de la segunda señal en la inducción de anergia. La presentación del antígeno por las células derivadas de la médula ósea resultaría también en la inducción de una segunda señal, lo que llevaría a la delección de la célula. Si el complejo es presentado en una célula epitelial, la segunda señal requerida no sería dada y en consecuencia la célula se inactivaría funcionalmente.

Speiser y col. (172) no concuerdan con las conclusiones recién mencionadas. Utilizando quimeras de médula ósea similares, demostraron que las células derivadas de médula ósea pueden también inducir anergia. La diferencia de interpretación resulta de una definición distinta de los haplotipos permisivos para la presentación de Mls. Mientras Ramsdell y col. (170) y Roberts y col. (171) consideran al H-2^b un haplotipo no permisivo, se demostró que el complejo I-A^b/Mls tiene una capacidad limitada de deleccionar intratímicamente a los timocitos que porten el TCR específico para Mls (237). Speiser y col. (172) demostraron que si el haplotipo de las células derivadas de médula ósea era H-2^b, se inducía anergia. Por el contrario si expresaban el haplotipo H-2^d que es verdaderamente no permisivo para la

presentación de Mls (237) no se inducía tolerancia. Según Jones y col.(238), estos datos apoyarían un modelo de afinidad entre el TCR y el complejo AMH/Ag. Si la capacidad para presentar Mls de los distintos haplotipos es $H-2^a < H-2^b < H-2^k$, entonces la interacción con el complejo Mls/AMH en el mismo tipo celular derivado de la médula ósea podría resultar en la delección clonal (cuando existe alta afinidad), inducción de anergia (cuando existe baja afinidad) o ninguna señal (afinidad por debajo de cierto umbral).

6. ANTECEDENTES

En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio, utilizando un modelo de híbridos F1 recíprocos adultos, habíamos demostrado la existencia de efectos maternos actuantes a través del amamantamiento (239a, 239b, 239c). Demostramos que los híbridos recíprocos diferían en su capacidad estimuladora en reacciones de cultivo de linfocitos semialogeneico y en su susceptibilidad a las reacciones de GvH; estas reacciones resultaron siempre menores cuando estaban dirigidas hacia antígenos de histocompatibilidad propios de origen paterno (239b). Los pares de híbridos F1 recíprocos también diferían en la reactividad T frente a antígenos convencionales extraños (239c). El amamantamiento parecía estar involucrado en las diferencias registradas y éstas podían detectarse sólo cuando las cepas parentales diferían en el superantígeno Mls-1^a. Pudo observarse además una correlación entre la presencia de superantígenos Mls-1^a en la cepa materna y una disminución de la reactividad T frente a antígenos convencionales en la descendencia de dichas madres.

Hemos hipotetizado que el impacto temprano con superantígenos Mls-1^a o Mls-1^a-like

maternos presentes en calostro y leche sería capaz de inducir alteraciones permanentes en la respuesta inmune del hijo. A lo largo de este trabajo, utilizamos un nuevo modelo experimental que permitió investigar esta hipótesis.

D

El objetivo de este trabajo fue investigar si el amamantamiento de ratones BALB/c (Mls-1^b) con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) y F1(BALB/cxDBA/2), portadoras de superantígenos Mls-1^a, era capaz de modificar el repertorio T de la cría por alteración de la frecuencia y/o funcionalidad de los clones reactivos a dicho superantígeno.

Para esto, ratones de la cepa BALB/c (Mls-1^b) se amamantaron desde el nacimiento con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) y F1(BALB/cxDBA/2), ambas Mls-1^{bsa}. Como controles, ratones de la cepa BALB/c se amamantaron con sus propias madres, con nodrizas F1(BALB/cxC57BL/6), F1(BALB/cxC3H/HeJ) (Mls-1^{bsb}), o con nodrizas singeneicas.

A partir de las cuatro semanas de vida se investigó:

- A. La frecuencia de clones T reactivos al superantígeno Mls-1^a
- B. La reactividad T frente a antígenos de histocompatibilidad expresados o no por la nodriza, y frente a antígenos convencionales.

1. ANIMALES

Se utilizaron animales de edades comprendidas entre los 4 y las 64 semanas de edad, de ambos sexos. Todos provenían del bioterio de la División Medicina Experimental, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina.

1.a. Cepas utilizadas

Se utilizaron ratones de las cepas endocriadas BALB/c (H-2^d, Mls-1^{b2*}); AKR/J (H-2^k, Mls-1^{*2^b}); DBA/2 (H-2^d, Mls-1^{*2*}); C57Bl/6 (H-2^b; Mls-1^{b2^b}) y C3H/HeJ (H-2^k; Mls-1^{b2*}). A partir de combinaciones de estas cepas se obtuvieron los siguientes híbridos de la primera generación: F1(BALB/cxAKR/J), F1(BALB/cxDBA/2), F1(BALB/cxC57Bl/6), F1(BALB/cxC3H/HeJ). Por convención, en la nomenclatura de los híbridos F1 se coloca en primer término la cepa materna y en segundo término la cepa paterna.

1.b. Amamantamiento con nodrizas F1

Se colocaron hembras preñadas a término, en jaulas especiales que contenían un estante intermedio enrejillado, de manera de permitir el paso de las crías recién nacidas al piso inferior de las jaulas y evitar el contacto directo con sus madres. Dentro de las 4 horas

posteriores al nacimiento, la mitad de la camada fue devuelta a su madre; la otra mitad se colocó en jaulas de parturientas F1 recientes a las que se retiraba su cría (239b).

Las crías amamantadas con nodriza se denominan con el nombre correspondiente a la cepa, seguido por el subíndice f y el nombre del híbrido utilizado como nodriza. Por ejemplo: BALB/c_{fF1(BALB/cxAKR/J)}: ratones de la cepa BALB/c amamantados con híbridos de la primera generación entre hembras BALB/c y machos AKR.

2. ANTICUERPOS MONOCLONALES

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: 44.22.1 (anti-Vβ6) (240) cedido gentilmente por la Dr. E. Simpson; KJ16.133 (anti-Vβ8.1-2) (241); F23.2 (anti-β8.2) (242); GK 1.5 (anti-CD4) (243,244); 3.168.8 (anti-CD8) (245) cedidos gentilmente por la Dr. S. Webb. y M4.1 (anti-gp52) (246) gentilmente cedido por el Dr. Schlom.

3. SUSPENSIONES CELULARES

Se extrajeron bazos, timos o ganglios y se prepararon las suspensiones celulares en medio de cultivo RPMI 1640 con rojo fenol (Sigma) por pasaje a través de una malla de acero inoxidable. Estas suspensiones se pasaron luego dos o tres veces por aguja fina, de manera de permitir una mejor separación de las células. Después de tres lavados con medio de cultivo suplementado con 5% de suero fetal bovino, se determinó la viabilidad por el método de exclusión de Azul Tripán, requiriéndose un mínimo de 90% de células vivas.

Cuando las suspensiones se utilizaron para llevar a cabo análisis citofluorométricos la resuspensión de las mismas se hizo en medio RPMI 1640 sin rojo fenol.

4. ANALISIS CITOFUOROMETRICO

Se incubaron alícuotas de células provenientes de timo o ganglios linfáticos resuspendidas en buffer Flow (RPMI 1640 sin rojo fenol suplementado con 3% de SBF, 0.1% azida sódica y 10mM Hepes) con diluciones apropiadas de anticuerpos monoclonales anti- VB a 4°C durante 20 minutos. Posteriormente (después de 2 lavados), se incubaron con fragmento F(ab')₂ de IgG de ratón anti-Ig de rata (Jackson Immunoresearch Lab, Inc.) o antisuero IgG anti-ratón (Sigma Chemical Co.) conjugados con fluoresceína también a 4°C durante 20 minutos. El porcentaje de clones T VB8.1+ se calculó sustrayendo el porcentaje de clones T F23.2+ al de clones KJ16.133+.

En los experimentos realizados para determinar qué sub-poblaciones T (CD4+ y/o CD8+) están afectadas, el tratamiento anterior se completó incubando las suspensiones con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD4 (GK1.5) marcado con ficoeritrina o anti-CD8 biotilado (Becton Dickinson & Co., Mountain View, Ca) seguido por streptavidina-ficoeritrina (Becton Dickinson & Co., Mountain View, Ca).

Las células muertas fueron seleccionadas por un análisis de dispersión de la luz en ángulo de 90° y 180° ("forward scatter y side scatter"). A los valores obtenidos se les sustrajeron los valores de tinción inespecífica obtenidos con el segundo anticuerpo sólo (marcado con fluorocromo).

La frecuencia de los distintos clones se analizó en un FACScan (Becton-Dickinson)

o en un FACStar (Becton-Dickinson), con el programa Lysis II.

5. RECOLECCION DE LECHE Y DETECCION DE VIRUS

La leche fue obtenida de hembras C3H/He, BALB/c, AKR/J o F1(BALB/cAKR/J) en período de lactancia 2 minutos después de la inoculación de 0.5 IU de syntocinon/oxitocina (Sandoz, Basilea, Suiza). Las muestras de leche frescas fueron diluídas 1:20 con agua y centrifugadas a 600 g durante 5 min. con el objeto de remover la caseína (60). El suero de la leche fue luego centrifugado a 45.000 g durante 2 horas y el pellet fue resuspendido en agua. Se llevaron a cabo ensayos de ELISA con el objeto de medir la glicoproteína gp52 de MMTV en leche. Se adsorbieron distintas diluciones del pellet viral en placas de fondo plano de 96 pozos por incubación 4°C durante la noche (247). Las placas fueron luego saturadas con 5% de leche en polvo (Epitope, Inc., Beaverton, OR) en PBS y luego de lavarlas, se les agregó el anticuerpo monoclonal M4.1. Luego de seis lavados con 0.05% Tween 20 en PBS, se agregó un anticuerpo biotinilado específico para IgM de ratón (Vector Lab. Inc. Burlingame, Ca). Como sistema de detección se utilizó streptavidina peroxidasa y el color se visualizó con o-phenylendiamine.2HCl (Abbott Lab., Chicago, IL). La DO_{492nm} se determinó utilizando un lector de microplacas.

6. REACCIONES DE INJERTO CONTRA HUESPED (GvH)

Se llevaron a cabo ensayos locales descriptos por Ford et al. (248). Ratones F1 adultos

fueron inoculados por vía intradérmica (id.) en la almohadilla plantar izquierda con suspensiones celulares de bazo de ratones de una de las cepas parentales amamantados por nodrizas F1. Como control, los híbridos F1 huéspedes fueron inoculados en la almohadilla plantar derecha con el mismo número de esplenocitos de ratones de la misma cepa parental de igual sexo y edad pero amamantados por sus propias madres. Los volúmenes inoculados fueron de 0.05 ml en todos los casos, utilizándose para ello jeringas de precisión Hamilton. Siete días más tarde los huéspedes fueron sacrificados, disecándose cuidadosamente los ganglios poplíteos derecho e izquierdo, que fueron luego secados y pesados en una balanza Mettler, con una precisión de 0.1 mg.

Se determinó la diferencia de peso entre ambos ganglios poplíteos, parámetro que se establece como una medida de la capacidad alorreactiva de la cepa dadora frente a los antígenos de histocompatibilidad de la otra cepa parental, expresados por el huésped F1.

7. REACCIONES DE CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS ALOGENEICO (CMLA)

Se utilizaron como poblaciones estimuladoras células esplénicas provenientes de ratones de distintas cepas endocriadas. Para ello, las mismas se pretrataron con mitomicina-C. Se incubaron las suspensiones celulares con 33 ug/ml de mitomicina-C (Sigma) cada 10^7 células durante 45 minutos a 37°C. Los esplenocitos se lavaron luego tres veces con medio de cultivo, con incubaciones intermedias de 5 minutos a 37°C.

Los cultivos se llevaron a cabo en microplacas de fondo plano. Distintas dosis de células estimuladoras se co-cultivaron con células de ganglios periféricos provenientes de

ratones amamantados por nodrizas F1. Como control se utilizaron ratones de la misma cepa amamantados por sus propias madres. Los cultivos se desarrollaron en medio RPMI 1640 (Gibco Lab.) suplementado con 10% de SBF (Gibco Lab.), $5 \times 10^{-5} \text{M}$ de 2-mercaptoetanol (Sigma) y 1% de antibióticos, manteniéndose en estufa de 37°C en atmósfera húmeda y gaseada con 5% de CO_2 durante 4 días. 18 horas antes de la recolección se agregó en cada pozo 1 μCi de timidina tritiada (^3H) (actividad específica 20 Ci/mM , New England Nuclear). La recolección se llevó a cabo en forma automática sobre papel Whatman GF/A, el que fue luego colocado en viales con líquido de centelleo. La radioactividad fue determinada en un contador de centelleo líquido Packard 3002.

La medida de la proliferación T específica se calculó como: la diferencia en la incorporación de ^3H -Timidina entre las células re-estimuladas y las células sin re-estimular ($\Delta \text{ cpm} = \text{cpm en presencia de antígeno} - \text{cpm en ausencia de antígeno}$)

8. ENSAYOS DE PROLIFERACION T IN VITRO FRENTE A ANTIGENOS CONVENCIONALES

Se llevaron a cabo ensayos de proliferación T in vitro frente a ovoalbúmina (OVA) (Sigma).

8.a. Inmunización

Ratones F1 adultos fueron inmunizados de la siguiente manera: 0.04 ml de una emulsión de 100 μg de OVA en adyuvante de Freund incompleto (Sigma) se inocularon sc.

en la base de la cola de ratones BALB/c normales y amamantados por nodrizas F1. Para la inoculación se utilizaron jeringas de precisión Hamilton

8.b. Ensayos de proliferación T

Los ensayos de proliferación se llevaron a cabo 7 días después de la inmunización con OVA. Se prepararon suspensiones de ganglios inguinales y para-aórticos en medio RPMI 1640 suplementado con 20% de SBF (GIBCO), $5 \times 10^{-5} \text{M}$ de 2-mercaptoetanol (Sigma) y 1% antibióticos (penicilina/estreptomicina, Sigma). Los cultivos se llevaron a cabo en microplacas de fondo plano (Falcon 3072). Distintas dosis de células de ganglios fueron re-estimuladas con 40ug de ovalbúmina. La incubación se realizó en estufa de 37°C y en una atmósfera húmeda y gaseada con 5% de CO₂ durante 5 días; 18 horas antes de la recolección se agregó en cada pozo 1uCi de timidina tritiada (T3H) (actividad específica 20Ci/mM, New England Nuclear). La recolección se llevó a cabo en forma automática sobre papel Whatman GF/A, el que fue luego colocado en viales con líquido de centelleo. La radioactividad fue determinada en un contador de centelleo líquido Packard 3002.

La medida de la proliferación T específica se calculó como: la diferencia en la incorporación de ³H-Timidina entre las células re-estimuladas y las células sin re-estimar ($\Delta \text{ cpm} = \text{cpm en presencia de antígeno} - \text{cpm en ausencia de antígeno}$).

9. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD T

Los cultivos mixtos se llevaron a cabo en microplacas de fondo redondo. Como

población respondedora se utilizaron diferentes números de células provenientes de ganglios inguinales, axilares y poplíteos de ratones adultos BALB/c y BALB/c amamantados por nodrizas F1. Se estimularon con 5×10^5 esplenocitos alogeneicos irradiados (3000 rad, fuente de ^{137}Cs) y se incubaron durante 5 días, en estufa de 37°C en atmósfera húmeda y gaseada con 5% de CO_2 en 200ul de RPMI 1640 suplementado con 20% SBF, 1% de antibióticos y 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol. Como control se incubaron células respondedoras sin estimular o estimuladas con células singeneicas. Como target para la citotoxicidad se utilizaron blastos obtenidos incubando esplenocitos ($4 \times 10^6/\text{ml}$) con 6ug/ml de Con-A (Sigma) durante 48 horas. Estos se marcaron posteriormente con cromo radioactivo ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) (New England Nuclear Corp. Boston, MA). Al día 5 las placas se centrifugaron y las células se resuspendieron en 200ul de RPMI conteniendo 10^4 células target marcadas con ^{51}Cr . Luego de 4 horas de incubación a 37°C se midió la radioactividad liberada en 100 ul de sobrenadante en un contador de centelleo gama. La liberación espontánea se midió en los pozos con células respondedoras solas o con células singeneicas. La liberación máxima se determinó utilizando células target lisadas en una solución de 0.1% de detergente Tritón X100. Las determinaciones fueron llevadas a cabo por cuadruplicado usando por lo menos tres relaciones target:efectoras. La relación target:efectora fue calculada considerando que la recuperación de células viables al día 5 del cultivo mixto fue del 50% de la inicial.

El porcentaje de liberación de ^{51}Cr específico se calculó como:

$$100 \times \frac{(\text{liberación experimental} - \text{liberación espontánea})}{(\text{total incorporado} - \text{liberación espontánea})}$$

10. TRATAMIENTO DE LAS SUSPENSIONES CELULARES CON ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CD8

Las suspensiones celulares se incubaron durante 15 min. a T° ambiente, en una concentración de 1×10^7 células por cada ml de una dilución apropiada de anticuerpo monoclonal anti-CD8 (clon 53-6.72). Al término de dicha incubación, las suspensiones fueron lavadas e incubadas durante 30 min. a 37°C, con una dilución de complemento de cobayo. El procedimiento descrito se realizó 2 veces consecutivas. El anticuerpo utilizado fue gentilmente cedido por la Dra. Susan Webb (Department of Immunology, Research Institute of Scripps Clinic, La Jolla, California).

10.a. Ensayos de proliferación

Células de ganglios linfáticos ($2-4 \times 10^5$ /pozo) provenientes de ratones amamantados por nodrizas F1 o por sus propias madres pretratadas con anticuerpo monoclonal anti-CD8 más complemento fueron cultivadas en 200 μ l de medio RPMI 1640 (Gibco Lab.) suplementado con 5×10^{-5} M 2-mercaptoetanol (Sigma), penicilina/estreptomicina y 5% SBF (Gibco Lab.) en placas de 96 pozos de fondo plano. Algunos pozos fueron pretratados con diluciones 1:10 a 1:200 de anticuerpos monoclonales 44-22-1, F23.2 o 145.2C11 durante 12 horas a 4°C, y luego lavados 10 veces con medio sin SBF (249). Posteriormente, las células se cultivaron en estufa de 37°C en atmósfera húmeda y gaseada con 5% de CO₂ durante 48 horas. De la

misma manera, células de ganglios linfáticos pretratadas con anti-CD8 más complemento fueron co-cultivadas durante 72 horas con 4×10^5 esplenocitos AKR/J o DBA/2 tratados con mitomicina-C.

En ambos casos, 18 horas antes de la recolección se agregó en cada pozo 1 μ Ci de timidina tritiada (3 H) (actividad específica 20Ci/mM, New England Nuclear). La recolección se llevó a cabo en forma automática sobre papel Whatman GF/A, que fue luego colocado en viales con líquido de centelleo. La radioactividad fue determinada en un contador de centelleo líquido Packard 3002.

La medida de la proliferación T específica se calculó como: la diferencia en la incorporación de 3 H-Timidina entre las células re-estimuladas y las células sin re-estimar (Δ cpm = cpm en presencia de antígeno - cpm en ausencia de antígeno)

11. PRESENTACION DE LOS RESULTADOS

Las Figuras y Tablas contienen, salvo donde se indique, resultados representativos obtenidos de experimentos repetidos de 3 a 6 veces en forma independiente. En todos los casos los animales fueron testeados individualmente.

12. ESTADISTICA

El Test "t" de Student y el test exacto de Fisher fueron utilizados para determinar el grado de significación de los resultados obtenidos.

1. EFECTO DEL AMAMANTAMIENTO DE RATONES BALB/c (Mls-1^b) CON NODRIZAS F1(BALB/cxAKR/J) y F1(BALB/cxDBA/2), PORTADORAS DE SUPERANTIGENOS Mls-1^a, SOBRE EL REPERTORIO T.

En la primera parte de este trabajo se investigó si el amamantamiento de ratones Mls-1^b con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a era capaz de modificar el repertorio T.

Con este objetivo, ratones de la cepa BALB/c (Mls-1^b) se amamantaron desde el nacimiento con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) y F1(BALB/cxDBA/2),(Mls-1^{ba}). Como controles, ratones de la cepa BALB/c se amamantaron con nodrizas F1(BALB/cxC57BL/6), F1(BALB/cxC3H/HeJ), o BALB/c (Mls-1^{bab}). Una vez adultos se evaluó el porcentaje de linfocitos T Vβ6+ y Vβ8.1 (reactivos a Mls-1^a) por técnicas citofluorométricas.

1.a. Frecuencia de clones T Vβ6+ en ganglio y timo de ratones BALB/c de nuestra colonia amamantados normalmente

Luego de testear un número representativo de animales de nuestra colonia de ratones de la cepa BALB/c no se detectaron alteraciones en la frecuencia de células Vβ6+ a lo largo de la vida de los mismos. Los resultados obtenidos cuando se analizaron células provenientes de ganglio se muestran en la Figura 1. La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos cuando las células de ganglio fueron tratadas con anticuerpos anti-Vβ6 y anti-CD4 acoplados a

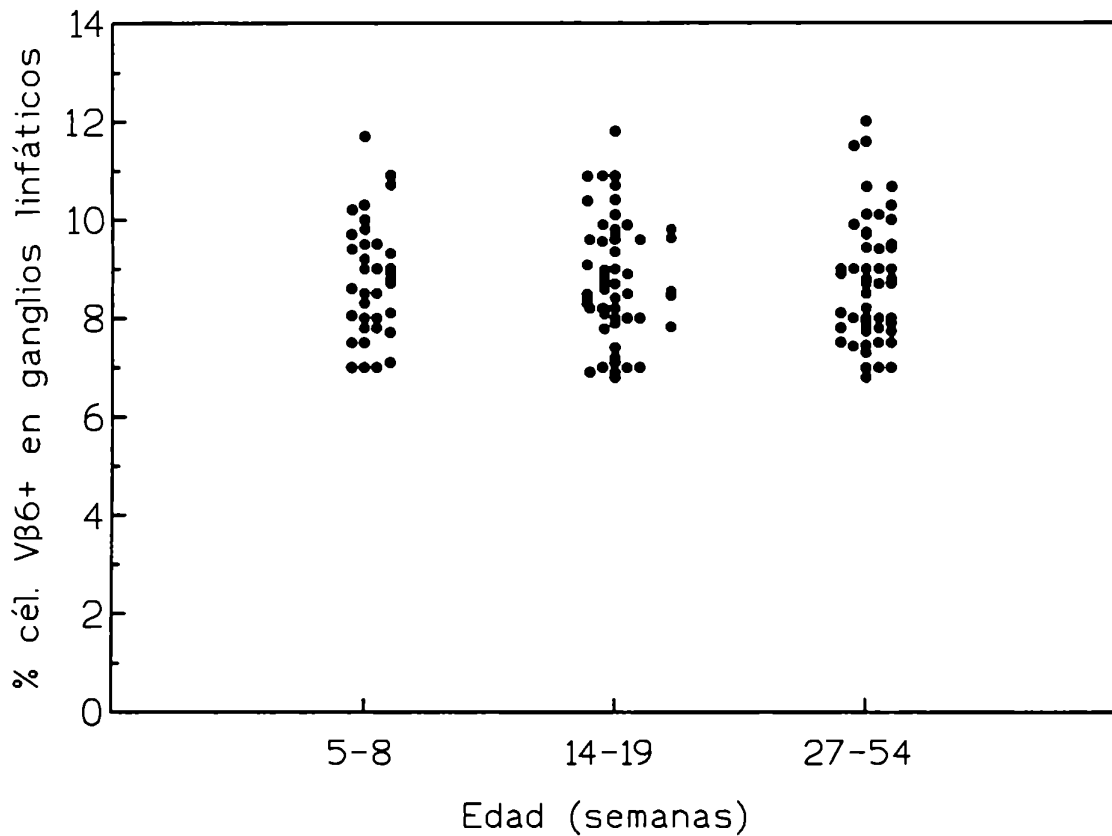


FIGURA 1

Células provenientes de ganglios linfáticos de ratones BALB/c fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal de rata anti-VB6 seguido por un anticuerpo anti-rata marcado con fluoresceína. Las células fueron analizadas por citofluorometría de flujo. Los puntos representan el porcentaje de células positivas en cada individuo. Los resultados presentados provienen de experimentos realizados con hembras, pero se obtuvieron resultados similares con machos.

TABLA 1

Frecuencia de células VB6+ en ganglios de ratones BALB/c de nuestra colonia.

edad (semanas)	% cel. de ganglio VB6+CD4+*
5-8	12.25 ± 0.83 (6)
14-19	14.46 ± 0.86 (6)
27-54	13.90 ± 0.30 (6)

Células provenientes de ganglios linfáticos fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal de rata anti-VB6 seguido por un anticuerpo anti-IgG de rata marcado con fluoresceína y luego con un anticuerpo monoclonal anti-CD4 marcado con ficoeritrina. Las células fueron analizadas por citofluorometría de flujo. Los resultados presentados provienen de experimentos realizados con hembras, pero se obtuvieron resultados similares con machos.

* Los resultados se expresan como la media del porcentaje de las células VB6+ CD4+ respecto de las células CD4+ totales ± ES (número de animales).

Los valores no difieren significativamente entre sí (Test "t" de Student).

distintos fluorocromos, lo cual permite determinar el porcentaje de la población V β 6+ CD4+. El porcentaje de linfocitos V β 6+ dentro de la población CD4+ permaneció constante entre las 5 y las 54 semanas de vida.

Con el objeto de estudiar la frecuencia de timocitos V β 6+ maduros, ratones BALB/c de distintas edades fueron tratados con 4mg de hidrocortisona por vía ip. 48 hs antes del ensayo. Esta hormona induce la eliminación de timocitos inmaduros (CD4+ CD8+) (146). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. Como puede observarse, no se encontraron alteraciones en el porcentaje de timocitos V β 6+ resistentes a la hidrocortisona en ratones BALB/c normales de edades comprendidas entre 5-8, 14-19, y 20-32 semanas de vida. La Figura 2 muestra un gráfico representativo de los perfiles de fluorescencia obtenidos.

El conjunto de estos resultados muestra que los ratones BALB/c de nuestra colonia no modifican el porcentaje de clones T V β 6+ a lo largo de su vida.

1.b. Frecuencia de clones T V β 6+ en ganglios linfáticos de ratones BALB/c amamantados con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1*

Ratones BALB/c se amamantaron desde el nacimiento con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) y F1(BALB/cxDBA/2). La utilización de nodrizas F1 permite evitar las posibles reacciones de injerto contra huésped que la madre pudiera causar a la cría como consecuencia del pasaje de células a través de la leche (250). Como controles se utilizaron ratones BALB/c amamantados por nodrizas F1(BALB/cxC57Bl/6), F1(BALB/cxC3H/He),

TABLA 2

Frecuencia de timocitos V β 6+ resistentes a hidrocortisona en ratones BALB/c de nuestra colonia.

EDAD (semanas)	% de timocitos HR V β 6% ^a
5-8	8.24 \pm 0.72 (6)
14-19	7.94 \pm 0.63 (6)
20-32	8.82 \pm 0.61 (6)

Ratones BALB/c de ambos sexos fueron inoculados con 4 mg de hidrocortisona por vía intraperitoneal. 48 horas más tarde se extrajeron los timos y las células fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal de rata anti-V β 6 seguido por un anticuerpo anti-IgG de rata marcado con fluoresceína. Se llevó a cabo un análisis por citofluorometría de flujo. Los resultados presentados provienen de experimentos realizados con hembras, pero se obtuvieron resultados similares con machos.

^a Los resultados se expresan como la media del porcentaje \pm ES (número de animales).

Los valores no difieren significativamente entre sí (Test "t" de Student).

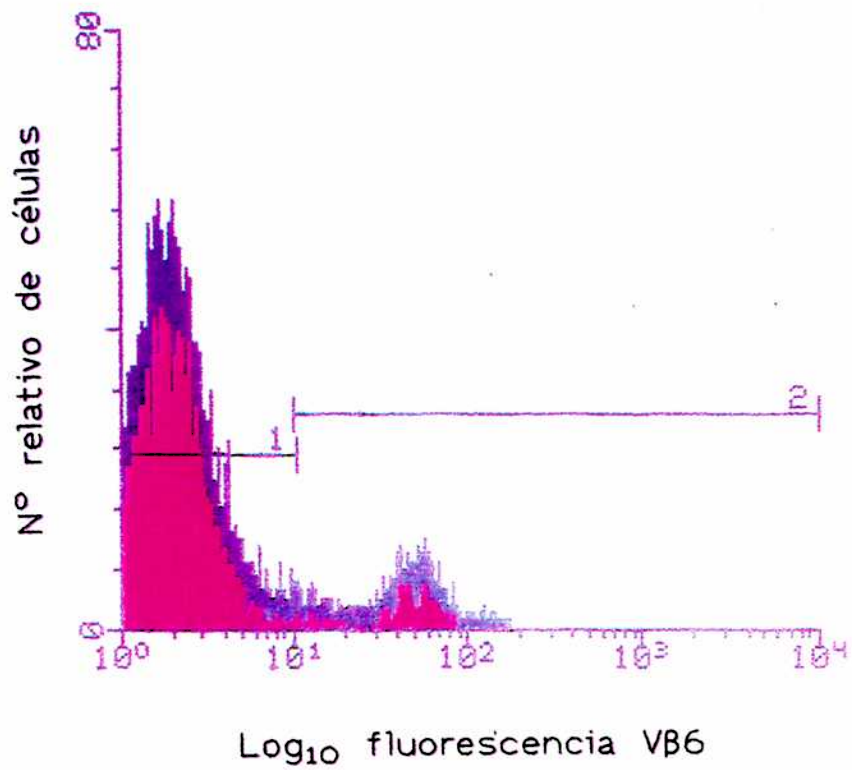


FIGURA 2

Perfil de fluorescencia representativo de timocitos VB6+ resistentes a hidrocortisona provenientes de ratones BALB/c. Se utilizó la metodología descrita en la leyenda de la Tabla 2.

por BALB/c singeneicas o, por sus propias madres. Las cepas BALB/c (H-2^d, Mls-1^b) y AKR/J (H-2^k, Mls-1^a) difieren a nivel de antígenos mayores y menores de histocompatibilidad, mientras que las cepas BALB/c y DBA/2 (H-2^d, Mls-1^a) difieren sólo a nivel de antígenos menores de histocompatibilidad, incluyendo el superantígeno Mls-1. Las cepas C57Bl/6 (H-2^b, Mls-1^b) y C3H/He (H-2^k, Mls-1^b) difieren de BALB/c a nivel de antígenos mayores y menores de histocompatibilidad, pero al igual que BALB/c poseen fenotipo Mls-1^b, es decir no expresan el superantígeno Mls-1.

Una vez adultos - entre las 10 y 54 semanas de vida - se determinó el porcentaje de clones T Vβ6+ (reactivos a Mls-1^a) en ganglios linfáticos. Asimismo se evaluó la frecuencia de células T Vβ8.2+, las que no presentan reactividad frente al superantígeno Mls-1^a (control de especificidad).

Como se puede observar en la Figura 3 y la Tabla 3, entre las 10 y 20 semanas de edad, 12/24 (50%) ($p < 0.0001$) hembras BALB/c amamantadas con madres F1(BALB/cxAKR/J) mostraron una disminución significativa en el porcentaje de células T Vβ6+ periféricas. También se pudo detectar una disminución significativa en el porcentaje de células T Vβ6+ en 5/10 (50%) ($p < 0.0002$) hembras amamantadas con nodrizas F1(BALB/cxDBA/2) (Figura 3 y Tabla 3). Sin embargo, sólo 1/20 machos BALB/c_{F1(BALB/cxAKR/J)} (5%) ($p < 0.001$ respecto de las hembras) mostró una disminución significativa de dicha población (Figura 3 y Tabla 4). No se detectaron alteraciones en 10 machos BALB/c_{F1(BALB/cxDBA/2)} de la misma edad ($p < 0.05$ respecto de las hembras) (Figura 3 y Tabla 4).

La Figura 4 muestra un ejemplo representativo del perfil de fluorescencia de linfocitos T Vβ6+ obtenidos en ratones hembras BALB/c de 10 a 20 semanas de edad amamantadas

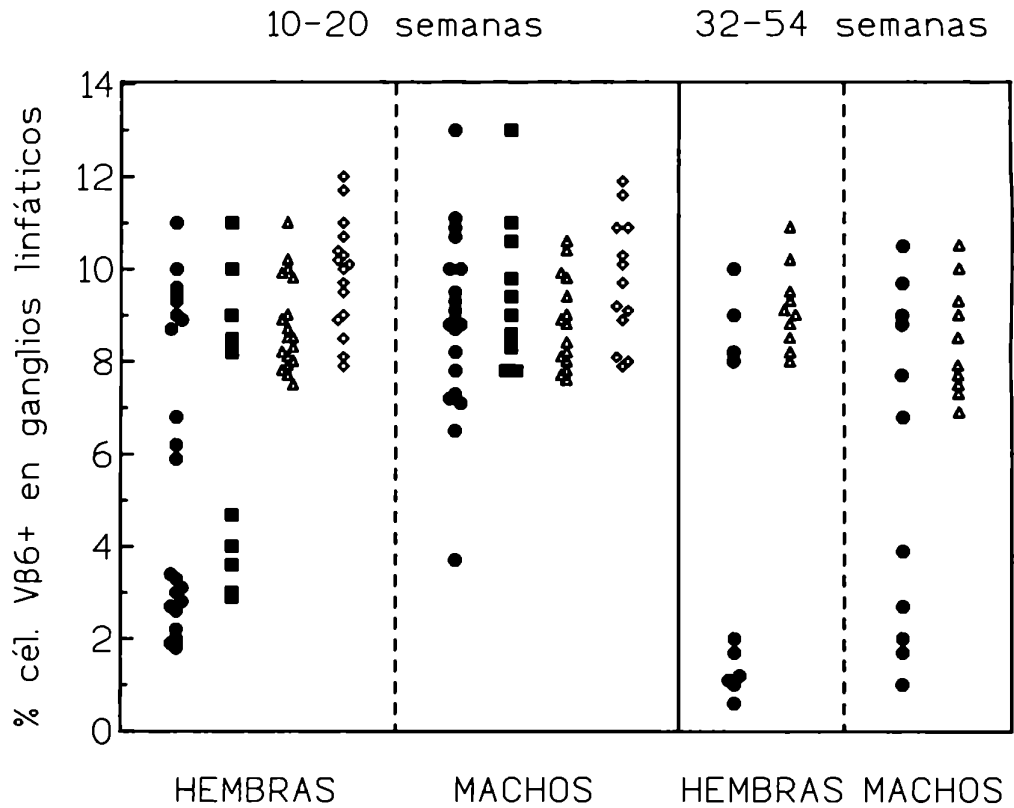


FIGURA 3

Células provenientes de ganglios linfáticos de ratones machos y hembras BALB/c amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) (●) F1(BALB/cxDBA/2) (■); F1(BALB/cxC57Bl/6) (▲) o F1(BALB/cxC3H/HeJ) (◆) fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal de rata anti-Vβ6 seguido por un anticuerpo anti-rata marcado con fluoresceína. Las células fueron analizadas por citofluorometría de flujo. Los puntos representan los porcentajes de células positivas de cada individuo.

TABLA 3

Frecuencia de células VB6+ en ganglios de hembras BALB/c amamantadas por nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a.

edad ^a	nodriza	% células que expresan			
		VB6		VB8.2	
		del VB6 ^b	no del VB6 ^c	del VB6	no del VB6
10	BALB/c	---	9.07 ± 0.27(37)	---	9.96 ± 0.82(4)
	F1(BALB/cxAKR/J)	2.55 ± 0.16(12) [*]	8.69 ± 0.69(12) ^{**}	12.20 ± 1.02(6) ^{**}	10.20 ± 0.74(4) ^{**}
	F1(BALB/cxDBA/2)	3.64 ± 0.33(5) [*]	9.34 ± 0.51(5) ^{**}	11.80 ± 0.82(3) ^{**}	11.50 ± 0.50(5) ^{**}
20	F1(BALB/cxC57Bl/6)	---	9.88 ± 0.29(16) ^{**}	ND	ND
	F1(BALB/cxC3H/HeJ)	---	8.76 ± 0.23(18) ^{**}	ND	ND
21	BALB/c	---	8.78 ± 0.40(8)	---	ND
	F1(BALB/cxAKR/J)	2.30 ± 0.10(5) [*]	8.51 ± 0.32(4) ^{**}	ND	ND
	F1(BALB/cxDBA/2)	3.53 ± 0.41(4) [*]	9.00 ± 0.35(5) ^{**}	ND	ND
25	F1(BALB/cxC57Bl/6)	---	ND	---	ND
	F1(BALB/cxC3H/HeJ)	---	9.02 ± 0.10(8) ^{**}	---	ND
32	BALB/c	---	8.89 ± 0.30(10)	---	10.10 ± 0.31(4)
	F1(BALB/cxAKR/J)	1.29 ± 0.20(6) [*]	8.80 ± 0.45(4) ^{**}	9.70 ± 0.50(3) ^{**}	9.60 ± 0.43(4) ^{**}
	F1(BALB/cxC57Bl/6)	---	9.05 ± 0.10(9) ^{**}	---	ND
54	F1(BALB/cxC3H/HeJ)	---	9.14 ± 0.27(10) ^{**}	---	ND

^a la edad se expresa en semanas de vida

^b animales que delecionan células VB6+

^c animales que no delecionan células VB6+

ND no determinado

--- no se registraron animales que delecionen células VB6+

Células provenientes de ganglio de ratones hembras BALB/c normales o amamantados por nodrizas semialogeneicas fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal de rata anti-VB6 o un anticuerpo monoclonal de ratón anti-VB8.2, seguidos por un anticuerpo monoclonal anti-IgG de rata o anti-IgG de ratón marcados con fluoresceína.

Los resultados se expresan como el porcentaje medio ± ES (número de animales).

^{*} p < 0.0001 (Test "t" de Student) respecto de BALB/c.

^{**} NS (Test "t" de Student) respecto de BALB/c.

TABLA 4

Frecuencia de células VB6+ en ganglio de machos BALB/c amamantados por nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a.

edad ^a	nodriza	% células que expresan				
		VB6		VB8.2		
		del VB6 ^b	n del VB6 ^c	del VB6	n del VB6	
10 A	BALB/c	---	8.88 ± 0.20(10)	---	9.40 ± 0.50(4)	
	F1(BALB/cxAKR/J)	3.7 (1)	8.74 ± 0.34(16)**	11.32 ± 0.98(5)**	10.50 ± 0.89(3)**	
	F1(BALB/cxDBA/2)	---	9.43 ± 0.47(11)**	11.72 ± 0.70(3)**	10.91 ± 0.93(4)**	
	20	F1(BALB/cxC57Bl/6)	---	9.73 ± 0.37(13)**	ND	ND
		F1(BALB/cxC3H/HeJ)	---	8.84 ± 0.25(15)**	ND	ND
21 A	BALB/c	---	8.97 ± 0.30(8)	---	ND	
	F1(BALB/cxAKR/J)	---	9.68 ± 0.68(8)**	---	ND	
	F1(BALB/cxDBA/2)	---	9.83 ± 0.31(3)**	---	ND	
	25	F1(BALB/cxC57Bl/6)	---	9.62 ± 0.25(6)**	---	ND
		F1(BALB/cxC3H/HeJ)	---	ND	---	ND
32 A	BALB/c	---	8.51 ± 0.21(10)	---	9.88 ± 0.50(5)	
	F1(BALB/cxAKR/J)	2.26 ± 0.49(5) [*]	8.75 ± 0.54(6)**	10.10 ± 0.30(3)**	9.94 ± 0.70(3)**	
	F1(BALB/cxC57Bl/6)	---	ND	---	ND	
	54	F1(BALB/cxC3H/HeJ)	---	8.45 ± 0.38(10)**	---	ND

^a la edad se expresa en semanas de vida

^b animales que delecionan células VB6+

^c animales que no delecionan células VB6+

ND no determinado

--- no se registraron animales que delecionen células VB6+

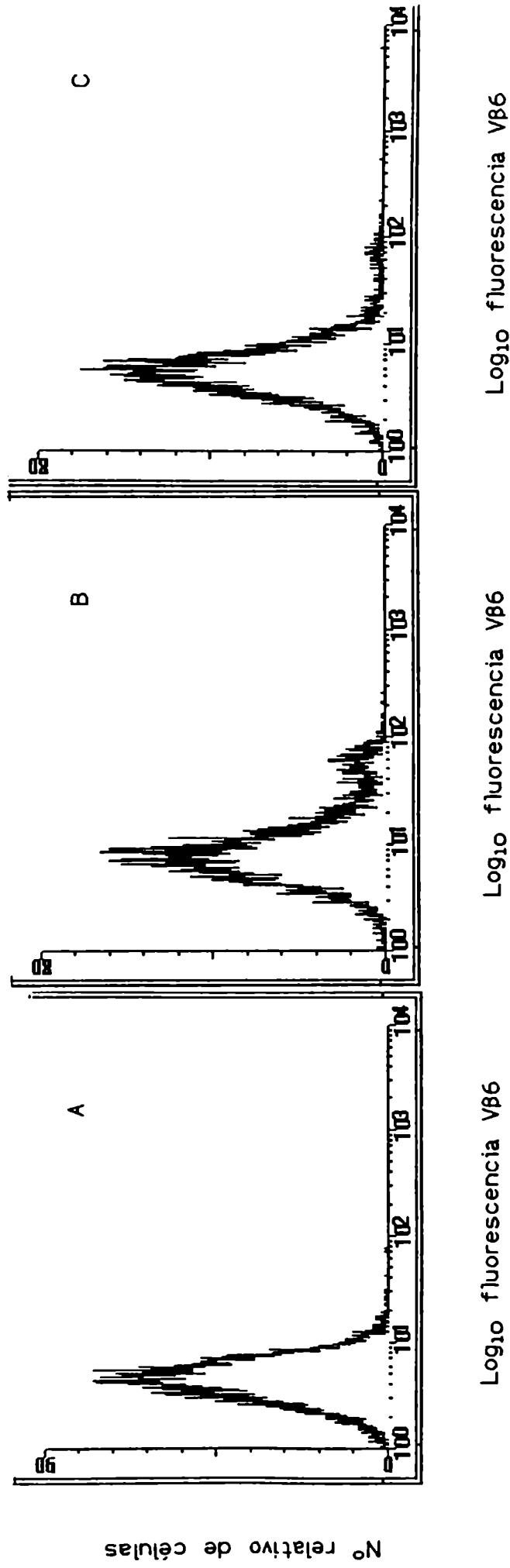
Células provenientes de ganglio de ratones machos BALB/c normales o amamantados por nodrizas semialogeneicas fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal de rata anti-VB6 o un anticuerpo monoclonal de ratón anti-VB8.2, seguidos por un anticuerpo monoclonal anti-IgG de rata o anti-IgG de ratón marcados con fluoresceína.

Los resultados se expresan como el porcentaje medio ± ES (número de animales).

^{*} p < 0.0001 (Test "t" de Student) respecto de BALB/c

^{**} NS (Test "t" de Student) respecto de BALB/c

FIGURA 4



Perfil de fluorescencia representativo de linfocitos Vβ6+ provenientes de ganglios de hembras BALB/c amantadas por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J).

A. tinción inespecífica B. BALB/c amantados normalmente C. BALB/c amantados por nodrizas F1. Se utilizó la metodología descrita en la leyenda de la Figura 1.

por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J).

Por otra parte, no se encontraron alteraciones en la frecuencia de clones T V β 8.2+ lo que sugiere que la delección fue selectiva para los linfocitos T V β 6+ (Tabla 3). En la Figura 5 se observa el perfil de fluorescencia de linfocitos tratados con anticuerpos anti-V β 8.2.

El análisis de los perfiles de fluorescencia de las células de ganglio V β 6+ reveló además, cambios en la intensidad de fluorescencia media en los ratones amamantados con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a que mostraban disminuciones en la frecuencia de células V β 6+. Los niveles medios de fluorescencia por célula en los ratones amamantados por nodrizas Mls-1^a fueron significativamente más bajos que los de los controles (Figura 6). Esta diferencia fue altamente reproducible (Tabla 5). Estos resultados sugerirían que además de disminuir el porcentaje de clones T V β 6+, las células expresarían una densidad menor de receptores V β 6+. La intensidad media de fluorescencia para el marcador V β 8.2 fue similar en los grupos experimentales y controles, enfatizando la especificidad de las alteraciones registradas. Por otra parte, en los animales amamantados con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) ó F1(BALB/cxDBA/2) que mostraban niveles normales de células T V β 6+ no se detectaron alteraciones significativas en la intensidad media de fluorescencia para el marcador V β 6 (Tabla 5).

Entre las 21 y 25 semanas de edad, el porcentaje de ratones amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) o F1(BALB/cxDBA/2) que delecionaban células V β 6+ no se alteró de manera significativa ni en hembras ni en machos. Así, el 55% (5/9) ($p < 0.03$) de las hembras amamantadas por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) y el 44% (4/9) ($p < 0.04$) de las amamantadas por nodrizas F1(BALB/cxDBA/2) mostraron una disminución significativa en la frecuencia de los clones V β 6+ (Tabla 3). El porcentaje de linfocitos V β 6+ en todos los machos

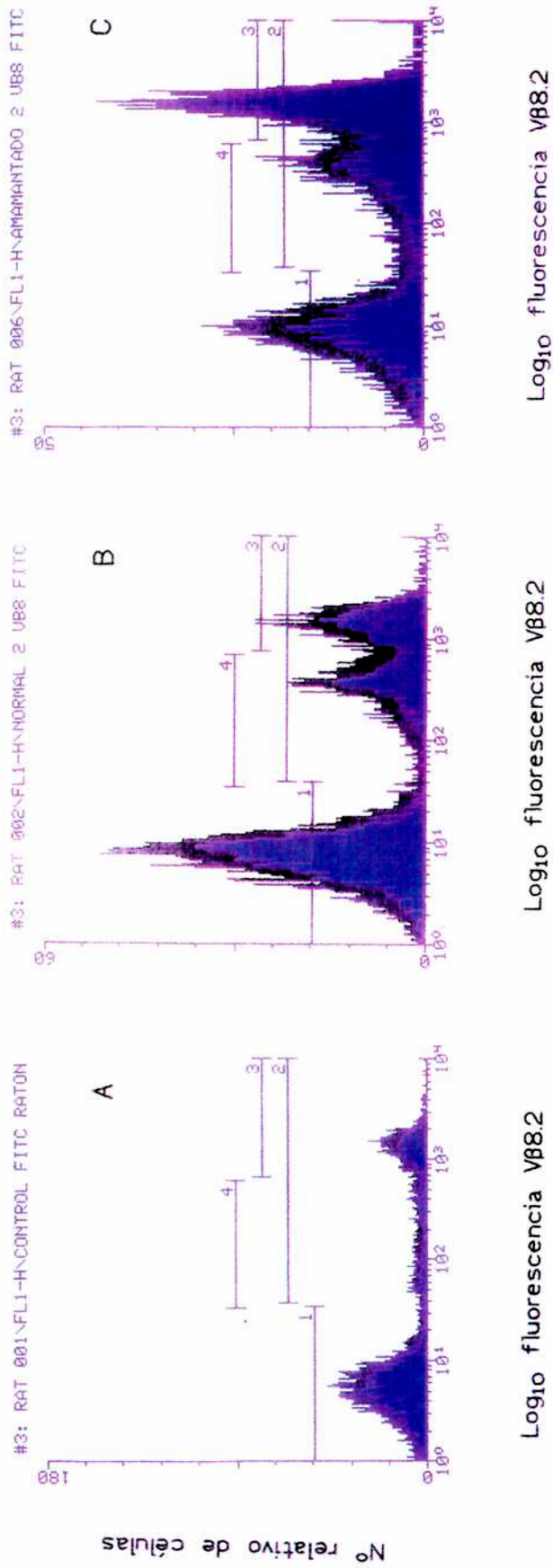


FIGURA 5

Perfil de fluorescencia representativo de linfocitos Vβ8.2+ provenientes de ganglios de hembras BALB/c amantadas por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J). A. tinción inespecífica B. BALB/c amantados normalmente C. BALB/c amantados por nodrizas F1. Se utilizó la metodología descrita en la leyenda de la Tabla 3.

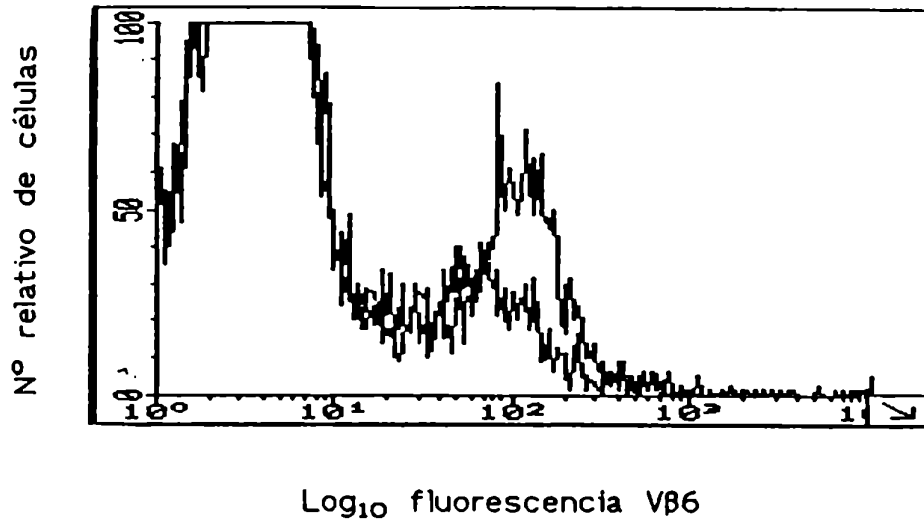


FIGURA 6

Perfil de fluorescencia representativo de linfocitos V β 6+ provenientes de ganglios de hembras BALB/c amamantadas por nodrizas F1(BALB/c x AKR/J) superpuesto con un perfil de fluorescencia de linfocitos de ratones BALB/c amamantados normalmente. Se puede observar una disminución en la densidad de TCR de las células V β 6+ de los ratones BALB/c amamantados por la nodriza F1. Se utilizó la metodología descrita en la leyenda de la Figura 1.

TABLA 5

Intensidad de fluorescencia media en células de ganglio VB6+ provenientes de ratones BALB/c amamantados con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a.

SEXO	MARCADOR	Δ intensidad media fluorescencia ^a	
		del. VB6 ^b	no del. VB6 ^c
hembras	VB6	24.57 ± 4.0 (5) [*]	0.40 ± 1.6 (5) ^{***}
	VB8.2	1.10 ± 2.0 (6) ^{***}	1.30 ± 1.7 (4) ^{***}
machos	VB6	20.49 ± 3.0 (6) ^{**}	0.95 ± 0.4 (4) ^{***}
	VB8.2	1.20 ± 1.5 (5) ^{***}	0.98 ± 0.3 (5) ^{***}

Células provenientes de ganglio de ratones hembras de 20 semanas y machos de 40 semanas de edad BALB/c normales y BALB/c amamantados con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal de rata anti-VB6 seguido por un anticuerpo anti-IgG de rata marcado con fluoresceína. Se llevó a cabo un análisis por citofluorometría de flujo.

^a Los resultados se expresan como el promedio de la diferencia del logaritmo de la intensidad media de fluorescencia por célula entre ratones BALB/c normales y amamantados con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) ± ES (número de animales).

^b animales que delecionan células VB6+

^c animales que no delecionan células VB6+

^{*} p < 0.003 (Test "t" de Student) respecto de 0

^{**} p < 0.0005 (Test "t" de Student) respecto de 0

^{***} NS (Test "t" de Student) respecto de 0

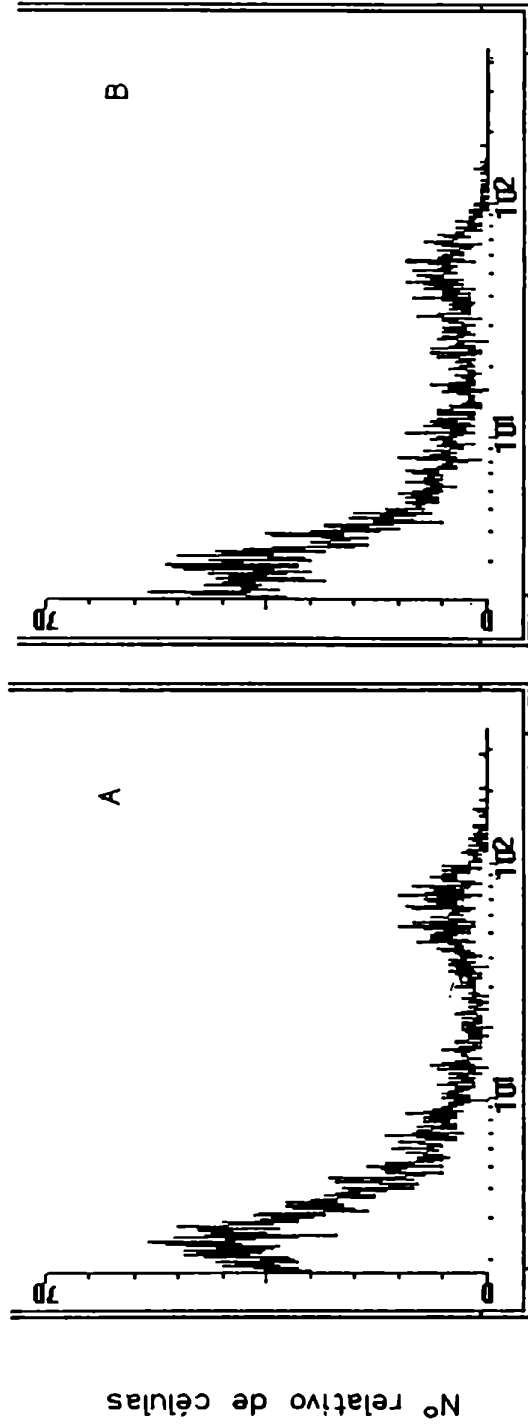
estudiados no mostró diferencias respecto de los controles amamantados normalmente (Tabla 4).

Por el contrario, cuando se analizó el porcentaje de linfocitos VB6+ en ratones BALB/c_{(F1(BALB/cxAKR/J))} de edades comprendidas entre 32 y 54 semanas, 5 machos de un total de 11 (47%) ($p < 0.04$) mostraron una disminución significativa en la frecuencia de estos clones (Figura 3 y Tabla 4). El porcentaje de hembras que delecionaban clones T VB6+ se mantuvo constante (60%) (Figura 3 y Tabla 3).

El amamantamiento de ratones BALB/c con nodrizas singeneicas o portadoras de superantígenos Mls-1^b, F1(BALB/cxC57Bl/6) o F1(BALB/cxC3H/He), no indujo alteraciones en el porcentaje de linfocitos VB6+ ni en hembras ni en machos, durante todo el período de observación (10-54 semanas) (Tablas 3 y 4, Figura 3). En las Figuras 7 y 8 se observa un ejemplo representativo de los perfiles de fluorescencia respectivos. La Figura 9 muestra en forma comparada un ejemplo representativo de los perfiles de fluorescencia de ratones BALB/c normales, amamantados por nodrizas F1(BALB/cxC57Bl/6) y F1(BALB/cxC3H/He).

La Figura 10 muestra la cinética de la disminución del porcentaje de las células T VB6+ en los ganglios de machos y hembras amamantados con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J). Como puede observarse, en las hembras, la deleción recién se detecta a las 10 semanas de vida, se profundiza con el tiempo, y se hace máxima a los 12 meses de vida. En los machos, la deleción no puede ser detectada hasta las 32 semanas de vida; a partir de este momento los porcentajes de células T VB6+ disminuyen con una pendiente similar a la de las hembras.

Los resultados obtenidos en esta serie de experimentos, muestran que el



Log₁₀ fluorescencia Vβ6

FIGURA 7

Perfil de fluorescencia representativo de linfocitos Vβ6+ provenientes de ganglios de hembras BALB/c amantadas por nodrizas F1(BALB/cx57Bl/6). A. BALB/c amantado normalmente B. BALB/c amantado por la nodriza F1. Se utilizó la metodología descrita en la leyenda de la Figura 1.

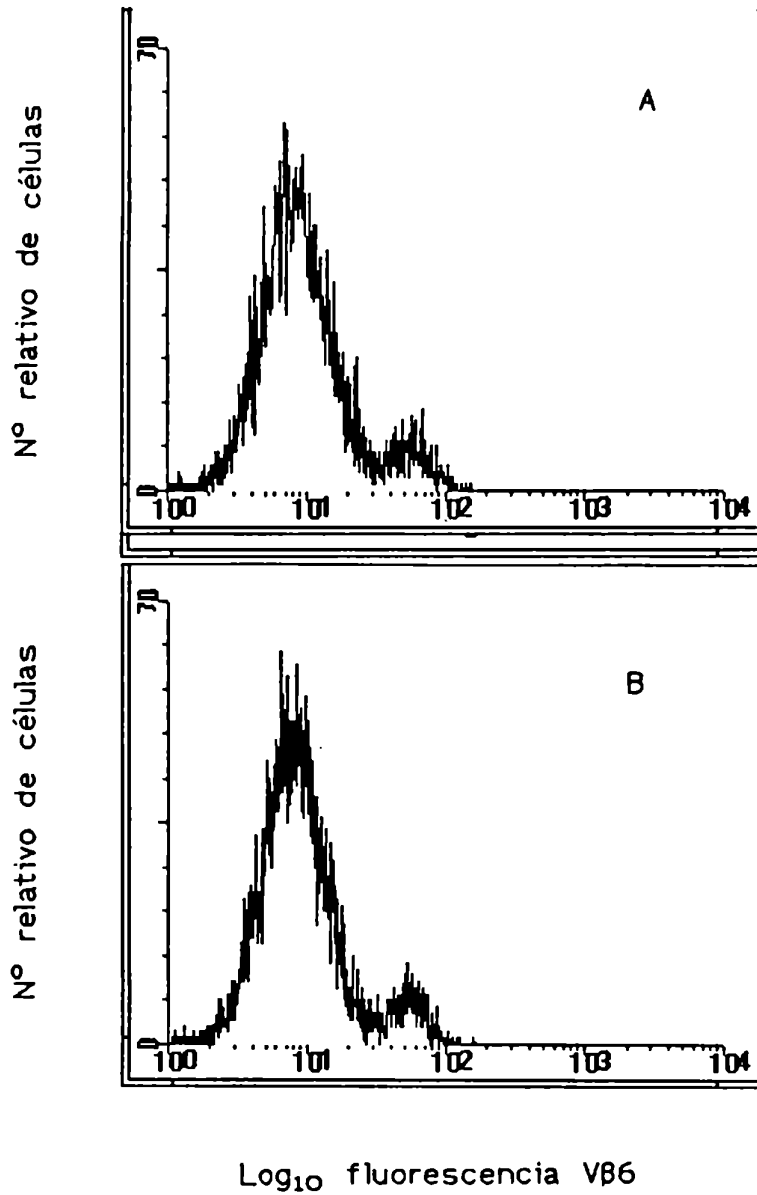


FIGURA 8

Perfil de fluorescencia representativo de linfocitos VB6+ provenientes de hembras BALB/c amamantadas por nodrizas F1(BALB/cxC3H/He). A. BALB/c amamantado normalmente. B. BALB/c amamantado por la nodriza F1. Se utilizó la metodología descrita en la leyenda de la Figura 1.

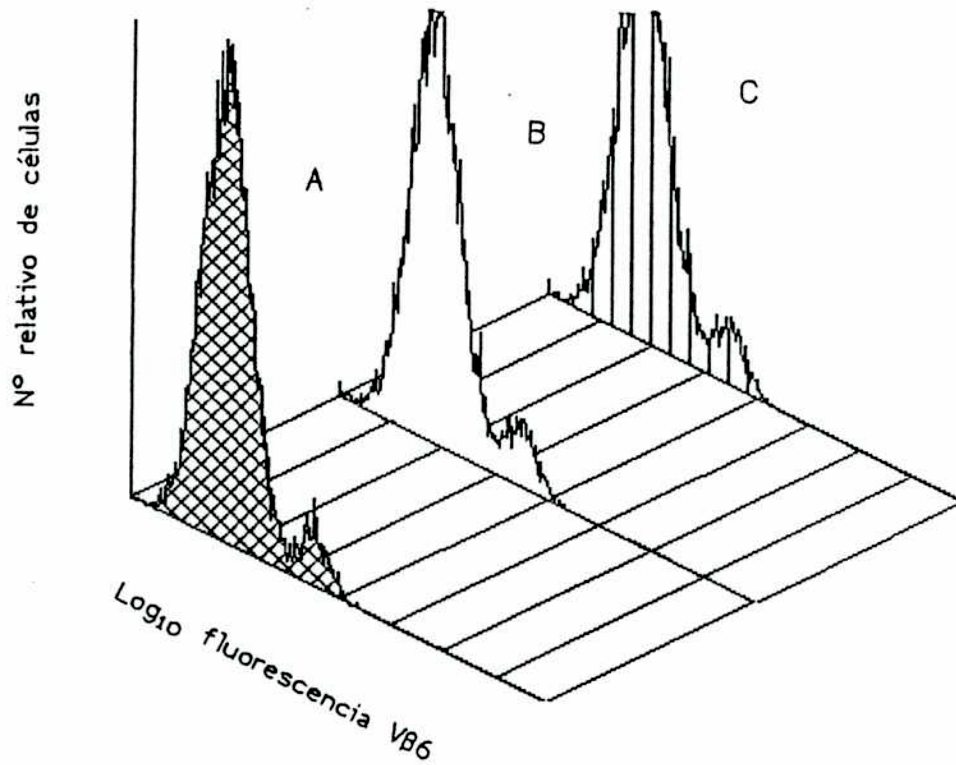


FIGURA 9

Comparación de los perfiles de fluorescencia representativos de linfocitos V β 6+ provenientes de ganglios de hembras BALB/c amamantadas por nodrizas MIs-1^{bxb}. A. BALB/c amamantado normalmente. B. BALB/c amamantado por una nodriza F1(BALB/cxC57Bl/6) C. F1(BALB/cxC3H). Se utilizó la metodología descrita en la leyenda de la Figura 1.

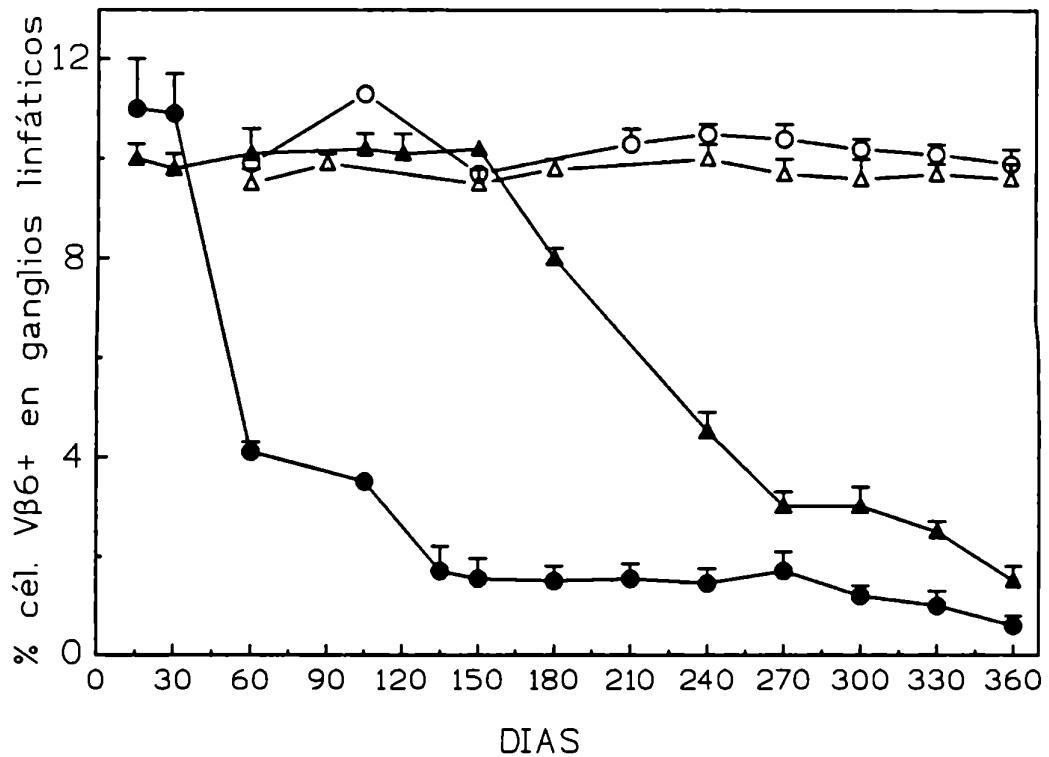


FIGURA 10

Ratones BALB/c machos (▲) y hembras (●) amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) que mostraban una disminución en la frecuencia de células Vβ6+ o machos (△) y hembras (○) amamantados por sus propias madres fueron sacrificados a distintos días luego del nacimiento. Las células provenientes de los ganglios linfáticos fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal de rata anti-Vβ6 seguido por un anticuerpo anti-IgG de rata marcado con fluoresceína. Las células fueron analizadas por citofluorometría de flujo. Cada punto de la curva representa el valor promedio de 2-3 determinaciones y su error standard.

amamantamiento de ratones BALB/c (Mls-1^b) con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a, induce la disminución de la frecuencia de clones T Vβ6+ (reactivos a Mls-1^a) en ganglios linfáticos en alrededor del 50% de la población, tanto en hembras como en machos. Sin embargo, en las hembras la disminución de esta subpoblación T es detectada entre las 10-20 semanas de vida mientras que en los machos, comienza a observarse recién a las 32 semanas. De esta manera, hemos podido detectar una diferencia significativa entre hembras y machos con respecto a la edad en que comienza a registrarse la disminución del porcentaje de células T Vβ6+.

1.c. Frecuencia de linfocitos T CD4+Vβ6+ y CD8+Vβ6+ en ganglios linfáticos de ratones BALB/c amamantados con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a

Se estudió luego la frecuencia de las células T Vβ6+ dentro de la población CD4+ en ganglios de ratones BALB/c amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J). Como puede observarse en la Tabla 6, el amamantamiento fue capaz de disminuir significativamente esta subpoblación en todas las hembras que muestran una disminución en el porcentaje de células T Vβ6+. Las Figuras 11 y 12 muestran ejemplos representativos de los perfiles de fluorescencia de células CD4+Vβ6+ de ganglios, provenientes de hembras que muestran disminuciones significativas en la frecuencia de los clones Vβ6+. Sin embargo, sólo 3 de 7 hembras BALB/c_{F1(BALB/cxAKR/J)} que mostraban una disminución en el porcentaje de células T CD4+ Vβ6+ mostraban también una disminución en la subpoblación CD8+ Vβ6+. Por otra parte, el grado de disminución fue menor en esta subpoblación que en la CD4+ Vβ6+ (Tabla

6).

Se obtuvieron resultados similares cuando se midió la frecuencia de las células CD4+ VB6+ en ratones machos amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) de edades

TABLA 6

Frecuencia de células VB6+ dentro de la población CD4+ y CD8+ provenientes de ganglios de ratones BALB/c amamantados con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) que delecionan células VB6.

NODRIZA	SEXO	% células de ganglio que expresan		
		VB6	VB6 CD4 ^a	VB6 CD8 ^b
F1(BALB/cxAKR/J)	hembra	2.69±0.19(7) [*]	2.33±0.50(7) [*]	6.83±0.32(3) [*]
F1(BALB/cxAKR/J)	macho	2.26±0.49(5) [*]	2.09±0.12(5) [*]	5.98 (1)
BALB/c (control)	hembra	8.94±0.23(10)	13.3±0.64(10)	13.5±0.32(6)
BALB/c (control)	macho	9.31±0.50(8)	12.8±0.61(8)	ND

Células provenientes de ganglios linfáticos de ratones BALB/c normales o amamantados con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal de rata anti-VB6 seguido por un anticuerpo anti-IgG de rata marcado con fluoresceína y luego con un anticuerpo monoclonal anti-CD4 marcado con ficoeritrina o seguido por un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD8 biotilado más un anticuerpo monoclonal streptavidina-ficoeritrina.

^a Los resultados se expresan como el porcentaje medio de las células VB6+ CD4+ respecto de las células CD4+ totales ± ES (número de animales).

^b Los resultados se expresan como el porcentaje medio de las células VB6+ CD8+ respecto de las células CD8+ totales ± ES (número de animales).

^{*} p<0.0001 (Test "t" de Student) respecto de BALB/c.

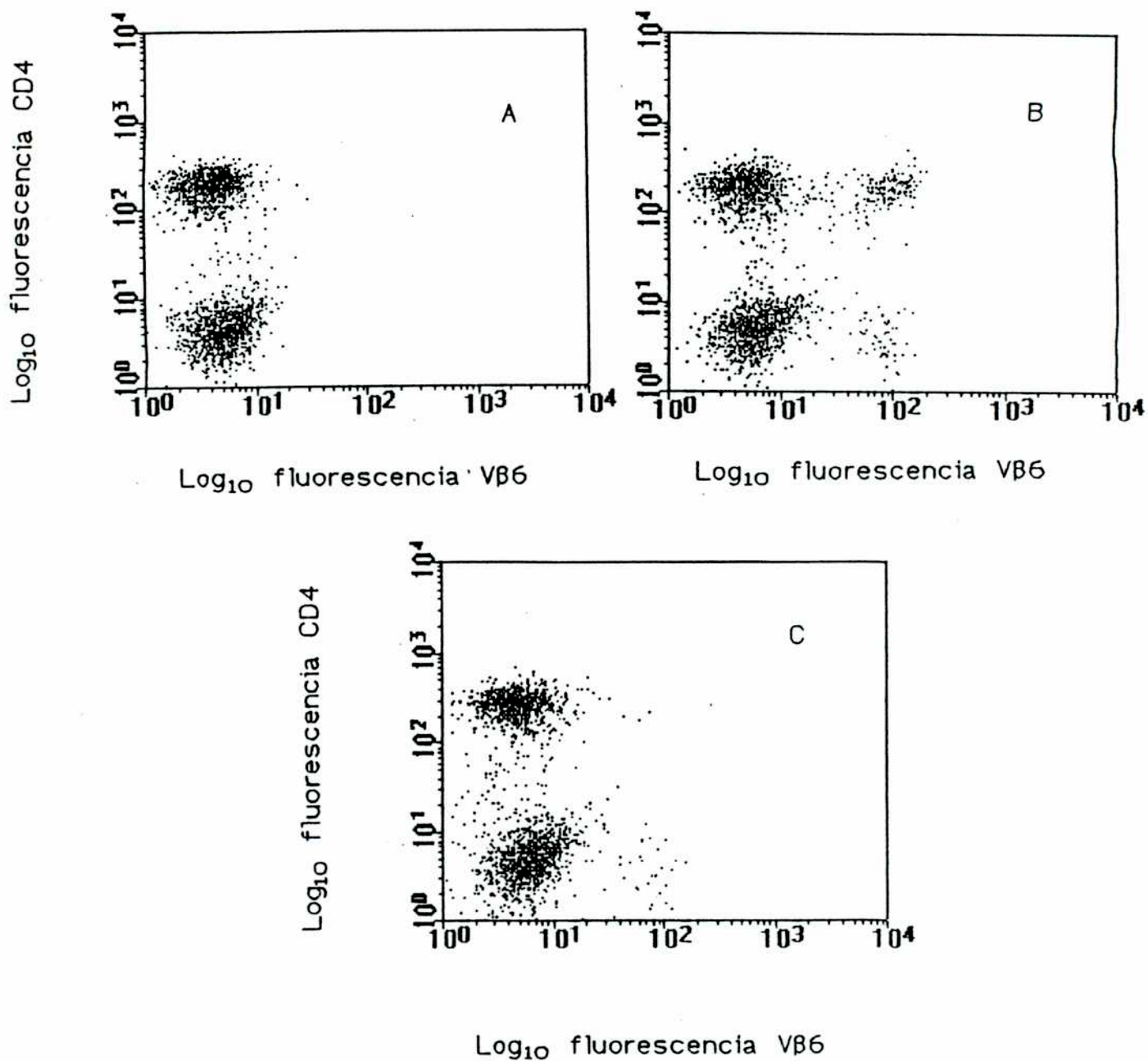


FIGURA 11

Gráfico representativo de linfocitos VB6+ CD4+ provenientes de hembras BALB/c amamantadas por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J). A. tinción inespecífica. B. BALB/c amamantado normalmente. C. BALB/c amamantado por la nodriza F1. Se utilizó la metodología descrita en la leyenda de la Tabla 1.

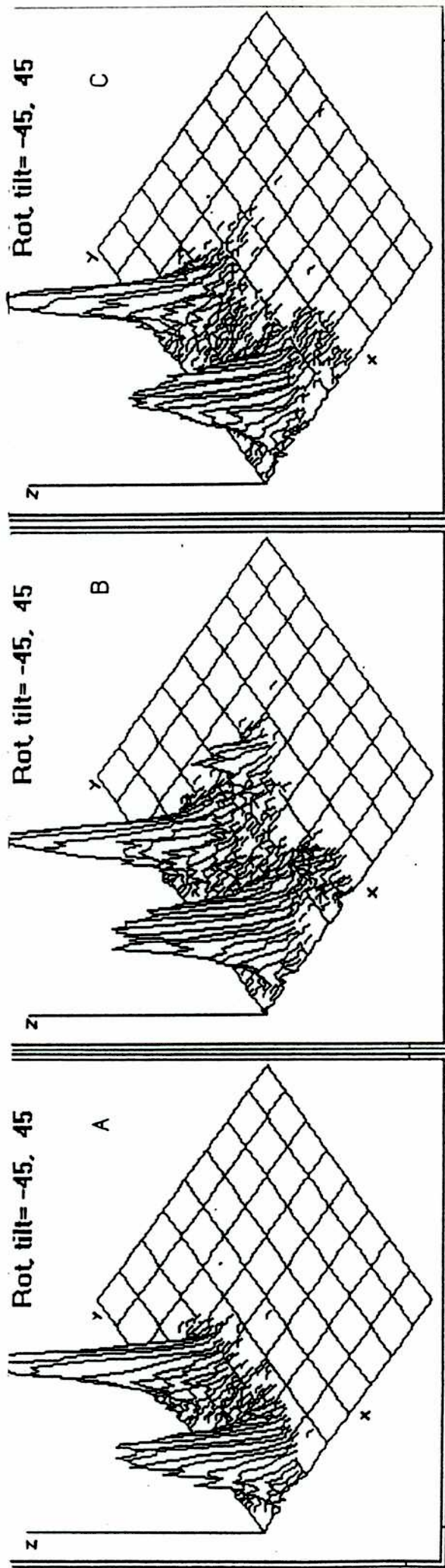


FIGURA 12

Gráfico de contorno tridimensional representativo de linfocitos V β 6+ CD4+ provenientes de hembras BALB/c amamantadas por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) correspondiente a la Figura 11. A. tinción inespecífica. B. BALB/c amamantado normalmente. C. BALB/c amamantado por la nodriza F1. Se utilizó la metodología descripta en la leyenda de la Tabla 1.

Eje x: \log_{10} fluorescencia V β 6

Eje y: \log_{10} fluorescencia CD4

Eje z: N° relativo de células

comprendidas entre 32 y 54 semanas. Al igual que lo registrado en las hembras, esta subpoblación resultó más afectada que la CD8+ Vβ6+ (Tabla 6).

1.d. Frecuencia de clones T Vβ8.1+ en ganglios de ratones BALB/c amamantados con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a

Con el objeto de estudiar si el amamantamiento de ratones BALB/c con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a era además capaz de alterar la frecuencia de clones T Vβ8.1+, también reactivos a Mls-1^a, se analizaron células provenientes de ganglios de hembras BALB/c amamantadas con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) de 48 semanas de edad, que mostraban o no, alteraciones en el porcentaje de linfocitos T Vβ6+. Las células fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal de rata específico para Vβ8.1+Vβ8.2 y reveladas con anticuerpos anti-rata marcados con fluoresceína. El porcentaje de clones T Vβ8.1+ se calculó sustrayendo a los valores obtenidos, el porcentaje de clones T Vβ8.2+. Como se puede observar en la Tabla 7, en aquellos ratones que delecionaban clones T Vβ6+, también se detectó una disminución significativa en el porcentaje de clones T Vβ8.1+.

1.e. Frecuencia de timocitos Vβ6+ en ratones BALB/c amamantados con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a

Con el objeto de investigar la participación del timo en la disminución del porcentaje de los clones T reactivos al superantígeno Mls-1^a, estudiamos la frecuencia de linfocitos

TABLA 7

Frecuencia de células Vβ8.1+ en ganglios de ratones BALB/c amamantados con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J)

NODRIZA	% células de ganglio Vβ8.1+ ^a	
	del Vβ6 ^b	n del Vβ6 ^c
F1(BALB/cxAKR/J)	0.10±0.08 (4) [*]	7.50±0.20 (5) ^{**}
F1(BALB/cxC57BL/6)	_____	7.98±0.23 (4) ^{**}
BALB/c	_____	7.80±0.31 (5)

Células provenientes de ganglios de ratones hembras BALB/c normales y amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) o F1(BALB/cxC57BL/6) de 48 semanas de edad que mostraban o no alteraciones en el porcentaje de células Vβ6+ fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal de rata anti-Vβ8.1+8.2 y reveladas con un anticuerpo monoclonal anti-IgG de rata marcado con fluoresceína. Paralelamente fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Vβ8.2 seguidos por un anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón marcado con fluoresceína.

^a Los resultados obtenidos se expresan como el porcentaje de células Vβ8.1+ ± ES (número de animales). La frecuencia se calculó como la diferencia entre el porcentaje de células Vβ(8.1+2) y Vβ8.2+.

^b animales que delecionan células Vβ6+

^c animales que no delecionan células Vβ6+

^{*} p<0.0001 respecto de BALB/c (test "t" de Student)

^{**} NS respecto de BALB/c (test "t" de Student)

VB6+ en timos de hembras BALB/c_{F1(BALB/cxAKR/J)}. A las 4 semanas de vida, no se detectaron alteraciones en la subpoblación de alta intensidad de fluorescencia, en la de baja intensidad de fluorescencia o en los timocitos resistentes a HC. La Figura 13 muestra el perfil de fluorescencia de los timos de hembras BALB/c_{F1(BALB/cxAKR/J)} tratados con hidrocortisona: al igual que los timos no tratados (Figura 14), el perfil de fluorescencia no difiere de los ratones BALB/c amamantados por sus propias madres.

A las 10 semanas de vida, se detectó una disminución significativa en la frecuencia de clones VB6+^{alta} (alta intensidad de fluorescencia) (VB6^{alta}: $0.36 \pm 0.03(3)$ vs $1.72 \pm 0.09(3)$ $X \pm SEM$ (n) $p < 0.0001$) y una disminución también significativa aunque no tan marcada en la frecuencia de los clones VB6+^{baja} (baja intensidad de fluorescencia) (VB6^{baja}: $1.9 \pm 0.10(4)$ vs $3.4 \pm 0.33(3)$ $X \pm SEM$ (n) ($p < 0.005$)) en los timos de las hembras BALB/c amamantadas por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) que mostraban delección en la periferia (Figura 15 A).

Cuando se analizaron los timos tratados con hidrocortisona, pudo detectarse una disminución significativa en el porcentaje de timocitos VB6+ dentro de la población CD4+ resistente a la misma ($1.25 \pm 0.08(3)$ vs $9.20 \pm 0.33(3)$ (control) ($p < 0.0001$)).

Los timocitos fueron entonces deplecionados de células CD8+ de modo de eliminar las subpoblaciones CD4+ CD8+ (doble positivo) y CD8+ (simple positivo) y, como puede observarse en la Figura 15 B, donde se muestra un ejemplo representativo, se detectó una disminución significativa en el porcentaje de timocitos CD8- VB6+ en hembras BALB/c amamantadas con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) de diez semanas de edad ($2.11 \pm 0.31(3)$ vs $10.3 \pm 0.7(3)$ ($p < 0.0004$)).

Estos resultados muestran que en los ratones BALB/c hembras amamantados por nodrizas Mls-1^a, puede detectarse delección clonal intratímica a las diez semanas de vida,

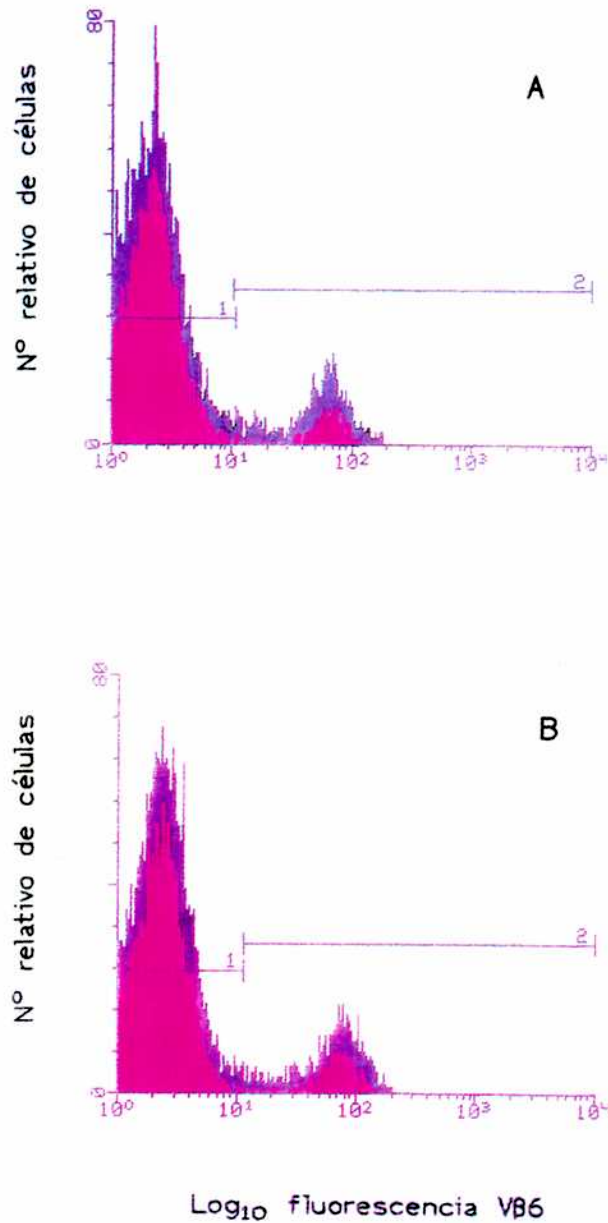


FIGURA 13

Perfil de fluorescencia representativo de timocitos V β 6+ resistentes a hidrocortisona provenientes de hembras BALB/c de cuatro semanas de vida amantadas por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J). A. BALB/c amantado normalmente B. amantado por la nodriza F1. Se utilizó la metodología descrita en la leyenda de la Tabla 2.

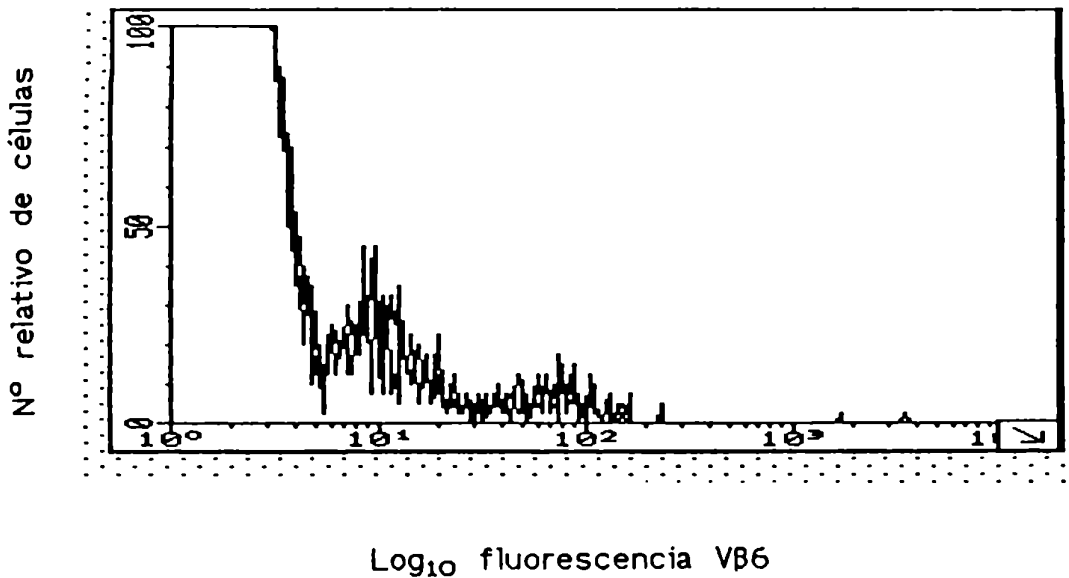


FIGURA 14

Perfil de fluorescencia representativo de timocitos VB6+ provenientes de hembras BALB/c de cuatro semanas de vida amamantadas por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) superpuesto con un perfil de fluorescencia de timocitos de ratones BALB/c de igual sexo y edad amamantados normalmente. Se utilizó la metodología descrita en la leyenda de la Tabla 2.

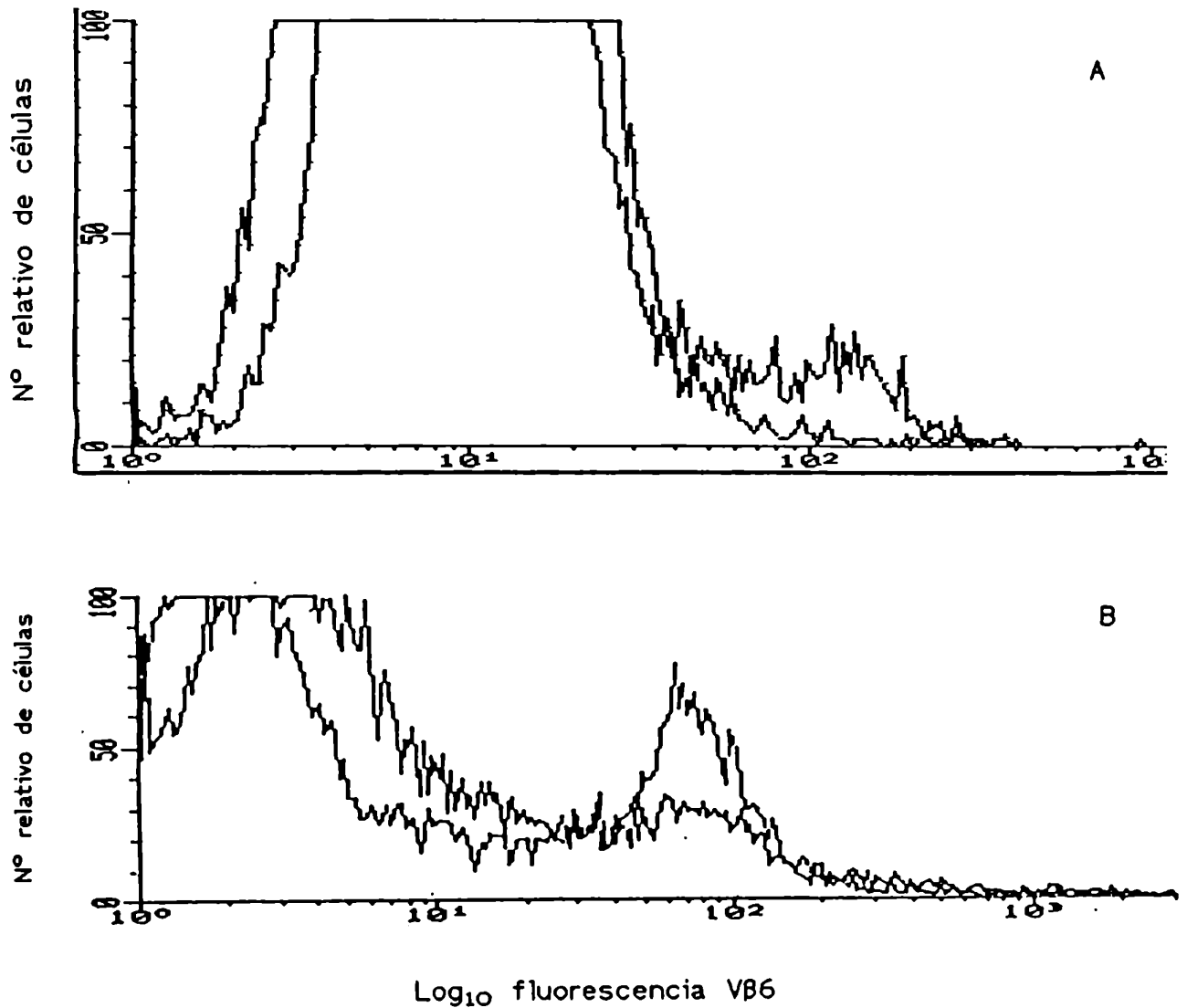


FIGURA 15

Perfil de fluorescencia representativo de timocitos VB6+ provenientes de hembras BALB/c de diez semanas de edad amamantadas por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) superpuesto con un perfil de fluorescencia de timocitos de ratones BALB/c de igual sexo y edad amamantados normalmente. A) timocitos sin tratar B) timocitos tratados con anti-CD8 más complemento. Se utilizó la metodología descrita en la leyenda de la Tabla 2.

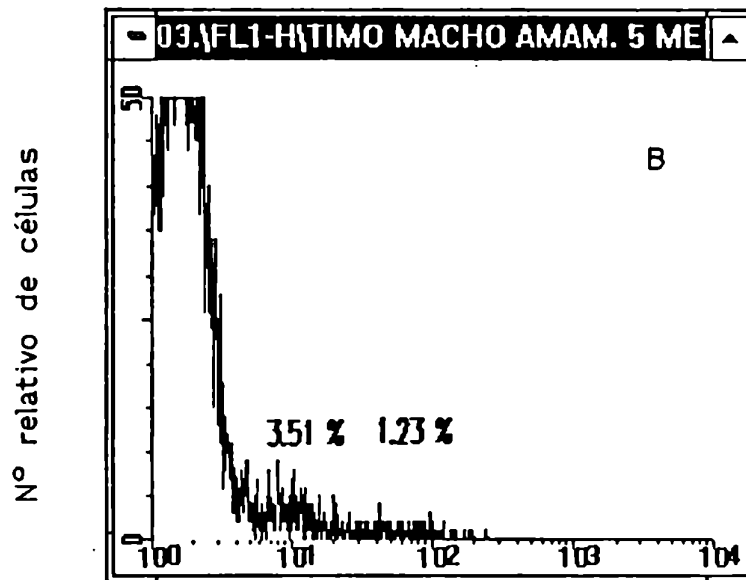
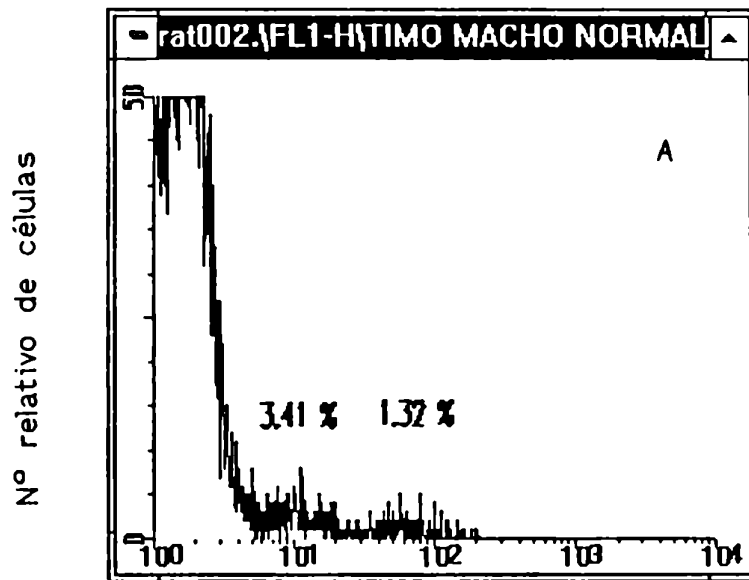
coincidiendo con el momento en que se registra una disminución de la frecuencia de clones V β 6+ en la periferia.

Excepto por un ratón, no se pudieron observar alteraciones en la frecuencia de timocitos V β 6+ en ratones machos amamantados con nodrizas F1(BALB/c \times AKR/J) hasta las 32 semanas de edad ($9.21 \pm 0.35(6)$ vs $8.64 \pm 0.17(6)$ (NS)) (Figura 16). Desde esta edad en adelante, se detectó deleción clonal de los timocitos CD4+ resistentes a hidrocortisona ($0.90 \pm 0.10(3)$ vs $8.53 \pm 0.56(3)$ ($p < 0.0002$) en el 50% de los animales estudiados) (Figuras 17 y 18). De la misma manera que en el caso de los ratones BALB/c hembras, el momento en que se detecta disminución en el porcentaje de células V β 6+ en la periferia coincide con la ocurrencia de deleción clonal intratímica.

Estos resultados muestran que tanto en ratones BALB/c hembras como en machos amamantados por nodrizas F1 (BALB/c \times AKR/J), cada vez que se detectó deleción clonal en la periferia se detectó deleción clonal en el timo. De esta manera, la deleción clonal inducida por el amamantamiento de ratones Mls-1^b con nodrizas Mls-1^a es -al menos en parte - intratímica (ver Discusión).

1.f. Presencia de virus MMTV exógeno en la leche de las nodrizas F1(BALB/c \times AKR/J)

Con el objeto de investigar la naturaleza del superantígeno Mls-1^a transmitido a través de la leche de las nodrizas F1(BALB/c \times AKR/J) y posiblemente involucrado en las



Log₁₀ fluorescencia Vβ6

FIGURA 16

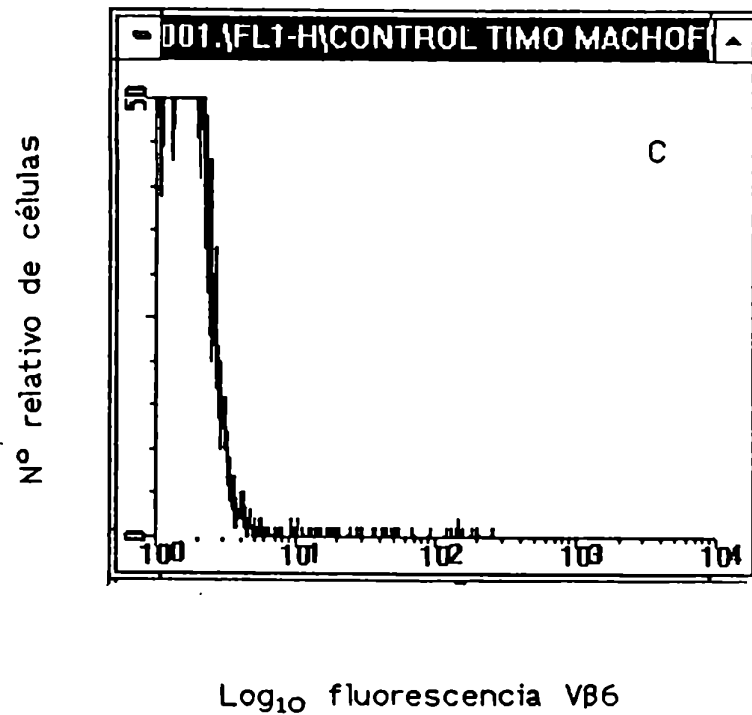


FIGURA 16

Perfil de fluorescencia representativo de timocitos Vβ6+ provenientes de machos BALB/c de 5 meses de edad amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J). A. BALB/c amamantado normalmente B. BALB/c amamantado por la nodriza F1. C. tinción inespecífica. Se utilizó la metodología descrita en la Tabla 2.

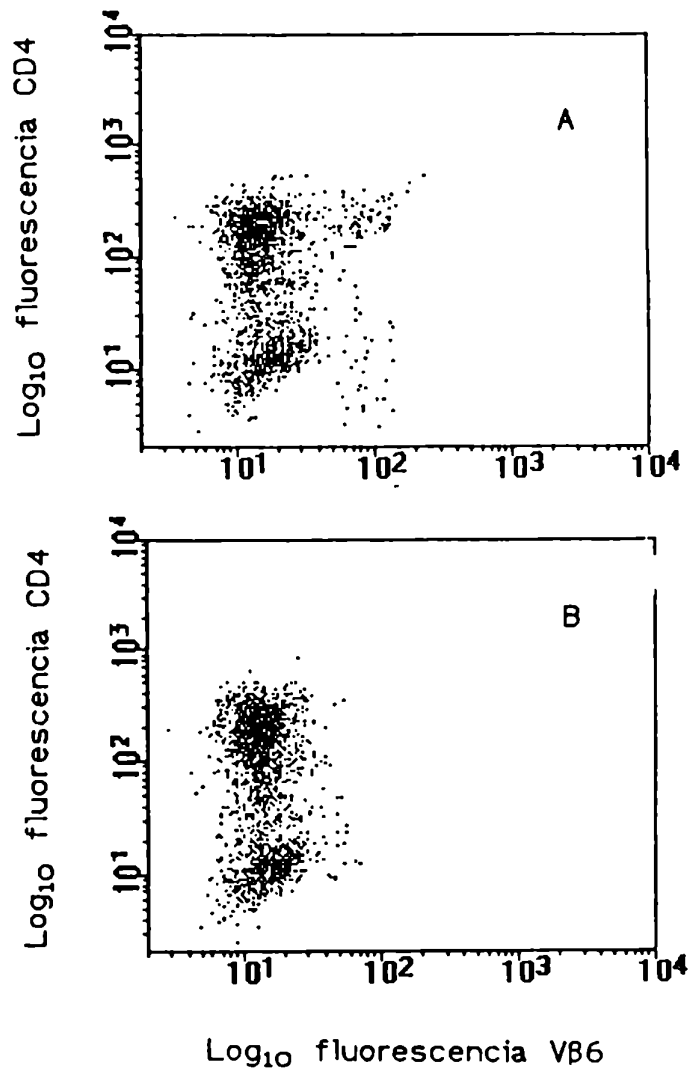


FIGURA 17

Gráfico representativo de timocitos Vβ6+ CD4+ resistentes a hidrocortisona provenientes de machos BALB/c de 12 meses de edad amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J). A. BALB/c amamantado normalmente. B. BALB/c amamantado por la nodriza F1. Se utilizó la metodología descrita en la leyenda de la Tabla 1.

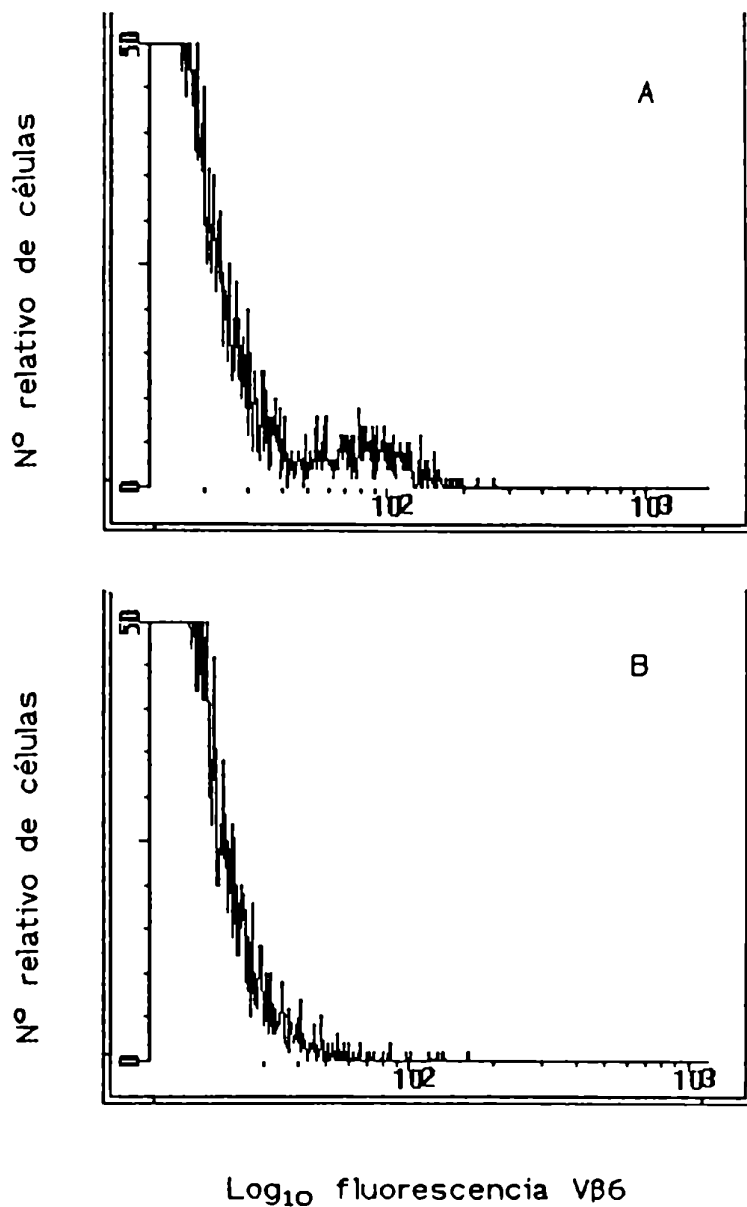


FIGURA 18

Perfil de fluorescencia representativo de timocitos Vβ6+ resistentes a hidrocortisona provenientes de machos BALB/c de 12 meses de edad amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) correspondiente a la Figura 17. A. BALB/c amamantado normalmente B. BALB/c amamantado por la nodriza F1. Se utilizó la metodología descrita en la Tabla 2.

alteraciones registradas, se estudió la presencia de virus MMTV exógeno en la leche de las mismas. Para esto se llevaron a cabo ensayos de ELISA con la finalidad de detectar la glicoproteína de envoltura gp52 del virus MMTV. Nodrizas F1(BALB/cxAKR/J), BALB/c y AKR/J en período de lactancia, fueron inoculadas con 0.5 UI de syntocinon/oxitocina. Dos minutos más tarde se les extrajo leche y, previa dilución con agua, ésta fue centrifugada a para remover la caseína. El suero de la leche fue luego centrifugado a 45000 g durante dos horas, y el pellet conteniendo el virus, resuspendido en agua. Distintas diluciones del virus fueron adsorbidas a una placa durante un noche y luego se les agregó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-gp52. El ensayo se reveló con un segundo anticuerpo anti-IgM de ratón biotinilado y streptavidina -peroxidasa. Como control positivo se utilizó la leche de ratones de la cepa C3H/HeJ, que transmite el MMTV exógeno por esta vía (59).

Como se puede observar en la Figura 19, se detectó gp52 en la leche de las nodrizas F1(BALB/cxAKR/J), siendo sus niveles, similares a aquellos observados en la leche de las hembras C3H/HeJ. Sin embargo, no se pudo detectar la presencia de gp52 ni en la leche de ratones BALB/c, ni en la de AKR/J.

2. EFECTO DEL AMAMANTAMIENTO CON NODRIZAS PORTADORAS DE SUPERANTIGENOS MIs-1^a SOBRE LA REACTIVIDAD T DE LA CRÍA.

En la segunda parte de este trabajo, investigamos si el amamantamiento con nodrizas portadoras de superantígenos MIs-1^a es capaz de alterar la reactividad T de la cría antes de la detección de deleción clonal de células reactivas al superantígeno. Para ello, siguiendo el mismo modelo experimental utilizado en la primera parte del trabajo, ratones de ambos sexos

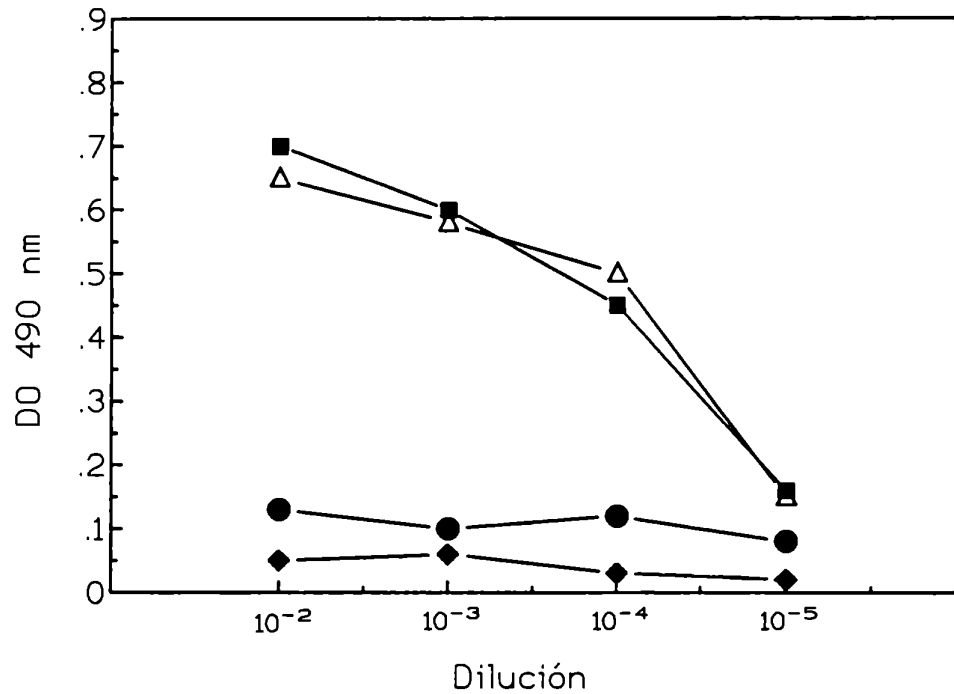


FIGURA 19

Suero de leche proveniente de hembras F1(BALB/cxAKR/J) (Δ), BALB/c (◆), AKR/J (●) y C3H/HeJ (■) fue centrifugado a 45000 g durante 2 horas y el pellet conteniendo el virus fue resuspendido en agua. Distintas diluciones del virus fueron adsorbidas a una placa durante una noche y luego se les agregó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-gp52. El ensayo se reveló con un segundo anticuerpo anti-IgM de ratón biotinilado y streptavidina-peroxidasa.

Los resultados se expresan como la densidad óptica (DO) medida a 490 nm.

de la cepa BALB/c (H-2^d, Mls-1^b) fueron amamantados desde el nacimiento con nodrizas F1 provenientes del cruzamiento de ratones BALB/c y distintas cepas endocriadas portadoras de superantígenos Mls-1^a. Como control, ratones de la cepa BALB/c fueron amamantados por sus propias madres o con nodrizas Mls-1^b. Una vez alcanzada la madurez inmunológica - entre las seis y las 10 semanas de vida - se evaluó la reactividad T frente a distintos antígenos

2.a. Reactividad T frente a antígenos de histocompatibilidad expresados por la nodriza

Comenzamos investigando si el amamantamiento con nodrizas F1 portadoras de superantígenos Mls-1^a es capaz de alterar la reactividad T del hijo frente a antígenos de histocompatibilidad expresados por la nodriza.

Se utilizaron como nodrizas hembras F1(BALB/c \times DBA/2), F1(BALB/c \times AKR/J), F1(BALB/c \times C57Bl/6), o nodrizas singeneicas.

A las seis semanas de edad, se evaluó la capacidad de células esplénicas y de ganglio para generar reacciones locales de injerto contra huésped (GvH), de cultivo mixto de linfocitos alogeneico (CMLA) y de citotoxicidad T (CTL). Los resultados se compararon con los obtenidos en ratones BALB/c amamantados por sus propias madres.

2.a.1. Reacciones locales de injerto contra huésped (GvH)

Con el objeto de investigar si el amamantamiento con nodrizas F1(BALB/c \times DBA/2)

modificaba los niveles de reactividad T frente a los superantígenos Mls-1^a expresados por la nodriza, se indujeron reacciones locales de GvH en huéspedes F1(BALB/cxDBA/2) inoculando 6, 10, y 14x10⁶ esplenocitos provenientes de ratones BALB/c amamantados con nodrizas F1(BALB/cxDBA/2) en la almohadilla plantar izquierda, mientras que la almohadilla contralateral fue inoculada con el mismo número de esplenocitos provenientes de ratones amamantados por sus propias madres. Se evaluó la respuesta 7 días más tarde, comparando el aumento de peso de los ganglios poplíteos drenantes. Como puede observarse en la Figura 20, la magnitud de las reacciones de GvH generadas por esplenocitos de los ratones amamantados por las nodrizas F1(BALB/cxDBA/2) fue significativamente menor que la generada por las células esplénicas de ratones BALB/c amamantados por sus propias madres. Estas diferencias se registraron para todas las dosis de esplenocitos estudiadas.

Resultados similares se obtuvieron cuando los ratones BALB/c se amamantaron con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J). 2, 3.5, y 5x10⁶ esplenocitos de ratones BALB/c_{F1(BALB/cxAKR/J)} se inocularon en la almohadilla plantar izquierda de huéspedes F1(BALB/cxAKR/J). La almohadilla plantar derecha fue inoculada con el mismo número de esplenocitos provenientes de ratones BALB/c amamantados por sus propias madres. Como se observa en la Figura 21, el amamantamiento con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) fue capaz de disminuir la reactividad T frente a los antígenos de histocompatibilidad expresados por la nodriza.

Para determinar si estaba alterado el reconocimiento de superantígenos Mls-1^a, se utilizaron huéspedes F1(BALB/cxDBA/2). Se inocularon 6, 8, y 14x10⁶ esplenocitos de ratones BALB/c_{F1(BALB/cxAKR/J)} en la almohadilla plantar izquierda; la derecha fue inoculada con el mismo número de esplenocitos de ratones BALB/c amamantados normalmente. Los resultados se muestran en la Figura 22. Como puede observarse, la magnitud de las reacciones de GvH generadas por los esplenocitos provenientes de ratones

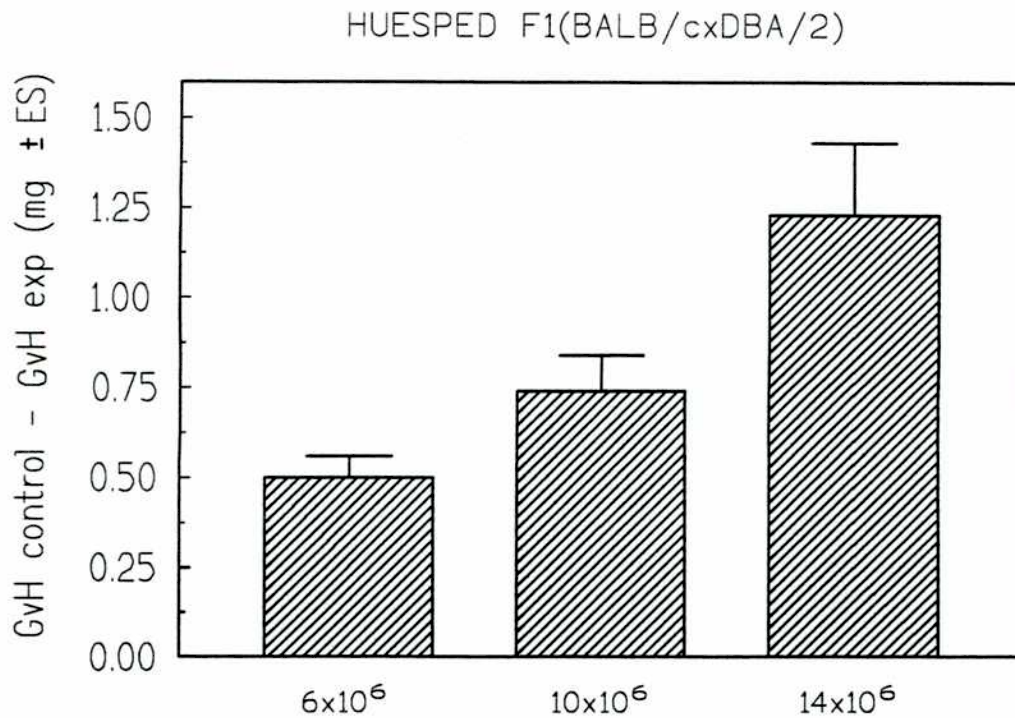


FIGURA 20

6, 10, 14 $\times 10^6$ esplenocitos provenientes de ratones adultos BALB/c amamantados por nodrizas F1(BALB/cxDBA/2) fueron inoculados en la almohadilla plantar izquierda de huéspedes F1(BALB/cxDBA/2). La almohadilla contralateral fue inoculada con el mismo número de esplenocitos provenientes de ratones BALB/c amamantados por sus propias madres. Siete días más tarde se comparó el peso de los ganglios poplíteos drenantes. Los resultados se expresan como el promedio de la diferencia de peso (mg \pm ES) entre los ganglios derecho (control) e izquierdo (exp). N^o de animales=5
 Nivel de significación: $p < 0.0001$ en todas las dosis testeadas (Test "t" de Student)

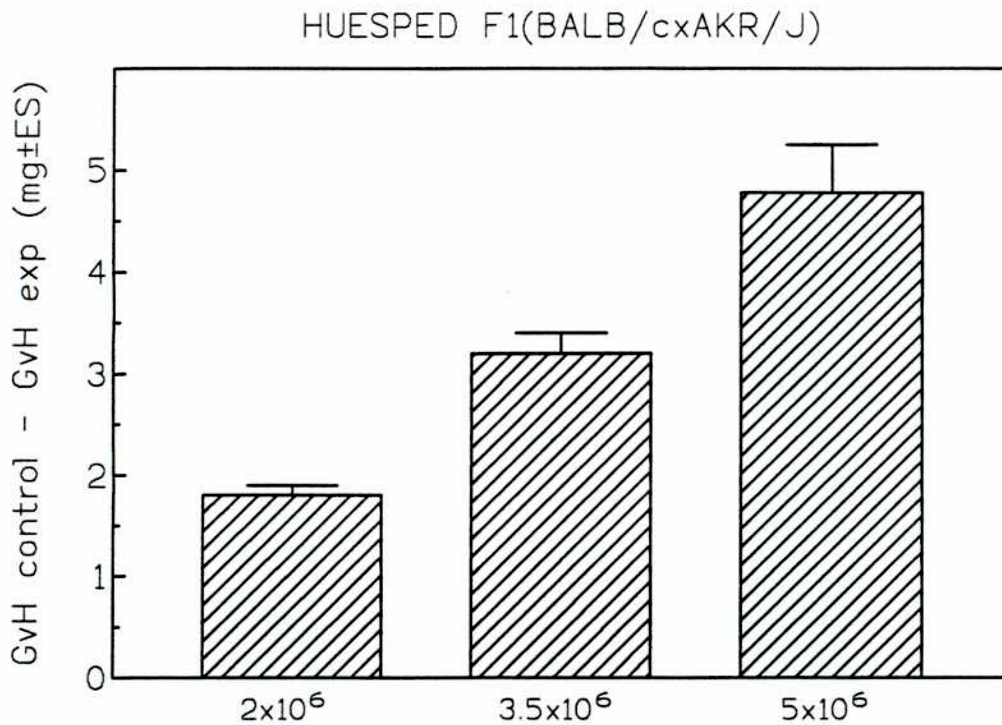


FIGURA 21

2, 3.5, 5 x 10⁶ esplenocitos provenientes de ratones adultos BALB/c amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) fueron inoculados en la almohadilla plantar izquierda de huéspedes F1(BALB/cxAKR/J) La almohadilla contralateral fue inoculada con el mismo número de esplenocitos provenientes de ratones BALB/c amamantados por sus propias madres. Siete días más tarde se comparó el peso de los ganglios poplíteos drenantes. Los resultados se expresan como el promedio de la diferencia de peso (mg ± ES) entre los ganglios derecho (control) e izquierdo (exp). N° de animales ≥ 6. Nivel de significación: p<0.0005 en todas las dosis testeadas (test "t" de Student).

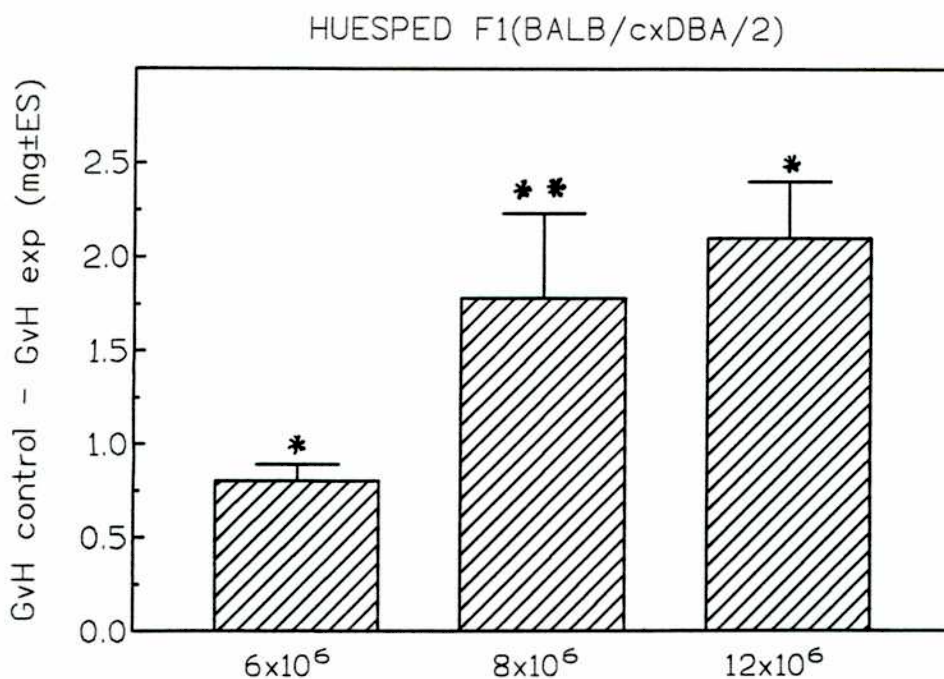


FIGURA 22

6, 8, 12 x 10⁶ esplenocitos provenientes de ratones adultos BALB/c amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) fueron inoculados en la almohadilla plantar izquierda de huéspedes F1(BALB/cxDBA/2). La almohadilla contralateral fue inoculada con el mismo número de esplenocitos provenientes de ratones BALB/c amamantados por sus propias madres. Siete días más tarde se comparó el peso de los ganglios poplíteos drenantes. Los resultados se expresan como el promedio de la diferencia de peso (mg ± ES) entre los ganglios derecho (control) e izquierdo (exp). N° de animales= 6.

Nivel de significación: * p<0.001 ** p<0.01
(test "t" de Student)

BALB/c_{IF1(BALB/cxAKR/J)} fue significativamente menor que la generada por los ratones controles.

La disminución de la reactividad T detectada en todos estos experimentos, fue observada en todos los animales estudiados, tanto en machos como en hembras.

Cuando las reacciones de GvH se indujeron con esplenocitos provenientes de ratones BALB/c amamantados por nodrizas F1(BALB/cxC57Bl/6) (Mls-1^b), no se pudieron detectar diferencias significativas respecto de la magnitud del GvH generada por los ratones BALB/c amamantados por sus propias madres. En la Figura 23 se muestran los resultados obtenidos cuando se inocularon 4, 6, y 10x10⁶ esplenocitos de ratones BALB_{IF1(BALB/cxC57Bl/6)} en huéspedes F1(BALB/cxC57Bl/6). De esta manera, no pudieron detectarse alteraciones en la reactividad T hacia antígenos de histocompatibilidad expresados por la nodriza cuando las crías fueron amamantadas con nodrizas Mls-1^b.

Estos resultados indicarían que el amamantamiento de ratones BALB/c (Mls-1^b) con nodrizas Mls-1^a es capaz de alterar la reactividad T in vivo frente a los antígenos de histocompatibilidad expresados por la nodriza, incluyendo el superantígeno Mls-1^a. Esta disminución ocurre tanto en machos como en hembras, antes de la delección clonal de las células T reactivas al superantígeno.

2.a.2. Cultivo mixto de linfocitos

Se llevaron a cabo reacciones de cultivo mixto de linfocitos co-cultivándose células

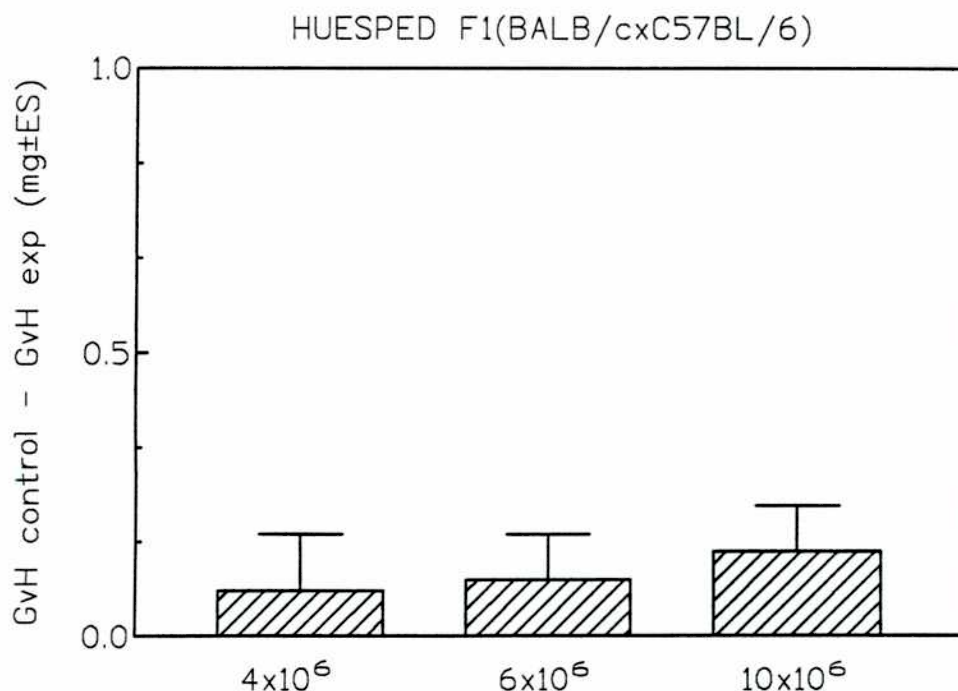


FIGURA 23

4, 6, 10 x 10⁶ esplenocitos provenientes de ratones adultos BALB/c amamantados por nodrizas F1(BALB/cxC57BL/6) fueron inoculados en la almohadilla plantar izquierda de huéspedes F1(BALB/cxC57BL/6). La almohadilla contralateral fue inoculada con el mismo número de esplenocitos provenientes de ratones BALB/c amamantados por sus propias madres. Siete días más tarde se comparó el peso de los ganglios poplíteos drenantes. Los resultados se expresan como el promedio de la diferencia de peso (mg ± ES) entre los ganglios derecho (control) e izquierdo (exp). N° de animales=6 Las diferencias no son significativas en ninguna de las dosis testeadas (Test "t" de Student).

provenientes de ganglios linfáticos de ratones BALB/c adultos amamantados normalmente o con nodrizas F1, con esplenocitos allogeneicos pretratados con mitomicina-C. Los niveles de proliferación T se determinaron por incorporación de timidina tritiada al día 4 de cultivo.

En la Figura 24, se muestran los resultados obtenidos en un experimento donde se enfrentaron $1.5, 3$ y 6×10^5 linfocitos provenientes de ratones BALB/C_{F1(BALB/cxDBA/2)} con 5×10^5 esplenocitos DBA/2. Como puede observarse, la respuesta proliferativa fue significativamente menor que la registrada cuando respondían linfocitos de BALB/c amamantados normalmente, en todos los puntos de la curva dosis-respuesta.

Es decir que el amamantamiento con nodrizas que expresan antígenos Mls 1^a disminuye la proliferación T in vitro frente a dicho superantígeno.

Se obtuvieron resultados similares cuando se comparó la respuesta de ratones BALB/c normales y amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J). La respuesta proliferativa de los ratones amamantados por nodrizas fue significativamente menor frente a esplenocitos AKR/J (Figura 25).

El amamantamiento con nodrizas F1(BALB/cxC57BL/6) no fue capaz de disminuir la proliferación T frente a los antígenos de histocompatibilidad expresados por la nodriza. Como puede observarse en la Figura 26, donde se muestra un experimento en el cual $3, 4$ y 6×10^5 células provenientes de ganglio de ratones BALB/C_{F1(BALB/cxC57BL/6)} se estimularon con 5×10^5 esplenocitos C57Bl/6, no se detectaron diferencias en la respuesta proliferativa respecto del control amamantado por su propia madre.

Tampoco se obtuvieron diferencias significativas cuando se comparó la respuesta T

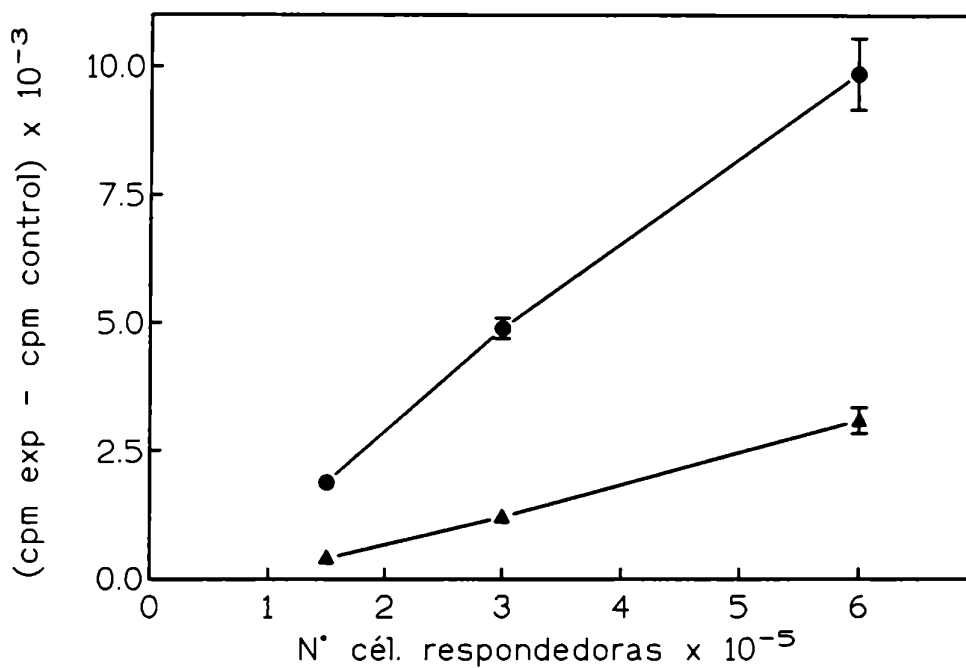


FIGURA 24

Distintas dosis de células provenientes de ganglios linfáticos de ratones BALB/c adultos amamantados por sus propias madres (●) o por nodrizas F1(BALB/cxDBA/2) (▲) se enfrentaron con 5×10^5 esplenocitos DBA/2 pretratados con mitomicina-C. Los niveles de proliferación T se determinaron por incorporación de timidina tritiada al día cuatro de cultivo.

Los resultados se expresan como Δ cpm (cpm exp-cpm control)
Cada punto es el valor medio de determinaciones por cuadruplicado \pm DS

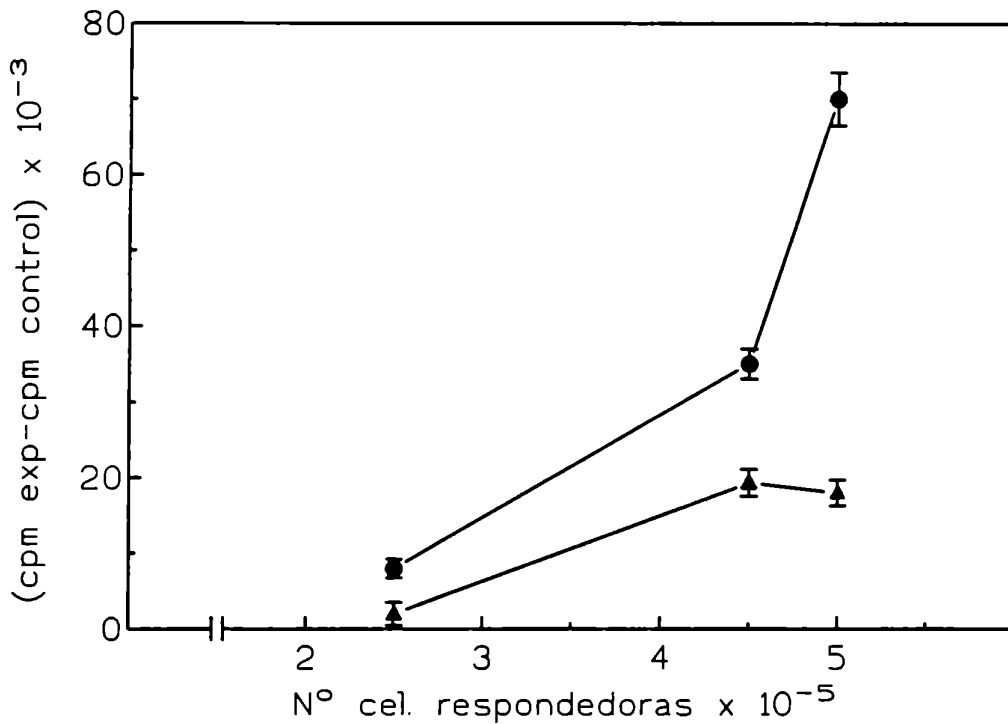


FIGURA 25

Distintas dosis de células provenientes de ganglios linfáticos de ratones BALB/c adultos amantados por sus propias madres (●) o Por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) (▲) se enfrentaron con 3×10^5 esplenocitos AKR/J pretratados con mitomicina-C. Los niveles de proliferación T se determinaron por incorporación de timidina tritiada al día cuatro de cultivo.

Los resultados se expresan como Δ cpm (cpm exp-cpm control). Cada punto es el valor medio de determinaciones por cuadruplicado \pm DS.

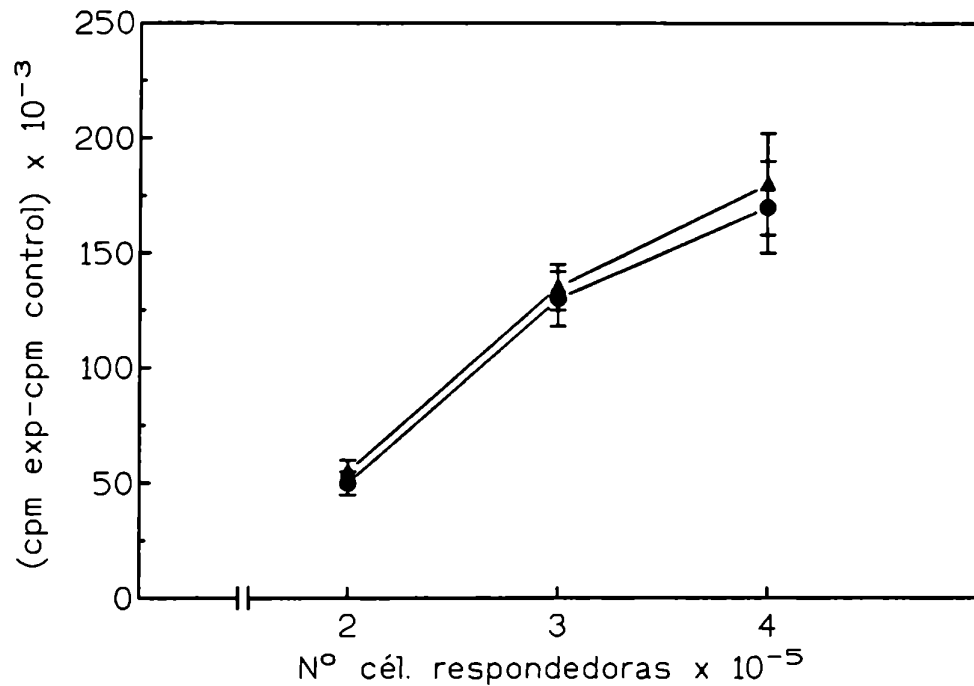


FIGURA 26

Distintas dosis de células provenientes de ganglios linfáticos de ratones BALB/c adultos amamantados por sus propias madres (●) o por nodrizas F1(BALB/cxC57BL/6) (▲) se enfrentaron con 5×10^5 esplenocitos C57BL/6 pretratados con mitomicina-C. Los niveles de proliferación T se determinaron por incorporación de timidina tritiada al día cuatro de cultivo.

Los resultados se expresan como Δ cpm (cpm exp-cpm control). Cada punto es el valor medio de determinaciones por cuadruplicado \pm DS.

frente a esplenocitos AKR/J de ratones BALB/c amamantados por sus propias madres y amamantados por nodrizas singeneicas (Figura 27).

Al igual que en las reacciones de injerto contra huésped, los resultados obtenidos fueron independientes del sexo y se registraron en todos los animales estudiados.

Estos resultados indican que - tal como se detecta en las reacciones in vivo (GvH)- el amamantamiento de ratones Mls 1^b con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a, fue capaz de disminuir la proliferación T in vitro del hijo frente a los antígenos de histocompatibilidad expresados por la nodriza. Esta disminución de la reactividad T se observó tanto en ratones machos como en hembras, y afectó todos los animales estudiados.

2.a.3. Reacciones de citotoxicidad T

Los experimentos que se detallan a continuación se desarrollaron con el objeto de investigar si los niveles de citotoxicidad T se encontraban también afectados. Linfocitos de ratones BALB/c normales y amamantados por nodrizas semialogeneicas F1(BALB/cxAKR/J) fueron comparados en su capacidad para desarrollar reacciones de citotoxicidad T frente a los antígenos de histocompatibilidad expresados o no por la nodriza.

Linfocitos provenientes de ganglios linfáticos de ratones BALB/c_{F1(BALB/cxAKR/J)} y de BALB/c normales fueron co-cultivados con esplenocitos alogeneicos (AKR/J, C57Bl/6, o C3H/HeJ) irradiados. Al quinto día se agregaron al cultivo blastos inducidos previamente con

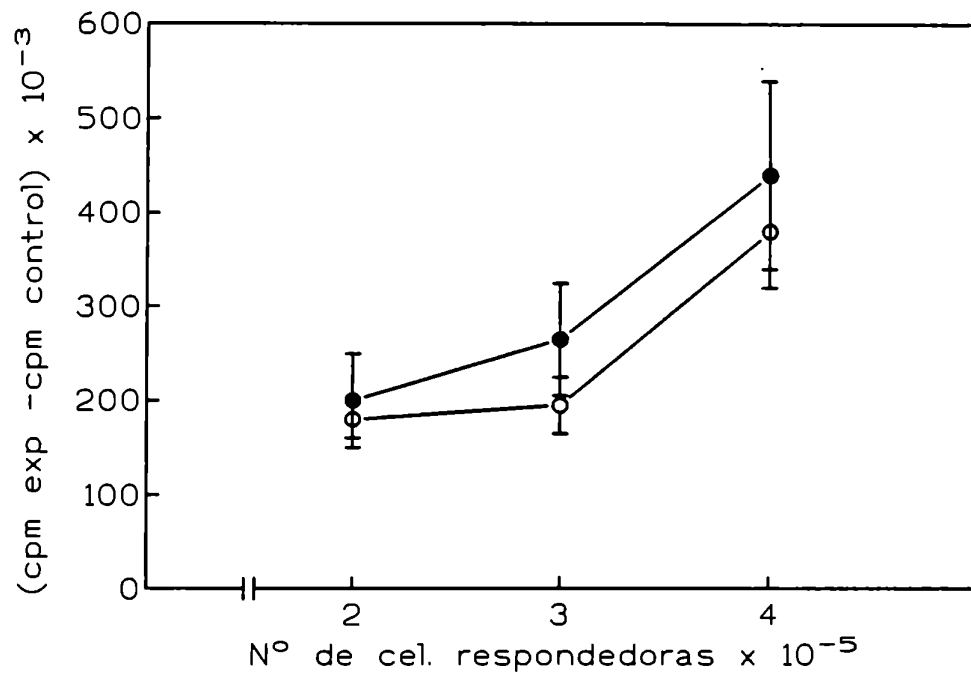


FIGURA 27

Distintas dosis de células provenientes de ganglios linfáticos de ratones BALB/c adultos amamantados por sus propias madres (●) o por nodrizas singeneicas (○) se enfrentaron con 5×10^5 esplenocitos AKR/J pretratados con mitomicina-C. Los niveles de proliferación se determinaron por incorporación de timidina trirradiada al día cuatro de cultivo. Los resultados se expresan como Δ cpm (cpm exp-cpm control) Cada punto es el valor medio de determinaciones por cuadruplicado \pm DS.

concanavalina-A y marcados con 51 Cr, como target de la reacción de citotoxicidad. Luego de cuatro horas de incubación se midió la radioactividad liberada.

Como puede verse en la Figura 28, los niveles de citotoxicidad T de linfocitos provenientes de ratones BALB/c_{FF1(BALB/cxAKR/J)} frente a blastos AKR/J, C57Bl/6 o C3H/HeJ fueron menores que los niveles de citotoxicidad de los controles amamantados normalmente. Estos resultados fueron obtenidos tanto en ratones machos como en ratones hembras, y en todos los animales analizados.

Coincidiendo con los resultados anteriores donde se veía disminuída la actividad T helper, se detecta una disminución en la actividad T efectora. La disminución de la citotoxicidad T pudo registrarse no sólo frente a las células de la nodriza sino también frente a células de cepas que comparten los AMH con la nodriza y frente a cepas no relacionadas.

2.b. Reactividad T frente a antígenos convencionales

Habiendo demostrado que el amamantamiento con nodrizas semialogeicas es capaz de alterar la reactividad T frente a antígenos de histocompatibilidad expresados por la nodriza y aún frente a los de cepas no relacionadas, nuestro objetivo fue investigar si también se encontraba modificada la reactividad T frente a antígenos convencionales. Como antígeno convencional se eligió la ovoalbúmina (OVA) ya que se ha demostrado la existencia de reactividad cruzada entre el el complejo Mls-1^a-H-2 y el complejo OVA-H-2 (251).

Estudiamos entonces la respuesta proliferativa T in vitro de ratones BALB/c

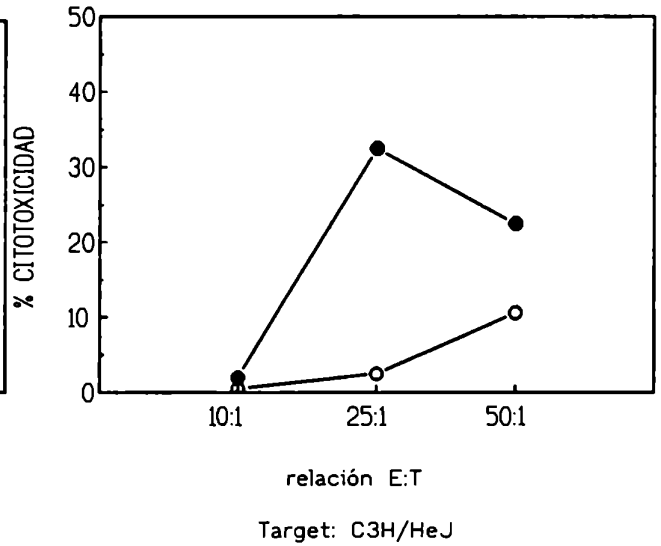
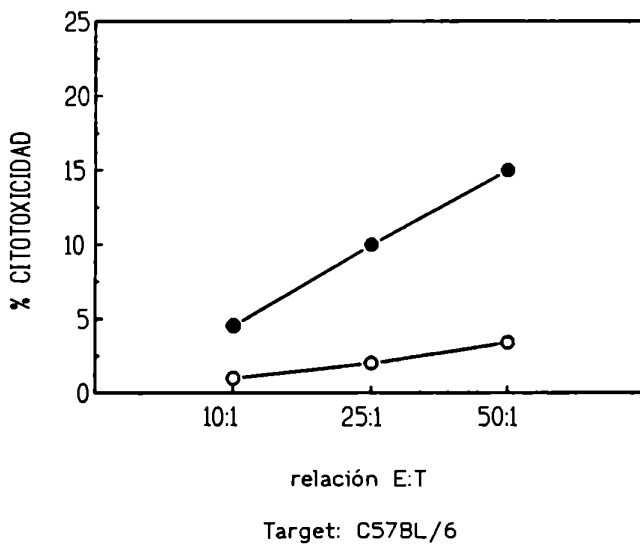
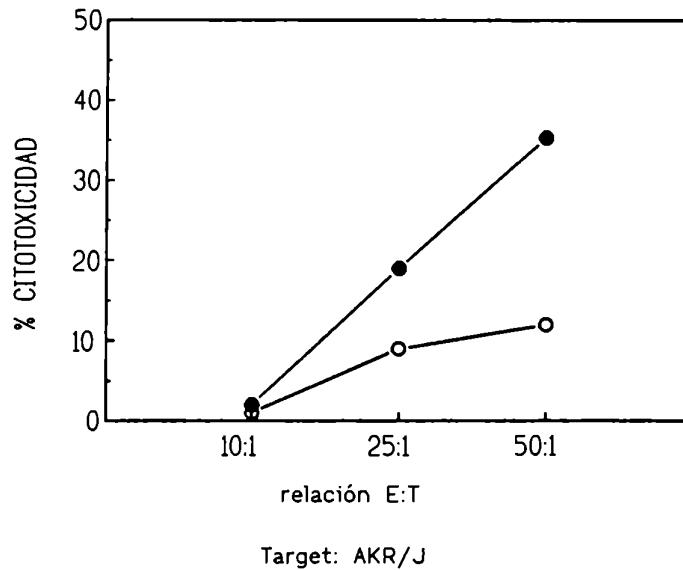


FIGURA 28

Linfocitos provenientes de ganglios linfáticos de ratones adultos BALB/c amamantados por sus propias madres (●) o por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) (○) fueron co-cultivados con esplenocitos alogeneicos irradiados. Al quinto día se agregaron al cultivo 10^4 blastos marcados con ^{51}Cr como target de citotoxicidad. Cuatro horas más tarde se midió la radioactividad liberada.

$$\% \text{ de citotoxicidad} = \frac{\text{cpm exp} - \text{cpm espontánea}}{\text{cpm total} - \text{cpm espontánea}}$$

amamantados con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a frente a ovoalbúmina (OVA). Ratones BALB/c amamantados por nodrizas F1(BALB/cxDBA/2), F1(BALB/cxAKR/J) o por sus propias madres se inmunizaron por vía subcutánea con una emulsión de 100ug de OVA en adyuvante de Freund incompleto. Seis días más tarde se midió la respuesta proliferativa de 1.5, 2.5 y 4x10⁵ células de ganglios inguinales y para-órticos re-estimuladas in vitro con 40 ug del antígeno.

Los resultados obtenidos fueron independientes del sexo de los ratones utilizados y se muestran en la Figuras 29 y 30. Como puede observarse, el amamantamiento con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a fue capaz de disminuir significativamente la respuesta proliferativa frente al antígeno. Esto se verifica para toda la curva de dosis respuesta.

La Figura 31 muestra los resultados obtenidos cuando se estudió la respuesta proliferativa T de ratones BALB/c amamantados por nodrizas F1(BALB/cxC57Bl/6). Como se observa no se detectaron diferencias significativas a lo largo de toda la curva de dosis respuesta, entre los ratones amamantados por la nodriza y aquellos amamantados normalmente.

2.c. Inactivación funcional de células T CD4+

Con el objeto de determinar si la disminución de la reactividad T era consecuencia del establecimiento de un estado de inactivación funcional o anergia en las células T CD4+, se investigó la capacidad funcional de células provenientes de ganglios linfáticos de ratones de ambos sexos BALB/c, normales y amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) de edades

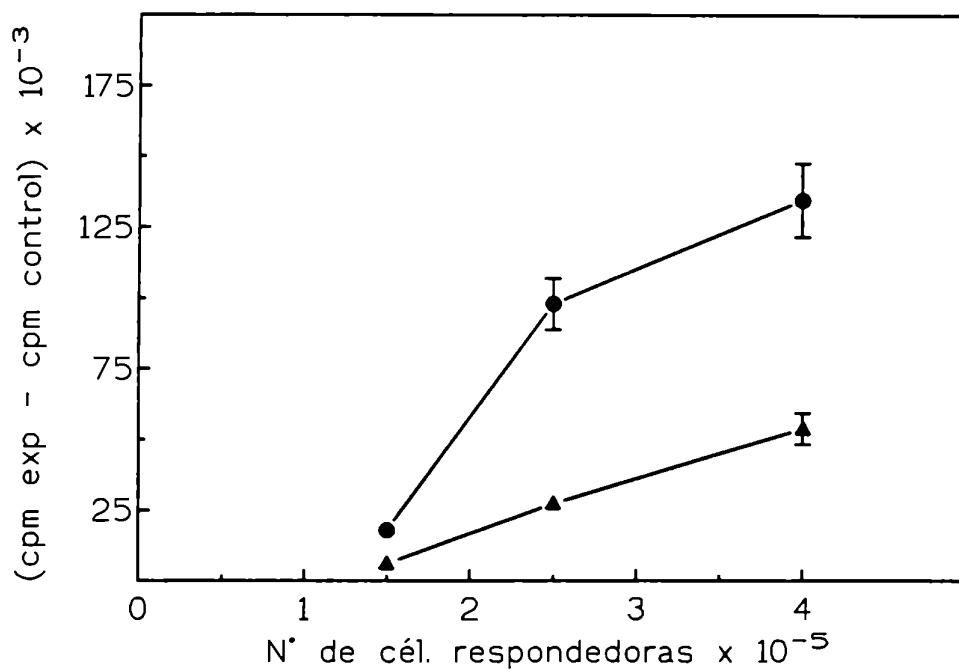


FIGURA 29

Ratones BALB/c adultos amantados por nodrizas F1(BALB/cxDBA/2) (▲) o por sus propias madres (●) se inmunizaron sc con 100 µg de OVA. Siete días más tarde distinto número de células de ganglios inguinales y para-aórticos se re-estimularon con 40 µg del antígeno. Los resultados se expresan como la diferencia entre la incorporación de timidina tritiada en presencia del antígeno y la registrada en ausencia del mismo (▲ cpm ± DS). Cada punto es el valor medio de determinaciones por cuadruplicado.

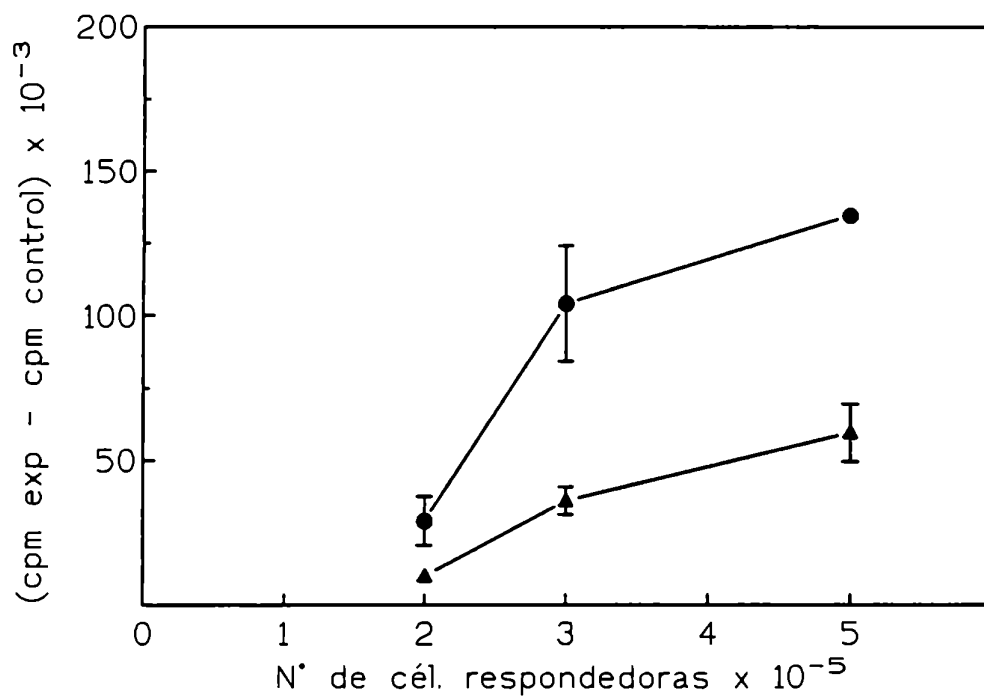


FIGURA 30

Ratones BALB/c adultos amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) (▲) o por sus propias madres (●) se inmunizaron sc con 100 µg de OVA. Siete días más tarde distinto número de células de ganglios inguinales y para-aórticos se re-estimularon con 40 µg del antígeno. Los resultados se expresan como la diferencia entre la incorporación de timidina tritiada en presencia del antígeno y la registrada en ausencia del mismo (△ cpm ± DS). Cada punto es el valor medio de determinaciones por cuadruplicado.

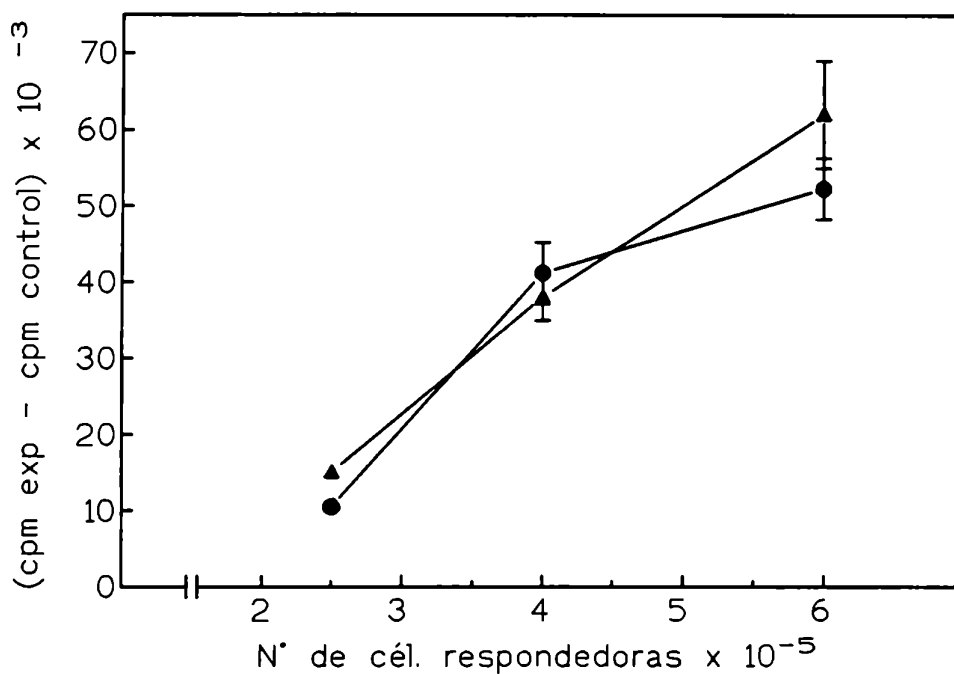


FIGURA 31

Ratones BALB/c adultos amamantados por nodrizas F1(BALB/cxC57BL/6) (▲) o por sus propias madres (●) se inmunizaron sc con 100µg de OVA. Siete días más tarde distinto número de células de ganglios inguinales y para-aórticos se re-estimularon con 40 µg del antígeno. Los resultados se expresan como la diferencia entre la incorporación de timidina tritiada en presencia del antígeno y la registrada en ausencia del mismo (Δ cpm ± DS). Cada punto es el valor medio de determinaciones por cuadruplicado.

comprendidas entre seis y diez semanas, en los cuales paralelamente se verificó que no mostraran una disminución en el porcentaje de células T V β 6+. Las células fueron tratadas previamente con anticuerpos monoclonales anti-CD8 más complemento. Posteriormente fueron estimuladas in vitro con anticuerpos monoclonales anti-V β 6, anti-V β 8.2 inmovilizados, o esplenocitos AKR/J o DBA/2 pretratados con mitomicina-C.

2.c.1. Proliferación de células T CD4+ frente a anticuerpos monoclonales anti-V β 6

Células provenientes de ganglios linfáticos fueron tratadas con anticuerpos monoclonales anti-CD8 más complemento de manera de eliminar la subpoblación de células T supresoras. A continuación fueron estimuladas con una dilución 1:50 de anticuerpo monoclonal anti-V β 6 o anti-V β 8.2 (control) previamente adsorbidos en la placa la noche anterior. Luego de tres días de incubación se midió la respuesta proliferativa de las células T CD4+ por incorporación de timidina tritiada. Como se puede observar en la Tabla 8, las células provenientes de ganglios de ratones BALB/c amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) registraron una menor respuesta proliferativa frente a anti-V β 6. Por otro lado, la respuesta proliferativa frente a anti-V β 8.2 fue similar a la observada en los ratones BALB/c amamantados por sus propias madres.

2.c.2. Proliferación de células T CD4+ frente a AKR/J y DBA/2

Células provenientes de ganglios linfáticos fueron tratadas con un anticuerpo

TABLA 8

Inactivación funcional de células T CD4+

nodriza	sexo	proliferación (Δ cpm) ^a	
		anti-V β 6	anti-V β 8.2
F1(BALB/cxAKR/J)	hembra	1 349 \pm 298	13 870 \pm 1 043
	macho	1 549 \pm 873	14 740 \pm 10 818
BALB/c	hembra/macho	10 724 \pm 1 132	14 325 \pm 987

3x10⁵ células provenientes de ganglios linfáticos de ratones BALB/c normales o amamantados con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal anti-CD8 + C' y estimuladas con anti-V β 6 (dilución 1:50) o anti-V β 8.2 (dilución 1:50). Se midió la respuesta proliferativa por incorporación de timidina tritiada al día tres de cultivo.

^a Los resultados se expresan como la diferencia de incorporación de timidina tritiada en presencia del anticuerpo y la registrada en ausencia del mismo (Δ cpm \pm DS). Cada dato es el valor medio de determinaciones por cuadruplicado. Los animales fueron testeados individualmente.

monoclonal anti-CD8 más complemento y estimuladas posteriormente con esplenocitos AKR/J o DBA/2 pretratados con mitomicina-C. Luego de 4 días de incubación, se midió la respuesta proliferativa por incorporación de timidina tritiada. La Figura 32 muestra un experimento donde se enfrentaron 3×10^5 células respondedoras con 2, 3 y 4×10^5 células estimuladoras AKR/J. Como puede observarse, el amamantamiento con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) fue capaz de disminuir la proliferación de las células T CD4+ in vitro frente a los antígenos de histocompatibilidad expresados por la nodriza. Mas aún, cuando las células respondían frente a esplenocitos provenientes de DBA/2 -es decir, hacia el superantígeno Mls-1^a- se obtuvo una fuerte disminución de la proliferación de las células T CD4+ (Figura 33).

Los resultados obtenidos en ambos ensayos fueron independientes del sexo.

La disminución de la reactividad T fue detectada en casi la totalidad de los animales testeados. Trece machos de un total de 19 y 15 hembras de un total de 16 mostraron una disminución en la reactividad T tanto in vivo como in vitro.

Los resultados obtenidos en la segunda parte del trabajo permiten concluir que el amamantamiento con nodrizas semialogéneas portadoras de superantígenos Mls-1^a, disminuye la reactividad T tanto frente a antígenos de histocompatibilidad expresados o no por la nodriza cuanto frente a antígenos convencionales. Esta disminución sería consecuencia de la inactivación funcional de células T CD4+ reactivas a Mls-1^a, ya que las mismas muestran una disminución muy significativa en los niveles de proliferación frente a anticuerpos monoclonales anti-V β 6.

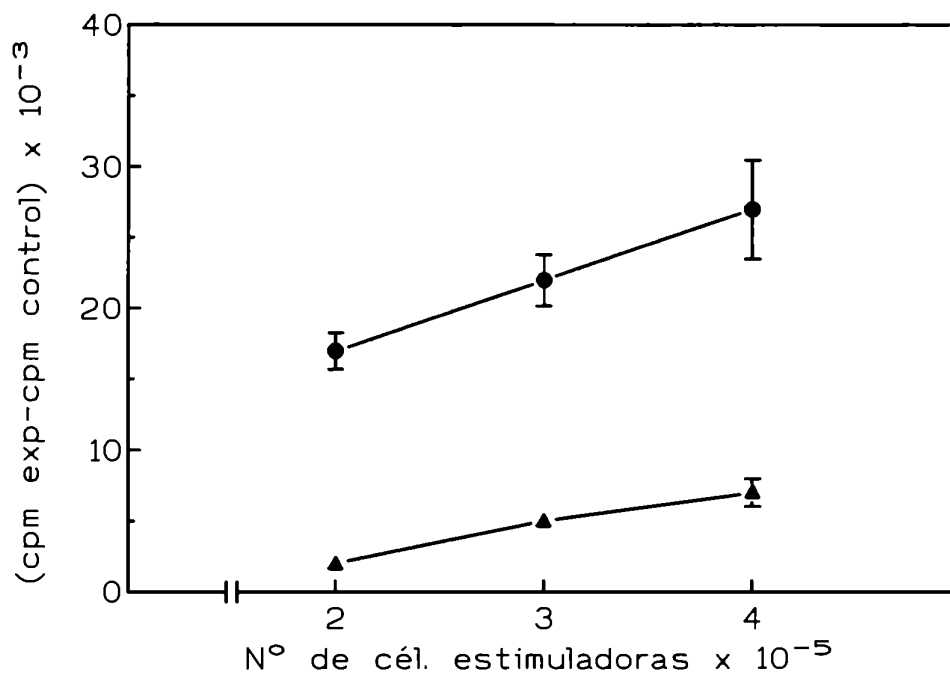


FIGURA 32

3×10^5 células pretratadas con anti-CD8 + C' provenientes de ganglios linfáticos de ratones BALB/c adultos amantados por sus propias madres (●) o por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) (▲) se enfrentaron con distintas dosis de esplenocitos AKR/J pretratados con mitomicina-C. Los niveles de proliferación T se determinaron por incorporación de timidina tritiada al día cuatro de cultivo.

Los resultados se expresan como Δ cpm (cpm exp-cpm control) Cada punto es el valor medio de determinaciones por cuadruplicado \pm DS.

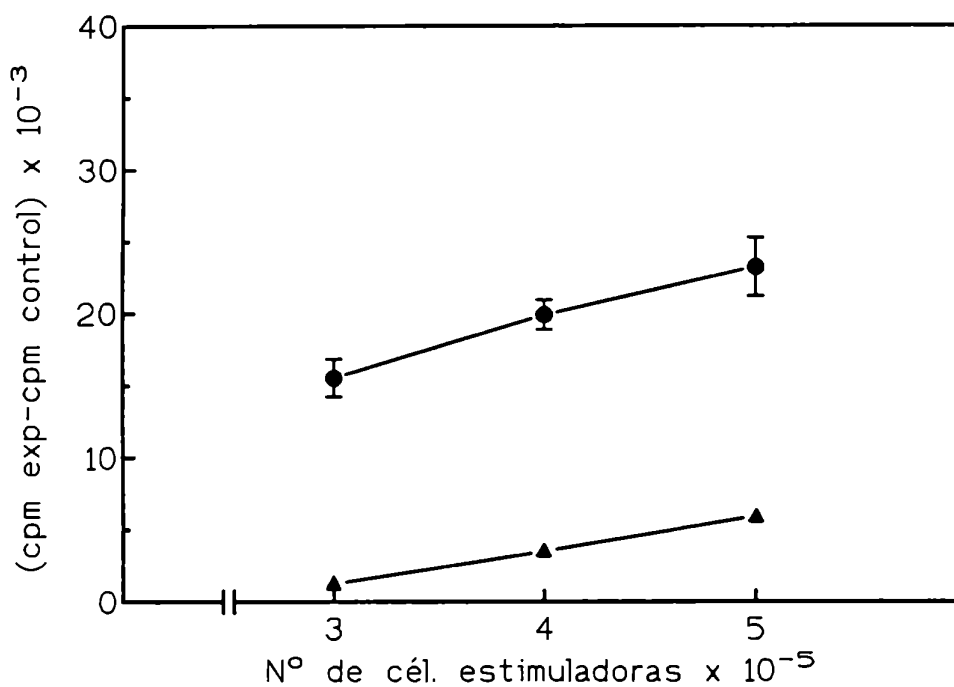


FIGURA 33

4x10⁵ células pretratadas con anti-CD8 + C' provenientes de ganglios linfáticos de ratones BALB/c adultos amantados por sus propias madres (●) o por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) (▲) se enfrentaron con distintas dosis de esplenocitos DBA/2 pretratados con mitomicina-C. Los niveles de proliferación T se determinaron por incorporación de timidina tritiada al día cuatro de cultivo. Los resultados se expresan como Δ cpm (cpm exp-cpm control) Cada punto es el valor medio de determinaciones por cuadruplicado \pm DS.

A lo largo de este trabajo, hemos investigado el efecto del amamantamiento con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a sobre el repertorio T de ratones BALB/c (Mls-1^b).

Hemos podido demostrar que el amamantamiento con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) y F1(BALB/cxDBA/2), portadoras de superantígenos Mls-1^a, es capaz de inducir la delección de clones T específicos para dicho superantígeno. La delección ocurre en el 50% de los animales y se detecta tanto en machos como en hembras. Sin embargo existe una diferencia significativa en la edad a la cual comienza a observarse la delección clonal, siendo significativamente más tardía en los machos. Demostramos además que se establece un estado de anergia en las células T Vβ6+ CD4+ -reactivas al superantígeno Mls-1^a- previo a la delección de dichos clones. Dicha inactivación funcional afecta a la casi totalidad de los animales. Por último, se demostró la presencia de un virus MMTV en la leche de las nodrizas F1(BALB/cxAKR/J).

Papiernik y col. (64) demostraron recientemente que una colonia de ratones BALB/c (BALB/c IC) modifica progresivamente su repertorio de células T de manera similar a la que ocurre en individuos portadores de superantígenos Mls-1^a, esto es, deleccionando los clones T Vβ6+ y Vβ8.1+. Posteriormente se demostró (60) que estas alteraciones del repertorio T correlacionaban con la presencia de un virus MMTV (SW) infeccioso en la leche de los ratones BALB/c de esta colonia.

Con el objeto de descartar la presencia de dicho virus infeccioso en nuestra colonia de ratones BALB/c, se investigó en primer lugar si existían alteraciones en la frecuencia de linfocitos T V β 6+ en los ganglios linfáticos a lo largo de la vida de los ratones BALB/c.

Se llevaron a cabo estudios citofluorométricos, analizando el porcentaje de linfocitos T V β 6+ de ganglios linfáticos de ratones de edades comprendidas entre las 5 y las 44 semanas de vida. El porcentaje de células T V β 6+ mostró niveles normales y estables a lo largo del tiempo en todos los animales examinados. El porcentaje de linfocitos T CD4+ V β 6+ también permaneció constante.

Estudiamos también la frecuencia de los timocitos V β 6+ maduros en ratones BALB/c normales de nuestra colonia. Para ello, los ratones fueron tratados con hidrocortisona. Se ha demostrado que los corticosteroides eliminan los timocitos corticales más rápidamente que los timocitos medulares. Así, la administración in vivo de corticosteroides causa dentro de las 12-48 horas un enriquecimiento en la población tímica medular. Esta población es más activa en sistemas que involucran actividad helper y citotóxica comparada con la población de timocitos sin previo tratamiento (252). Ceredig y col. (253) demostraron que las poblaciones que resultan luego del tratamiento con hidrocortisona son de tamaño mediano, expresan bajos niveles de Thy.1 y altos niveles de antígenos mayores de histocompatibilidad de clase I. Este fenotipo es característico de las células T periféricas y por lo tanto estas poblaciones son consideradas timocitos maduros. MacDonald y col. (147) han sugerido que los timocitos resultantes luego del tratamiento con hidrocortisona poseen un fenotipo maduro CD4+ o CD8+ (simple positivo).

No se encontraron alteraciones en la frecuencia de los timocitos V β 6+ resistentes a hidrocortisona en ratones BALB/c de nuestra colonia de edades comprendidas entre las 5 y

las 32 semanas de vida.

Estos resultados indican que los ratones BALB/c de nuestra colonia no muestran alteraciones en el porcentaje de clones T V β 6+ a lo largo de la vida. Por otra parte, no se detectó la presencia de la glicoproteína gp52 en la leche de los ratones BALB/c. El conjunto de estos resultados sugiere fuertemente la ausencia de virus MMTV (SW) infeccioso en los ratones BALB/c de nuestra colonia capaz de modificar el repertorio T en forma semejante a la que ocurre en individuos portadores de superantígenos Mls-1^a.

Investigamos entonces si el amamantamiento de ratones BALB/c (Mls-1^b) con nodrizas Mls-1^{b^{aa}} era capaz de inducir alteraciones en el repertorio T. Con este objetivo, ratones de la cepa BALB/c (Mls-1^b) fueron amamantados desde el nacimiento con nodrizas semialogeneicas F1(BALB/ \times AKR/J) y F1(BALB/ \times DBA/2) portadoras de superantígenos Mls-1^a. Como controles se utilizaron ratones BALB/c amamantados con nodrizas F1(BALB/ \times C57BL/6) (Mls-1^b), F1(BALB/ \times C3H/He) (Mls-1^b), por BALB/c singeneicos o, por sus propias madres. Se utilizaron nodrizas F1 para evitar las posibles reacciones de injerto contra huésped que la madre pudiera causar a la cría como consecuencia del pasaje de células a través del amamantamiento (250). Una vez alcanzada la madurez inmunológica, se determinó el porcentaje de clones T reactivos a dicho superantígeno.

Mediante análisis citofluorométricos se pudo demostrar que el amamantamiento con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a fue capaz de disminuir significativamente el porcentaje de linfocitos T V β 6+ en ganglios linfáticos. Los ratones BALB/c amamantados con nodrizas Mls-1^b no mostraron alteraciones en la frecuencia de dichos clones. La disminución de células T V β 6+ se detectó en el 50% de los animales amamantados con

nodrizas F1 Mls-1^a, tanto en ratones hembras como en ratones machos. Sin embargo, en los machos la disminución en el porcentaje de los clones T Vβ6+ se observó sólo a partir de las 32 semanas de edad, mientras que las hembras mostraron ya alteraciones en estos clones a las 10 semanas de edad. El porcentaje de linfocitos T Vβ8.2 (no reactivos frente a Mls-1^a) no se vio alterado.

Cuando se analizaron los perfiles de fluorescencia de las células de ganglio Vβ6+ en los ratones con una disminución en la frecuencia de estos clones, se observó que la intensidad de fluorescencia media era significativamente menor que la de los controles. No se detectaron en cambio alteraciones en la intensidad de fluorescencia media para el marcador Vβ8.2. Este resultado sugiere que además de disminuir el porcentaje de clones Vβ6+, los linfocitos expresaban un menor número de receptores Vβ6 por célula. La disminución de la densidad de receptores TCR se ha interpretado como una evidencia de la existencia de una señal tolerogénica. En este sentido, Schneider y col. (254) demostraron que la densidad de TCR de los timocitos CD4+ Vβ6+ de ratones congénicos BALB/c.Mls^a de cuatro y cinco días de edad -previo a la desaparición total de dichos clones autorreactivos- se encontraba significativamente reducida respecto de los controles BALB/c (Mls^b).

El superantígeno Mls-1^a induce también la deleción de clones T Vβ8.1 (145,146), por lo tanto investigamos la existencia de deleción clonal de linfocitos T Vβ8.1+. Pudimos determinar que aquellos ratones que mostraban una disminución significativa en la frecuencia de clones T Vβ6+ en ganglios linfáticos, también tenían disminuída la población T Vβ8.1+.

Se estudió luego la frecuencia de las células T CD4+ Vβ6+ y CD8+ Vβ6+ en ganglios provenientes de ratones BALB/c amamantados con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J).

Se observó que el amamantamiento fue capaz de disminuir significativamente el subset CD4+ VB6+ en todos los ratones que mostraban un decrecimiento en el porcentaje de células T VB6+. Sin embargo, no todos los ratones que presentaban disminuciones en la frecuencia de células VB6+ mostraron alteraciones en la subpoblación CD8+VB6+. Más aún, el grado de disminución fue menor en esta subpoblación que en la CD4+VB6+. El subset CD8+VB6+ fue entonces menos afectado que el subset CD4+VB6+. Esto se verificó tanto para hembras como para machos.

Estos resultados coinciden con aquellos observados por otros autores. Así, se ha reportado que la delección inducida por el virus MMTV (SW) afecta más al subset VB6+CD4+ que a las células T VB6+CD8+ (64). De la misma manera, en ratones Mls-2^a se encuentra una mayor disminución en el porcentaje de células T VB3+CD4+ que el de células T VB3+CD8+ (255). En este sentido,- como se ha discutido anteriormente (ver Introducción)- la respuesta T hacia el superantígeno endógeno Mls-1^a históricamente se ha considerado limitada a la subpoblación de células T CD4+ (47,98,103). Experimentos más recientes en los cuales se estimulan células T CD8+ VB8.1+ y VB6+ con linfocitos B Mls-1^a, demostraron que las células CD8+ también pueden reconocer el determinante Mls-1^a, a pesar de que este reconocimiento ocurriría en menor grado (256). MacDonald y col.(72) y Webb y col.(105) obtuvieron resultados similares en experimentos realizados in vivo en los que se utilizaron animales irradiados reconstituídos con células estimuladoras Mls-1^a (linfocitos B) y células respondedoras Mls-1^b. Este reconocimiento más débil por parte de las células T CD8+ se podría explicar por el hecho de que las células T CD8+ ven al determinante Mls-1^a en el contexto de los AMH de clase II.

Con el objeto de investigar si la disminución de la frecuencia de células T reactivas

a Mls-1^a observada en los ganglios linfáticos era reflejo de la existencia de delección clonal intratímica, se estudió el porcentaje de timocitos VB6⁺. Para esto, se llevaron a cabo estudios citofluorométricos de timocitos provenientes de ratones BALB/c amamantados con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) tratados con anticuerpos anti-VB6. La marcación de los timocitos con el anticuerpo anti-VB6 reveló la existencia de dos poblaciones diferentes, una de baja intensidad de fluorescencia (baja densidad de TCR VB6⁺) y una de alta intensidad de fluorescencia (alta densidad de TCR VB6⁺), que corresponden a poblaciones de células tímicas, menos maduras y más maduras respectivamente (257).

Pudimos demostrar que el amamantamiento de ratones BALB/c hembras con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) fue capaz de disminuir drásticamente la frecuencia del subset de alta intensidad de fluorescencia y también, aunque de manera menos marcada, el de baja intensidad de fluorescencia. Los ratones de la cepa BALB/c (Mls-1^b) no mostraron alteraciones en la frecuencia de timocitos VB6⁺ en ninguna de las dos poblaciones (alta y baja densidad de TCR). Este resultado coincide con trabajos previos de Hodes y col. (257) donde se observa que en ratones AKR/J (Mls-1^a) en los timocitos con alta densidad de TCR, la expresión de VB6⁺ se encuentra significativamente disminuída. Hengarter y col. (258) habían demostrado mediante experimentos inmunohistológicos y de citometría de flujo que la delección de timocitos VB6⁺ en ratones DBA/2 (Mls-1^a) ocurriría en el límite entre la corteza y la médula tímica dentro de la población de alta intensidad de fluorescencia VB6. Posteriormente, Matsuzaki y col. (259) con el objeto de definir mejor el momento de delección de los timocitos VB6⁺, utilizaron un sistema experimental por medio del cual es posible sincronizar la diferenciación de las células T en timo. Así, observaron que sumada a la delección total de la población de alta intensidad de fluorescencia VB6, se detectaba una delección parcial de la población de baja intensidad de fluorescencia VB6, pudiendo demostrar

que la delección clonal de las células VB6+ ocurre en una etapa tardía del estadio inmaduro (baja densidad de TCR).

Cuando se trataron los ratones con hidrocortisona y se utilizó una doble marcación (anti-VB6 y anti-CD4), pudo detectarse una disminución significativa en el porcentaje de timocitos VB6+ dentro de la población CD4+ resistente a dicha hormona.

Con el objeto de eliminar las subpoblaciones CD4+ CD8+ y CD8+, se trataron células tímicas provenientes de hembras amamantadas con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J), de dos meses de edad, con anticuerpos monoclonales anti-CD8 más complemento. Cuando se realizó el análisis citofluorométrico para establecer la frecuencia de células T VB6+, se pudo observar una disminución significativa en el porcentaje de esta subpoblación.

Se ha reportado (64) que todos los timos de los ratones de la colonia BALB/c IC infectados con el virus MMTV(SW) muestran una disminución en el porcentaje de timocitos VB6+ entre las 14 y 19 semanas de vida. Luego, algunos ratones parecen recuperarse de la crisis y muestran niveles normales de células VB6+ en el timo, bazo, y ganglios linfáticos entre las 27 y 43 semanas de vida. En nuestro modelo experimental, no hemos detectado dicha crisis tímica. A lo largo de todas las edades testeadas (4 a 52 semanas), siempre se registraron hembras y machos con niveles normales de células tímicas VB6+.

El conjunto de estos resultados muestra la existencia de delección clonal intratímica.

En cuanto al momento en que comienza a observarse la delección clonal, a las 4 semanas de vida no se detectaron alteraciones en el subset de alta intensidad de fluorescencia, en el de baja intensidad de fluorescencia o en los timocitos resistentes a hidrocortisona respecto de los controles amamantados por sus propias madres. La delección clonal intratímica pudo detectarse en las hembras, a partir de las diez semanas de vida. Coincidiendo con los resultados obtenidos cuando se analizó el porcentaje de células T VB6+ en ganglios

periféricos, los ratones machos BALB/c amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) recién muestran alteraciones en el porcentaje de timocitos V β 6+CD4+ resistentes a hidrocortisona partir de las 32 semanas de vida.

Tanto en ratones BALB/c hembras como en ratones machos amamantados con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J), cada vez que se detectó delección clonal en la periferia, se detectó delección clonal en el timo. Esto indica que -al menos en parte- la delección clonal inducida por el amamantamiento de ratones Mls-1^b con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a es intratímica.

Si bien la delección de células T V β 6+ fue detectada simultáneamente en timo y periferia, no puede descartarse que exista una ventana entre la delección tímica y la disminución del porcentaje de células T V β 6+ en la periferia que los períodos estudiados no hayan permitido detectar. Así, en las hembras, no puede descartarse que la delección ocurra primero en el timo y luego como consecuencia disminuya el porcentaje de células V β 6+ en la periferia. Sin embargo, en los machos, la delección de clones V β 6+ se detecta tanto en timo como en periferia recién a las 32 semanas de edad. En este caso es difícil atribuir la delección clonal que se observa en la periferia a un evento intratímico, ya que la migración de células desde el timo a la periferia a una edad tan avanzada es mínima. Se ha reportado que alrededor de los 6 meses de edad, sólo el 0.1% de los timocitos abandonan el timo en un período de 24 horas (260). Por lo tanto, al menos en los machos, es posible postular que -además de existir delección clonal intratímica- los clones T V β 6+ sufren delección clonal en la periferia. En este sentido, diversos estudios han demostrado que bajo ciertas condiciones, la activación de células T maduras en la periferia puede llevar a la eliminación de las mismas (153,184,193). Webb y col.(153) han demostrado que luego de la inoculación por vía

endovenosa de células Mls-1^a (AKR/J) en ratones adultos timectomizados Mls-1^b (B10.BR), se detecta a partir del día cuatro una disminución progresiva de la frecuencia de células Vβ6+ CD4+ del huésped. Los porcentajes de células Vβ6+ llegan a niveles del 2-3% hacia la tercera semana luego de la inoculación.

Los resultados hasta aquí descriptos permiten concluir que el amamantamiento de ratones BALB/c con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) y F1(BALB/cxDBA/2) induce la deleción clonal de las células T Vβ6+ y T Vβ8.1+, sugiriendo que a través de la leche de estos ratones se transmitiría un superantígeno similar a Mls-1^a.

Con el objeto de determinar si la leche de las nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) contenía virus MMTV, se llevaron a cabo ensayos de ELISA a fin de investigar la presencia de la glicoproteína de envoltura del virus, gp52. Como control positivo se utilizó leche de ratones de la cepa C3H/HeJ, que transmite el MMTV (C3H) exógeno por esta vía (59,261). Se detectó la presencia de gp52 en la leche de las nodrizas F1(BALB/cxAKR/J), siendo sus niveles similares a aquellos observados en la leche de las hembras C3H/HeJ. Sin embargo, no se pudo detectar la presencia de gp52 ni en la leche de ratones BALB/c, ni en la de AKR/J.

Durante la realización de este trabajo, se han descripto diferentes superantígenos codificados por tres MMTV exógenos que son transmitidos a través de la leche de la madre al hijo, capaces de causar la deleción Vβ específica de células T. Marrack y col. (59) describieron un elemento selectivo Vβ capaz de deleccionar células T Vβ14+. Este superantígeno está codificado por un MMTV que es transmitido verticalmente a través de la

leche materna de ratones de la cepa C3H/He. Hodes y col. (257) demostraron que un MMTV infeccioso de una sublínea de la cepa BALB/c (BALB/c.V) también transmitido por leche, causa la deleción específica de células T CD4+ Vβ2+. Held y col. (60) aislaron recientemente un virus MMTV (MMTV-SW) de una sublínea de BALB/c (BALB/cIC) que es transmitido por leche y tiene las mismas propiedades superantigénicas del Mtv-7, esto es delecionar los clones Vβ6+ y Vβ8.1+.

La deleción de células T Vβ6+ y Vβ8.1+ en nuestro modelo experimental es un fenómeno dependiente de la edad, como ocurre en el caso de los virus exógenos MMTV(C3H) (59) y MMTV(SW) (60,64) y en el caso del virus endógeno Mtv-44 en ratones NZW (249). Similarmente a la deleción ocasionada por los virus MMTV(C3H/HeJ) y MMTV(SW), transmitidos a través de la leche, la deleción de las células T Vβ6+ en ratones BALB/c amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) o F1(BALB/cxDBA/2) se detecta luego de varios meses después del nacimiento.

La deleción de células T Vβ6+ y Vβ8.1+ inducida ya sea por MMTV(SW) o por el amamantamiento de ratones BALB/c por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) o F1(BALB/cxDBA/2) afecta el 50% de los ratones. Sin embargo, mientras en el primer caso la deleción tarda de 14-20 semanas en completarse (64) tanto sea en machos como en hembras, en el modelo experimental descrito en este trabajo la deleción puede detectarse en un período similar (20 semanas) sólo en hembras e incluso a esta edad, no parece haberse completado. Los machos no muestran alteraciones significativas en el porcentaje de clones reactivos frente a Mls-1^a hasta las 32 semanas de vida. A diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, la deleción de células T Vβ14+ inducida por el MMTV de C3H/HeJ se detecta primero en los

machos (59). No se han descrito hasta el momento influencias del sexo en el comienzo de la delección clonal de células reactivas a Mls-1^a o superantígenos similares. Las diferencias observadas entre hembras y machos podrían deberse a que el mecanismo de delección y/o la expresión del superantígeno estén controlados por hormonas sexuales. Es sabido que los virus MMTV poseen en el LTR elementos regulatorios respondedores a hormonas (HREs). Los glucocorticoides y progestágenos pueden inducir la expresión de los virus MMTV mediante la interacción del complejo hormona esteroide-receptor con dichos HREs (262-266).

Hasta el presente, es sabido que las células T Vβ6+ pueden ser delecionadas por el superantígeno Mls-1^a, codificado por el virus endógeno Mtv-7, por los virus endógenos Mtv-44 (267), Mtv-43 (268) y por el virus infeccioso MMTV(SW) (60). Los resultados obtenidos en la primera parte del trabajo, en particular la presencia de la glicoproteína de envoltura gp52 del virus MMTV en leche, que correlaciona con la transmisión de un superantígeno Mls-1^a-like por leche, sugieren que el superantígeno involucrado en este trabajo sería un MMTV exógeno. De todas maneras, no se puede descartar que se trate de algún otro agente infeccioso o incluso de células de origen materno que expresen el superantígeno endógeno Mls-1^a (147,268)

No está claro aún el origen del virus MMTV exógeno detectado en la leche de las nodrizas F1(BALB/cxAKR/J). No fue posible detectar gp52 en la leche de los ratones BALB/c de nuestra colonia, cepa que -salvo excepciones en las que la colonia ha sido infectada al amamantar las crías con nodrizas portadoras del virus MMTV (como en el caso de BALB/cIC)- es considerada negativa para MMTV. Tampoco se observaron alteraciones en la frecuencia de células Vβ6+ en el timo o en los ganglios a lo largo de la vida de los mismos. Por lo tanto, se deben considerar dos posibilidades: 1) que este virus MMTV

infeccioso esté presente en AKR/J y en DBA/2 y sea transmitido al híbrido F1 a través de los machos como se ha reportado para ratones de la cepa GR (269,270) y 2) que el virus se origine en el híbrido F1.

Es sabido que la mayor parte de los provirus Mtv no producen partículas virales infectivas, a excepción de Mtv-1 (271) y Mtv-2 (270) que están relacionados con la expresión de virus infeccioso. La cepa DBA/2 porta el virus exógeno MMTV que se transmite a través de la leche -como en ratones C3H- y en su genoma además se encuentra codificado el alelo Mtv-1^a que controla la expresión de los antígenos del virus mamario tumoral MTV-L en la leche (272) mientras que la cepa AKR/J es negativa para Mtv-1 y Mtv-2 y es considerada una cepa MMTV negativa. En coincidencia con esto, no se ha podido detectar gp52 en la leche de los AKR/J de nuestra colonia. Esto hace improbable que en este caso el virus se transmita libre a través del semen de los ratones.

En cuanto a la segunda posibilidad, es decir que el virus se origine en el híbrido F1, se ha reportado que varios híbridos F1 provenientes del cruzamiento de ratones de la cepa BALB/c (que no contiene virus MMTV) y otras cepas MMTV negativas como AKR/J, ND2 y RFM, liberan cantidades sustanciales de gp52 en la leche (273). Se ha sugerido que la cepa BALB/c sería permisiva para la expresión de un provirus Mtv presente en las otras tres cepas MMTV negativas. Estas cepas serían portadoras de genes recesivos que inhibirían la síntesis de las proteínas de los MMTV. En el híbrido F1, como consecuencia de una complementación, los genes de la cepa BALB/c permitirían la expresión del Mtv y así habría producción de virus. Teniendo en cuenta que la delección Mls-1^a-like observada en este trabajo correlaciona con la presencia de Mtv-7 en las nodrizas, se podría hipotetizar que el virus MMTV presente en la leche de las mismas se originaría a partir del Mtv-7.

En los últimos años se ha intensificado notablemente el estudio de distintos virus con actividad superantigénica. Entre los virus que codifican para superantígenos se encuentran los del tumor mamario murino (MMTV) (59,60,257,261), el virus de la rabia (68) y el HIV (66). Se ha hipotetizado que la presencia de superantígenos codificados por Mtv endógenos con reactividad cruzada frente a aquellos codificados por virus exógenos protegería de los efectos patológicos asociados a la infección (119). La delección de elementos V β por virus endógenos Mtv disminuiría significativamente el transporte del virus MMTV exógeno por las células T desde el tracto digestivo hacia la mama. En este sentido, se ha podido demostrar que la delección temprana de las células reactivas al superantígeno viral correlaciona con una disminución de la expresión del virus infeccioso en mama (119). Sin embargo, las desventajas originadas por la presencia de los provirus en el genoma podrían superar esta ventaja. Primero, la expresión de superantígenos endógenos induce la delección de una alta proporción de células, reduciendo de esta manera el repertorio T del individuo. Esta reducción podría resultar en una incapacidad para responder a patógenos no relacionados (274). Segundo, la integración proviral al genoma determinaría tolerancia frente a epitopes conservados entre distintos MMTVs (por ejemplo aquellos derivados de gag, pol, y env), lo cual podría impedir la respuesta inmune convencional frente a células infectadas con cualquier MMTV.

La posibilidad de que el virus MMTV presente en la leche de las nodrizas F1 portadoras de superantígenos MIs-1^a se origine en el híbrido F1 a partir de un virus endógeno- probablemente el Mtv-7- plantearían quizás la mayor objeción a la supuesta ventaja que otorgaría la presencia estable de virus Mtv en el genoma.

Las células T pueden ser anergizadas al enfrentarse con superantígenos. Los modelos utilizados para demostrar este fenómeno incluyen superantígenos bacterianos (275), virus

endógenos (176,276) o exógenos (261,277). Ignatowicz y col. (261) han demostrado que el amamantamiento de ratones C3H/He recién nacidos con nodrizas portadoras del superantígeno viral MMTV(C3H), lleva a la inactivación funcional de las células T CD4+ Vβ14+ reactivas al mismo. Esta se detecta a las cuatro semanas de vida; posteriormente, la frecuencia de las células T Vβ14+ CD4+ comienza a declinar en la periferia. Los autores han hipotetizado que las células T en estado anérgico tendrían una vida media más corta que las células T normales, y como consecuencia desaparecerían con la edad. La inoculación de esplenocitos Mls-1^a por vía endovenosa en ratones adultos Mls-1^b resulta en la inactivación funcional de los linfocitos T Vβ6+ (276,278). En cuanto al efecto de las toxinas bacterianas, Rellahan y col. (275) han demostrado que la reactividad de las células T de ratones BALB/c que habían sido previamente inoculados por vía endovenosa con SEB se encontraba disminuída cuando eran reestimuladas in vitro con la toxina. La administración de SEB, ya sea en forma subcutánea con adyuvante o endovenosa, induce un estado de anergia en las células T Vβ8+ (reactivas al antígeno) que se detecta a los 8 días post-inoculación. A las dos semanas post-inoculación se observó una disminución del 50% del número de células T Vβ8+.

A diferencia de lo reportado para el superantígeno viral MMTV(C3H), se ha observado que la exposición de ratones BALB/c al virus MMTV(SW) no lleva al establecimiento de anergia en las células CD4+ reactivas a dicho superantígeno (279).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en la segunda parte del trabajo se investigó el efecto del amamantamiento de ratones BALB/c con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) y F1(BALB/cxDBA/2), portadoras de superantígenos Mls-1^a, sobre la reactividad T en el período previo al inicio de la selección clonal. Se estudiaron individuos machos y hembras de edades comprendidas entre seis y ocho semanas. Se verificó paralelamente que no mostraran

alteraciones en el porcentaje de linfocitos T VB6+.

Comenzamos estudiando el efecto del amamantamiento sobre la reactividad T frente a los antígenos de histocompatibilidad expresados por la nodriza. Para ello, se llevaron a cabo reacciones locales de GvH, de cultivo mixto de linfocitos alogeneicos y de citotoxicidad T. Como controles, se utilizaron ratones BALB/c amamantados por nodrizas F1(BALB/cxC57BL/6) (Mls-1^b) o por sus propias madres. Pudimos demostrar que el amamantamiento con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a era capaz de disminuir la reactividad T frente a los antígenos de histocompatibilidad expresados por la nodrizas incluida la reactividad frente al superantígeno Mls-1^a. Esta disminución de la reactividad fue detectada tanto en ratones hembras como en ratones machos. Los dos primeros ensayos sugieren que se encuentra alterada la actividad T helper. Los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad muestran que las alteraciones pueden también detectarse en la actividad T efectora. El amamantamiento con nodrizas Mls-1^b no alteró la reactividad T frente a los antígenos de histocompatibilidad expresados por la nodriza.

El impacto con un determinado superantígeno, induzca éste la delección de clones reactivos al mismo y/o la generación de anergia clonal específica para el mismo, debería ser capaz de alterar también el repertorio T que reconoce a los antígenos convencionales o a antígenos de histocompatibilidad no relacionados: dada la alta frecuencia de clones reactivos al superantígeno es posible hipotetizar que algunos de ellos se superpondrán con los clones que reconocen específicamente a los antígenos convencionales o a antígenos de histocompatibilidad alogeneicos.

Se evaluó entonces si se encontraba alterada la reactividad T frente a antígenos de histocompatibilidad no expresados por la nodriza. Con este fin se realizaron ensayos de citotoxicidad T enfrentando células provenientes de ganglio de ratones amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) (H-2^k) con blastos AKR/J (H-2^k), C3H/HeJ (H-2^k) y C57BL/6 (H-2^b). Demostramos que no sólo se encontraba alterada la citotoxicidad T frente a los antígenos de histocompatibilidad expresados por la nodriza sino también frente a antígenos no expresados por la misma.

Estudiamos luego si el amamantamiento con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a era capaz de alterar la reactividad T frente a antígenos convencionales. Se estudió la respuesta proliferativa *in vitro* de ratones BALB/c amamantados con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) o F1(BALB/cxDBA/2) frente a OVA. Se eligió este antígeno teniendo en cuenta que se ha demostrado la existencia de reactividad cruzada entre epitopes del complejo Mls-1^a-H-2 y epitopes de OVA (252). Como controles se utilizaron ratones amamantados con nodrizas F1(BALB/cxC57Bl/6) o por sus propias madres. Los resultados obtenidos indican que el amamantamiento con nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a fue capaz de disminuir la reactividad T frente a este antígeno.

Las alteraciones en la reactividad T inducidas por el amamantamiento con nodrizas Mls-1^a pudieron detectarse tanto en hembras como en machos.

Estudiamos por último, si la disminución de la reactividad T detectada podría atribuirse al establecimiento de un estado de inactivación funcional o anergia en las células T CD4⁺. La ~~anergia-clonal~~ anergia se ha definido en base a la ausencia o disminución de la

respuesta de células T CD4+ frente a la estimulación in vitro con anticuerpos específicos dirigidos hacia el TCR. Con este objetivo, se investigó la capacidad funcional de células provenientes de ratones de ambos sexos y de edades comprendidas entre seis y diez semanas, en los cuales paralelamente se verificó que no mostraran una disminución en el porcentaje de células T Vβ6+. Células de ganglios linfáticos de ratones BALB/c, normales y amamantados por nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) fueron pretratadas con anticuerpos monoclonales anti-CD8 más complemento de forma de eliminar la subpoblación de células T CD8+, y estimuladas in vitro con anticuerpos monoclonales anti-Vβ6 o anti-Vβ8.2 inmovilizados, o con esplenocitos AKR/J o DBA/2 pretratados con mitomicina-C. Se observó una disminución de la reactividad T tanto frente a anticuerpos anti-Vβ6 como frente a esplenocitos AKR/J y DBA/2.

A pesar de que estos ensayos no permiten investigar y por lo tanto descartar la existencia de actividad T supresora, los resultados obtenidos sugieren que las células T CD4+ Vβ6+ se encontraban inactivadas funcionalmente. La respuesta frente a anti-Vβ8.2 fue similar a la observada en los ratones amamantados por sus propias madres, lo que sugiere que la anergia es específica.

Los resultados obtenidos fueron independientes del sexo.

El hecho de que la anergia parece afectar a la casi totalidad de las hembras y machos (80%) y la deleción sólo al 50% de los ratones, sugiere que la generación de anergia clonal no siempre lleva a la desaparición de dichos clones. En este sentido se ha demostrado que las células anérgicas permanecen vivas por largos períodos (170,276). En contraste con estos resultados, existe evidencia de que éstas sufren deleción clonal (261,275). El amamantamiento de ratones C3H/He recién nacidos con nodrizas portadoras del superantígeno viral

MMTV(C3H) induce la deleción de clones T CD4+ V β 14+ reactivos al mismo. El análisis de las células T V β 14+ de ratones de distintas edades mostró que una alta proporción de dichas células se encontraba inactivada funcionalmente en el período previo a la deleción clonal. Se ha hipotetizado que las células T en estado anérgico tendrían una vida media más corta que las células T normales, y como consecuencia desaparecerían con la edad (261). La inducción de tolerancia por la administración in vivo de SEB involucra la generación de un estado de anergia específico y la deleción clonal de células T V β 8+ (reactivas a SEB). El hecho de que algunas células T V β 8.1+ se encuentren anergizadas y sean luego deleccionadas ha llevado a sugerir que la anergia y la deleción clonal serían dos estadios de un proceso continuo. De todas maneras, al igual que indican nuestros resultados, la deleción clonal no sería una consecuencia inevitable de la inducción de anergia ya que por lo menos un 50% de las células T V β 8.1+ fueron capaces de persistir en estado anérgico (275).

En trabajos realizados en nuestro laboratorio con posterioridad a éste, se pudo demostrar que la falta de respuesta podía revertirse estimulando las células con anticuerpos anti-CD3 ϵ . Esto sugiere que en las células anérgicas la señalización a través del TCR y del complejo CD3 se encuentra desacoplada funcionalmente, como ha sido demostrado en varios modelos experimentales (280,281), incluyendo la inducción de tolerancia en el timo (160,282).

El conjunto de los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo indica que el amamantamiento de ratones Mls-1^b con nodrizas F1 portadoras de superantígenos Mls-1^a es capaz de modificar la reactividad T de la cría. Esta alteración de la reactividad

T pudo asociarse a la delección de clones V β 6+ y V β 8.1+, reactivos al superantígeno, la que resultó fuertemente influenciada por el sexo, y al establecimiento de un estado de anergia previo a la ocurrencia de delección clonal de las células T CD4+ reactivas a dicho superantígeno.

Se puede concluir que un superantígeno Mls-1^a-like es transmitido a los ratones BALB/c a través de la leche de nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) y F1(BALB/cxDBA/2). Esta transmisión correlaciona con la presencia de la glicoproteína de envoltura de MMTV gp52 en la leche de las nodrizas, lo cual permite sugerir que el superantígeno involucrado está relacionado con un MMTV exógeno.

A lo largo de este trabajo, hemos demostrado que el amamantamiento de ratones BALB/c (Mls-1^b) con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) y F1(BALB/cxDBA/2), portadoras de superantígenos Mls-1^a, es capaz de alterar el repertorio T de la cría.

Esta alteración del repertorio T pudo asociarse a la delección clonal de las células reactivas al superantígeno Mls-1^a y al establecimiento de un estado de anergia en los clones reactivos al superantígeno Mls-1^a

La disminución de la frecuencia de los clones T Vβ6+ (reactivos a Mls-1^a) en la periferia, se detectó en el 50% de la población amamantada por las nodrizas portadoras de superantígenos Mls-1^a, tanto en hembras como en machos. Se observó además que, en los animales que mostraban una disminución parcial en la frecuencia de estos clones, las células Vβ6+ restantes expresaban una menor densidad de receptores Vβ6. Los ratones amamantados por nodrizas F1 Mls-1^{b/b} no mostraron alteraciones en el porcentaje de células Vβ6+.

Aquellos ratones que tenían disminuído el porcentaje de células Vβ6+ en ganglios linfáticos mostraban además una disminución en la frecuencia de células Vβ8.1+, también reactivas al superantígenos Mls-1^a. No se observaron alteraciones en la frecuencia de células Vβ8.2+, no reactivas al superantígeno Mls-1^a ni en la densidad de estos receptores.

El momento en que comienza a detectarse la delección clonal difirió significativamente en hembras y machos. Las hembras mostraban una disminución en la frecuencia de la

subpoblación T V β 6+ en ganglios linfáticos entre las 10-20 semanas de vida mientras que en los machos la delección comienza a detectarse recién a las 32 semanas.

La delección clonal afectó más al subconjunto V β 6+CD4+ que al V β 6+CD8+. Todos los ratones que mostraban una disminución en el porcentaje de células V β 6+ presentaban disminuciones en la frecuencia de la subpoblación CD4+V β 6+; sólo alguno de ellos mostraron alteraciones en el porcentaje de la subpoblación CD8+V β 6+.

Cada vez que se detectó delección clonal en la periferia se detectó delección clonal en el timo, indicando de esta manera que, la delección clonal es -al menos en parte- intratímica. Se observó una fuerte disminución en la frecuencia del subconjunto de alta intensidad de fluorescencia y también aunque menos marcadamente en el de baja intensidad de fluorescencia. La frecuencia de timocitos CD4+ V β 6+ resistentes a hidrocortisona y la de CD8- V β 6+ también resultó significativamente disminuída.

En el período previo a la delección clonal se detectó el establecimiento un estado de anergia en los clones reactivos al superantígeno Mls-1^a. Los ratones amamantados por nodrizas F1 portadoras de superantígenos Mls-1^a mostraron una disminución en la reactividad T tanto frente a los antígenos de histocompatibilidad expresados por la nodriza como frente a antígenos no relacionados. Esta disminución fue detectada en reacciones in vivo (GvH) e in vitro (CMLA y CTL). El amamantamiento con nodrizas Mls-1^b no alteró la reactividad T frente a los antígenos de histocompatibilidad expresados por la misma.

La reactividad T frente a OVA, también resultó significativamente disminuída.

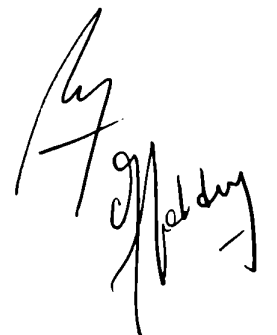
Los resultados obtenidos cuando se estimularon in vitro células T CD4+ con anticuerpos monoclonales anti-V β 6 inmobilizados, o con esplenocitos AKR/J o DBA/2 pretratados con mitomicina-C, sugieren que las células T CD4+ reactivas a Mls-1^a se

encontraban inactivadas funcionalmente. La respuesta frente a anticuerpos monoclonales anti-VB8.2 no se vio alterada respecto de los controles amamantados normalmente.

La disminución de la reactividad T afectó tanto a hembras como a machos y a la casi totalidad de animales testeados.

Estas alteraciones correlacionaron con la presencia de la glicoproteína de envoltura de MMTV gp52 en la leche de las nodrizas F1(BALB/cxAKR/J). No se detectó la presencia de la misma ni en ratones BALB/c ni en AKR/J.

El conjunto de los resultados obtenidos permite concluir que un superantígeno Mls-1^a-like es transmitido a los ratones BALB/c a través del amamantamiento con nodrizas F1(BALB/cxAKR/J) y F1(BALB/cxDBA/2), portadoras de superantígenos Mls-1^a. Esta transmisión correlaciona con la presencia de la glicoproteína de envoltura de MMTV gp52 en la leche de las nodrizas, lo cual permite postular que el superantígeno involucrado está relacionado con un MMTV exógeno originado posiblemente a partir del Mtv-7.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ay' followed by a stylized name and a period.

1. Raulat DH. 1989. The structure, function and molecular genetics of the γ/δ T cell receptor. *Ann. Rev. Immunol.* 7:175.
2. Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. 1988. The T cell receptor/CD3 complex: A dynamic protein ensemble. *Ann. Rev. Immunol.* 6:629.
3. Patten P, Yokota T, Rothbard J, Chien Y-h, Arai K-i, Davis MM. 1984. Structure, expression and divergence of T-cell receptor β -chain variable regions. *Nature* 312:40
4. Barth RK, Kim BS, Lan NC, Hunkapiller T, Sobieck N, Winoto A, Gershenfeld H, Okada C, Hansburg D, Weissman IL, Hood L. 1985. The murine T-cell receptor uses a limited repertoire of expressed V^{β} gene segments. *Nature* 316:517
5. Arden B, Klotz J, Sui G, Hood L. 1985. Diversity and structure of genes of the α family of mouse T-cell antigen receptor. *Nature* 316:783
6. Becker DM, Patten P, Chien Y-h, Yokota T, Eshhar Z, Giedlin M, Gascoigne NRT, Goodnow C, Wolf R, Arai K-i, Davis MM. 1985. Viability and Repertoire size of T-cell receptor V_{α} gene segments *Nature* 317:430
7. Amzel LM, Plojak RJ. 1979. Three-dimensional structure of immunoglobulins. *A.Rev.Biochem.* 48:961
8. Davies DR, Metzger HA. 1983. Structural basis of Ab function. *A.Rev. Immunol.* 1:87
9. Wu TT, Kabat EA. 1970. An analysis of the sequences of the variable regions of bence jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J.Exp.Med.* 132:211
10. Kabat EEA, Wu TT, Reid-Miller M, Perry HM, Gottesman KS. Sequences of proteins of immunological interest (NIH, Bethesda, Maryland 1987
11. Jorgensen JL, Esser U, Fazekas de St. Groth B, Reay PA, Davis MM. 1992. Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature* 355:224.
12. van del Elsen P, Shepley B-A, Borst J, Coligan JE, Markham AF, Orkin S, Terhorst C. 1984. Isolation of cDNA clones encoding the 20K T3 glycoprotein of human T-cell receptor complex. *Nature* 312:413
13. Gold DP, Puck JM, Pettrey CL, Cho M, Coligan J, Woody JN, Terhorst C. 1986. Isolation of cDNA clones encoding the 20K non-glycosylated polypeptide chain of the human T-cell receptor/T3 *Nature* 321:431
14. Chien Y-h, Iwashima M, Kaplan KB, Elliot JF, Davis MM. 1987. A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature* 327:677
15. Pardoll DM, Fowlkes BJ, Bluestone JA, Kruisbeek A, Maloy WL, Coligan JE, Schwartz RH. 1987. Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development *Nature* 326:79
16. Raulat DH, Garman RD, Saito H, Tonegawa S. 1985. Developmental regulation of T-cell receptor gene expression. *Nature* 314:103
17. Samelson RE, Lindsten T, Fowlkes BJ, van den Elsen P, Terhorst C, Davis MM, Germain RN, Schwartz RH. 1985. Expression of genes of the T-cell antigen receptor complex in precursor thymocytes. *Nature* 315:765
18. Snodgrass HR, Dembic Z, Steinmetz M, von Boehmer H. 1985. Expression of T-cell antigen receptor genes during fetal development in the thymus. *Nature* 315:232

19. Akira S, Okasaki K, Sakano H. 1987. Two pair of recombination signals are sufficient to cause immunoglobulin V-(D)-J joining. *Science*. 238:1134
20. Yancopoulos GD, Blackwell TK, Suh H, Hood L, Alt FW. 1986. Introduced T cell receptor variable region gene segments recombine in Pre-B cells: Evidence that B and T cells use a common recombinase. *Cell* 44:251
21. Fujimoto S, Yamagishi H. 1987. Isolation of an excision product of T cell receptor α chain gene rearrangements. *Nature* 327:242
22. Okazaki K, Davis DD, Sakano H. 1987. T cell receptor β gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: Direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining. *Cell* 49:477
23. Lai E, Barth R, Hood L. 1987. Genomic organization of the mouse T cell receptor β -chain gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 84:3846
24. Lee NE, Davis MM. 1988. T cell receptor β -chain genes in BW5147 and other AKR tumors. *J.Immunol.* 140:1665
25. Malissen M, Maloy C, Blanc D, Trucy J, Devaux C, Schmitt-Verhulst A-M, Fitch F, Hood L, Malissen B. 1986. Direct evidence for chromosomal inversion during T-cell receptor β -gene rearrangements. *Nature* 319:28
26. Iwashima M, Green A, Davis MM, Chien Y. 1988. Variable region (V_β) gene segment most frequently utilized in adult thymocytes is 3' of the constant (C_β) region. *Proc.Natl. Acad.Sci USA* 85:8161
27. Lindsten T, Lee NE, Davis MM. 1987. Organization of the T-cell antigen-receptor β -chain locus in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 48:7639
28. Chou HS, Nelson CA, Godambe SA, Chaplin DD, Loh DY. 1987. Germline organization of the murine T cell receptor β -chain genes. *Science* 238:545
29. Kronenberg M, Siu G, Hood LE, Shastri NA. 1986. The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and antigen recognition. *Ann.Rev.Immunol.* 4:529
30. Behlke MA, Spinella DG, Chou HS, Sha W, Hartl D, Loh DY. 1985. T-cell receptor β -chain expression: dependence on relatively few variable region genes. *Science* 229:566
31. Behlke MA, Chou HS, Huppi K, Loh DY. 1986. Murine T-cell receptor mutants with deletions of β -chain variable region genes. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 83:767
32. Kotzin BL, Barr VL, Palmer E. 1985. A large deletion within the T cell receptor beta-chain gene complex in New Zealand White mice. *Science* 229:167
33. Noonan DJ, Kofler R, Singer PA, Cardenas G, Dixon FJ, Theofilopolus AN. 1986. Delineation of a defect in T cell receptor β genes of NZW mice predisposed to autoimmunity. *J.Exp.Med.* 163:644
34. Hayday AC, Saito H, Gillies SD, Kranz DM, Tanigawa G, Eisen HN, Tonegawa S. 1985. Structure, organization, and somatic rearrangement of T cell gamma genes. *Cell* 40:259
35. Iwamoto A, Rupp F, Ohashi PS, Walker CL, Pircher H, Joho R, Hengartner H, Mak TW. T cell-specific gamma genes in C57BL/10 mice. 1986. *J.Exp.Med.* 163:1203.
36. Garman RD, Doherty PJ, Raulet DH. 1986. Diversity, rearrangements, and expression of murine T cell gamma genes. *Cell* 45:733

37. Heilig JS, Tonegawa S. 1987. T-cell γ gene is allelically but not isotypically excluded and is not required in known functional T-cell subsets. *Proc.Natl.Acad.Sci USA*84:8070
38. Elliott JR, Rock EP, Patten PA, Davis MM, Chien Y. 1988. The adult T-cell receptor δ -chain in diverse and distinct from that of fetal thymocytes. *Nature* 331:627
39. Lindsten T, Fowlkes BJ, Samelson LE, Davis MM, Chien Y. 1987. Transient rearrangements of the T cell antigen receptor α locus in early thymocytes. *J.Exp.Med.* 166:761.
40. Chien Y, Iwashima M, Wettstein DA, Kaplan KB, Elliot JF, Bon W, Davis MM. 1987. T cell receptor delta gene rearrangements in early thymocytes. *Nature* 330:722.
41. Hood L, Steinmetz M, Malissen B. 1983. Genes of the major histocompatibility complex of the mouse. *Ann. Rev. Immunol.* 1:569
42. Klein J. 1979. The major histocompatibility complex of the mouse. *Science* 203:516
43. Klein J, Figueroa F, Nagy ZA. 1983. Genetics of the major histocompatibility complex: the final act. *Ann. Rev. Immunol.* 1:119
44. Benacerraf B. 1980. Genetic control of the specificity of T lymphocytes and their regulatory products. *Prog. in Immunol. IV Fourth International Congress of Immunology.* M.Fougereau, J.Dausset (eds) p 419
45. Klein J, The major histocompatibility complex p.161 en *Immunology*, Blackwell Scientific Publications, Inc. 1990
46. Marrack P, Kappler J. 1990. The Staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248:705.
47. Janeway CA, Lerner EA, Jason JM, Jones B. T lymphocytes responding to Mls-locus antigens are Lyt 1 +2- and I-A restricted. 1980. *Immunogenetics* 10:481
48. Shevach EM, Rosental AS. 1973. The function of the macrophage in the regulation of the genetic control of the murine response. *J.Exp.Med.* 145:726
49. Zinkernagel RM, Doherty PC. 1975. H-2 compatibility requirement for T-cell mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J.Exp.Med.* 141:1427
50. Festenstein H. 1974. Pertinent features of M locus determinants including revised nomenclature and strain distribution. *Transplantation* 18:555.
51. Abe R, Hodes RJ. 1989. T-cell recognition of minor lymphocyte stimulating (mls) gene products. *Annu Rev Immunol* 7:683
52. Frankel WN, Rudy C, Coffin JM, Huber BT. 1991. Linkage of Mls genes to endogenous mammary tumor viruses of inbred mice. *Nature.* 349:526
53. Choy Y, Kappler JW, Marrack P. 1991. A superantigen encoded in the open reading frame of the 3' long terminal repeat of mouse mammary tumor virus. *Nature.* 350:203
54. Pullen AM, Choy Y, Kushnir E, Kappler J, Marrack P. 1992. The open reading frames in the 3' long terminal repeats of several mouse mammary tumor virus integrants encode V β 3-specific superantigens. *J.Exp.Med.* 175:41
55. Paliard X, West SG, Lafferty JA, Clements JR, Kappler JW, Marrack P, Kotzin BL. 1991. Evidence for the Effects of a Superantigen in Rheumatoid Arthritis. *Science* 253:325

56. Tomai M, Kotb M, Majumdar G, Beachey. 1990. Superantigenicity of Streptococcal M protein. *J Exp Med* 172:359
57. Cole BC, Karchner DR, Wells DJ. 1990. 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* 144:425
58. Iandolo JJ. 1989. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* 43:375
59. Marrack P, Kushnir E, Kappler J. 1991. A Maternally Inherited Superantigen Encoded by a Mammary Tumor Virus. *Nature* 349:524
60. 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-1^a (Mtv-7) *J.Exp.Med.* 175:1623
61. Woodland DL, Happ MP, Golob KJ, Palmer E. 1991. An Endogenous Retrovirus Mediating Deletion of Alpha Beta T Cells? *Nature* 349:529
62. Dyson PJ, Knight AM, Fairchild S, Simpson E, Tomonari K. 1991. Genes encoding ligands for deletion of V β 11 T cells cosegregate with mammary tumor virus genomes. *Nature.* 349:531.
63. Acha-Orbea H, Shakhov AN, Scarpellino I, Kolb E, Muller V, Vessas Shaw A, Fuchs R, Blochlinger K, Rollini P, Billote J. 1991. Clonal Deletion of V β 14-bearing T Cells in Mice Transgenic for Mammary Tumor Virus. *Nature* 350:207
64. Papiernik M, Pontoux C, Gisselbrecht S. 1992. Acquired Mls-1^a-like clonal deletion in Mls-1^b mice *J.Exp.Med.* 175:453
65. Hugin AW, Vacchio MS, Morse HC. 1991. A Virus-encoded Superantigen in a Retrovirus-induced Immunodeficiency Syndrome of Mice. *Science* 252:424
66. Imberti L, Sottini A, Bettinardi A, Puoti M, Primi D. 1991. Selective depletion in HIV infection of T cells that bear specific T cell receptor V β sequences. *Science* 254:862
67. Chatila T, Geha RS. 1992. Superantigens. *Current Opinion in Immunology* 4:74
68. 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. 1992. *Nature* 358:507
69. Janeway CA Jr, Katz ME. 1985. The immunobiology of the T cell response to mls-locus-disparate stimulator cells. I. Unidirectionality, new strain combinations, and the role of Ia antigens. *J.Immunol.* 134:2057
70. Webb SR, Sprent J. 1989. T-cell responses and tolerance to Mls-1^a determinants. *Immunol.Rev* 107:141
71. Anderson GD, Banerjee S, David CS. 1989. MHC class II A_u and E_u molecules determine the clonal deletion of V β 6 cells. *J. Immunol.* 143:3757
72. MacDonald HR, Lees RL, Chvatchko Y. 1990. CD8+ T cells respond clonally to Mls-1^a-encoded determinants. *J.Exp.Med* 171:1381
73. Larsson-Sciard EL, Spetz-Hagberg AL, Casrouge A, Kourlisky. 1990. Analysis of T cell receptor V β gene usage in primary mixed lymphocyte reactions: evidence for directive usage by different antigen-presenting cells and mls-like determinants on T cell blasts. *Eur.J.Immunol.* 20:1223

74. Winslow GM, Scherer MT, Kappler JW, Marrack P. 1992. Detection and biochemical characterization of the Mouse Mammary Tumor Virus 7 Superantigen (Mls-1*), Cell 71:719
75. Mecheri S, Edidin M, Dannecker G, Mittler RS, Hoffmann MK. 1990. Immunogenic Ia-binding peptides immobilize the Ia molecule and facilitate its aggregation on the B cell membrane. Control by the Mls-1 gene. J.Immunol. 144:1361.
76. Mecheri S, Dannecker G, Dennig D, Hoffmann MK. 1990. Immunogenic peptides require an undisturbed phospholipid cell membrane environment and must be amphipatic to immobilize Ia on B cells. J.Immunol. 144:1369
77. Molina IJ, Cannon NA, Hyman R, Huber BT. 1989. Macrophages and T cells do not express Mls* determinants. J.Immunol. 143:39
78. Webb SR, Sprent J. 1990. Induction of neonatal tolerance to Mls* antigens by CD8+ T cells. Science 248:1643
79. Fischer H, Dohlste M, Lindvall M, Sjorgren H-O, Carlsson R. 1989. Binding of staphylococcal enterotoxin A to HLA-DR on B cell lines. J.Immunol. 142:3151
80. Fraser JD. 1989. High affinity binding of staphylococcal enterotoxins A and B to HLA-DR. Nature 339:221
81. Scholl PR, Diez A, Mourad W, Parsonett J, Geha RS, Chatila T. 1989. Toxic shock syndrome toxin 1 binds to major histocompatibility complex class II molecules. Proc.Natl.Acad. Sci USA 86:4210
82. Herrmann T, Accolla RS, MacDonald HR. 1989. Different staphylococcal enterotoxins bind preferentially to distinct major histocompatibility complex class II isotypes. Eur.J.Immunol. 19:2171
83. Mollick JA, Cook RG, Rich RR. 1989. Class II MHC molecules are specific receptors for staphylococcus enterotoxin A. Science 244:817
84. Bekoff MC, Cole BC, Grey HM. 1987. Studies on the mechanism of stimulation of T cells by the mycoplasma arthritidis-derived mitogen. J.Immunol. 139:34
85. Lee JM, Watts TH. 1990. Binding of staphylococcal enterotoxin A to purified murine MHC class II molecules in supported lipid bilayers. J.Immunol. 144:3360
86. Dellabona P, Peccoud J, Kappler J, Marrack P, Benoist C, Mathis D. 1990. Superantigens interact with MHC class II molecules outside the binding groove. Cell 62:1115
87. Sholl PR, Diez A, Geha RS. 1989. Staphylococcal Enterotoxin B and Toxic Shock Syndrome Toxin-1 Bind to distinct Sites on HLA-DR and HLA-DQ Molecules. J.Immunol. 143:2583
88. Karp DR, Teletski CL, Scholl P, Geha R, Long EO. 1990. The Alpha 1 Domain of the HLA-DR Molecule is Essential for High-affinity Binding of the Toxic Shock Syndrome Toxin-1. Nature 346:474
89. Pontzer CH, Russell JK, Johnson HM. 1991. Structural Basis for Differential Binding of Staphylococcal Enterotoxin A and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 to Class II Major Histocompatibility Molecules. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 88:125
90. Karp DR, Teletski CL, Long EO. 1991. Identification of HLA-DR Beta Chain Residues Responsible for Binding of Staphylococcal Toxins. FASEB J 5:727
91. Cole BC, Daynes RA, Ward JR. 1981. Stimulation of mice lymphocytes by a mitogen derived from

- mycoplasma arthritidis. I. Transformation is associated with an H-2 linked gene that maps to the I-E/I-C subregion. *J.Immunol.* 127:1931
92. Fleischer B, Schrezenmeier H. 1988. T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement to major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells. *J.Exp.Med.* 167:1697
93. Yagi J, Baron J, Buxer S, Janeway CA Jr. 1990. Bacterial protein that mediate the association of a defined subset of T cell receptor: CD4 complexes with class II MHC. *J.Immunol.* 144:892
94. Kotb M, Majumdar G, Tomai M, Beachy EH. 1990. Accessory cell-independent stimulation of human T cells by streptococcal M protein superantigen. *J.Immunol.* 145:1332
95. Herrmann T, Romero P, Sartoris S, Paiola F, Accolla RS, Maryanski JL, MacDonald HR. 1991. Staphylococcal enterotoxin-dependent lysis of MHC class II negative target cells by cytolytic T lymphocytes. *J.Immunol.* 146:2504
96. Dohsten M, Hedlund G, Segren S, Lando PA, Herrmann T, Kelly AP, Kalland T. 1991. Human MHC class II-colon carcinoma cells present staphylococcal superantigens to cytotoxic T lymphocytes: evidence for a novel enterotoxin receptor. *Eur.J.Immunol.* 21:1229
97. Kaye J, Hedrick SM. 1988. Analysis of specificity for antigen, MIs, and allogeneic MHC by transfer of T-cell receptor α - and β -chain genes. *Nature* 336:580
98. Kats ME, Janeway CA Jr. 1985. The immunobiology of T cell responses to mls-locus-disparate stimulator cells. II. Effects of mls-locus-disparate stimulator cells on cloned, protein antigen-specific, Ia restricted T cell lines. *J.Immunol.* 134:2064
99. Matthes M, Schrezenmeier H, Homfeld J, Fleischer S, Malissen B, Kirchner H, Fleischer B. 1988. Clonal analysis of human T cell activation by the mycoplasma arthritidis mitogen (mas). *Eur.J.Immunol.* 18:1733
100. Sekaly RP, Croteau G, Bowman M, Scholl P, Burakoff S, Geha RS. 1991. The CD4 Molecule is not Always Required for the T Cell Response to Bacterial Enterotoxins. *J.Exp.Med.* 173:367
101. Marrack P, Enders R, Shimonkevitz R, Zlotnik A, Dialynas D, Fitch F, Kappler J. 1983. The Major Histocompatibility Complex-restricted Antigen Receptor on T cells. II. Role of the L3T4 Product. *J.Exp.Med.* 158:1077
102. Herrmann T, Maryanski JL, Romero P, Fleischer B, MacDonalds HR. 1990. Activation of MHC class I-restricted CD8+ CTL by microbial T cell mitogens. Dependence upon MHC class II expression of the target cells and V β usage of the responder T cells. *J.Immunol.* 144:11
103. MacDonald HR, Hengarter H, Pedrazzini T. 1988. Intrathymic deletion of self reactive cells prevented by anti-CD4 antibody treatment. *Nature* 335:174
104. Braciale VL, Braciale TJ. 1981. MIs locus recognition by a cloned line of H-2 restricted influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J.Immunol.* 127:859
105. Webb SR, Sprent J. 1990. Response of mature unprimed CD8+ T cells to MIs^a determinants. *J.Exp.Med.* 171:953
106. Gao EK, Kanagawa O, Sprent J. 1989. Capacity of unprimed CD4+ CD8+ T cells expressing V β 11 receptors to respond to I-E alloantigens in vivo. *J.Exp.Med.* 170:1947
107. Chvatchko Y, MacDonald HR. 1991. CD8+ T Cell Responses to MIs-1^a Determinants Involves Major

Histocompatibility Complex Class II Molecules. *J.Exp.Med.* 173:779

108. Gascoigne NR, Ames KT. 1991. Direct Binding of Secreted T cell Receptor Beta Chain to Superantigen Associated with Class II Major Histocompatibility Complex Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:613

109. Happ MP, Woodland DL, Palmer E. 1989. A third T cell receptor V β gene encodes reactivity to Mls-1^a gene products. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 86:6293

110. Choy YW, Herman A, DiGiusto D, Wade T, Marrack P, Kappler J. 1990. Residues of the Variable Region of the T-cell Receptor Beta-chain that Interact with *S. aureus* Toxin Superantigens. *Nature* 346:471

111. Pullen AM, Wade T, Marrack P, Kappler JW. 1990. Identification of the Region of T Cell Receptor Beta Chain that Interacts with Self-superantigen Mls-1^a. *Cell* 61:1365

112. Cazenave PA, Marche PN, Jouvin ME, Voegtle D, Bonhomme F, Bandeira A, Coutinho A. 1990. V β 17 Gene Polymorphism in Wild-derived Mouse Strains: Two Amino Acid Substitutions in the V β 17 Region Greatly Alter T Cell Receptor Specificity. *Cell* 63:717

113. Pullen AM, Bill J, Kubo RT, Marrack P, Kappler JW. 1991. Analysis of the Interaction Site for Self Superantigen Mls-1^a on T Cell Receptor V β . *J. Exp. Med.* 173:13

114. Kappler J, Kotzin B, Herron L, Gelfand EW, Bigler RD, Boylston A, Carrel S, Posnett DN, Choy Y, Marrack P. 1989. V β -specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 244:811

115. Pullen AM, Marrack P, Kappler JW. 1988. The T cell repertoire is heavily influenced by tolerance to polymorphic self-antigens. *Nature* 335:796

116. Kappler JW, Pullen A, Callahan J, Choy Y, Herman A, White J, Wakeland E, Marrack P. 1989. Consequence of self and foreign superantigen interaction with specific V β elements of the murine TCR $\alpha\beta$. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 54:401

117. Marrack P, Blackman M, Kushnir E, Kappler J. 1990. The toxicity of staphylococcal enterotoxin B in mice is mediated by T cells. *J.Exp.Med.* 171:455

118. Alber G, Hammer DK, Fleischer B. 1990. Relationship between enterotoxic-and T lymphocyte-stimulating activity of staphylococcal enterotoxin B. *J.Immunol.* 144:4501

119. Golovkina TV, Chervonsky A, Dudley JP, Ross SR. 1992 Transgenic Mouse Mammary Tumor Virus Superantigen Expression Prevents Viral Infection. *Cell* 69:637

120. Acha-Orbea H, Steinman L, McDevitt HO. 1989. T cell receptors in murine autoimmune diseases. *Annu.Rev.Immunol.* 7:371

121. Kumar V, Kono DH, Urban JL, Hood L. 1989. The T cell receptor repertoire and autoimmune diseases. *Annu.Rev.Immunol.* 7:657

122. Tofte RW, Williams DN. 1982. Clinical and Laboratory Manifestations of Toxic Shock Syndrome. *Ann Intern Med* 96:843

123. Cannon GW, Cole BC, Ward JR, Smith JL, Eichwald EJ. 1988. Arthritogenic Effects of *Mycoplasma Arthritis* T Cell Mitogen in Rats. *J.Rheumatol* 15:735

124. Fowlkes BJ, Pardoll DM. 1989. Molecular and cellular events of T cell development. *Adv. Immunol.* 44:207

125. Roehm N, Herron L, Cambier J, DiGiusto D, Haskins K, Kappler J, Murrack P. 1984. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells: distribution on thymus and peripheral cells. *Cell* 38:577
126. Scollay R, Shortman K. 1984. The surface phenotype of mouse T lymphocytes. *Immunol. Today* 5:3
127. RM Zinkernagel and PC Doherty, 1974. Immunological surveillance against altered self components by sensitized T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 251:547
128. MJ Bevan and PJ Fink, 1978. *Immunol. Rev.* 42:3
129. RM Zinkernagel, Callahan GN, Althage A, Cooper S, Klein PA, Klein J. On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition? 1978. *J. Exp. Med.* 147:882
130. Lo D and Sprent J. 1986. Identity of cells that imprint H-2-restricted T-cell specificity in the thymus. *Nature.* 319:672
131. C. Benoist and D. Mathis. 1989. Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur? *Cell* 58:1027
132. J. Bill and E. Palmer. 1989. Positive selection of CD4+ T cells mediated by MHC class II-bearing stromal cell in the thymic cortex. *Nature* 341:649
133. M. Mc Duffie, W. Born, P. Murrack, J. Kappler. 1986. The role of the T cell receptor in thymocyte maturation: Effects in vivo of anti-receptor antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 83:8728
134. W. Born, Mc Duffie M, Roehm N, Kushnir E, White J, Thorpe D, Stefano J, Kappler J, Murrack P. 1987. Expression and role of the T cell receptor in early thymocyte differentiation in vitro. *J. Immunol.* 138:999
135. Marusic-Galesic SD, Stephany D, Longo DL, Kruisbeek AM. 1988. Development of CD4⁺CD8⁺ cytotoxic T cells requires interactions with class I MHC determinants. *Nature*, 333:180
136. P. Murrack, E. Kushnir, W. Born, M. Mc Duffie, J. Kappler, 1988. The development of helper T cell precursors in mouse thymus. *J. Immunol.* 140:2508
137. Von Boehmer H et al. 1989. *Progress in Immunol.* 7:297
138. Berg LJ, Pullen AM, Fazecas DS, Groth B, Mathis D, Benoist C, Davis MM. Antigen/MHC-specific T cells are preferentially exported from the thymus in the presence of their MHC ligand. 1989. *Cell* 58:1035
139. Sprent J, Lo D, Gao E-K, Ron Y. 1988. T cell selection in the thymus. *Immunol. Rev.* 101:173
140. von Boehmer H, Teh H-S, Kisielow P. 1989. The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful. *Immunol. Today* 10:57
141. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. 1992. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 10:267
142. JW. Kappler, E. Kushnir, P. Murrack. 1989. Analysis of Vβ17a expression in new mouse strains bearing the Vβ⁺ haplotype. *J. Exp. Med.* 169:1533
143. P. Murrack et al. 1990. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 54:105
144. J.W. Kappler, Wade T, White J, Kushnir E, Blackman M, Bill J, Roehm N, Murrack P. 1987. A T cell receptor Vβ segment that imparts reactivity to a class II major histocompatibility complex product. *Cell* 49:263

145. J.W.Kappler, N. Roehm, P. Marrack. 1987. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49:273
146. J.W.Kappler, U. Staerz, J. White, P. Marrack. 1988. Self-tolerance eliminates T cell specific for Mls-modified products of the major histocompatibility complex. *Nature* 332:35
147. H.R. MacDonald, Schneider R, RK Lees, RC Howe, H Acha-Orbea, H Festenstein, Rm Zinkernagel, H Hengartner. 1988. T-cell receptor V β use predicts reactivity and tolerance to Mls^a-encoded antigens. 1988. *Nature*. 332:40
148. J.Bill, V.Appel, E. Palmer. 1988. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 85:94
149. J.Bill, O.Kenagawa, DL. Woodland, E. Palmer. 1989. The MHC molecule I-E is necessary but not sufficient for the clonal deletion of V β 11-bearing T cells. *J.Exp. Med.* 169:1405
150. Blackman M, Kappler J, Marrack P. 1990. The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. *Science* 248:1335
151. Sprent J, Webb SR. 1987. Function and specificity of T cell subsets in the mouse. *Adv. Immunol.* 41:39
152. Sprent J. T lymphocytes and the thymus. en: *Fundamental Immunology*. William E. Paul (ed). pp.75, Raven Press New York
153. Webb S, Morris C, Sprent J. 1990. Extrathymic tolerance of mature T cells:clonal elimination as a consequence of immunity *Cell* 63:1249
154. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J.Pathol.* 142:67
155. McConey DJ, Orrenius S, Jondal M. 1990. Cellular signaling in programmed cell death (apoptosis). *Immunol. Today* 11:120
156. P. Kisielow, H Bluthmann, UD Staerz, M Steinmetz, H von Boehmer. 1988. Tolerance in T-cell receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4⁺8⁺ thymocytes. *Nature* 333:742
157. Fowlkes BJ, RH Schwartz, DM Pardoll. 1988. Deletion of self-reactive thymocytes occurs at a CD4⁺8⁺ precursor stage. *Nature* 334:620
158. HR MacDonald, H Hengartner, T Pedrazzini. 1988. Intrathymic deletion of self-reactive cells prevented by neonatal anti-CD4 antibody treatment. *Nature* 335:174
159. MacDonald HR, Lees RK. 1990. Programmed death of autoreactive thymocytes. *Nature*. 343:642
160. TH. Finkel, Cambier JC, Kubo RT, Born W, Marrack P., Kappler JW. 1989 The thymus has two functionally distinct populations on immature $\alpha\beta$ + T cells: one population is deleted by ligation of $\alpha\beta$ TCR. *Cell* 58:1047
161. Jenkinson EJ, Kingston R, Owen JTT. 1990. Newly generated thymocytes are not refractory to deletion when the α/β component of the T cell receptor is engaged by the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *Eur. J. Immunol.* 20:2517
162. L Berg, B Fazekas de ST. Groth, A Pullen, M Davis. 1989. Phenotypic differences between $\alpha\beta$ versus β T cell receptor transgenic mice undergoing negative selection. *Nature* 340:559
163. H Pircher, Mak TW, Lang R, Ballhausen W, Ruedi E, Hentgartner H, Zinkernagel RM, Burk K. 1989.

T cell tolerance to Mls^a encoded antigens in T cell receptor V β 8.1 chain transgenic mice. *EMBO J* 8:719

164. H Pircher, K Burki, R Lang, H Hengartner, R Zinkernagel. 1989. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 342:559

165. Sprent J, Webb S. 1987. Function and specificity of T cell subsets in the mouse. *Adv.Immunol.* 41:39

166. Marrack P, Kappler J. 1987. The T Cell Receptor. *Science* 238:1073

167. Murphy DB, Lo D, Rath S, Brinster RL, Flavell RA, Slanetz A, Janeway Jr CA. 1989. A novel MHC class II epitope expressed in thymic medulla but not cortex. *Nature* 338:765

168. Marrack P, McCrmack J, Kappler J. 1989. Presentation of antigen, foreign major histocompatibility complex proteins and self by thymus cortical epithelium. *Nature* 338:503

169. Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JT. 1989. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 337:1

170. Ramsdell F, Lantz T, Fowlkes BJ. 1989. A non deletional mechanism of thymic self tolerance. *Science* 246:1038.

171. Roberts JL, Sharrow SO, Singer A. 1990. Clonal deletion clonal anergy in yhe thymus induced by cellular elements with different radiation sensitivities. *J.Exp.Med.* 171:935.

172. Speiser DE, Chvatchko V, Zinkernagel RM, MacDonald HR. 1990. Distinct fates of self-specific T cells developing in irradiation bone marrow chimeras: clonal deletion, clonal anergy, or in vitro responsiveness to self-Mls-1^a controlled by hematopoietic cells in the thymus. *J.Exp.Med.* 172:1305.

173. Hammerling GJ, Schonrich G, Momburg F, Auphan N, Malissen B, Schmitt-Verhulst AM, Arnold B. 1991. Non-deletional mechanisms of peripheral and central tolerance: studies with transgenic mice with tissue-specific expression of a foreign MHC class I antigen. *Immunological Reviews* 122:47

174. Matzinger P, Gueder S. 1989. Does T cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature* 338:74

175. Morahan G, Allison J, Miller JFAP. 1989. Tolerance of class I histocompatibility antigens expressed extrathymically. *Nature* 339:622

176. Blackman MA, Gerhard-Burgert H, Woodlan DL. 1990. A role for clonal inactivation in T cell tolerance to Mls-1^a. *Nature* 345:540

177. Burkly LC, Lo D, Kanagawa O, Brinster RL, Flavell RA. 1989. T-cell tolerance by clonal anergy in transgenic mice with nonlymphoid expression of MHC class II I-E. *Nature* 342:564

178. Lamb JR, Skidmore Bj, Green N, Chiller JM, Feldmann M. 1983. Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocytes clones with synthetic peptides of Influenza Hemagglutinin. *J.Exp.Med* 157:1434

179. Jones LA, Chin LT, Merriam GR, Nelson LM, Kruisbeek AM. 1990. Failure of clonal deletion in neonatally thymectomized mice: tolerance is preserved through clonal anergy. *J.Exp.Med.* 172:1277

180. Chiller JM, Habicht GS, Weigle WO. 1971. Kinetic Differences in Unresponsiveness of Thymus and Bone Marrow Cells. *Science* 171:813

181. Miller SD, Wetzig RP, Claman HN. 1979. The induction of cell-mediated immunity and tolerance with protein antigens coupled to syngeneic lymphoid cells. *J.Exp.Med.* 149:758

182. Dallman MJ, Shiho O, Page TH, Wood KJ, Morris PJ. 1991. Peripheral tolerance to alloantigens results from altered regulation of the interleukin 2 pathway. *J.Exp.Med.* 173:79
183. Hori S, Sato S, Kitagawa S, Azuma T, Kokudo S, Hamaoka T, Fujiwara H. 1989 Tolerance induction of allo-class II H-2 antigen-reactive L3T4+ helper T cells and prolonged survival of the corresponding class II H-2-disparate skin graft. *J.Immunol.* 143:1447
184. Kawabe Y, Ochi A. 1991. Programmed cell death and extrathymic reduction of V β 8+ CD4+ T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature* 349:245
185. Lo D, Freedman J, Hesse S, Brinster R Sherman L. 1991. Peripheral tolerance in transgenic mice: tolerance to class II MHC and non MHC transgene antigens *Immunol.Rev.* 122:87
186. Pircher H, Hoffmann Rohrer U, Moskophidis D, Zinkernagel RM, Hengartner H. 1991. Lower receptor avidity required for thymic clonal deletion than for effector T-cell function. *Nature* 351:482
187. Yagi J, Janeway CA. Jr. 1990. Ligand thresholds at different stages of T cell development. *Int.Immunol.* 2:83
188. Nieto MA, González A, López Rivas A, Díaz Espada S, Gambón F. 1990. IL-2 protects against anti-CD3 induced cell death in human medullary thymocytes. *J.Immunol.* 145:1364
189. Newell MK, Haughn LJ, Maroun CR, Julius MH. 1990. Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature* 347:286
190. Liu Y, Janeway CAJ. 1990. Interferon γ plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance. *J.Exp.Med.* 172:1735
191. Sambhara SR, Miller RG. 1991. Programmed cell death of T cells signaled by the T cell receptor and the α 3 domain of class I MHC. *Science* 252:1424
192. Von Boehmer H. 1990. Developmental biology of T cell receptor transgenic mice. *Ann.Rev.Immunol.* 8:531
193. Jones LA, Chin LT, Longo DL, Kruisbeeck AM. 1990. Peripheral clonal elimination of functional T cells. *Science* 250:1726
194. Moss DJ, Burrows SR, Baxter GD, Lavin MF. 1991. T cell-T cell killing is induced by specific epitopes: evidence for an apoptotic mechanism. *J.Exp.Med.* 173:681
195. Sambhara SR, Miller RG. 1991. Programmed cell death of T cells signaled by the T cell receptor and the α 3 domain of class I MHC. *Science* 252:1424.
196. Gershon RK, Kondo K. 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21:903
197. Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liehhaber S. 1972. Suppressor T cells. *J.Immunol.* 108:586
198. Gershon RK. 1975. A disquisition on suppressor T cells. *Transplant Rev.* 26:170
199. Green DR, Flood PM, Gershon RK. 1983. Immunoregulatory T cell pathways. *Ann.Rev.Immunol.* 1:439
200. Dorf ME, Benacerraf B. 1984. Suppressor cells and immunoregulation. *Ann.Rev.Immunol.* 2:127
201. Asherson GL, Colizzi V, Zembala M. 1986. An overview of T suppressor cell circuits. *Ann.Rev.Immunol.* 4:37

202. Moller G. 1988. Do suppressor T cells exist? *Scand.J.Immunol.* 27:247
203. Bloom BR, Salgame P, Diamond B. 1992. Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol.Today* 13:131
204. Bloom BR, Modlin RL, Salgame P. 1992. Stigma variations: observations on suppressor T cells and leprosy. *Ann.Rev.Immunol.* 10:453
205. Dorf ME, Kuchroo VK, Collins M. 1992. Suppressor T cells: some answers but more questions. *Immunol.Today* 13:241
206. Hu F-Y, Asano Y, Sano K, Inoue T, Furutani-Seiki M, Tada T. 1992. Establishment of stable CD8+ suppressor T cell clones and the analysis of their suppressive function. *J.Immunol.* 152:123
207. Ding L, Shevach EM. 1992. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J.Immunol.* 148:3133
208. Rock KL, Rothstein L, Fleischacker C, Gamble S. 1992. Inhibition of class I and class II MHC-restricted antigen presentation by cytotoxic T lymphocytes specific for an exogenous antigen. *J.Immunol.* 148:3028
209. Shinohara N, Huang Y-Y, Muroyama A. 1991. A specific suppression of antibody responses by soluble protein specific, class II-restricted cytolytic T lymphocyte clones. *Eur.J.Immunol.* 21:23
210. Street NE, Mosmann TR. 1991. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns *FASEB J* 5:171
211. Miller A, Lider O, Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL. 1992. Suppressor T cells Generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vivo and in vitro immune responses by the release of transforming growth factor β after antigen-specific triggering. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 89:421
212. Tada T, Inoue T, Asano Y. 1992. Suppression of immune responses by cloned T cells and their products. *Bebring Inst. Mitt.* 91:78
213. Jingwu Z, Schreurs M, Medaer R, Raus JCM. 1992. Regulation of myelin basic protein-specific helper T cells in multiple sclerosis: generation of suppressor T cell lines. *Cell.Immunol.* 139:1
214. Sercarz E, Krzych V. 1991. The distinctive specificity of antigen specific suppressor T cells. *Immunol. Today* 12:111
215. Webb DR. 1991. Mechanisms of peripheral tolerance: a work-shop on antigen-specific suppression. *Cell Immunol.* 136:251
216. Green DR, Bissonnette R, Zheng H, Onda T, Echeverri F, Mogil RJ, Steel JK, Voralia M, Fotadar A. 1991. Immuno-regulatory activity of T cell receptor α chain demonstrated by retroviral gene transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 88:8475
217. Dorf ME, Benacerraf B. 1985. I-J as a restriction element in the suppressor T cell system. *Immunol.Rev.* 83:23
218. Yamaguchi K, Mori A, Ohno H, Tagaya Y, Ishizaka K. 1992. Requirement of certain epitope specificities of glycosylation inhibiting factor for the suppression of in vivo IgE and IgG antibody responses. *Int.Immunol.* 4:337
219. Fowlkes BJ, Sshwartz RH, Pardoll DM. 1988. Deletion of self reactive-reactive thymocytes occurs at a CD4+CD8+ precursor stage. *Nature* 334:620

220. Bretscher P y Cohn M. 1970. A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 169:1042
221. Jenkins MK y Schwartz RH. 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 165:302
222. Weaver CT, Unanue ER. 1990. The costimulatory function of antigen-presenting cells. *Immunol. Today* 11:49
223. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Ann.Rev.Immunol.* 7:445
224. Jenkins MK, Tailor PS, Norton SD, Urdahl KB. 1991. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J.Immunol.* 147:2461
225. Yockochi T, Holley RD, Clark EA. 1982 B Lymphoblast antigen (BB-1) expressed on epstein-barr virus-activated B cell blasts, B lymphoblastoid cell lines, and Burkitt's lymphomas. *J.Immunol.* 128:823
226. van Seventer GA, Shimuzu Y, Horgan KJ, Shaw S. 1990. Tja LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J.Immunol.* 144:4579
227. Crabtree GR. 1989. Contingent Genetic Regulatory Events in T Lymphocyte Activation. *Science* 243:355
228. Jenkins MK, Mueller D, Schwartz RH. 1991. *Adv.Exp.Med.Biol.* 292:167
229. Beverly B, Kang SM, Lenardo MJ, Schwartz RH. 1992. Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation. *Int.Immunol.*, 4:661
230. Essery G, Feldmann M, Lamb JR. 1988. IL-2 can prevent and reverse antigen-induced unresponsiveness in cloned human T lymphocytes. *Immunology* 64:413
231. Schwartz RH. *Immunological tolerance en: Fundamental Immunology.* William E. Paul (ed). pp.75, Raven Press New York
232. DeSilva DR, Urdahl KB, Jenkins MK. 1991. Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation. *J.Immunol.* 147:3261
233. Lindsten J, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thomson CB. 1989. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 244:339
234. Freaser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A. 1991. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 251:313
235. Ramsdell F, Fowlkes BJ. 1990. Clonal deletion versus clonal anergy: the role of the thymus in inducing self tolerance. *Science* 248:1342.
236. Lorenz RG, Allen PM. 1989. Thymic cortical epithelial cells lack full capacity for antigen presentation. *Nature* 340:557
237. Anderson GD, Banerjee S, David CS. 1989. MHC class II A α and E α molecules determine the clonal deletion of V β 6+ T cells. Studies with recombinant and transgenic mice. *J.Immunol.* 143:3757
238. Jones LA, Kruisbeek AM. 1992. What is the mechanism of induction of intrathymic tolerance? *Research in Immunology* 143:291
- 239a. Nepomnaschy I, Deroche A, Torello S, Goldman A, Buggiano V, Pasqualini CD, Piazzon I. 1990.

- Popliteal lymph node enlargement induced in syngeneic hosts by T cells from foster nursed mice. *Cell.Immunol.* 128:175.
- 239b. Déroche A, Nepomnaschy I, Torello S, Goldman A, Piazzon I. 1993. Regulation of parental alloreactivity by reciprocal F1 hybrids. The role of lactation. *J.Reprod.Immunol.* 23:235
- 239c. Torello S. 1992. Influencias parentales en la respuesta inmune. Tesis de Doctorado.
240. Payne J, Huber BT, Cannon NA, Schneider R, Schihlam MW, Acha-Orbea H, MacDonald HR, Hengartner H. 1988. Two monoclonal rat antibodies with specificity for the β -chain variable region V β 6 of the murine T cell receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 85:7695
241. Haskins, K., C. Hannum, J. White, N. Roehm, R. Kubo, J. Kappler, and P. Marrack. 1984. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. VI. An antibody to a receptor allotype. *J. Exp. Med.* 160:452
242. Staerz, U.D., H. Rammensee, J. Bendetto, and M. Bevan. 1985. Characterization of a murine monoclonal antibody specific for an allotypic determinant on T cell antigen receptor. *J. Immunol.* 134:3994
243. Wilde, D.B., P. Marrack, J. Kappler, D.P. Dialynas, and F.W. Fitch. 1983. Evidence implicating L3T4 in class II MHC antigen reactivity; monoclonal antibody GK 1.5 (anti-L3T4a) blocks class II MHC antigen-specific proliferation, release of lymphokines, and binding by cloned murine helper T lymphocyte lines. *J. Immunol.* 131:2178
244. Dialynas, D.P., Z.S. Quan, K.A. Wall, A. Pierres, J. Quintans, M.R. Loken, M. Pierres, and F.W. Fitch. 1983. Characterization of the murine T cell surface molecule designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK 1.5: similarity of L3T4 to the human Leu3/T4 molecule. *J. Immunol.* 131:2445
245. Sarmiento, M., A.L. Glasebrook, and F.W. Fitch. 1980. IgG or IgM monoclonal antibodies reactive with different determinants in the molecular complex bearing Lyt-2 antigen block T cell-mediated cytotoxicity in the absence of complement. *J. Immunol.* 125:2665
246. Colcher, D., P. Horan Hand, Y. A. Teramoto, D. Wunderlich, and J. Schlom. 1981. Use of monoclonal antibodies to define the diversity of mammary tumor viral gene products in virion and mammary tumors of the genus *Mus*. *Cancer Res.* 41:1451
247. Tijssen, P. 1985. The immobilization of immunoreactants on solid phases. In *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg, editors. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 297-329
248. Ford WL, Simonsen MM 1970 A lymph node weight assay for the graft-vs-host activity of rat lymphoid cells. *Transplantation* 10:258
249. Tomonari K, Fairchild S. 1992. Positive and negative selection of Tcr β -V β 6+ T cells. *Immunogenetics* 36:230
250. Weiler IJ, Hickler W, Sprenger R. 1983. Demonstration that milk cells invade the suckling neonatal mouse. *Am.J.Reprod.Immunol.* 4:95
251. Janeway CA, Conrad PJ, Tite J, Jones B, Murphy DB. 1983 Efficiency of antigen presentation differs in mice differing at the Mls locus. *Nature* 306:80
252. Wagner H, Harris AW, Feldmann M. 1972 Cell-mediated immune responses in vitro. II. The role of the thymus and thymus derived lymphocytes. *Cell.Immunol.* 4:39
253. Ceredig R, Glasebrook, MacDonald HR. 1982. Phenotypic and functional properties of murine thymocytes

- I. Precursors of cytolytic T lymphocytes and interleukin 2-producing cells are all contained within a subpopulation of 'mature' thymocytes as analyzed by monoclonal antibodies and flow microfluorometry. *J.Exp.Med.* 155:358
254. Schneider R, Less RK, Pedrazzini T, Zinkernagel T, Hengartner RM, Mac Donald HR. 1989 Post-natal disappearance of self-reactive (V β 6+) cells from the thymus of Mls⁺ mice. Implications for T cell development and autoimmunity. *J.Exp.Med.* 169:2149
255. Pullen AM, Marrack P, Kappler J. 1989. Evidence that Mls-2 antigens which delete V β 3 T cells are controlled by multiple genes. *J.Immunol.* 142:3033
256. Herrmann T, MacDonald HR. 1991. T cell recognition of superantigens. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 174:21
257. Hodes RJ, Novick MB, Palmer LD, Knepper JE. 1993. Association of a V β 2-specific superantigen with a tumorigenic milk-borne mouse mammary tumor virus. *J.Immunol.* 150:1422
258. Hengartner H, Odermatt B, Schneider R, Scheyer M, Walle G, MacDonald HR, Zinkernagel RM. 1988. Deletion of self-reactive T cells before entry into the thymus medulla. *Nature* 336:388
259. Matsuzaki G, Yoshikai Y, Ogimoto M, Kishihara K, Nomoto K. 1990. Clonal deletion of self reactive T cells at the early stage of T cell development in thymus of radiation bone marrow chimeras. *J.Immunol.* 145:46
260. Scollay RG, Butcher EC, Weissman IL. 1980. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur.J.Immunol.* 10:210
261. Ignatowicz, L., J. Kappler, and P. Marrack. 1992. The effects of chronic infection with a superantigen-producing virus. *J. Exp. Med.* 175:917
262. Cato, A.C.B., R. Miksicek, G. Schütz, J. Arnemann, and M. Beato. 1986. The hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus mediates progesterone induction. *EMBO J.* 5:2237
263. Cato, A.C.B., D. Henderson, and H. Ponta. 1987. The hormone response element of the mouse mammary tumor virus DNA mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region. *EMBO J.* 6:363
264. Chalepakis, G., J. Arnemann, E. Slater, H.-J. Brüller, B. Gross, and M. Beato. 1988. Differential gene activation by glucocorticoids and progestins through the hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus. *Cell* 53:371
265. Kalff, M., B. Gross, and M. Beato. 1990. Progesterone receptor stimulates transcription of mouse mammary tumor virus in a cell-free system. *Nature* 344:260
266. Brüggemeier, U., M. Kalff, S. Franke, C. Scheidereitn, and M. Beato. 1991. Ubiquitous transcription factor OTF-1 mediates induction of the MMTV promoter through synergistic interaction with hormone receptors. *Cell* 64:565
267. Rudy CK, Kraus E, Palmer E, Huber BT. 1992. Mls-1-like superantigen in the MA/MyJ mouse is encoded by a new mammary provirus that is distinct from Mtv-7. *J.Exp.Med.* 175:1613
268. Zhang L, Miller RG. 1993. Prolonged survival of maternal skin grafts correlates with the presence of naturally transferred maternal T cells. *Transplantation.* In press
269. Muhlbock O. 1952. Studies on the transmission of the mouse mammary tumor agent by the male parent.

270. van Nie R, Verstraeten, Moes J de. 1977. Genetic transmission of mammary tumor virus by GR mice. *Int.J.Cancer* 19:383
271. van Nie R, Verstraeten. 1975. Studies of genetic transmission of mammary tumor virus by C3Hf mice. *Int.J.Cancer* 16:922
272. Traina VL, Taylor BA, Cohen JC. 1981. Genetic mapping of endogenous mammary tumor viruses: locus characterization, segregation, and chromosomal distribution. *J.Virol.* 40:735
273. Bentvelzen P, Brinkhof, Westenbrink F. 1980. Expression of endogenous mammary tumor virus in mice: its genetic control and relevance to spontaneous mammary carcinogenesis. In *Viruses in Naturally Occurring Cancers*. M. Essex, G. Todaro, and H. zur Hausen, editors. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. Vol. 7. Cold Spring Harbor Laboratory. 1095:1104
274. Nanda NK, Apple R, Sercarz E. 1991. Limitations in plasticity of the T-cell repertoire. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA.* 88:9503.
275. Rellahan BL, Jones LA, Kruiibeek AM, Fry AM, Matis LA. 1990. In vivo induction of anergy in peripheral V β 8+ T cells by staphylococcus enterotoxin B. *J. Exp. Med.* 172:1091
276. Rammsee HG, Kroschewski R, Frangoulis B. 1989. Clonal anergy induced in mature V β 6+ T lymphocytes on immunizing Mls-1^b mice with Mls-1^a expressing cells. *Nature.* 339:541
277. Kawabe Y, Ochi A. 1990. Selective anergy of V β 8+ CD4+ T cells in Staphylococcus enterotoxin-B primed mice. *J.Exp.Med.* 172:1065
278. Dannecker G, Mechery S, Staiano-Coico L, Hoffmann MK. 1991. A characteristic Mls-1^a response precedes Mls-1^a anergy in vivo. *J.Immunol.* 146:2083
279. Tucek CL, Desaynard C, Papiernik M. 1993. A kinetic studies on the deletion of thymic, peripheral, and gut-associated V β 6+ T cells in a Mls-1^b BALB/c colony infected with an exogenous mouse mammary tumor virus. *J.Immunol.* 151:759
280. Newell MK, Haughn CR, Maroun CR, Julius MH. 1990. Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T cell receptor for antigen. *Nature* 347:286
281. Haughn L, Gratton S, Caron L, Sekaly R-P, Veillette A, Julius M. 1992. Association of tyrosine kinase p56^{lck} with CD4 inhibits the induction of growth through the $\alpha\beta$ T-cell receptor. *Nature* 358:328
282. Finkel TH, Marrack P., Kappler JW, Kubo RT, Cambier JC. 1989. $\alpha\beta$ T cell receptor and CD3 transduce different signals in immature T cells. Implications for selection and tolerance. *J. Immunol.* 142:3006

ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
AMH	Antígenos mayores de histocompatibilidad
APC	Célula presentadora de antígeno
CDR	Región determinante complementaria
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CMLA	Cultivo mixto de linfocitos alogeneico
ConA	Concanavalina-A
CSR	Receptor co-estimulador
CTL	Linfocitos T citotóxicos
GvH	Injerto contra huésped
HC	Hidrocortisona
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
HR	Resistentes a hidrocortisona
HRE	Elemento respondedor a hormona
id.	Intradérmica
ip.	Intraperitoneal
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocítica
LTR	"Long terminal repeat"
MAM	mitógeno de <i>Mycoplasma arthiditis</i>
min.	minutos
MI _s	Sistema menor de estimulación linfocitaria
MMTV	Virus exógenos de tumor mamario murino
Mtv	Virus endógenos de tumor mamario murino
ORF	Marco de lectura abierto
OVA	Ovalbúmina
PMA	"Phorbol myristate acetate"
SBF	Suero fetal bovino
sc.	Subcutánea
SE	Enterotoxinas de <i>Staphylococcus aureus</i>
TCR	Receptor T
Th	Células T "helper"
Ts	Células T supresoras