



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**“EXPRESIÓN DE LA MOLECULA RECONOCIDA
POR LA LECTINA *AMARANTHUS LEUCOCARPUS*
EN LINFOCITOS T CD4+ MURINOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

MARÍA DEL CARMEN ARENAS DEL ÁNGEL

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. BLANCA ORTÍZ QUINTERO

MÉXICO, D. F

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina y al Posgrado de Ciencias Biológicas por darme la oportunidad de aprender y forjarme como profesional.

Agradezco a CONACyT por haberme otorgado una beca durante mis estudios y al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) por las facilidades para la realización de este trabajo.

A mi comité tutorial:

Dra. Gloria Soldevila Melgarejo.

Dra. Yolanda López Vidal

Dr. Edgar Zenteno Galindo.

Por sus enseñanzas, paciencia y apoyo.

DEDICATORIA

A mis padres Lorenzo y Eloina por su gran amor, por haberme apoyado en todo momento y por enseñarme a ser responsable, gracias a ustedes he llegado a esta meta...
LOS AMO!!!

A mi hermano Jorge... Por ser el ejemplo de un hermano mayor y porque siempre he contado contigo para todo. Tqm

A mis familiares: Va por ti Julio...Pepe y Janet (los adoro primos), a mis hermosas tías: Griselda, Chata, Elvia, Tere y Eglantina... Y a toda mi querida familia: Gracias a ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ricardo Lascurain Ledesma por su paciencia y dedicación para la realización de este trabajo. No tengo como agradecerle su tiempo, su apoyo y la sabiduría que me ha transmitido... Muchas gracias por haberme guiado en esta etapa de mi vida. Mi más profunda admiración!

A mis sinodales: Dra. Gloria Soldevila, Dra. Yolanda López Vidal, Dr. Ricardo Lascurain, Dr. Francisco J. Sánchez y Dr. Edgar Zenteno, por sus valiosas aportaciones y comentarios. A la Dra. Blanca Ortiz por su tiempo.

A mis amigos: Lety...hermanita sigues tu!!! (Tqm); a mi adorada, querida y aprensiva Leslie gracias por tu amistad; Pedrito gracias por ser mi ángel guardián; Blanquita Espinosa y Paty Gorocica...que hubiera sido de mi sin sus enseñanzas, mil gracias; Glo, Gygy y May aun en la distancia...Lqm!!; Dolores y Surid los mejores amigos que pude tener en la maestría; Agus gracias por tu invaluable amistad (échale ganas chaparrito); Moni y Moniquita por su cariño y fe en mi; Sra. Rosa mis respetos y cariño...es usted un amor, gracias por el té!! Y a todos mis compañeros de labo que fueron parte de esta etapa maravillosa de mi vida.

INDICE

I RESUMEN	2
ABSTRACT	4
II INTRODUCCIÓN	6
GLICOSILACIÓN (MOLECULAS GLICOSILADAS Y SU PARTICIPACIÓN EN EL SISTEMA INMUNE) ..	7
LECTINAS Y EL SISTEMA INMUNE	14
III ANTECEDENTES	17
IV JUSTIFICACIÓN	20
V HIPÓTESIS	21
VI OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
VII MATERIAL Y MÉTODOS	22
ANTICUERPOS Y REACTIVOS BIOLÓGICOS.....	22
OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE GANGLIO DE RATÓN	22
INMOVILIZACIÓN EN PLACA DEL ANTICUERPO ANTI-CD3.....	23
CULTIVO CELULAR Y ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T	23
ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....	24
OBTENCIÓN DE LA LECTINA.....	24
RECONOCIMIENTO DE ALL POR LINFOCITOS EN REPOSO	25
EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA RECONOCIDA POR ALL EN LINFOCITOS ACTIVADOS	25
ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	26
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
VIII RESULTADOS	27
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE ALL-B	27
RECONOCIMIENTO DE ALL POR CÉLULAS EN REPOSO	27
CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE LOS MITÓGENOS CELULARES	27
RECONOCIMIENTO DE ALL EN CÉLULAS ACTIVADAS.....	37
IX DISCUSIÓN	46
X CONCLUSIONES	51
XI REFERENCIAS	52

I. RESUMEN

Las moléculas glicosiladas de la superficie celular tienen un papel determinante en la maduración, activación y muerte celular, los cuales son procesos críticos en la respuesta inmunológica. En el 33% de los timocitos CD4⁺ así como en el 15% de linfocitos periféricos T CD4⁺ maduros de ratón se ha encontrado que expresan en su membrana la estructura Gal β 1,3GalNAc (antígeno de Thomsen-Friedenreich) en una glicoproteína de 70 kDa, la cual es reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL). En virtud de que la expresión de este disacárido está relacionada con la activación celular del linfocito, el objetivo de la tesis fue determinar su expresión en linfocitos T CD4⁺ activados en forma aislada o en conjunto con otras poblaciones celulares. Se obtuvieron ganglios linfáticos axiales de ratones machos Balb/c de 6-8 semanas de edad, de los cuales se aislaron las células linfoides o la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ mediante el uso de anticuerpos acoplados a perlas magnéticas y se activaron *in vitro* con 1 μ g/mL de anticuerpo anti-CD3 soluble (anti-CD3s) o inmovilizado en placa (anti-CD3p) o con 2.5 μ g/mL de concanavalina-A (ConA), durante 24, 48 y 72h. Se evaluó la proliferación celular mediante células teñidas con carboxifluoresceína succimidil ester y se identificaron las células con anticuerpos anti-CD4 o las células positivas a la lectina ALL, analizando por citometría de flujo. En la cinética de activación usando ConA, se observó que el mayor porcentaje de linfocitos T CD4⁺ALL⁺ (65.59%) se presenta cuando las células linfoides de ganglio se cultivaron durante 72h. Sin embargo, cuando se cultivaron linfocitos TCD4⁺ de forma purificada, se observó que el máximo porcentaje de linfocitos ALL⁺ fue de 8.41% a las 24h de cultivo. Asimismo, en la activación por medio de anticuerpos anti-CD3s en

células linfoides de ganglio linfático hubo un reconocimiento máximo 44.86% de linfocitos T CD4+ a las 24 horas de cultivo; mientras que la activación de linfocitos T CD4+ purificados presentó un reconocimiento máximo de 19.2% por ALL. Con el uso de anticuerpos anti-CD3p se observó que el porcentaje máximo de linfocitos T CD4+ ALL+ en células linfoides de ganglio linfático fue de 50.18% a las 48h de cultivo, mientras que en los linfocitos T CD4+ purificados el porcentaje de células que expresan el receptor de ALL fue máximo de 18.25% a las 24 h de cultivo. Los resultados sugieren que la expresión de la glicoproteína reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* en linfocitos T CD4+ depende de la activación de otras poblaciones celulares.

ABSTRACT

The molecules glycosylation of the cell surface have a determinant role in maturation, activation and cell death, which are critical processes in the immune answer. In 33% of the thymocytes CD4 + as well as in 15% of peripheral lymphocytes T CD4 + mature of mouse has been found that they express in its membrane the structure Gal β 1,3GalNAc (antigen of Thomsen-Friedenreich) in a glycoprotein of 70 kDa, it is recognized for the lectin of *Amaranthus leucocarpus* (ALL). Expression of this disaccharide is related to the cell activation of the lymphocyte, the objective of this thesis was to determine its expression in process of activation in lymphocytes T CD4 + purified or with other cell populations. Axial lymph glands were obtained of male mice Balb/c of 6-8 weeks of age, the lymphoid cells or the subpopulation of lymphocytes T CD4 + were isolated by means of the use of antibodies acoplated to magnetic microbeads and they were activated in vitro with 1 μ g/mL of antibody anti-CD3 soluble (anti-CD3s) or 5 μ g/mL immobilized in plate (anti-CD3p) or with 2,5 μ g/mL of concanavalin A to (ConA), during 24, 48 and 72h. The cell proliferation was evaluated by means of carboxyfluorescein succinimidyl ester and the population of interest were identified with antibodies anti-CD4 and lectin ALL, analyzed by flow cytometry. Using ConA in CMN was observed that the major percentage of lymphocytes T CD4+ALL + (65.59%) it was observated 72h. Nevertheless, when lymphocytes TCD4 + purified were cultivated, only observed a maximum of 8,41% of lymphocytes ALL + to 24h of cultivation. Respect a activation with antibodies anti-CD3s in

CMN we found a maximum of 44,86% of lymphocytes T CD4 + ALL+ at 24 o'clock of cultivation; lymphocytes T CD4+ purified presented a maximum of 19,2% by ALL. With anti-CD3p was observed that the maximum percentage of lymphocytes T CD4 + ALL + in CMN was from 50,18% to the 48h of cultivation, in lymphocytes T CD4 + purified the percentage of cells that express the receptor of ALL was maximum of 18,25% at 24 o'clock h of cultivation. The results suggest that the expression of the glycoprotein recognized by the lectin of *Amaranthus leucocarpus* in lymphocytes T CD4 + depends of its activation by other cell populations

II. INTRODUCCIÓN

La respuesta inmunológica depende de la interacción de diferentes clases de células, por ejemplo, los linfocitos T presentan en su superficie, moléculas como CD4 o CD8, TCR, CD2, CD3, CD28 y CD40L entre otras, mientras que macrófagos, células de Langerhans y linfocitos B presentan MHC-I, MHC-II, CD1, LFA-3 y CD80/CD86, y sus interacciones se involucran en los procesos de comunicación celular [1]. El estudio y caracterización de las moléculas de superficie, como las mencionadas anteriormente, permiten un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados en la cooperación célula con célula [1]. Los linfocitos T son activados cuando su receptor de antígeno (TCR) reconoce al antígeno específico en el contexto del MHC seguido de interacciones entre receptores y ligandos [1, 2]. Dicha activación conlleva a cambios en su fenotipo y función, por ejemplo, aumenta la expresión de moléculas de superficie así como la secreción de citocinas que favorecen la diferenciación efectora de los linfocitos T [1,2]. Los linfocitos T cooperadores (Th) que son positivos para la expresión del correceptor CD4, se diferencian en tipo 1 (Th1) o tipo 2 (Th2); los primeros favorecen el desarrollo de una respuesta celular mediante la síntesis de interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ), los cuales se involucran en el proceso de activación de macrófagos, linfocitos citotóxicos (Tc) y células asesinas naturales (NK), mientras que los linfocitos Th2 ayudan a coordinar la respuesta humoral mediante la síntesis de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, estimulando la maduración de linfocitos B y producción de anticuerpos. Otra población linfocitaria, son los linfocitos Tc positivos para el correceptor CD8, que eliminan células infectadas por patógenos intracelulares y células tumorales mediante la lisis, aunque para poder realizar su función requiere de la cooperación de los linfocitos Th1 [2].

Glicosilación (Moléculas glicosiladas y su participación en el sistema inmune).

La glicosilación es un proceso pos-traducciona que consiste en la adición enzimática de oligosacáridos a proteínas, confiriendo diferentes cualidades estructurales y funcionales [3]. La relevancia fisiológica de la glicosilación se observa en el correcto plegamiento de proteínas o en la estabilidad ante modificaciones físico-químicas del medio. Por otra parte, los carbohidratos cumplen funciones importantes en el reconocimiento biológico, así como mediar interacciones de célula con célula y célula con matriz extracelular [3]. Existen 3 tipos de glicosilación de proteínas: 1) la N-glicosilación que consiste en la unión de oligosacáridos a la proteína mediante el enlace entre una N-acetilglucosamina (GlcNAc) y un residuo de asparagina; 2) la C-glicosilación que es la unión de un residuo de α -manopiranosil con un carbono 2 del grupo indol del triptófano vía unión C-C; y 3) la O-glicosilación que es la unión de oligosacáridos unidos a proteínas mediante un enlace alfa formado por la N-acetilgalactosamina (GalNAc) y un residuo de la serina o treonina, por ejemplo, GalNAc α 1-O-ser/Thr (Fig. A) [3-4,52]. Las cadenas oligosacáridas, están constituidas estructuralmente por tres secciones principales: a) el "core" o región donde se encuentran los carbohidratos más cercanos al sitio de unión con la cadena peptídica, b) el "esqueleto", que determina la longitud de la cadena del oligosacárido, y c) la región periférica, donde habitualmente se encuentra galactosa, N-acetilgalactosamina y ácido siálico. La primera reacción de la O-glicosilación (adición de GalNAc a la cadena peptídica) es catalizada por una N-acetilgalactosaminiltransferasa (GalNAc-T), formando el antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr).

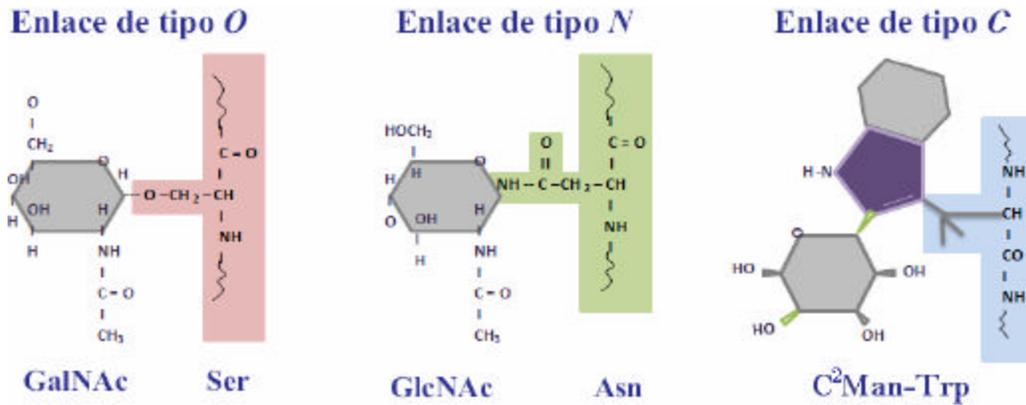


Figura A. **Tipos de enlace de oligosacáridos a proteínas.** Enlace tipo O donde la N-acetilgalactosamina (GalNAc) es unida a residuos de serina o treonina. Enlace tipo N, en el cual la N-acetilglucosamina (GlcNAc) es unida a un residuo de asparagina. Enlace tipo C donde la manosa es unida al carbono 2 de un residuo de triptofano (C^2 Man-Trp). (Adaptado de Furmanek, 2000 y de Freire, 2002).

A partir de esta estructura pueden formarse los diferentes “core”, mediante la acción de glicosiltransferasas específicas, que actúan de manera secuencial [3]. Por ejemplo, el “core 1” se sintetiza por la adición de galactosa en enlace β 1,3 a la GalNAc del antígeno Tn, mediante la enzima β 1,3 galactosiltransferasa. Esta estructura es conocida también como antígeno TF o de Thomsen-Friedenreich (Gal β 1,3GalNAc-O-Ser/Thr). La adición de N-acetilglucosamina (GlcNAc) mediante la acción de otra glicosiltransferasa al “core 1” forma el “core 2”. El “core 3” se forma por la adición de GlcNAc en unión β 1,3 al antígeno Tn. El “core 3” se convierte en “core 4” cuando se le adiciona otra GalNAc [3,4]. Estas 4 estructuras de O-glicanos son las que se sintetizan principalmente en células eucariotas (Figura B).

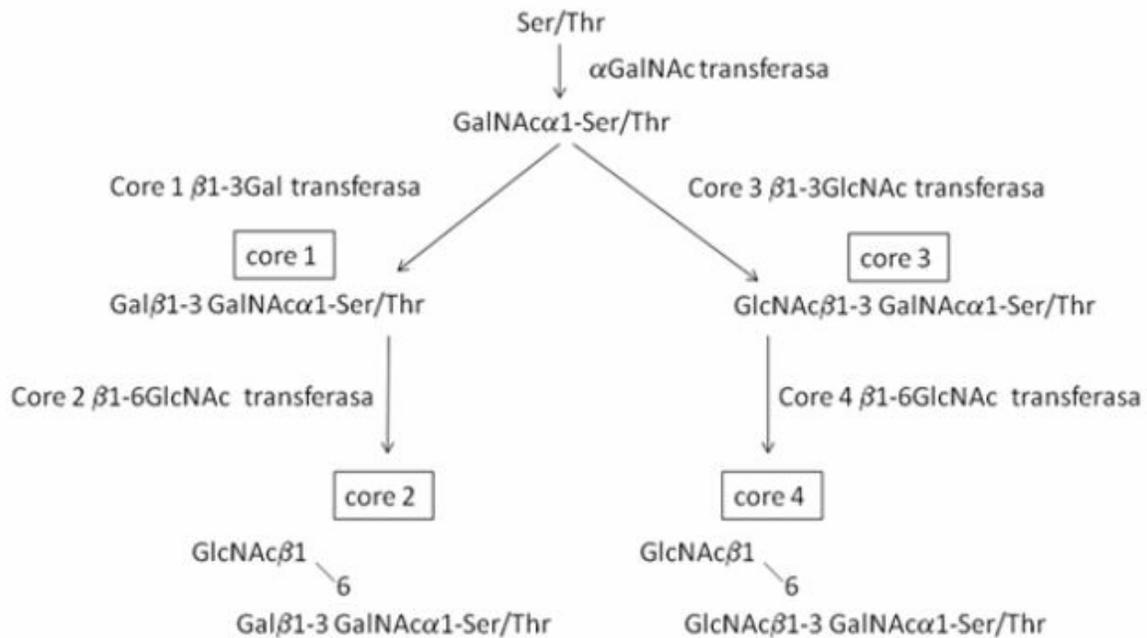


Figura B. **Biosíntesis de core en Oligosacáridos.** La reacción inicial de la Oligosilación es la adición de GalNAc a residuos de serina o treonina de una proteína. Estas estructuras pueden ser modificadas por galactosilación, sialilación, fucosilación o sulfatación. (Adaptado de Tsuboi S y Fukuda M, 2001).

Las moléculas glicosiladas de la superficie celular tienen un papel determinante en la respuesta inmunológica, por ejemplo, se ha demostrado que la pérdida del ácido siálico durante la activación es un evento selectivo que afecta a todos los glicanos de la superficie celular, estos mecanismos de glicosilación selectivos de las glicoproteínas son importantes para regular el desarrollo y función de los linfocitos T [28]. Una glicoproteína interesante que está implicada en la interacción entre los linfocitos T y los B es el CD45 (antígeno leucocitario común) cuya expresión en la superficie de los linfocitos T cambia

durante la diferenciación celular; es decir, la isoforma CD45RA que caracteriza a los linfocitos T vírgenes, se pierde progresivamente al activar a los linfocitos y da paso a la expresión de CD45RO, la cual es asociada a los linfocitos T de memoria [45]. También la molécula CD2 (LFA-2, antígeno 2 de función linfocitaria) es una molécula de linfocitos T y de células NK que aparece tempranamente en las células progenitoras [1, 2]. Durante la interacción entre el linfocito T CD4+ y la célula presentadora de antígeno (APC), la molécula CD2 incrementa la estabilidad de unión actuando como receptor para la molécula LFA-3 (CD58) o en el caso de ratón para la molécula CD48 [1,5]. La unión de CD2 con su ligando CD58 durante la activación celular estimula la producción de IL-1 que tiene acciones estimuladoras, sobre un gran número de células [5]. Otra molécula glicosilada que juega un papel importante para la activación del linfocito T es el CD28 (glicoproteína constitutiva), su expresión se incrementa a medida que los linfocitos T maduran en el timo [1]. El CD28 es la principal molécula coestimuladora [1,6-8], uno de sus efectos más importantes es el incremento en la producción de las citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) y factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF) [6-7]. Otra molécula de coestimulación es el CD40L que al interactuar con su receptor CD40 determinará la respuesta del linfocito T frente a los antígenos presentados por las APC. La unión de CD40L con el CD40 de la APC induce aumento en la expresión del CD28 en el linfocito T y a su vez la unión del CD28 con CD80 o CD86 de la APC induce la expresión del CD40 [51]. Es decir la expresión de algunas moléculas de coestimulación durante la interacción del linfocito T CD4+ con la APC depende de la unión de otros receptores con su ligandos. La coestimulación de linfocitos T murinos vía CD3/CD28 estabiliza la expresión de CD40L, ya

que los linfocitos T estimulados de esta manera expresan niveles altos de esta molécula si son activados en presencia de linfocitos B, fenómeno que no se observa si solo son activados con Anti-CD3 [42]. La glicoproteína CTLA-4 se expresa en la superficie de linfocitos T en reposo en niveles muy bajos, a medida que el linfocito se activa, los niveles de CTLA-4 en la superficie celular se elevan [1, 40]. La expresión de CTLA-4 a bajos niveles es suficiente para inducir una señal negativa en los linfocitos T; la mayoría de las moléculas CTLA-4 se acumulan intracelularmente en lisosomas donde son degradadas rápidamente con el fin de regular su expresión; sólo un pequeño grupo de moléculas CTLA-4 se expresa en la superficie de los linfocitos T [40]. Asimismo, en ausencia de estimulación la molécula CTLA-4 es degradada y en presencia de la activación del receptor de linfocitos T el CTLA-4 contenido en los lisosomas es secretado aumentando su expresión en la superficie celular. Los linfocitos T de memoria tienen mayor cantidad de CTLA-4 intracelular, que se expresa rápidamente en la superficie del linfocito T de memoria activado, en comparación con la velocidad de expresión durante la activación de los linfocitos T vírgenes. Adicionalmente, CTLA-4 es retenida en la superficie del linfocito T de memoria activado un tiempo considerablemente más largo que en el caso del linfocito T virgen activado [41]. Se ha demostrado que la molécula ICOS presenta poca expresión en linfocitos T purificados murinos, pero es rápida y altamente regulada sobre linfocitos T CD4+ y CD8+ después de la activación; sin embargo dicha expresión se ve disminuida significativamente en ausencia de moléculas como CD80 y CD86, la cual se puede restaurar si se estimula a la célula con CD28, es decir CD28-CD80/CD86 pueden interactuar optimizando la expresión de ICOS [44]. CD44 es otra glicoproteína que tiene una amplia distribución tisular y está implicada en la activación y entrada selectiva

de los linfocitos a los ganglios linfáticos, hematopoyesis, progresión tumoral y metástasis; se sabe que se expresa en células epiteliales, linfocitos activados y linfomas agresivos. Durante la ontogenia y activación linfocitaria, el CD44 está rigurosamente regulado, sugiriéndose con esto que desempeña un papel importante en este proceso [48]. CD95 (Fas) es una glicoproteína de superficie con un dominio citoplasmático de "muerte celular" conservado, su ligando (FasL) está altamente expresado en [linfocitos](#) activados y se ha reportado que la inactivación de las señales vía Fas debida a la baja expresión de esta molécula en la membrana puede llevar a la célula a una sobrevivencia anormal y contribuir al desarrollo y progresión de células transformadas [49]. Otras glicoproteínas que participan en la respuesta inmunológica son las integrinas, las cuales existen en estado activo e inactivo, una célula activada puede transmitir una señal desde su citoplasma para modificar la conformación de los dominios extracelulares de las integrinas en la membrana celular, aumentando la afinidad de estas moléculas por sus ligandos; esta señal de "adentro hacia afuera" ocurre, por ejemplo, cuando los leucocitos son estimulados por péptidos bacterianos y así rápidamente aumentan la afinidad de las integrinas leucocitarias por miembros de la familia de las inmunoglobulinas, la señal de "afuera hacia adentro" permite la unión de la integrina con su ligando afectando muchos procesos internos en la célula, incluyendo proliferación y apoptosis [50]. La síntesis de O-glicanos de "core 2" es particularmente relevante en la fisiología de una célula T activada, proporcionando gran parte de la base estructural para la síntesis de ligandos de selectinas [9]. Las selectinas son glicoproteínas transmembranales que se involucran en la migración linfocitaria [1-2]. La expresión de L-selectina (CD62L) difiere entre linfocitos T de memoria y los vírgenes, ya que se ha demostrado que mientras los linfocitos T vírgenes son

uniformes en la expresión CD62L, algunos linfocitos T de memoria pierden la expresión de dicha molécula [46-47]; la L-selectina interviene en la recirculación de los linfocitos, los cuales son unidos a las vénulas de endotelio alto de los ganglios linfáticos mediante el reconocimiento específico de carbohidratos tipo Lewis X. Esta selectina también une neutrófilos a células endoteliales activadas por citocinas (IL-1, TNF- α e IFN- β) en procesos de inflamación [1, 23]. En procesos de inflamación la selectina E (CD62E o ELAM-1) y la P (CD62P) se expresan en células endoteliales activadas por citocinas, reconociendo grupos de carbohidratos sialilados, complejos relacionados con la familia Lewis X o Lewis A que se encuentran en proteínas de membrana de granulocitos, monocitos y algunos linfocitos T efectores o de memoria previamente activados [1]. La importancia que presentan estas moléculas glicosiladas son ejemplos de procesos críticos en la respuesta inmunológica [2-6]. Sin embargo, alteraciones en la estructura sacarídica de proteínas glicosiladas de linfocitos T conduce a una respuesta humoral y celular alterada [11] como sucede con las elongaciones incompletas de las cadenas sacarídicas con enlaces tipo O, determinando que algunos tipos de "core" se encuentren enmascarados por la adición de otros carbohidratos, los cuales quedan expuestos en la superficie celular dando lugar a antígenos como el Tn, TF y sialil-Tn (STn) los cuales están asociados al desarrollo de cáncer [11]. Dicha expresión celular de glicosilación incompleta podría corresponder a una alteración de la expresión de glicosiltransferasas, responsables de la O-glicosilación de proteínas [3]. Por ejemplo, en la O-glicosilación de moléculas de tipo mucina, estas alteraciones pueden tener como resultado la producción de MUC-I (glicoproteína asociada a la membrana celular que constituye uno de los componentes principales de la superficie celular del tejido glandular normal), lo cual

provoca una sialilación más corta en O-glicanos y por lo tanto un sitio de reconocimiento diferente [12, 13]. Esta glicoproteína está sobreexpresada y deficientemente glicosilada en la célula cancerosa. La función de MUC1 en la progresión tumoral, es la pérdida de polaridad de la membrana y la sobreexpresión de esta molécula en la célula cancerosa interfiriendo con la adhesión celular, protege a la célula tumoral del reconocimiento por la vía efectora celular del sistema inmune, favoreciendo la creación de metástasis [13]. En tumores asociados a O-glicanos sialilados, el disacárido STn, se expresa en un 30% en carcinomas de glándulas mamarias y en la mayoría de los tumores específicos. La enzima encargada de catalizar la transferencia de ácido sialico al GalNAc, es la glicosiltransferasa ST6GalNAc-I. Sin embargo, en carcinomas de glándula mamaria existe una correlación completa entre la expresión del ácido ribonucleico (RNA) codificante para ST6GalNAc-I y la expresión de STn, demostrando que la expresión del STn resulta del cambio en la expresión de ST6GalNAc-I. La expresión endógena o exógena de ST6GalNAc-I (pero no de ST6GalNAc-II) siempre tiene como resultado la expresión de STn [12]. Otro ejemplo, es el Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) un padecimiento característico en enfermedades por defecto de la O-glicosilación [11]. Particularmente, los linfocitos de pacientes con WAS tienen un incremento en la glicosilación de tipo O en la molécula de superficie CD43, mostrando proliferación disminuida ante estímulos mitogénicos policlonales, en comparación con individuos sanos, ya que esta estructura O-glicosídica puede estar involucrada en procesos de activación linfocitaria y consecuentemente en las alteraciones observadas en las mismas [11]. Dichos ejemplos son muestra de la diversidad de funciones en las que participan los glicoconjugados.

Lectinas y el sistema inmune.

Una de las herramientas útiles para el estudio de glicoproteínas son las lectinas [8, 14]. Las lectinas son proteínas que comparten en común la propiedad de unirse de forma específica y reversible a carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas [15-16]. La especificidad de unión de las lectinas a su ligandos, es comparable con aquélla que presentan los anticuerpos con los antígenos. La mayoría de las lectinas contienen al menos 2 sitios de unión, de ahí que su utilidad esté basada en la propiedad que tienen de combinarse con varios tipos de glicoconjugados presentes en superficie celulares [14, 17]. Las lectinas están presentes en diversos organismos como virus, bacterias, hongos, plantas, así como animales vertebrados superiores [17]. Algunas de estas proteínas son ampliamente reconocidas por su capacidad de activar linfocitos y promover su proliferación a través de la interacción con residuos sacarídicos presentes en numerosas glicoproteínas de membrana, incluyendo aquéllas involucradas en la sinápsis inmunológica como es el caso de las sialolectinas, por ejemplo CD22 (siglec-2) que se une específicamente al ácido sialico y tiene como función inhibir la señalización del receptor de células B, así como prevenir la sobreactivación del sistema inmune y el desarrollo de enfermedades autoinmunes; o CD33 (siglec-3) molécula que inhibe la proliferación celular, induce apoptosis, inhibe la activación celular e induce secreción de citocinas proinflamatorias, además de que media interacciones celulares entre proteínas y carbohidratos, además del reconocimiento entre proteína y proteína [39]. Las interacciones de lectinas con carbohidratos, no sólo se hallan involucradas en el fenómeno de activación de linfocitos, sino que también juegan un papel fundamental en innumerables eventos de la regulación de la fisiología del sistema inmune, como maduración tímica, migración linfocitaria y apoptosis [4,14, 21-22]. En la actualidad se

han estudiado lectinas con efecto mitogénico sobre los linfocitos, entre las que se destacan las provenientes de *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Canavalia ensiformis* (ConA), *Pisum sativum* (PSA) y *Fitolaca americana* (PWM) [1,23, 54]. Estos mitógenos pueden activar de forma diferente los linfocitos T y B, por ejemplo la PHA y ConA inducen mitogenicidad en células T [17,54], mientras que PWM estimula ambos tipos de células [14]. Las interacciones de estas lectinas con células pueden ser inhibidas en muchos casos por monosacáridos, por lo que se ha llegado a la conclusión de que ellas se unen a sacáridos de la superficie celular, lo que ha provisto a los científicos de útiles marcadores para emplearlos en técnicas histoquímicas y en la microscopía electrónica para estudiar la estructura y función de la membrana plasmática [25]. Generalmente se utilizan lectinas conjugadas con fluorocromos como la fluoresceína y las más usadas para estos fines son la PHA-L, PHA-E y las provenientes de *Pisum sativum* (PSA), *Triticum vulgare* (WGA), *Solanum tuberosum* (STL), *Arachis hypogae* (PNA), *Datura stramonium* (DSL), *Lens culinaris* (LCA) y de *Griffonia simplicifolia* (GSL) [1, 54]. Dentro de los estudios de membrana se ha reportado en la literatura el uso de lectinas para estudiar cambios estructurales en los glicoconjugados presentes en las superficies celulares y en ocasiones de esta forma detectar cambios morfológicos ocurridos, para analizar la distribución subcelular de epitopos y terminales glicoproteicos, además para detectar alteraciones en la expresión de moléculas presentes en la superficie celular [18]. Otra área importante en la cual se emplean las lectinas es la detección de transformaciones malignas en células, a través de la aglutinación preferencial que muestran las lectinas con células transformadas. Además se han realizado investigaciones para utilizar las lectinas y polímeros sintéticos enlazados a ellas como agentes anticancerígenos *in vivo* e *in vitro*, ya que se ha visto que

III. ANTECEDENTES

La lectina del *Amaranthus leucocarpus* (ALL) es una glicoproteína dimérica de 35kDa específica para el antígeno T (Gal β 1,3GalNAc) presente en O-glicanos [26]. En trabajos previos se demostró mediante técnicas histoquímicas que ALL posee la capacidad de interactuar específicamente con timocitos presentes en la zona corticomedular y medula tímica [21], mientras que las células reconocidas por la lectina *Arachis hypogaea* (PNA) que también reconocen específicamente la estructura Gal β 1,3GalNAc, se encuentran básicamente distribuidas en la corteza tímica [21]. La molécula detectada por ALL reconoce en medula tímica de ratón una población de linfocitos que son predominantemente CD4+, mientras que los linfocitos CD8+ identificados se presentan en menor proporción (aproximadamente 11%), reforzando así la etapa de maduración en las que se encuentran las poblaciones celulares [21-22]. Así mismo fueron encontradas células dendríticas ALL+, las cuales interactúan principalmente con los timocitos CD4+ [21].

Otros estudios han demostrado que el ALL reconoce macrófagos no activados y la expresión de la molécula reconocida por ALL depende del estado de activación del macrófago [27]. Todos los macrófagos ALL+ son Mac-, se sabe que Mac 2 (Galectina-3) pertenece a la familia de las galectinas, las cuales son moléculas que aumentan proporcionalmente su expresión con la activación celular. La interacción de ALL con el macrófago disminuye con el estado de activación del macrófago [27]. Estudios bioquímicos revelaron que el receptor de ALL es una glicoproteína de 70kDa la cual, podría jugar un papel importante en los mecanismos de activación de macrófagos [23].

El aislamiento de la molécula detectada por el ALL mediante cromatografía de afinidad reveló que la glicoproteína presenta un peso molecular de 70kDa, la cual no coincide con el peso molecular de los diferentes ligandos que reconoce la lectina PNA [24]. Esta glicoproteína presenta una composición de 20% de carbohidratos, principalmente GalNAc y Galactosa. La composición de aminoácidos reveló que la mayoría de los residuos corresponden a serinas, lo cual es común de las proteínas O-glicosiladas [24]. La caracterización por MALDI-TOF (“matrix assisted laser desorption ionization-time of flight”) de la molécula reconocida por ALL proveniente de timocitos de ratón indican mediante comparación con la base de datos NCBIInr (Swiss-Prot) que no existe homología significativa con otras proteínas ya descritas, sugiriendo que este receptor sea considerado como una molécula de membrana no descrita [24].

Por citometría de flujo se ha demostrado que ALL puede unirse a linfocitos T CD4+ y CD8+ de circulación sanguínea, de bazo y de ganglios axiales provenientes de células mononucleadas de ratón; observándose que casi todos los linfocitos T CD8+ (88-95%) expresan la molécula reconocida por ALL, mientras que la mayoría de los linfocitos T CD4+ no expresan el ALLr y quienes lo presentan (12-40%) es en menor densidad que los CD8+, este reconocimiento no es observado en linfocitos B [4]. El estímulo mitogénico mediante ConA a las 72h de cultivo, induce un decremento en el número de linfocitos T CD8+ ALL+, mientras que induce un incremento máximo en el número de los linfocitos T CD4+ALL+ a las 24h de cultivo, seguido por un rápido decremento después de las 48h de cultivo. Esta glicoproteína pareciera ser expresada de manera selectiva por los linfocitos T CD8+ en reposo, y en los primeros estadios de activación de los linfocitos T CD4+. La activación en el co-cultivo de los linfocitos T CD4+ ALL- con células CD3- y ConA en un

cultivo de 72h, dió como resultado, que la expresión de ALLr en dicho co-cultivo fuera equivalente al encontrado en linfocitos T CD4+ de cultivos totales. Sin embargo, el máximo grado de unión de la ALL sobre linfocitos T en el co-cultivo fue a las 48h, a diferencia de las 24h en el cultivo de linfocitos T CD4+ de cultivos de células linfoides de ganglio linfático [53]. En este trabajo se utilizaron linfocitos T de nódulos linfoides axiales, puesto que, en la paracorteza de dichos nódulos encontramos aproximadamente el 70% de LT CD4+ [1], los cuales son los linfocitos de interés para este estudio, debido a que por ser nódulos de concentración linfocitaria en espera de la presentación antigénica por medio de las células presentadoras de antígenos (APC), los linfocitos T CD4+ se encuentran en reposo, a diferencia de órganos como el timo (localizándose timocitos dobles positivos) o bazo (encontrándose escasos linfocitos T).

IV. JUSTIFICACIÓN

En virtud de que la expresión de la molécula reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* está relacionada con la activación celular del linfocito T CD4+, es importante determinar si dicha expresión depende de la interacción de otras poblaciones celulares. Algunas moléculas coestimuladoras durante la interacción del linfocito T CD4+ con la APC dependen de la unión de otros receptores con su ligandos, como sucede con ICOS el cual presenta baja expresión en linfocitos T murinos, pero es rápida y altamente regulado sobre linfocitos T CD4+ y CD8+ después de la activación. Resultando interesante observar si el comportamiento de expresión de el receptor de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* es semejante a la presentada en moléculas accesorias.

V. HIPÓTESIS

La expresión de la molécula reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* en linfocitos T CD4+ depende de su estado de activación celular y de la presencia de otras poblaciones celulares.

VI. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de la molécula detectada por el ALL en linfocitos T CD4+ purificados murinos durante la activación celular.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar en células de ganglio linfático de ratón, la expresión de ALLr en linfocitos T en reposo: en linfocitos T CD4+ co-cultivados en con otras poblaciones linfoides y en linfocitos T CD4+ purificados.
2. Establecer la cinética de proliferación de células linfoides y linfocitos T CD4+ purificados de ganglios linfáticos de ratón.
3. Determinar en células de ganglio linfático de ratón, la expresión de ALLr en la región de linfocitos T CD4+ de células linfoides y en linfocitos T CD4+ purificados después de activar con concanavalina-A, anticuerpos anti-CD3 Soluble o inmovilizado en placa y anti-CD28 soluble a diferentes días de cultivo celular.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Anticuerpos y Reactivos Biológicos

Los anticuerpos acoplados a perlas magnéticas así como la columna magnética fueron de Miltenyi (Alemania). Los anticuerpos contra las moléculas de ratón, anti-CD3 para activar linfocitos T murinos (clona 145-2C11), anti-CD4 L3T4 conjugado a ficoeritrina (PE) clona H129.19, anti-CD8-PE (clona 53-6.7), anti-CD19-PE (clona ID3), anti-CD28 (clona 37.51), control de isotipo IgG_{2a},K-PE (clona R35-95) y estreptavidina-CyChr fueron de PharMingen (San Diego, Estados Unidos). Carboxifluorescein succinimidil ester (CFSE), azul tripano, *Canavalia ensiformis* (concanavalina, ConA), L-glutamina, HEPES, azida de sodio, albúmina de suero bovino (BSA) y el medio de cultivo RPMI-1640 fueron de Sigma Chemical (Saint Louis, Estados Unidos). 2-mercaptoetanol fue de BioRad (Estados Unidos).

Obtención de células de ganglio de ratón.

Se utilizaron ratones machos BALB-c de 6-8 semanas de edad del bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical, se obtuvieron los ganglios linfáticos axiales y de éstos, se disgregaron manualmente las células, las cuales se suspendieron en medio de cultivo RPMI-1640 sin suplementar. A partir de las células de ganglio, se obtuvieron linfocitos T CD4+ mediante la incubación con anticuerpos acoplados a perlas magnéticas y se separaron mediante una columna magnética. Se determinó el número y viabilidad de las

células mediante la exclusión del colorante azul tripano (0.2%). Se utilizaron suspensiones celulares con viabilidad >87%.

Inmovilización en placa del anticuerpo anti-CD3.

En una placa de cultivo de 96 pozos de fondo plano (Nunc, Dinamarca) se colocó por triplicado a cada pozo, las siguientes concentraciones de anticuerpo anti-CD3: 0.1, 1, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ y se llevó a un volumen final de 50 μL de PBS, y se incubaron durante 120 min a 37°C; finalizada la incubación se realizaron 3 lavados con 200 μL de amortiguador de fosfatos salinos (PBS), quedando así el anticuerpo inmovilizado listo para realizar el cultivo celular.

Cultivo celular y activación de linfocitos T.

Células linfoides (1×10^7) y linfocitos T CD4+ (5×10^6) provenientes de ganglios linfáticos axiales, fueron incubadas 15 min con CFSE a 5mM, a temperatura ambiente en agitación ligera y en oscuridad. Enseguida, se lavaron una vez con 8 mL de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal de ternera (CFS) inactivado con calor. Las células (2×10^5) se colocaron en una placa de 96 pozos con medio RPMI-1640 suplementado [(suero fetal al 10%, 1% de L-glutamina, penicilina (100U/mL), estreptomina (100 $\mu\text{g/mL}$), 10 mM HEPES y 50 mM de 2-mercaptoetanol)] a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5% durante 24, 48 y 72h en presencia de anticuerpos anti-CD3 soluble (0.01 a 1 $\mu\text{g/mL}$), o anti-CD3 inmovilizado en placa (0.01 a 10 $\mu\text{g/mL}$) o concanavalina A (1 a 5 $\mu\text{g/mL}$). En los experimentos se cultivaron células sin tinción de

CFSE y sin estímulo como control negativo de los ensayos y todos los experimentos se realizaron por duplicado, para corroborar el resultado.

Análisis de proliferación celular.

Las células linfoides de ganglio linfático tratadas con CFSE obtenidas del cultivo se incubaron primero 15 min con anticuerpos anti-CD4-PE, luego se lavaron con 1 mL de PBA (PBS conteniendo albúmina de suero bovino al 0.2% y azida de sodio al 0.1%) a 4°C, centrifugándose a 1500 rpm durante 5 min. Después de el lavado, las células se analizaron en un citómetro FACS-Excalibur de Becton & Dickinson (Mountain View, Estados Unidos) con el programa Cellquest para verificar la población celular que se encuentra en proliferación.

Obtención de la lectina.

La lectina proveniente de las semillas de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando estroma de eritrocitos humanos tipo "O" (Zenteno *et.al*, 1988), y posteriormente se acopló con biotina para obtener el conjugado ALL-B, para esto se disolvieron 2mg de ALL en 1mL de solución amortiguadora de bicarbonato de sodio al 50mM (pH 8.5) y simultáneamente se disolvió 1mg de Sulfo-NHS-Biotina en 1mL de agua desionizada y se adicionaron 74µL de esta solución Sulfo-NHS-Biotina a la solución de ALL, se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y

finalmente se removió el exceso de biotina mediante diálisis contra solución salina. La proteína biotinilada se guardó a -20°C hasta su uso; la actividad hemaglutinante se realizó en una microplaca de 96 pozos de fondo en "U" utilizando diluciones seriadas 1:2 de la siguiente manera, se adicionó $25\mu\text{L}$ de PBS a cada uno de los pozos. Luego, se colocaron $25\mu\text{L}$ de la lectina en el primer pozo de la extrema izquierda y después de mezclar se retiraron $25\mu\text{L}$ que a su vez se añadieron al segundo pozo haciéndose el mismo procedimiento hasta completar la línea (diluciones progresivas hacia la derecha), al final se descartaron los $25\mu\text{L}$ sobrantes. Finalmente, se adicionaron $25\mu\text{L}$ de eritrocitos al 2% en PBS y se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para determinar la actividad específica de la lectina, el título hemaglutinante obtenido se multiplicó por 40 ($1/40$ de mL), posteriormente el resultado fue dividido entre la concentración de proteína de la lectina (1.4 mg/mL).

Reconocimiento de ALL por linfocitos en reposo.

Células linfoides provenientes de ganglios linfáticos axiales (2×10^5), se incubaron con anticuerpos anti-CD4-PE, anti-CD8-PE o anti-CD19-PE, respectivamente, durante 15 min a 4°C , se lavaron con 1 mL de PBA y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y posteriormente se incubaron con la ALL-B a 30 min a 4°C , se lavaron con 1 mL de PBA y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, seguido por estreptavidina-CyChr, durante 15 min a 4°C . Para todos los casos se utilizaron controles de isotipo unidos a PE y estreptavidina-CyChr en ausencia de la lectina como control de la tinción. Los experimentos se realizaron por duplicado, para corroborar el resultado.

Expresión de la molécula reconocida por ALL en linfocitos activados.

Las células linfoides y los linfocitos T CD4⁺ purificados provenientes de cultivos celulares (con o sin CFSE), se lavaron con 1 mL de PBA y se incubaron con 10 µL de anticuerpos anti-CD4-PE durante 15 min. Tanto las células linfoides como los linfocitos T CD4⁺ purificados se incubaron 30 min con la ALL-B y después de lavar con 1 mL de PBA, se incubaron 15 min con estreptavidina-CyChr (diluida 1:400). Los experimentos se realizaron por duplicado, para corroborar el resultado. Todas las incubaciones se realizaron a 4°C.

Análisis mediante citometría de flujo.

Todos los experimentos se analizaron por citometría de flujo donde se adquirieron al menos 10⁴ eventos en cada experimento y se analizaron las regiones correspondientes a los linfocitos de acuerdo a su tamaño y granularidad.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa STATA 9; se consideró una $p < 0.05$ como significancia estadística. Se compararon dos grupos utilizándose la prueba U de Mann-Whitney para muestras no paramétricas. Las gráficas representan la media \pm error estándar (media \pm ErSd) de 5 experimentos independientes.

VIII. RESULTADOS

Determinación de la concentración y de la actividad específica de ALL-B.

La primera meta fue obtener la concentración óptima de ALL conjugado a biotina (ALL-B) para realizar el análisis por citometría de flujo; la concentración de proteína fue de 1.4 mg/mL, la concentración óptima fue aquella concentración sub-aglutinante a la cual la unión de ALL-B a las células es inhibida con el carbohidrato competidor GalNAc al 0.2M, la actividad específica de la ALL-B fue de 1828.57 UHA.

Reconocimiento de ALL por células en reposo.

En relación al reconocimiento de ALL de células en reposo, en la figura 1a se observa el control negativo, el cual representa la tinción basal dada únicamente por la estreptavidina-CyChr, en las figuras 1c y 1d se observa que la unión de la ALL-B en linfocitos T CD4+ es del 15% y de un 89% en linfocitos T CD8+, respectivamente; este reconocimiento no se observa en los linfocitos CD19+ (Fig. 1b).

Concentración óptima de los mitógenos celulares.

La siguiente meta fue obtener la concentración óptima del mitógeno celular que se requiere para una adecuada proliferación celular, para lograr esto, se utilizaron diferentes concentraciones de mitógenos celulares en un cultivo de 24 a 72h. En todos los casos, se analizaron las células correspondientes a las regiones de linfocitos y células en proliferación de acuerdo a su tamaño y granularidad, así como la región específica correspondiente a los linfocitos T CD4+ (figura 2a). En la figura 2b, se ejemplifica el

incremento en el porcentaje de linfocitos que proliferaron en respuesta a concentraciones crecientes de ConA (de 1, 2.5 y 5 $\mu\text{g/mL}$). En el caso de las células linfoides de ganglio linfático activadas con un $1\mu\text{g/mL}$ de ConA el valor fue de 42.79 ± 12.98 , mientras que en

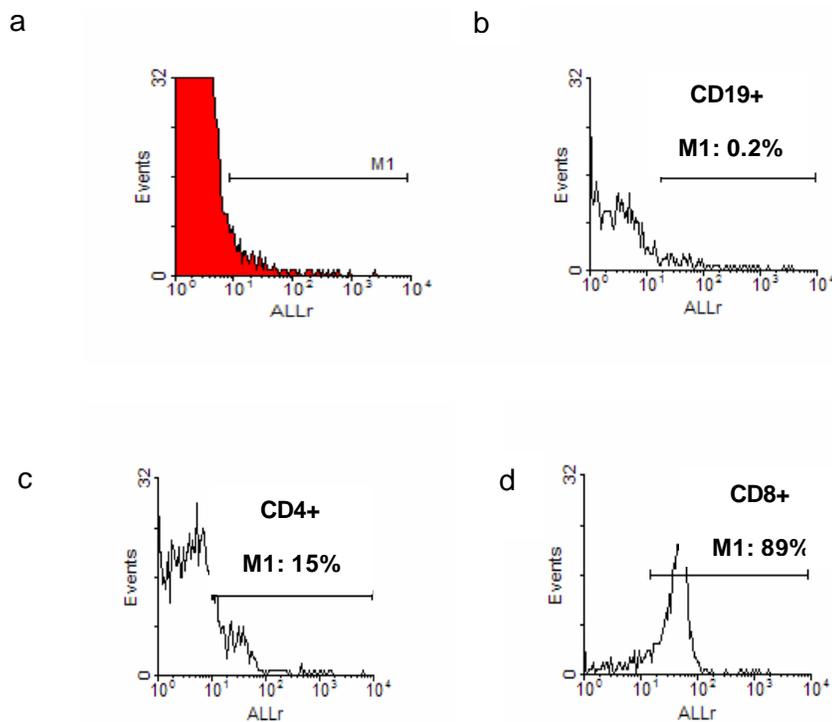


Figura 1. Unión específica de la ALL a linfocitos de ratón. Las células provenientes de ganglio linfático de ratón se incubaron con anticuerpos anti-CD4-PE, anti-CD8-PE o anti-CD19-PE respectivamente. Luego se incubaron con ALL-biotina seguido por estreptavidina-CyChr. Se analizó la unión de la ALL en cada una de las subpoblaciones de linfocitos. En **a)** se muestra la reacción basal dada únicamente por la estreptavidina-CyChr. En **b)** se muestra el reconocimiento de ALL por linfocitos

B. En **c)** y **d)** se muestra el porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos T reconocidos por ALL. Los datos provienen de un experimento representativo de 15 que se realizaron.

la región de linfocitos T CD4+ fue de 27.52 ± 8.34 y en linfocitos T CD4+ purificados se halló el 56.86 ± 6.72 . Con $2.5\mu\text{g/mL}$ de ConA el valor fue de 76.24 ± 3.86 en células linfoides, en la región de linfocitos T CD4+ fue de 72.98 ± 0.58 y en linfocitos T CD4+ purificados el porcentaje fue de 78.26 ± 3.88 . Respecto a las células linfoides de ganglio linfático activadas con $5\mu\text{g/mL}$, el valor encontrado fue de 83.28 ± 1.65 , en la región de los linfocitos T CD4+ fue de 84.8 ± 2.54 y finalmente en linfocitos T CD4+ purificados, el porcentaje fue de 87.65 ± 1.71 . La concentración óptima para la proliferación celular se observó con una concentración de $2.5 \mu\text{g/mL}$ tanto en células linfoides de ganglio linfático como en linfocitos T CD4+ purificados, debido a que no existe diferencia estadística con la concentración de $5\mu\text{g/mL}$ de ConA (figura 3).

Se analizaron las células correspondientes a las regiones de linfocitos y células en proliferación de acuerdo a su tamaño y granularidad, así como la región específica correspondiente a los linfocitos T CD4+ (figura 4a). En la figura 4b, se ejemplifica el incremento en el porcentaje de linfocitos que proliferaron en respuesta a concentraciones crecientes de anticuerpo anti-CD3 soluble (0.01 , 0.1 y $1 \mu\text{g/mL}$). En el análisis de la proliferación de células activadas con el anticuerpo anti-CD3 soluble, el porcentaje de proliferación en células linfoides con $0.01 \mu\text{g/mL}$ del estímulo fue de 27.67 ± 9.73 , en la región de linfocitos T CD4+ se encontró el 28.11 ± 16.71 y en linfocitos T CD4+ purificados fue de 4.59 ± 1.3 . El porcentaje de proliferación con $0.1 \mu\text{g/mL}$ del estímulo en células linfoides fue de 49.13 ± 7.92 , en la región de linfocitos T CD4+ fue de 58.84 ± 6.52 y en linfocitos T CD4+ purificados fue de 28.23 ± 6.02 . Con $1 \mu\text{g/mL}$ de anticuerpo anti-CD3

soluble el porcentaje de proliferación en células linfoides fue de 62.13 ± 3.34 , en la región de linfocitos T CD4+ se observó el 65.57 ± 2.94 y en linfocitos T CD4+ purificados fue de 63.29 ± 9.54 . Por lo tanto, el óptimo porcentaje de proliferación celular con el anticuerpo anti CD3 soluble tanto en células linfoides de ganglio linfático como en linfocitos T CD4+ a)

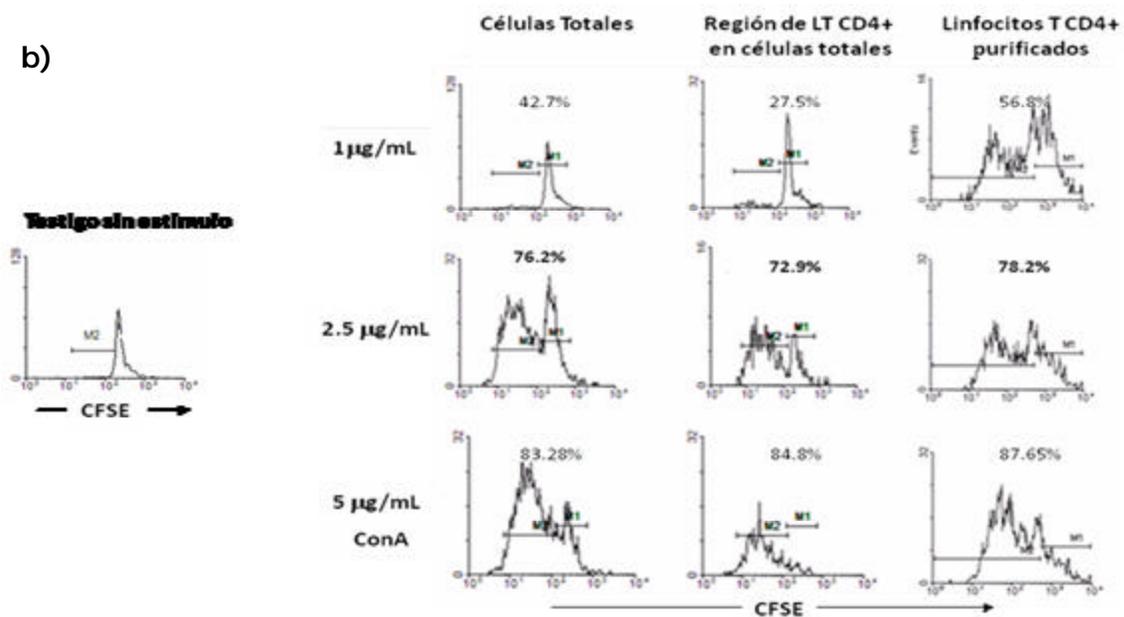
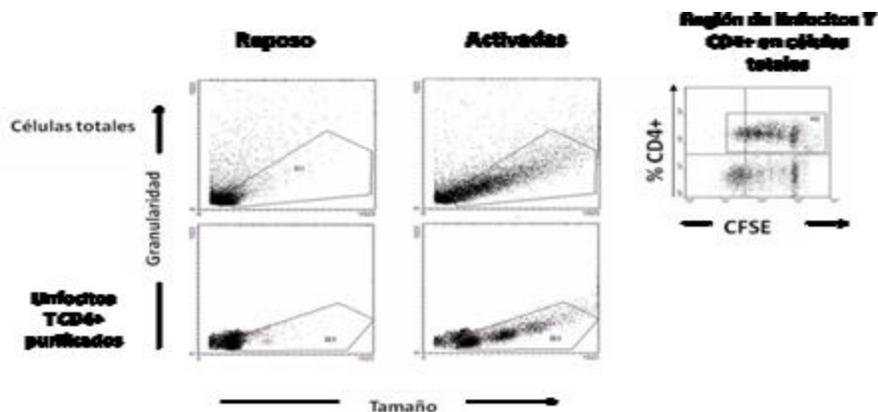


Figura 2. Análisis de la proliferación celular activando con diferentes concentraciones de ConA. Se realizó un análisis por citometría de flujo de una doble fluorescencia de células linfoides de ganglio

linfático y linfocitos T CD4+ de ratón. **a)** Gráficas de tamaño contra granularidad de las células en reposo y las activadas con ConA. Panel superior, células linfoides; en la extrema derecha se observa la región de linfocitos T CD4+. Panel inferior, linfocitos T CD4+ purificados mediante anticuerpos acoplados a perlas magnéticas. **b)** Porcentajes de proliferación celular con 1, 2.5 y 5 μ g del mitógeno en células tratadas con CFSE e incubadas con anticuerpos anti-CD4. El análisis representativo (histograma), de células estimuladas durante 72h de cultivo. M1 = células sin proliferación, M2 = proliferación celular. Figura representativa de 5 experimentos independientes.

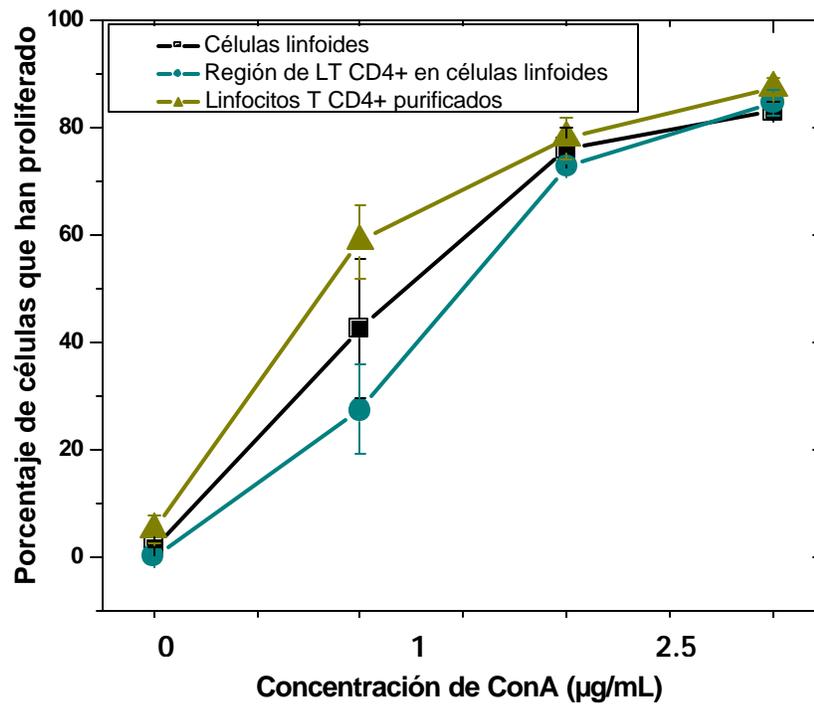
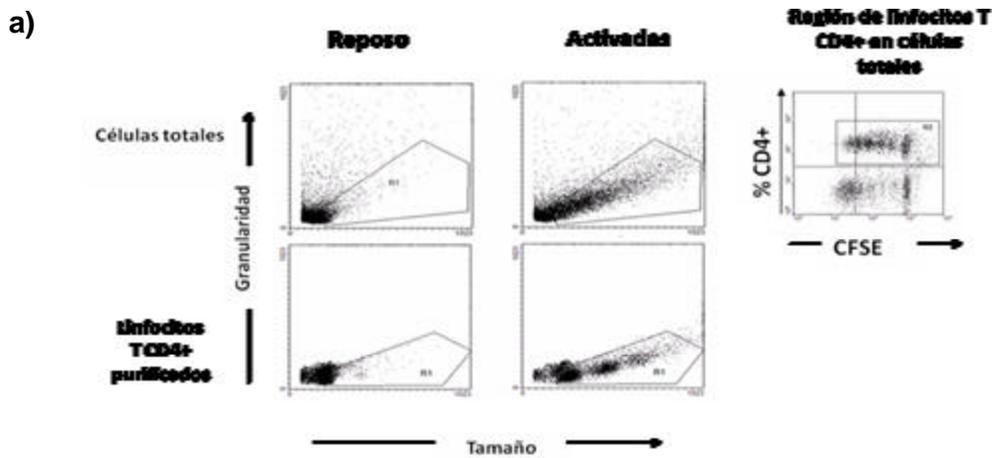


Figura 3 Análisis estadístico de la proliferación de células activadas con ConA. Se obtuvieron células linfoides de ganglios linfáticos y se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de concanavalina A. La gráfica representa la media \pm ErSd de los resultados en el que se indica el porcentaje de células que han proliferado. La concentración óptima de ConA fue de 2.5 μ g/mL, n = 5.



b)

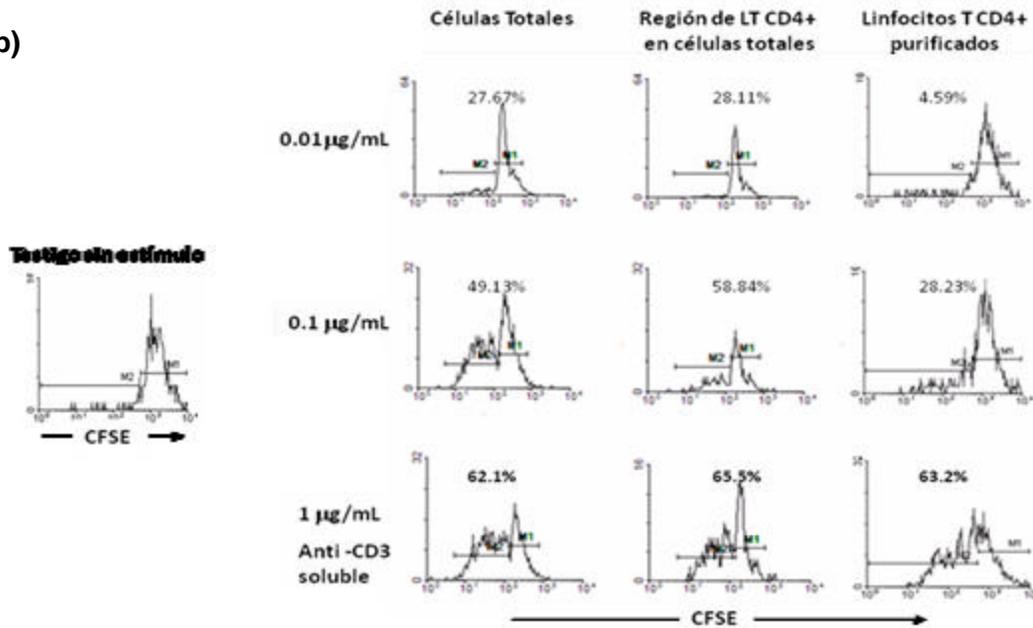


Figura 4. Análisis de la proliferación celular activando con diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CD3s. Se realizó un análisis por citometría de flujo de una doble fluorescencia de células linfoides de ganglio linfático y linfocitos T CD4+ de ratón. **a)** Gráficas de tamaño contra granularidad de las células en reposo y las activadas ConAnti-CD3s. Panel superior, células linfoides; en la extrema derecha se observa la región de linfocitos T CD4+. **b)** Panel inferior, linfocitos T CD4+ purificados mediante anticuerpos acoplados a perlas magnéticas. Porcentajes de proliferación celular con 0.01, 0.1 y 1µg del mitógeno en células tratadas con CFSE e incubadas con anticuerpos anti-CD4. El análisis representativo (histograma), de células estimuladas durante 72h de cultivo. M1 = células sin proliferación, M2 = proliferación celular. Figura representativa de 5 experimentos independientes.

purificados fue con 1 µg/mL de concentración, ya que con esta concentración se obtiene el mayor porcentaje de células que han proliferado (figura 5).

El análisis de las células correspondientes a las regiones de linfocitos y células en proliferación de acuerdo a su tamaño y granularidad, así como la región específica correspondiente a los linfocitos T CD4+ (figura 5a). En la figura 5b, se ejemplifica el

incremento en el porcentaje de linfocitos que proliferaron en respuesta a concentraciones crecientes de anticuerpo anti-CD3 inmovilizado (0.01, 1, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$). En la figura 7 se observa el análisis estadístico de la proliferación de células activadas con el anticuerpo anti-CD3p, el porcentaje de proliferación en células linfoides con 0.1 $\mu\text{g/mL}$ del estímulo fue de 9.6 ± 1.88 , en la región de linfocitos T CD4+ fue de 15.8 ± 6.73 y en linfocitos T CD4 purificados fue de 4.31 ± 3.12 . El porcentaje de las células linfoides activadas con 1 $\mu\text{g/mL}$ fue de 62.23 ± 4.56 , mientras que en la región de linfocitos T CD4+ fue 74.32 ± 7.25 y en linfocitos T CD4+ purificados se halló el $39.52\% \pm 5.1$. El porcentaje de proliferación con 5 $\mu\text{g/mL}$ en células linfoides fue de 70.58 ± 5.23 y en la región de linfocitos T CD4+ fue de 74.32 ± 7.13 y del $73.61\% \pm 4.87$ en linfocitos T CD4+ purificados. Respecto a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo anti-CD3p, el porcentaje de proliferación en células linfoides fue de 77.88 ± 0.76 , para la región de linfocitos T CD4+ fue de 82.33 ± 3.73 y en linfocitos T CD4+ purificados fue de 78.74 ± 3.46 . Por lo tanto, el óptimo porcentaje de proliferación celular ConAnti-CD3p es con la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ tanto en células linfoides, como en linfocitos T CD4+ purificados, debido a que no existe diferencia estadística con la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ del anticuerpo anti-CD3p. En todos los casos, el control sin estímulo mitogénico no presentó proliferación. Estos análisis se realizaron con una $n = 5$, los porcentajes están dados como media \pm error estándar.

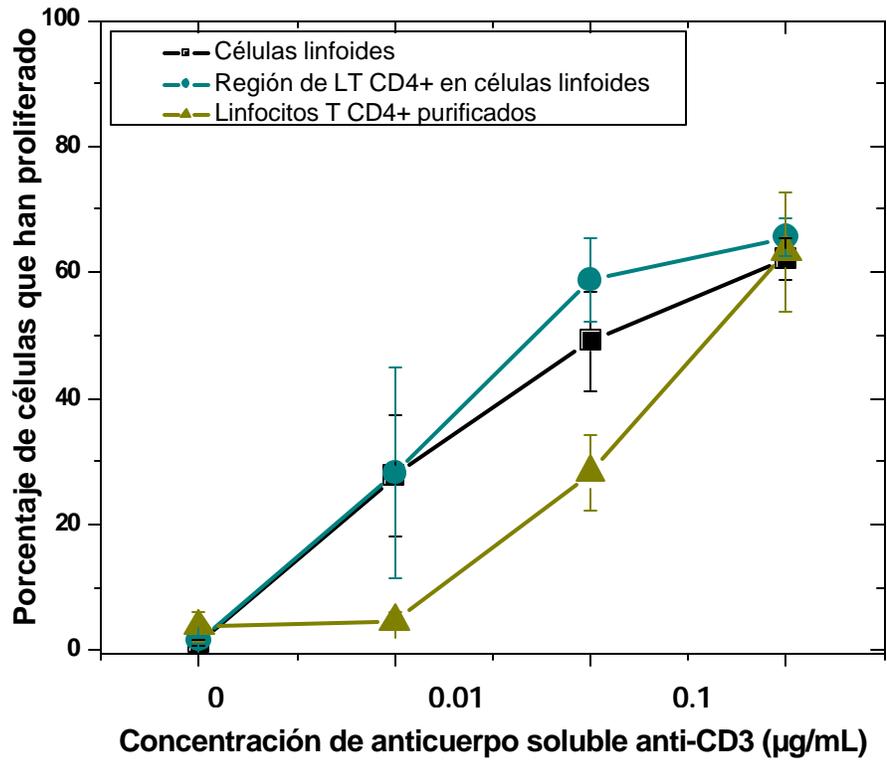


Figura 5 **Análisis estadístico de la proliferación de células activadas con anticuerpo anti-CD3 soluble.** Se obtuvieron células linfoides de ganglios linfáticos y se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CD3 soluble. La gráfica representa la media \pm ErSd de los resultados en el que se indica el porcentaje de células que han proliferado. La concentración óptima de anticuerpo anti-CD3 soluble fue de 1µg/mL, n = 5.

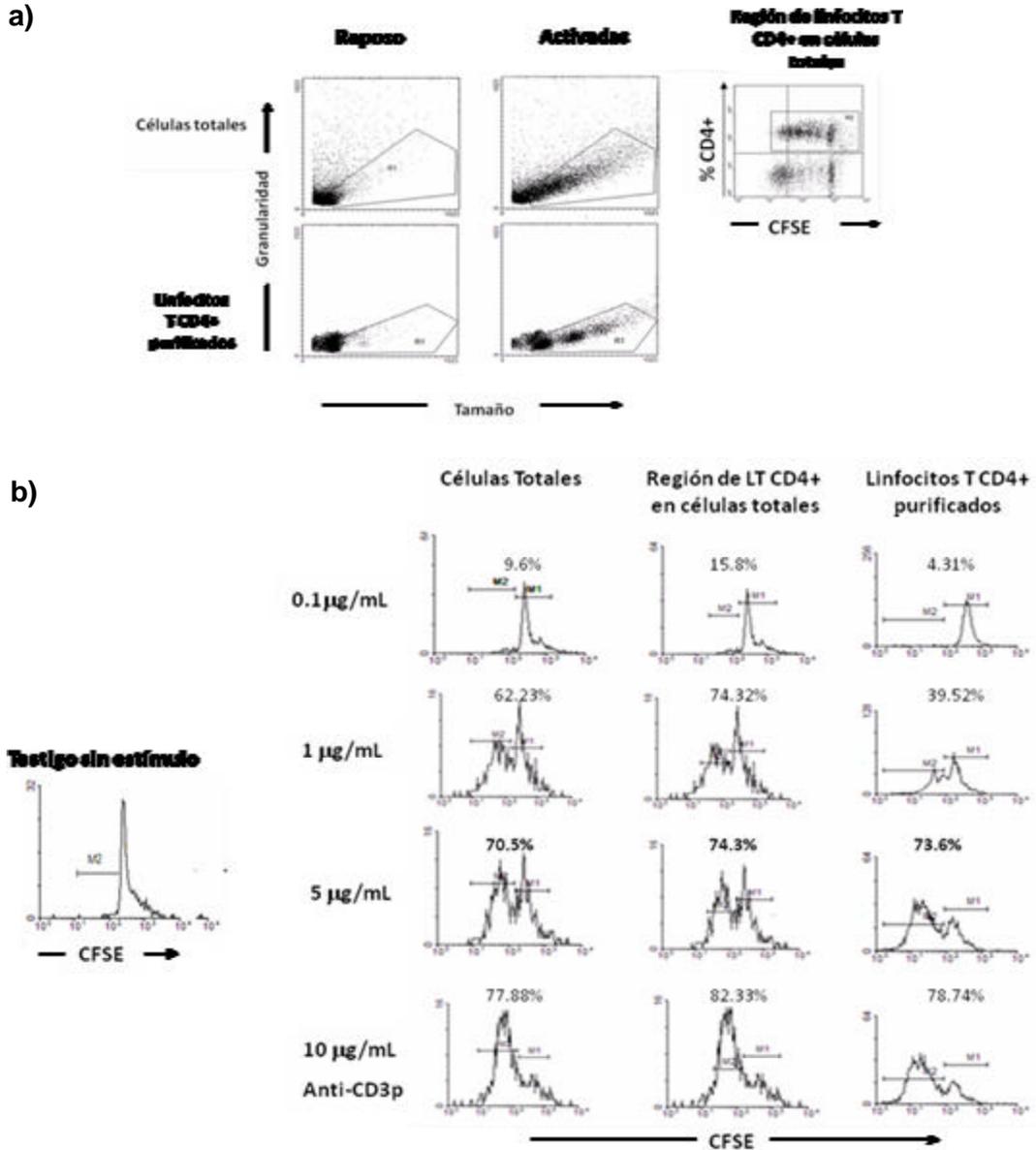


Figura 6. Análisis de la proliferación celular activando con diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CD3p. Se realizó un análisis por citometría de flujo de una doble fluorescencia de células linfoides de ganglio linfático y linfocitos T CD4+ de ratón. **a)** Gráficas de tamaño contra granularidad de las células en reposo y las activadas ConAnti-CD3p. Panel superior, células linfoides; en la extrema derecha se observa la región de linfocitos T CD4+. **b)** Porcentajes de proliferación celular con 0.1, 1, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ del mitógeno en células tratadas con CFSE e incubadas con anticuerpos anti-CD4.

El análisis representativo (histograma), de células estimuladas durante 72h de cultivo. M1 = células sin proliferación, M2 = proliferación celular. Figura representativa de 5 experimentos independientes.

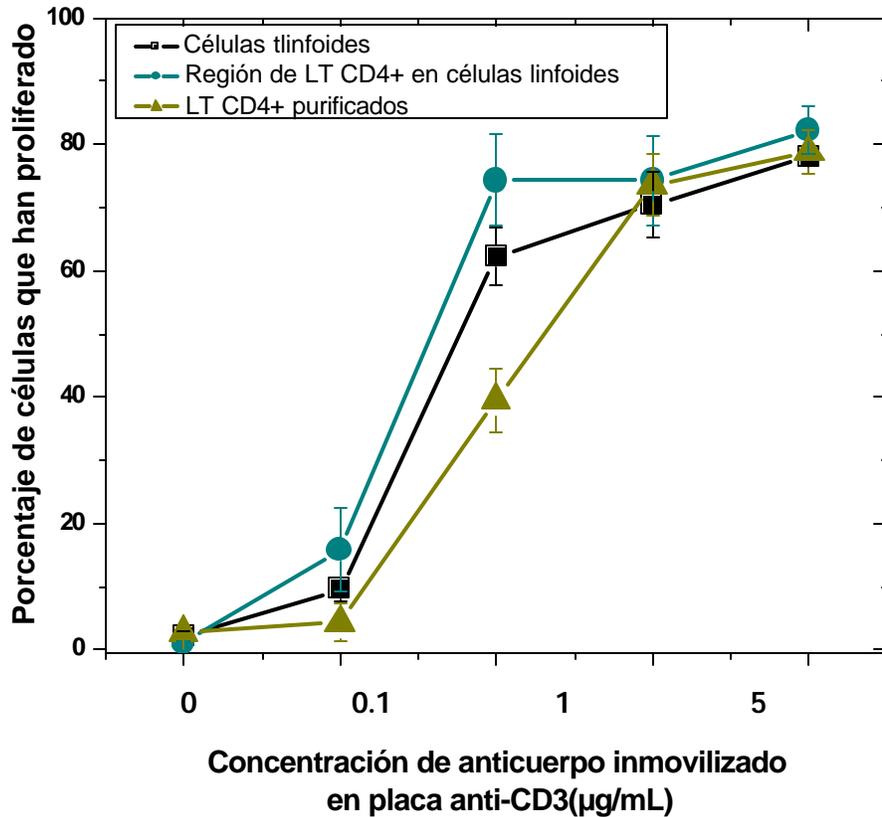


Figura 7. Análisis estadístico de la proliferación de células activadas con anticuerpo anti-CD3 inmobilizado en placa. Se obtuvieron células linfoides de ganglios linfáticos y se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpo anti-CD3 inmobilizado en placa. La gráfica representa la media \pm ErSd de los resultados en el que se indica el porcentaje de células que han proliferado. La concentración óptima de anticuerpo anti-CD3 soluble fue de 5µg/mL, n = 5.

Reconocimiento de ALL en células activadas.

El siguiente objetivo a realizar fue la cinética de expresión del ALLr en cultivos de células linfoides de ganglio linfático y en linfocitos T CD4+, durante 24, 48 y 72h, los cuales fueron estimulados con ConA, anticuerpo anti-CD3s y anti-CD3p. El análisis se realizó mediante citometría de flujo; en la figura 8a se muestra un análisis representativo de la proliferación celular de células tratadas con CFSE, así como el reconocimiento del ALL en células activadas con ConA (2.5 µg/mL) a 72h de cultivo. En la figura 8b se observa la región de linfocitos obtenida mediante tamaño y granularidad (región 1) y la subpoblación de linfocitos T mediante su expresión de CD4 (región 2). El reconocimiento de ALL en la región de linfocitos T CD4+ de células linfoides activadas con ConA (2.5 µg/mL) se mostró que el porcentaje de ALLr a 24 h de cultivo fue de 4.38 ± 4.8 , a las 48h fue de $22.13\% \pm 3.9$ y a las 72h de cultivo el porcentaje fue de 65.59 ± 7.3 . A diferencia de lo anterior, en los linfocitos T CD4+ purificados activados con ConA se halló que el porcentaje de ALLr a 24h de cultivo fue de 8.41 ± 0.56 , a las 48h se presentó un porcentaje de 7.55 ± 0.25 y a las 72h el porcentaje fue de 4.72 ± 0.86 . En la figura 9a se compara la cinética de expresión del ALLr entre la región de linfocitos T CD4+ versus linfocitos T CD4+ purificados, donde se observa que el valor de $p=0.0339$ a las 48h de cultivo y de $p=0.0019$ a las 72h, demostrándose la diferencia estadística en dicha expresión. Respecto al porcentaje de células que expresan el ALLr en células linfoides de ganglio linfático activadas con ConA, se encontró que a 24h de cultivo el valor es de $51.35\% \pm 0.78$, el

porcentaje a 48h fue de 47.23 ± 5.61 y a las 72h de cultivo el valor es de $64.1\% \pm 7.5$. En cuanto a la expresión del ALLr en células linfoides depletadas de LT CD4+, a 24h de cultivo se halló el $41.95\% \pm 1.45$ a diferencia de lo encontrado a las 48h ($7.54\% \pm 0.28$) y a las 72h ($6.59\% \pm 0.61$) de cultivo, mostrándose en la figura 9b la diferencia estadística entre las células linfoides versus células linfoides depletadas de LT CD4+, ya que a 48h el valor fue $p=0.034$ y a las 72h de cultivo, $p=0.001$. La figura 10a muestra un análisis representativo de la proliferación celular de células tratadas con CFSE, así como el reconocimiento del ALL en células activadas con anticuerpo anti-CD3s ($1 \mu\text{g/mL}$) a 72h de cultivo. En la figura 10b se observa la región de linfocitos obtenida mediante tamaño y granularidad (región 1) y la subpoblación de linfocitos T mediante su expresión de CD4 (región 2). En la región de los linfocitos T CD4+ de células linfoides de ganglio linfático activadas con $1\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo anti-CD3 soluble, la expresión de ALLr a las 24h de cultivo fue de $5.78\% \pm 2.7$, mientras que el porcentaje a las 48h fue de 44.86 ± 5.1 y a las 72h de cultivo el porcentaje disminuyó a 22.51 ± 4.5 . Referente a los linfocitos T CD4+ purificados el porcentaje reconocido por ALL a las 24h de cultivo fue de 15.6 ± 0.5 , a las 48h el valor fue de $19.02\% \pm 0.69$, decayendo el porcentaje a $9.44\% \pm 0.34$ a las 72h de cultivo. La diferencia estadística entre la región de LT CD4+ en células linfoides versus LT CD4+ purificados se observa a las 48h y 72h, con $p=0.033$ y $p=0.014$ respectivamente (Fig. 11a). Las células linfoides de ganglio linfático reconocidas por ALL mostraron un porcentaje de 45.13 ± 4.26 a las 24h, mientras que a las 48h fue de 65.26 ± 5.8 y a las 72h el porcentaje fue de 16.27 ± 5.9 , en comparación a b mostrado por las células linfoides depletadas de LT CD4+; cuyos porcentajes a las 24h fue de 39.22 ± 1.19 , a las 48h 20.07 ± 0.58 y a las 72h de 6.94 ± 0.27 . El análisis entre la región de células linfoides

versus células linfoides depletadas de LT CD4+, muestra diferencia estadística al inicio del cultivo con una $p=0.019$ y a las 72h con una $p=0.032$ (Fig. 11b).

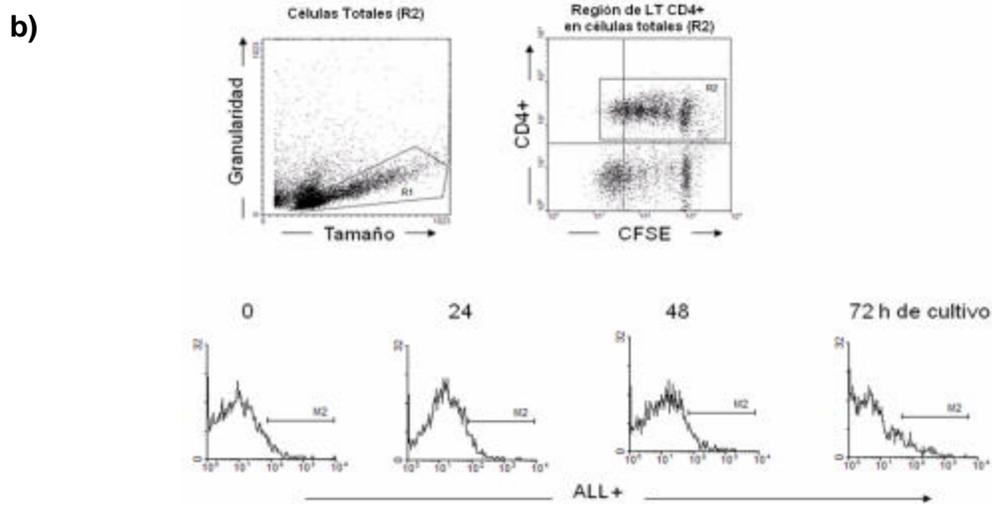
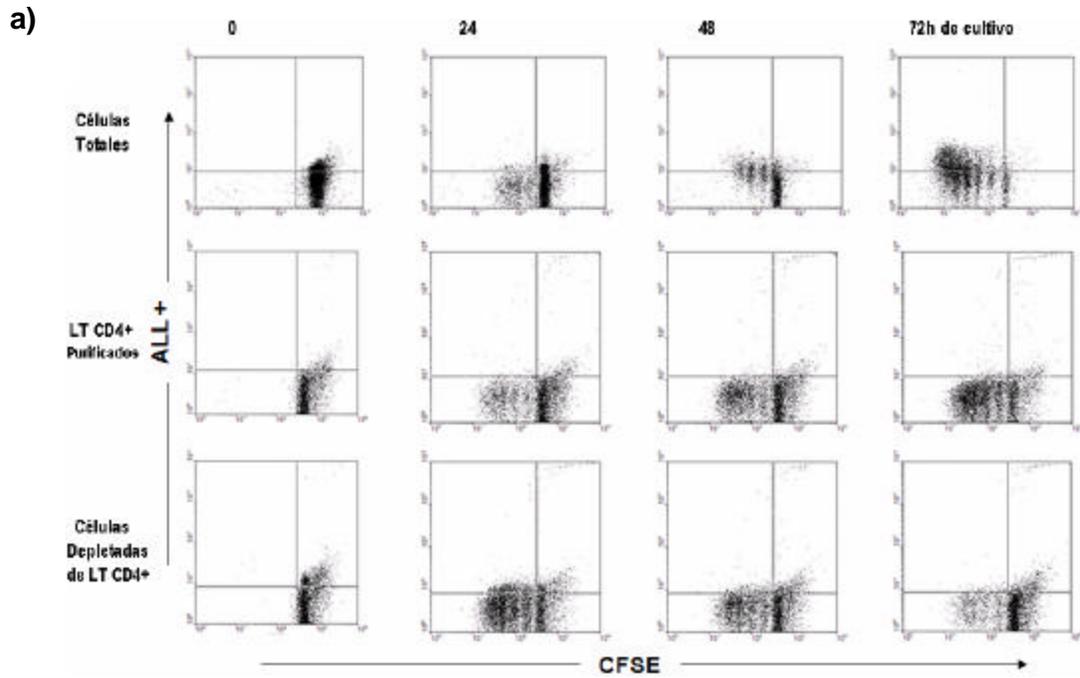
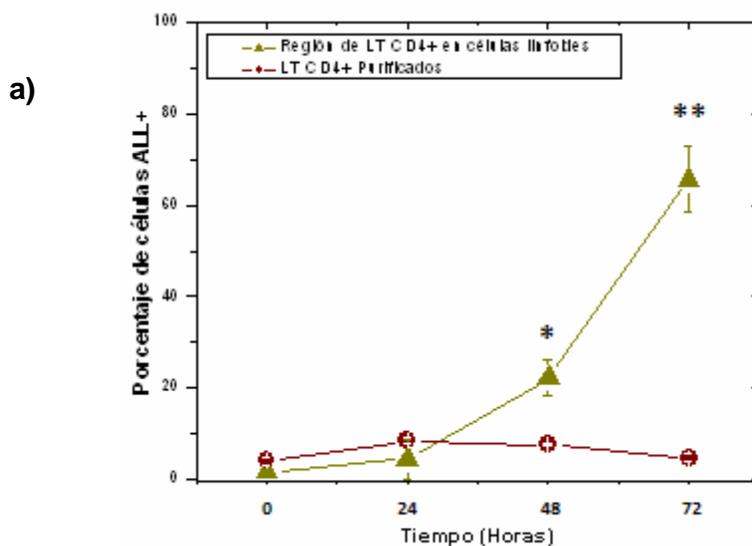


Figura 8 Reconocimiento de ALL en una cinética de células activadas procedentes de ganglio linfático axial. Análisis mediante citometría de flujo, **a)** células linfoides (panel superior), linfocitos T CD4+ purificados (panel intermedio) y células linfoides depletadas de LT CD4+ (panel inferior). **b)** gráfica de tamaño contra granularidad de células linfoides donde se observa la región de linfocitos, R1 (panel superior izquierdo); gráfica de doble fluorescencia de la región de linfocitos T CD4+, R2 (panel superior derecho); porcentaje de reconocimiento de ALL por linfocitos de la región R2 activados con 2.5µg de ConA durante 24, 48 y 72h de cultivo (panel inferior). Figura representativa de 5 experimentos realizados en forma independiente.



b)

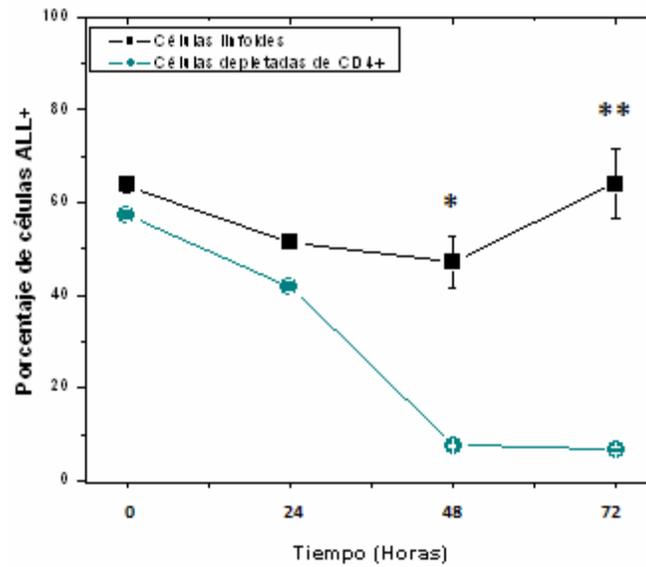
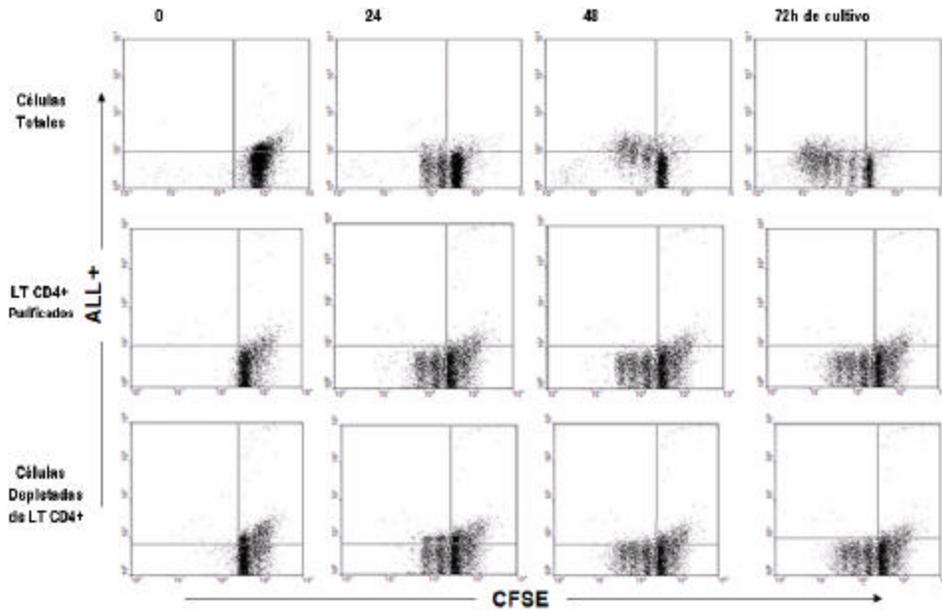


Figura 9. Análisis estadístico de la expresión del ALLr. Se obtuvieron células de ganglios linfáticos y se cultivaron en presencia de 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ConA. **a)** Gráfica de porcentaje de células reconocidas por ALL con respecto al tiempo; * $p=0.039$, ** $p=0.0019$; **b)** Gráfica de porcentaje de células reconocidas por ALL con respecto al tiempo; * $p=0.034$, ** $p=0.001$. Las gráficas representa la media \pm ErSd de los porcentajes de células ALL+. $n=5$.

a)



b)

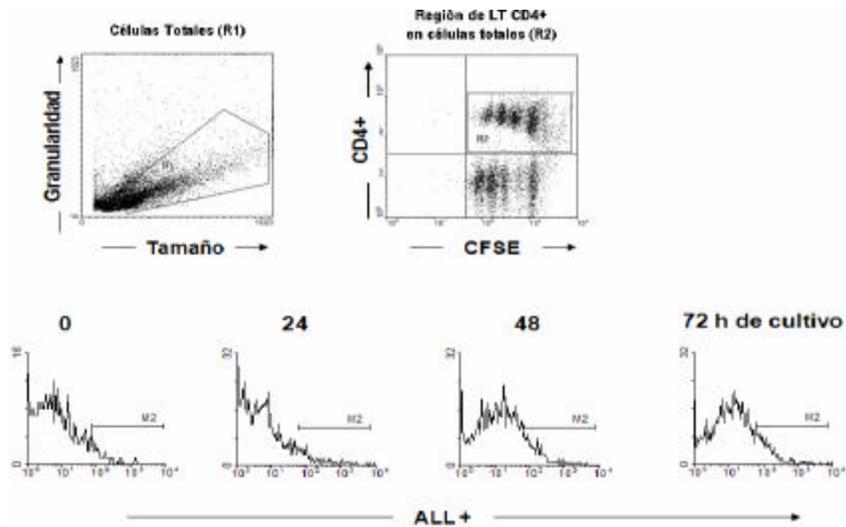


Figura 10. Reconocimiento de ALL en una cinética de células activadas procedentes de ganglio linfático axial. Análisis mediante citometría de flujo, **a)** células linfoides (panel superior), linfocitos T CD4+ purificados (panel intermedio) y células linfoides depletadas de LT CD4+ (panel inferior). **b)** gráfica de tamaño contra granularidad de células linfoides donde se observa la región de linfocitos, R1 (panel superior izquierdo); gráfica de doble fluorescencia de la región de linfocitos T CD4+, R2 (panel superior derecho); porcentaje de reconocimiento de ALL por linfocitos de la región R2 activados con 1 μ g de

anticuerpo anti-CD3s durante 24, 48 y 72h de cultivo (panel inferior). Figura representativa de 5 experimentos realizados en forma independiente.

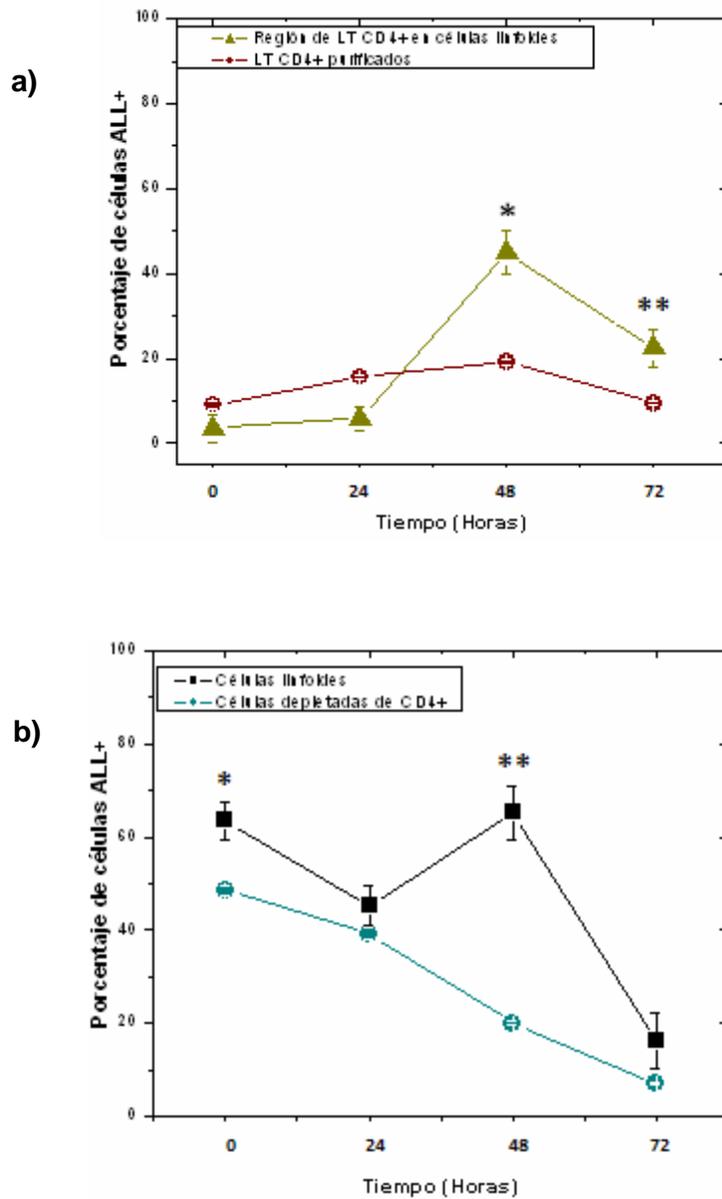


Figura 11. Análisis estadístico de la expresión del ALLr. Se obtuvieron células de ganglios linfáticos y se cultivaron en presencia de 1 µg/mL de anti-CD3s. a) Gráfica de porcentaje de células reconocidas

por ALL con respecto al tiempo $*p=0.033$, $**p=0.014$; **b)** Gráfica de porcentaje de células reconocidas por ALL con respecto al tiempo $*p=0.019$, $**p=0.032$. Las gráficas representan la media \pm ErSd de los porcentajes de células ALL+. n=5.

El análisis representativo de la proliferación celular de células tratadas con CFSE, así como el reconocimiento del ALL en células activadas con anticuerpo anti-CD3p (1 μ g/mL) a 72h de cultivo se observa en la figura 12a.

En la figura 12b se observa la región de linfocitos obtenida mediante tamaño y granularidad (región 1) y la subpoblación de linfocitos T mediante su expresión de CD4 (región 2). La expresión del ALLr en la región de linfocitos T CD4+ de células linfoides de ganglio linfático activadas con 5 μ g/mL de anti-CD3 inmovilizado en placa, a las 24h mostró un porcentaje de 7.58 ± 5.3 , a las 48h el valor fue de $50.18\% \pm 11.9$ y el porcentaje encontrado a las 72h fue de 42 ± 14.5 . Con respecto al reconocimiento de ALL por linfocitos T CD4+ purificados fue de $18.25\% \pm 4.67$ a las 24h, decayendo $16.94\% \pm 1.19$ y a $9.23\% \pm 3.76$ a las 48 y 72h respectivamente. En el análisis mostrado en la Fig. 13a se observa la diferencia estadística entre las células linfoides versus linfocitos T CD4+ purificados a las 48h con una $p=0.039$ y con una $p=0.020$ a las 72h de cultivo comparando con el obtenido a las 24 horas de cultivo. Respecto a la expresión de ALLr en células linfoides de ganglio linfático, el porcentaje a las 24h fue de 55.71 ± 17.1 , mientras que a las 48h fue de $50.35\% \pm 17.4$, disminuyendo a $34.18\% \pm 18.7$ a las 72h. Finalmente, la expresión del ALLr en las células linfoides depletadas de LT CD4+ a las 24h fue de $42.52\% \pm 6.09$, a las 48h se halló el $19.1\% \pm 3.91$, decayendo a $6.49\% \pm 6.3$ a las 72h de cultivo. En la Fig. 13b se muestra la diferencia estadística entre las células linfoides

versus las células linfoides depletadas de LT CD4+ al inicio del cultivo, con una $p=0.029$ y a las 48h con una $p=0.032$ y a las 72h con una $p=0.03$.

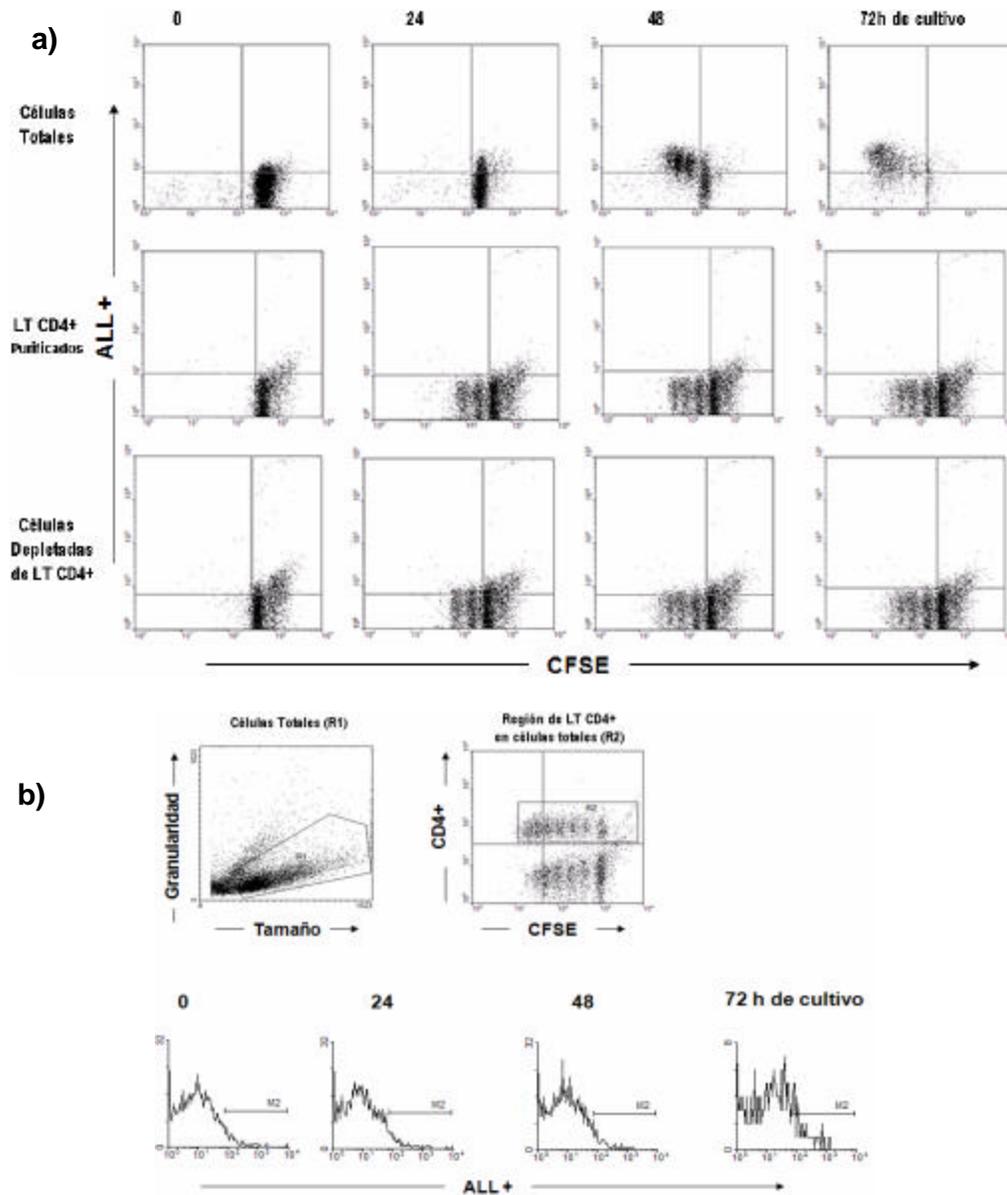
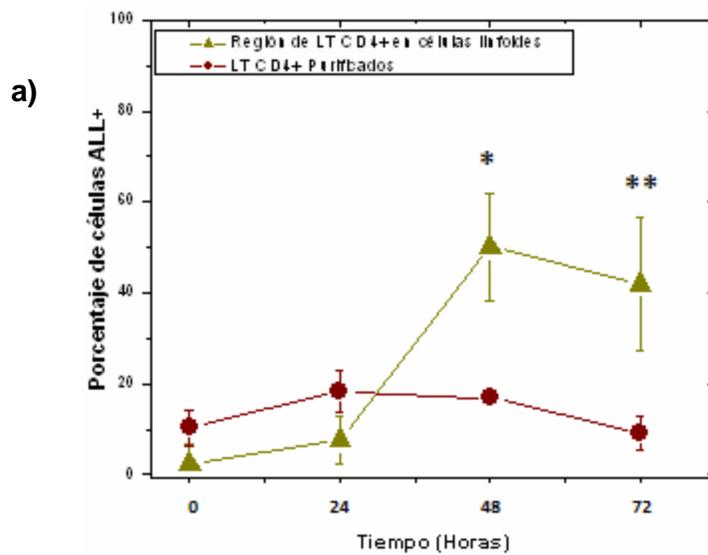


Figura 12. Reconocimiento de ALL en una cinética de células activadas procedentes de ganglio linfático axial. Análisis mediante citometría de flujo, **a)** células linfoides (panel superior), linfocitos T

CD4+ purificados (panel intermedio) y células linfoides depletadas de LT CD4+ (panel inferior). **b)** gráfica de tamaño contra granularidad de células linfoides donde se observa la región de linfocitos, R1 (panel superior izquierdo); gráfica de doble fluorescencia de la región de linfocitos T CD4+, R2 (panel superior derecho); porcentaje de reconocimiento de ALL por linfocitos de la región R2 activados con 1 μ g de anticuerpo anti-CD3p durante 24, 48 y 72h de cultivo (panel inferior). Figura representativa de 5 experimentos realizados en forma independiente.



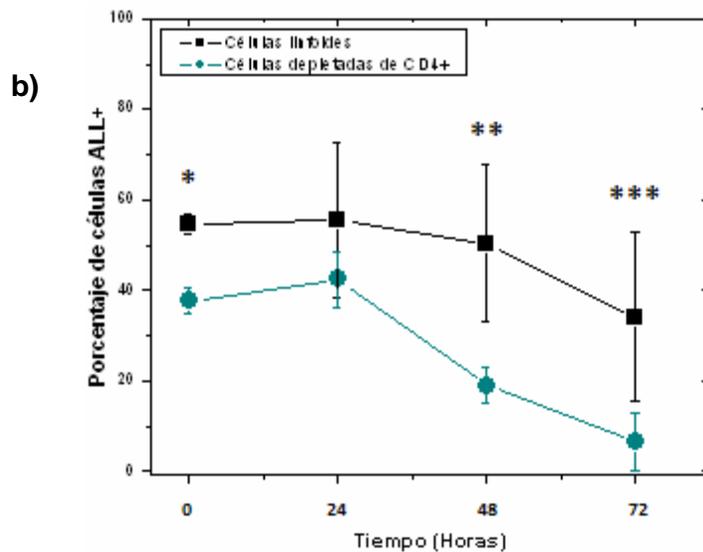


Figura 13. **Análisis estadístico de la expresión del ALLr.** Se obtuvieron células de ganglios linfáticos y se cultivaron en presencia de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-CD3p. **a)** Gráfica de porcentaje de células reconocidas por ALL con respecto al tiempo; * $p=0.039$, ** $p=0.0209$; **b)** Gráfica de porcentaje de células reconocidas por ALL con respecto al tiempo; * $p=0.029$, ** $p=0.032$, *** $p=0.030$. Las gráficas representa la media \pm ErSd de los porcentajes de células ALL+. $n=5$.

IX. DISCUSIÓN

Gran parte de las glicoproteínas que se encuentran en la superficie de los linfocitos y que están involucrados en mecanismos de cooperación celular, contienen uniones de tipo O-glicanos [29]; el estudio y caracterización de estas moléculas ha permitido entender algunos de los mecanismos; una herramienta importante para el estudio de estas glicoproteínas son las lectinas ya que en ocasiones se pueden detectar cambios estructurales ocurridos en la interacción celular, así como también se han usado para analizar la distribución subcelular de oligosacáridos y carbohidratos terminales

expuestos en glicoproteínas, además de detectar alteraciones en la expresión de estas moléculas [14-15,18]. En este trabajo, se utilizó una lectina aislada de la semilla de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) que identifica una O-glicoproteína de 70 KDa (ALLr) en la superficie de linfocitos T de órganos linfoides murinos [4]. Dicha glicoproteína no muestra homología en la secuencia de sus aminoácidos con respecto a los marcadores fenotípicos reportados en linfocitos [24]. Los resultados mostraron mediante análisis por citometría de flujo que los linfocitos T CD4+ y CD8+ en reposo, provenientes de órganos linfáticos expresan en diferentes porcentajes la molécula reconocida por ALL. En el caso de los LT CD8+ la expresión del ALLr es muy alta comparada con la expresión del ALLr en LT CD4+. Confirmando lo reportado por Ortiz et al en el 2002 [4] donde se observó que el 80% de los linfocitos T CD8+ expresaron la glicoproteína reconocida por ALL a diferencia de los linfocitos T CD4+ que solo un 20% lo reconoció. Estudios reportados sobre las variaciones en la glicosilación de los linfocitos T proponen que son debidas a un incremento en la síntesis de la ST3Gal sialiltransferasa y ST6GalNac-I sialiltransferasa [12, 30]. Asimismo, existen evidencias de que los O-glicanos de la superficie de linfocitos T vírgenes, sufren modificaciones en el patrón de expresión cuando estos linfocitos reconocen a su antígeno y son activados [28-30]; con base a estos reportes, se ha propuesto que la pérdida del ácido sialico del core 1 (SA α 2,3Gal β 1,3GalNAc-Ser/Thr) en la superficie celular durante la activación de los linfocitos T favorece la interacción del TCR con el antígeno [28, 31]. Demostrándose en estudios previos que los linfocitos T CD4+ en reposo tratados con neuraminidasa incrementan la unión del ALL un 60-73%. Sin embargo, dicho fenómeno no sucede en los linfocitos T CD8+, los cuales presentan un porcentaje similar antes y después del tratamiento con neuramidasa [9]. Otro suceso

relacionado a los cambios con la O-Glicosilación se observa durante la activación de linfocitos T con mitógenos, el cual induce cambios en los niveles de O-GlcNAc en las proteínas citoplasmáticas y nucleares [32]. En 1991, se demostró que los niveles de O-GlcNAc sobre varias proteínas citosolicas de los linfocitos T disminuyen en respuesta a la activación con ConA, regresando a su nivel basal pocas horas después, sin embargo esto no ocurre en las proteínas nucleares, ya que sus niveles de O-GlcNAc se incrementan después de la activación del linfocito T [32].

Debido a este tipo de evidencias y siendo este un evento selectivo que afecta a los glicanos de la superficie celular, decidimos determinar si existe alguna modificación en la expresión del ALLr en linfocitos T CD4+ de cultivos totales posterior a la activación con diversos estímulos, en donde nuevamente observamos que el patrón de expresión del ALLr es distinto al presentado por linfocitos T en reposo. Observamos un rápido incremento seguido por un decremento en la unión de la ALL; respecto a las células linfoides activadas con ConA, el mayor porcentaje de linfocitos T CD4+ALL+ fue a las 72h, lo cual no se observó en la activación ConAnti-CD3 soluble, ya que su máxima expresión fue a las 24h y la expresión de linfocitos T CD4+ALL+ activados ConAnti-CD3 inmobilizado en placa fue a las 48h de cultivo. Existen evidencias experimentales, donde han utilizado ConA y anticuerpos anti-CD3, debido a que las 2 comparten características semejantes, por ejemplo: 1) los dos imitan los efectos de interacción TCR activando a los linfocitos T, y 2) estos estímulos provocan cambios fisiológicos particularmente en timocitos [19]. También demuestran que el entrecruzamiento del TCR con ConA activa mecanismos de supervivencia, por una vía diferente al anticuerpo anti-CD3, debido a que ambos reconocen estructuras diferentes en el TCR [19], por ejemplo, ConA activa a los

linfocitos T uniendo glicoproteínas de la membrana celular, así como al complejo TCR-CD3; Sin embargo, se ha demostrado que los linfocitos T activados con ConA requieren de una señal coestimuladora separada, dada por el receptor B7 el cual se une a CD28 [33]; también se conoce que los linfocitos T activados en ausencia de coestimulación pueden permanecer en cultivo de 4 a 7 días, pero con características de células anérgicas, las cuales proliferan bien con la estimulación, además reportan que la presencia de IL-2 exógena en linfocitos T activados sin la coestimulación de CD28 o ICOS puede revertir esta inducción anérgica generando una función efectora [35]. Se conoce que anticuerpos específicos dirigidos al complejo TCR-CD3 proveen una importante vía de activación inicial, los anticuerpos anti-CD3 inducen la expresión de moléculas accesorias lo que provoca un entrecruzamiento del TCR en las células, llevándose a cabo la proliferación [1,2-31]; aunque se ha reportado que la estimulación de linfocitos T con lectinas mitogénicas y con anticuerpo Anti-CD3 inmovilizado se puede dar en ausencia de moléculas coestimuladoras [31], ya que al encontrarse así, las células se reacomodan favoreciendo la proliferación celular [1-2,19]; además de que se conoce que la estimulación con anticuerpo Anti-CD3 soluble da como resultado una proliferación inferior [31]. Sugiriéndose con esto, que la activación y proliferación de los linfocitos T esta modificada por el estímulo empleado, no obstante desconocemos si estos estímulos modifiquen el tiempo de expresión del ALLr. Sin embargo, el comportamiento en la expresión del ALLr en los linfocitos T CD8+, es similar al observado en los LT CD4⁺ en reposo (70%), disminuyendo esta expresión gradualmente (5%) a las 72h cuando los linfocitos T CD4⁺ han sido activados, suceso que se explica con lo reportado por Ortiz et al en el 2002 [4], donde observan que los linfocitos T CD8+ de células linfoides de ganglios

linfoides en reposo expresan el ALLr en un 80% pero al activarlas con ConA la expresión también disminuye a las 72h de cultivo. Por lo que posiblemente la expresión del ALLr hallada en linfocitos T CD4⁺ es proporcionada por los linfocitos T CD8⁺, concordando este porcentaje de expresión con el porcentaje en células linfoides de ganglios linfoides tanto en reposo como en células linfoides activadas; confirmando que el ALLr en células linfoides está expresada en las primeras horas de cultivo en los linfocito T CD8⁺ y que este porcentaje en la expresión de células linfoides se mantiene hasta las 72h en los LT CD4⁺.

Hasta el momento los resultados han mostrado que la expresión del ALLr en linfocitos T CD4⁺ de células linfoides en reposo es diferente a la que presentan linfocito T CD4⁺ de cultivos de células linfoides, los cuales fueron activadas con diferentes mitógenos; sin embargo, se desconocía si el ALLr se expresaba en linfocitos T CD4⁺ purificados, los cuales solo han tenido contacto con diferentes estímulos de activación, debido a esto, mediante un análisis por citometría de flujo, nosotros encontramos que el 18% de expresión del ALLr en linfocitos T CD4⁺ purificados y activados con diferentes estímulos, se encuentra expresado de forma semejante a linfocitos T CD4⁺ de células linfoides, cuando estas se encontraban en reposo. En un estudio previo [4], aislaron linfocitos T CD4⁺ y los cultivaron en presencia de células CD3⁻ activándolas con ConA durante 24, 48 y 72h de cultivo, reportando que los linfocitos T CD4⁺ de células linfoides y linfocitos T CD4⁺ purificados en co-cultivo con células CD3⁻ expresan el ALLr en porcentaje similar, en un 60% (24h) y un 62% (48h), respectivamente; esta variación en la expresión del ALLr en linfocitos T CD4⁺ purificados probablemente este dada por cooperación celular, ya que el papel del ALLr en dichas células podría estar implicado en procesos de activación

celular, presentación o solamente como un estabilizador en la interacción célula con célula durante la sinapsis inmunológica (SI); ya que está establecido que durante el proceso de presentación antigénica, el linfocito T reconoce mediante su TCR al antígeno presentado por la APC, ocasionándose una unión altamente específica, pero de baja afinidad estabilizada por medio de moléculas coestimuladoras [7-8]; estas moléculas por ser receptores oscilan entre estados de alta y baja afinidad con sus respectivos ligandos [1-2, 8] produciendo un cambio conformacional en el dominio extracelular que afecta la función de las células, lo que ocasiona cambios intracelulares en el citoesqueleto o en su composición química [6]. Sin embargo, en la sinapsis inmunológica formada por los linfocitos T CD4+ y las células dendríticas (DCs) se ha demostrado que en ausencia de antígeno y de moléculas MHC, se dan cambios de morfología, movilidad, adhesión, proliferación y sobrevivencia en el linfocito T [36]; por ejemplo la coestimulación de linfocitos T murinos vía CD3/CD28 estabiliza la expresión del ligando de CD40 y se ha demostrado que los linfocitos T estimulados de esta manera expresan altos niveles de CD40L si son activados en presencia de linfocitos B, fenómeno que no se observa si solo son activados con anticuerpo Anti-CD3 [42]. En relación a esto, se conoce que los ganglios linfáticos son los órganos en que se inician las respuestas inmunitarias adaptativas a los antígenos transportados por la linfa, estos órganos están formados por una corteza externa, en donde suelen estar cercanos entre sí linfocitos T (70% son LT CD4+) con CPAs (células dendríticas y macrófagos) y por linfocitos B localizados en la medula [1-2,37-38]. Por lo que proponemos que la expresión del ALLr depende de una cooperación celular la cual puede estar dada por linfocitos B o células dendríticas, así como también proponemos que la expresión del ALLr en linfocitos T CD4+ purificados

podría darse si estas células se estimulan con CD3/CD28. Sin embargo resulta evidente que se requiere de otro tipo de ensayos para poder confirmarlo, ya que esto es necesario para dilucidar la participación del ALLr en procesos de activación y cooperación celular.

X. CONCLUSIONES

- Los linfocitos T CD4+ en reposo expresan del 5 al 15% de la molécula reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus*.
- Los linfocitos T CD4+ activados expresan del 50-80% de la molécula reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus*.
- La expresión de la molécula reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* en linfocitos T CD4+ depende de otras poblaciones celulares.

IX. REFERENCIAS

- [1] Abbas K., Lichtman A. Cellular and Molecular immunology. Elsevier science. 2004.
- [2] Roitt I., Brostoff J., Male D. Inmunología. Quinta edición. Harcourt. 2000.
- [3] Freire T., Robello C., Casaravilla C., Álvarez D., Medeiros A., Carmona C., Osinaga E. Antígenos mucínicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos. *Actas de fisiología*. 8 (2002): 89-107.
- [4] Ortíz B., Porrás F., Jiménez-Martínez MC., Montañó L.F., Martínez-Cairo S., Lascurain R., and Zenteno E. Differential expression of a 70 kDa O-glycoprotein on T cells: a possible marker for naive and early activated murine T cells. *Cel. Immunol.* 218 (2002):34-45.
- [5] Rudd P., Wormald M., Dwek R. Sugar-mediated ligand-receptor interactions in the immune system. Review. *Trends in Biotechnology*. 22 (2004):524-30.
- [6] Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 System of T Cell Costimulation. *Annu Rev Immunol.* 14 (1996):233-58.
- [7] Schwartz RH. Costimulation of Lymphocytes: The Role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in Interleukin-2 Production and Immunotherapy. *Cell.* 71(1992):1065-68.
- [8] Bluestone JA, Khattri R, van Seventer GA. Accessory Molecules. In: Paul WE, Ed. *Fundamental Immunology*. Fourth Edition ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, (1999) 449-78.
- [9] Toscano M., Ilarregui J., Bianco G., Rubinstein N., Rabinovich G. Interacción entre proteínas y glicanos en la regulación fisiológica de las células T. *Medicina* 66 (2006): 357-362.
- [10] [Gagneux P, Varki A.](#) Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology*. Review. 9 (1999):747-55.

- [11] Jiménez M., Trejo H., Herrera A., Romero JL., Chávez R., Lascurain R., Zenteno E. Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas. Rev. Inst. Nal Enf Resp Mex. 15(2002): 39-47.
- [12] Sewell R., Bäckström M., Dalziel M., Gschmeissner S., et al. The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer. J. Biol Chem. 281(2006): 3586-3594.
- [13] Agrawal B., Longenecker M. Muc1 mucin-mediated regulation of human T cells. Inter. Immunol 17(2005): 391-399.
- [14] Peacock J. S., Colsky A. S., Pinto V. B. Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions, J. Immunol. Methods 126 (1990):147-157.
- [15] Lis, H., Sharon, N. Lectins as molecules and as tools. Ann. Rev. Biochem. 55 (1986):35-67.
- [16] Hellstrom U, Hammarstrom M. L, Hammarstro, S., Permann P. Fractionation of human lymphocytes on Helix pomatia a hemagglutinin-sepharose and wheat germ agglutinin-sepharose. Methods Enzymol.108 (1984):153-68.
- [17] Lis H, Sharon N. Lectins: Carbohydrate- Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. Science Chem. Rev. 98 (1988):637-674. .
- [18] Gillespie, W., Paulson, J.C., Kelm, S., Pang, M., Baum, L.G., Regulation of α 2,3-sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin (PNA⁺) to PNA⁻ phenotype in developing thymocytes. J. Biol. Chem. 268 (1993):3801-3811.

- [19] J Pongracz , S Parnell, G Anderson, J Jaffrézou, E Jenkinson. ConA activates an Akt/PKB dependent survival mechanism to modulate TCR induced cell death in double positive thymocytes. *Mol. Immunol* 39 (2003):1013–1023.
- [20] Hernández P., Pérez E., Martínez L., Ortiz B., Martínez G. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *REB.* 24 (2005): 21-27.
- [21] Lascurain R., Chavez R., Gorocica P., Perez A., Montaña L.F., Zenteno E., Recognition of CD4+ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin, *Immunology.* 83(1994):410-413..
- [22] Álvarez G, Lascurain R, Hernández P, Tetaert D, Degand P, Gorocica P, Espinosa B, Zenteno E, Chávez R. Differential O-glycosylation in cortical and medullary thymocytes. *Bioch et Biophys Acta.* 1760 (2006):1235-1240.
- [23] Gorocica P, Lascurain R, Hernández P, Porras F, Bouquelet S, Vázquez L, Zenteno E. Isolation of the receptor for *Amaranthus Leucocarpus* lectin from murine peritoneal macrophages *Glycoconjugate J.* 15 (1998):809-814.
- [24] Porras, F., Lascurain, R., Chávez, R., Ortíz, B., Hernández, P., Debray, H., Zenteno, E., Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine naive thymocytes. *Glycobiology.* 10 (2000):459-465.
- [25] De Nadal E, Zapater M, Alepuz PM, Sumoy L, Mas G, Posas F: «The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoreponsive genes», *Nature.* 427 (2004): 370-374.
- [26] Zenteno, E., Lascurain, R., Montaña, L.F., Debray, H., Montreuil, J., Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj. J.* 9 (1992): 204-208.

- [27] Maldonado G, Gorocica P, Agundis C, Perez A, Molina J, Zenteno E. Inhibition of phagocytic activity by the N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Amaranthus leucocarpus*. *Glycoconjugate J.* 15 (1998):615-622.
- [28] Hernandez J., Klein J., Van Dyken SJ., Marth JD., Baum LG. T-cell activation results in microheterogeneous changes in glycosylation of CD45. *Int Immunol.* 19(2007): 847-56.
- [29] Tsuboi S., Fukuda M. Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. *BioEssays* 23 (2001):46-53.
- [30] Daniels Mark A., Hogquist Kristin A., Jameson Stephen C. Sweet ´n´ sour: the impact of differential glycosylation on T cell response. *Nature immunol.* 3(2002): 903-10.
- [31] Trickett A., Kwan Y. L., T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of immunological methods.* 275 (2003):251-255.
- [32] Kearse K. P., Hart G. W., Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88 (1991):1701-1705.
- [33] Amado M., Yan Q., Comelli E., Collins B., Paulson J., Peanut agglutinin high phenotype of activated CD8+ T cells results from de novo synthesis of CD45 glycans. *J. Biol. Chem.* 279(2004):366-89.
- [34] Perrin P., Davis T., Smoot D., Abe R., June & K. Mitogenic stimulation of T cells reveals differing contributions for B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulation. *P. Immunology.* 90(1997): 534-542.
- [35] Nurieva R., Thomas S., Nguyen T., Martin-Orozco N, Wang Y., Kaja M K., Yu Z X., Dong C. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *The EMBO Journal.* 25 (2006): 2623–2633.

- [36] Revy P., Sospedra M., Barbour B., and Trautmann A. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nature Immunology*. 2(2001):925-931.
- [37] Fu Y. X., D D Chaplin. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 17(1999):399–433.
- [38] [MacLennan IC](#). Germinal centers. [Annu Rev Immunol](#). 12(1994):117-39.
- [39] Crocker P. R., Paulson J. C., Varki A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nature reviews immunology*. 7(2007): 255-66.
- [40] Frauwirth K., Thompson CB. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *Journal Clin. Invest.* 109 (2002): 295-9.
- [41] Jago CB., Yates J., Camara N, Lechler R., Lombarda G. Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. *Clin. Exp. Immunol.* 136(2004):463-71.
- [42] Johnson-Léger C., Christensen J., Klaus G. CD28 co-stimulation stabilizes the expression of the CD40 ligand on T cells. *International Immunology*. 10(1998): 1083–1091.
- [43] Johnson-Léger C., Christensen J., Holman M., Klaus G. Evidence for a critical role for IL-2 in CD40-mediated activation of naive B cells by primary CD4 T cells. [J Immunol](#). 161(1998):4618-26.
- [44] [McAdam A](#), [Chang T](#), [Lumelsky E](#), [Greenfield A](#), [Boussiotis A](#), [Duke-Cohan J](#), [Chernova T](#), [Malenkovich N](#), [Jabs C](#), [Kuchroo V](#), [Ling V](#), [Collins M](#), [Sharpe A](#), [Freeman G](#). Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. [J Immunol](#). 165(2000):5035-40.
- [45] [Altin J](#) and [Sloan E](#). The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. [Immunol Cell Biol](#). 75 (1997):430-45.

- [46] Swain S., Bradley L., Croft M., Tonkonogy S., Atkins G., Weinberg A., et al. Helper T-cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. *Immunol Rev.*123 (1991):115-144.
- [47] Berard M., Tough D. Qualitative differences between naive and memory T cells. *Immunology.* 106(2002): 127-138.
- [48] Horst E., Meijer C., Radaszkiewicz T., et al. Adhesion molecules in the prognosis of diffuse large cell lymphoma: expression of a lymphocyte homing receptor CD44, LFA-1 (CD11a/18) and ICAM(CD54). *Leukemia.* 4(1990):595-9.
- [49] Danial N., Korsmeyer S. Cell death: critical control points. *Cell.* 116 (2004):205-19.
- [50] Petruzzelli L., Takami M., Humes D. Structure and Function of Cell Adhesion Molecules. *Am J Med.* 106(1999): 467-475.
- [51] Ding L., Green J., Thompson C., Shevach E. B7/CD28-Dependent and-independent Induction of CD40 Ligand Expression. *The Journal of Immunology.* 155(1995): 51 24-51 32.
- [52] Furmanek A., Hofsteenge. Protein C-mannosylation: Facts and questions. *Acta Biochimica Polonica.* 47 (2000): 781-789.
- [53] Ortíz B. Estudio de un nuevo marcador O-glicosilado de linfocitos T murinos. Tesis Ciencias Biomedicas. UNAM. (2002): 1-57.
- [54] Nilson C. *Lectins Analytical Technologies.* ElServier. USA (2007): 1-457.