



Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“CARACTERIZACIÓN Y VALORACIÓN FUNCIONAL DE UNA
O-GLICOPROTEÍNA DE MEMBRANA, DURANTE LA RESPUESTA
INMUNE, EN LINFOCITOS T HUMANOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

MED. CIR. FRANCISCO JAVIER URREA RAMIREZ

MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM, EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS Y EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGIA, UIMI, IMSS, BAJO LA DIRECCION DEL DR. EDGAR ZENTENO GALINDO, DRA. BLANCA ORTIZ QUINTERO Y EL DR. FRANCISCO ANTONIO BLANCO FAVELA. ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO EN PARTE POR: CONACYT PROYECTOS 0113815 y 0129932, BECA CONACYT 186262, BECA IMSS 99375024 Y UNAM-PAPIIT IN212108.

Agradecimientos

A mi Madre: Por todo su esfuerzo y comprensión.

A mis Hermanos: José Luis, Artemisa y Nora: Por que sin ellos no hubiera logrado esto.
A Germán y Janelly: Por enriquecer mi vida.

Al Dr. Edgar Zenteno: Por dejarme ser parte de su grupo y enseñarme que lo más importante en la ciencia es la actitud y el conocimiento.

A la Dra. Ortiz: Por sus oportunas críticas y comentarios

Al Dr. Blanco y al Dr. Sánchez: Por su apoyo y valiosas aportaciones.

Al Dr. Lascurain, Dr. Chávez, Dr. Montaña y Dra. Agundis: Por sus valiosos comentarios y gran experiencia.

A mis Compañeros y Amigos: Jonathan Garfias, Diana Magaña, Carmen Lara, Alejandro Valenzuela, Daniel López, José Bátiz, Musel Tabares: Porque sus opiniones científicas y personales fueron de gran ayuda.

A mis compañeros de laboratorio: Paty, Mary, Leslie, Blanca, Toño, Fede, Noe, Alí: ¡Gracias por su ayuda!

A la Sra. Rosa Nieto: Por su excelente labor. ¡Muchísimas Gracias!,

Dedico esta Tesis; A mi hija *Alejandra* y a mi esposa *Fabiola* por apoyarme en tantas y tan variadas situaciones en el transcurso de la obtención de este doctorado.
¡Muchas gracias, las Amo!

INDICE

Abreviaturas	6
Índice de figuras y tablas	7
Resumen	9
Abstract	10
Introducción.....	11
Linfocitos T CD4 ⁺	11
Activación de Linfocitos T CD4 ⁺	11
Modificaciones postraduccionales	13
Glicosilación de proteínas	13
Cambios en la O-glicosilación de superficie de los Linfocitos T CD4 ⁺ activados	17
Antecedentes	21
Justificación.....	23
Planteamiento del problema	23
Hipótesis.....	24
Objetivo general y específicos.....	24
Material y métodos.....	26
Resultados.....	37
<i>Aislamiento del ALL-R</i>	37
<i>Métodos analíticos</i>	39
<i>Secuenciación de aminoácidos del ALL-r</i>	43
<i>Reconocimiento de LT CD4⁺ por ALL</i>	45

<i>ALL incrementa la proliferación y la expresión de CD25 en LT CD4⁺ activados por anticuerpos anti-CD3.</i>	49
<i>ALL incrementa la producción intracelular de IL-2 e IFN-γ de LT CD4⁺ activados por anticuerpos anti-CD3.</i>	52
<i>ALL incrementa la movilización de Ca²⁺ intracelular en los LT CD4⁺ activados por anticuerpos anti-CD3.....</i>	55
Discusión	57
Conclusiones.....	70
Perspectivas.....	71
Referencias	72
Anexo 1 Urrea et al. TJEM 2010	84
Anexo 2 Porras et al. BBA 2005	
Anexo 3 Urrea et al. Immunol. Invest. 2011	

ABREVIATURAS

MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
CPA	Célula presentadora de antígenos
TCR	Receptor de células T
kDa	Kilodalton
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GalNAc	N-acetilgalactosamina
Gal	Galactosa
Asp	Asparagina
Ser	Serina
Thr	Treonina
ALL	Lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i>
ALL-r	Receptor de la lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i>
PNA	Lectina de <i>Arachis hipogaea</i>
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
Con A	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CFDA-SE	Éster de succinimidil carboxifluorescein diacetate,
iCa^{2+}	Calcio intracelular

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.- Glicosilación de proteínas.....	15
Figura 2.- Tipos de O-glicanos	16
Figura 3. Modificaciones en la estructura oligosacáridica de la leucosialina (CD43)	20
Figura 4. Aislamiento del ligando para ALL a partir de linfocitos T, por cromatografía de afinidad..	38
Figura 5. Análisis electroforético del ligando para ALL aislado por cromatografía de afinidad.	40
Figura 6. Análisis cromatográfico del ALL-r usando una columna de intercambio iónico, en un sistema FPLC.	40
Figura 7. Electroforesis bidimensional del ALL-r	41
Figura 8. Porcentaje de carbohidratos del ALL-r..	42
Figura 9. Reconocimiento de LT CD4 ⁺ por ALL.....	47
Figura 10. Reconocimiento de LT CD4 ⁺ CD69 ⁺ y Ki-67 ⁺ por ALL.	48
Figura 11. ALL incrementa la proliferación en LT CD4 ⁺ activados por anticuerpos anti-CD3.....	50
Figura 12. ALL incrementa la expresión de CD25 en LT CD4 ⁺	

activados por anticuerpos anti-CD3..... 51

Figura 13. ALL incrementa la producción de IL-2 e IFN- γ de LT CD4⁺ activados por anticuerpos anti-CD3..... 53

Figura 14. ALL incrementa la movilización de Ca²⁺ intracelular de los LT CD4⁺ activados por anticuerpos anti-CD3..... 56

Figura 15. Modelo de la generación de ligandos sacarídicos del ALL (ALL-L) en LT CD4⁺ activados..... 68

Figura 16. Efecto de la ALL sobre los LT CD4⁺..... 69

Tabla 1.- Composición de carbohidratos del ALL-r..... 41

Tabla 2.- Composición de aminoácidos del ALL-r. 42

Tabla 3.- Secuencia de aminoácidos obtenida del ALL-r por MALDI-TOF. 44

Tabla 4.- ALL incrementa la producción de IL-2 e IFN- γ de los LT CD4⁺ activados por anticuerpos anti-CD3..... 54

RESUMEN

La activación del linfocito T CD4⁺ está asociada a cambios en la glicosilación de receptores celulares. La lectina *Amaranthus leucocarpus* (ALL) es específica para glicoproteínas O-glicosiladas conteniendo GalNAc α 1,0Ser/Thr o Gal β 1,3GalNAc. El objetivo de este trabajo es realizar la caracterización fenotípica de los linfocitos T (LT) reconocidos por esta lectina. En LT humanos se identificó que ALL reconoció 48.7 \pm 8.7% de las células T CD4⁺ en reposo y 81.2 \pm 3.3% de los LT CD4⁺ CD69⁺ activados, este reconocimiento se inhibió con GalNAc. Se purificó el ligando de ALL de LT humanos por cromatografía de afinidad con la lectina; ALL reconoce una glicoproteína de 70 kDa (ALL-r) con 20 % de carbohidratos. El análisis de carbohidratos del ALL-r sugirió que es una proteína principalmente O-glicosilada y el estudio de los péptidos trípticos de este receptor por espectrometría de masas (MALDI-TOF) no encontró identidad significativa con otras moléculas de membrana del LT (NCBI nr, ProFound 2004/06/01). La estimulación con 5 μ g/ml ALL (dosis optima), no indujo ningún efecto en LT CD4⁺, pero en LT estimulados con anticuerpos anti-CD3, la ALL incrementó significativamente la expresión de CD25 ($p=0.05$), la proliferación celular ($p=0.028$), la producción de IL-2 ($p=0.044$), de IFN γ ($p=0.045$), pero no de IL-4. Nuestros resultados sugieren que la ALL reconoce un patrón de O-glicosilación relacionado con LT CD4⁺ activados la cual participa en la potenciación del proceso de activación de una manera semejante a otras moléculas co-estimuladoras.

ABSTRACT

Activation of CD4⁺ T cells (LT) is associated with changes in glycosylation of cell receptors. *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) is specific for O-glycosylated glycoproteins containing GalNAc α 1, 0Ser/Thr or Gal β 1, 3GalNAc. ALL recognized 48.7 \pm 8.7% of LT CD4⁺ at rest and 81.2 \pm 3.3% of LT CD4⁺ CD69⁺ activated, this recognition was inhibited by GalNAc. In this work was purified the ALL ligand, the lectin recognizes a 70 kDa glycoprotein (ALL-r) with 20% carbohydrates. Carbohydrate analysis of the ALL-r suggested that is protein mainly O-glycosylated and the study of tryptic peptides of this receptor by mass spectrometry (MALDI-TOF) found no significant identity with other membrane molecules of LT (NCBIInr, ProFound 2004/06/01). Stimulation with 5 μ g/ml ALL (as optimal dose) showed no effect on LT CD4⁺; however, in LT stimulated previously with anti-CD3, ALL significantly increased the expression of CD25 ($p = 0.05$), cell proliferation ($p = 0.028$), the production of IL-2 ($p = 0.044$), of IFN γ ($p = 0.045$), but not IL-4. Our results suggest that ALL recognizes a pattern of O-glycosylation associated with LT CD4⁺ activated and that ALL can recognize an O-glycosidically linked protein which is involved in enhancing the activation process in a way similar to other co-stimulatory molecules.

INTRODUCCIÓN

Linfocitos T CD4⁺

El linfocito T CD4⁺ (LT CD4⁺) regula la respuesta inmunológica a través de interacciones celulares mediadas por receptores y por la secreción de citocinas. El LT CD4⁺ reconoce antígenos peptídicos de aproximadamente 15 aminoácidos de longitud acoplado sobre una molécula del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II) expresado por la célula presentadora de antígeno (CPA), lo que desencadena un proceso de activación del linfocito T. La activación del LT CD4⁺ genera divisiones mitóticas repetitivas (expansión clonal o proliferación), diferenciación a célula efectora y la secreción de citocinas. El LT CD4⁺ efector se clasifica por el tipo de citocinas que produce en TH1 y TH2. El TH1 produce principalmente IL-2 e IFN γ las cuales favorecen la respuesta inmunológica celular, mientras que el TH2 produce principalmente IL-4 e IL-10 que favorecen la respuesta inmunológica humoral (Feldmann et al., 1989; Trinchieri et al., 1996).

Activación de LT CD4⁺

La activación del LT CD4⁺ involucra interacciones celulares que requieren el reconocimiento de receptores de superficie del propio LT y la CPA. Así mismo, dicho proceso celular requiere de dos señales esenciales de estimulación que consisten en: i) el reconocimiento de complejo antígeno-MHCII sobre la CPA a través del receptor de antígenos de linfocitos T (TCR); ii) el reconocimiento de moléculas co-estimuladoras y sus ligandos expresados en la CPA (Nel, 2002;

Watts y DeBenedette, 1999). El reconocimiento del complejo antígeno-MHCII por parte del TCR induce una primera señal que genera señales intracelulares como la fosforilación de tirosinas y el incremento del calcio intracelular (Smith-Garvin et al., 2009). La interacción de moléculas co-estimuladoras y sus ligandos, como el CD28 y las moléculas B7, generan segundas señales que inducen activación, proliferación, secreción de citocinas, sobrevivencia celular, diferenciación de linfocitos T y la generación de células de memoria. La falta de señales mediadas por moléculas co-estimuladoras trae como consecuencia que el linfocito T muera por apoptosis o se convierta en una célula anérgica (Viola y Lanzavecchia, 1996; Carreno y Collins, 2002; Song et al., 2008). En general, las moléculas co-estimuladoras son incapaces de inducir la activación del linfocito T por si mismas, ya que requieren de la primera señal generada por la interacción del TCR con el complejo Ag-MHCII, sin embargo, tienen la capacidad de incrementar la potencia de las señales generadas por esta última.

Durante el proceso de activación, el linfocito T aumenta la expresión de otros receptores de superficie como el receptor de IL-2 (CD25) y el CD69, los cuales se expresan en baja densidad en los LT en reposo. (Biselli et al., 1992; Ziegler et al., 1993). Debido a lo anterior, la expresión de CD25 y CD69 se utiliza como marcador de activación de linfocitos T. El papel esencial de los receptores de superficie en las funciones del linfocito T ha llevado al estudio de la estructura y función de dichas moléculas. Prácticamente todos los receptores de superficie son de naturaleza glicoproteica, un tipo de modificación postraduccional, y pronto se

descubrió que hay cambios en el patrón de O-glicosilación de proteínas de superficie de linfocitos T que regulan diversos procesos celulares.

Modificaciones postraduccionales

Existen diversas modificaciones postraduccionales en las proteínas tales como glicosilación, fosforilación, sulfatación, ubiquitinación y rompimiento proteolítico. Estos tipos de modificaciones otorgan propiedades químicas diferentes, alteran el plegamiento de proteínas y en determinados casos su funcionalidad (Bekri, 2006; Sette, 2010). Existen dos tipos de modificaciones muy importantes por su alta incidencia, la glicosilación y la fosforilación. Esta última se lleva a cabo en los residuos de Serina, Treonina y Tirosina, se relaciona principalmente con la activación e inhibición de enzimas de diversas vías de señalización y la creación de sitios de anclaje para otras proteínas. En cuanto al proceso de glicosilación se puede decir que es un proceso enzimático que comprende la unión de azúcares a las proteínas y que se lleva a cabo en la mayoría de ellas. A continuación profundizaremos acerca del proceso de glicosilación el cual es tema central en este trabajo.

Glicosilación de proteínas

La glicosilación de proteínas es un proceso complejo que consiste en la unión enzimática de un residuo sacarídico a una proteína. En los mamíferos puede clasificarse en N-glicosilación y O-glicosilación de acuerdo al tipo de unión entre el azúcar y la proteína (**Figura 1**). La N-glicosilación se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y consiste en la unión de N-acetilglucosamina (GlcNAc) a una

Asparagina en la secuencia consenso Asparagina-X-Treonina. La O-glicosilación de proteínas se inicia por la unión de N-acetilgalactosamina (GalNAc) a la Serina (Ser) o Treonina (Thr) en el Aparato de Golgi (**Figura 1**). Los sitios susceptibles para la O-glicosilación pueden contener cercano un residuo de Prolina, aunque no es estrictamente necesario, además, se sabe que las adiciones sacarídicas son catalizadas por diversas glicosiltransferasas (Brockhausen et al., 2009). En el caso de la O-glicosilación, la GalNAc se adiciona a los residuos de Ser/Thr mediante la acción de la transferasa de α GalNAc para formar la primera estructura conocida como antígeno Tn (**Figura 2**). Posteriormente se adiciona Galactosa (Gal) al antígeno Tn en posición β 1-3, mediante la transferasa de Gal β 1-3 core 1 (C1GnT), para formar el núcleo 1 (“Core 1”) (Gal-GalNAc-Ser/Thr). A continuación puede haber otras modificaciones como la adición GlcNAc al residuo de GalNAc inicial pero en posición β 1-6 formando el núcleo 2 (Gal-(GlcNAc-)GalNAc-Ser/Thr) mediante la transferasa de GlcNAc β 1-6 core 2 (C2GnT). Existen hasta 8 tipos de núcleos diferentes los cuales son susceptibles de modificaciones en sus estructuras, dando como resultado una gran variedad de O-glicanos en las superficies celulares (**Figura 2**).

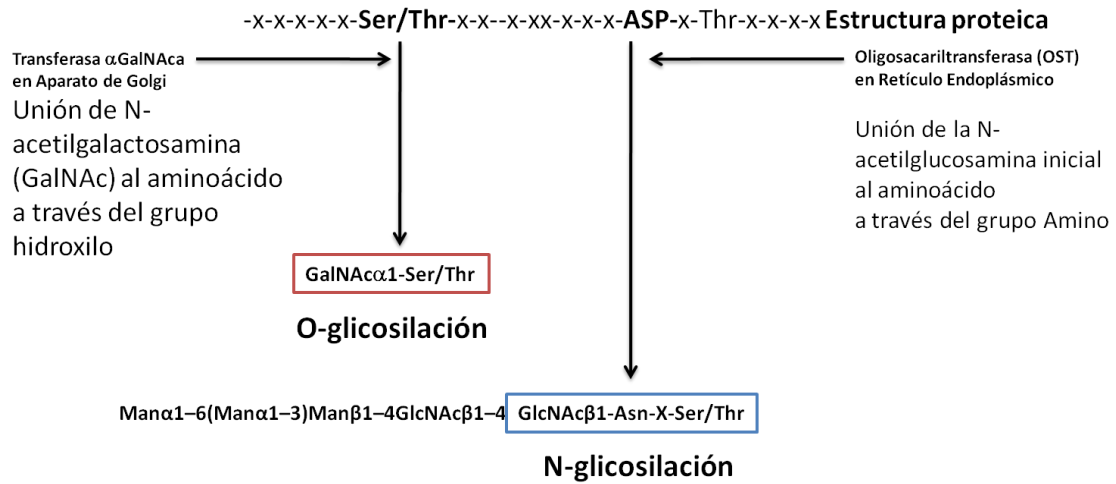


Figura 1. Glicosilación de proteínas. Unión sacarídica inicial de tipo O- y N-glicosídica.



Figura 2. Tipos de O-glicanos. Principales núcleos en O-glicanos.

Cambios en la O-glicosilación de superficie de los Linfocitos T CD4⁺ activados.

Desde los años 70's se han reportado cambios en el patrón de O-glicosilación de los linfocitos T durante el proceso de activación y desde esos primeros estudios se han utilizado lectinas como herramientas para analizar los oligosacáridos de superficie (Sharon et al., 2004). Las lectinas son proteínas de origen vegetal o animal que presentan la capacidad de unirse específicamente a cadenas oligosacáridicas. Esta característica de las lectinas ha sido utilizada para estudiar la relevancia de la glicosilación de superficie del linfocito T, así como para caracterizar y purificar subpoblaciones celulares, por ejemplo: la lectina de cacahuete (PNA) reconoce el OH en C4 de galactosa en estructuras O-glicosídicas (Pereira et al., 1976) y tiene la característica de diferenciar entre linfocitos T CD4⁺ efectores y de memoria (Galván et al., 1998), además ha sido utilizada en diferentes estudios para separar poblaciones celulares (Reisner et al., 1976; Hernandez et al., 2002); la lectina de *Vicia villosa* (VVL), reconoce también galactosa pero identifica principalmente a linfocitos T CD8⁺ (Fortune y Lehner, 1988). Otras lectinas han sido utilizadas para inducir señales de activación desde la membrana mediante el entrecruzamiento de receptores de superficie como la lectina Con A o PHA que reconocen residuos de manosa y lactosamínicos, respectivamente (Toscano et al., 2005; Galván et al., 1988; Ashraf y Khan, 2003).

Gracias a estos primeros estudios se descubrió que los linfocitos T maduros en el timo y en la periferia presentan ácido siálicos en el núcleo 1 de los O-glicanos debido a la acción de las enzimas α 2-3 y α 2-6 sialiltransferasa (ST3Gal-I y ST6Gal-I, respectivamente), y puede ser detectado por la lectina de *Sambucus*

nigra (SNA) y *Maackia amurensis* (MAA), que muestran afinidad por ácido siálico α 2,6 y α 2-3 respectivamente (Baum et al., 1996). Cuando el linfocito T se activa, se incrementa la actividad de la C2GnT y disminuye la expresión de ST3Gal-I y ST6Gal-I, lo cual favorece la síntesis del núcleo 2 de O-glicanos que carece de ácido siálico (Gillespie et al., 1993; Priatel et al., 2000; Comelli et al., 2006). Este núcleo 2 de O-glicanos es reconocido por la lectina del cacahuate PNA (Pereira et al., 1976) pero ya no es reconocida por SNA ni MAA (Baum et al., 1996), por lo que la PNA es utilizada actualmente como un marcador de linfocito T activados (Galván et al., 1988). El núcleo 2 de O-glicanos puede presentar residuos de lactosamina ([Gal β 1–4GlcNAc]_n), los cuales son ligandos preferentes de la galectina-1. La galectina-1 es una proteína endógena de la familia de las lectinas que regula la homeostasis inmunológica al reconocer estructuras glicosiladas en los linfocitos T activados induciendo la muerte por apoptosis (Perillo et al., 1997; Perillo et al., 1995; Pace et al., 2000).

Muchos de los cambios en la O-glicosilación reportados sobre la superficie de los linfocitos T han sido estudiados principalmente sobre las glicoproteínas CD43 y CD45. El CD43 es la sialoglicoproteína más abundante en los leucocitos y presenta una glicofoma de bajo peso molecular (115 kDa) con ácidos siálicos en su estructura la cual puede ser reconocida por el anticuerpo S7, y un glicofoma de mayor peso molecular (130-140 kDa), dicho cambio en el peso molecular es debido principalmente por la síntesis del núcleo 2 de los O-glicanos ramificado el cual es reconocido por el anticuerpo 1B11 y la lectina PNA. La glicofoma de 115 kDa es expresada por los linfocito T naive, mientras que los linfocitos T activados

expresan la glicofoma de 130 kDa, **Figura 3** (Piller et al., 1988; Bierhuizen y Fukuda, 1992; Carlsson et al., 1986; Saitoh et al., 1991). En las células T, CD43 induce múltiples señales que promueven la expresión génica, la progresión del ciclo celular y la regulación de la supervivencia celular (Allenspach et al., 2001; Cruz-Muñoz et al., 2003; Llani et al., 2007; Hernández et al., 2006). En relación al papel de la O-glicosilación en la función del linfocito T, existen evidencias que indican que la glicosilación alterada de CD43 se asocia con una disminución de la proliferación de linfocitos T, una disminución de la secreción de citocinas y un daño en la respuesta de tipo humoral (Tsuboi y Fukuda, 1997; 1998). El CD45 es una glicoproteína de alto peso molecular expresada específicamente por leucocitos, la cual presenta una actividad de fosfatasa (Tonsk et al., 1988). El CD45 incluye moléculas derivadas de un solo gen mediante splicing alternativo (CD45A, B y C en el humano) y varias glicofomas con peso molecular de 180-220 kDa (Symons y Barclay, 2000; Ralph et al., 1987; Pulido y Sánchez-Madrid, 1990; Lefrancois, 1987). CD45 está implicado en el desarrollo, activación, senescencia y apoptosis de linfocitos T, y las evidencias indican que la función de CD45 depende tanto de la isoforma del polipéptido como de la glicosilación del dominio extracelular (Earl y Baum, 2008). Xu y Weiss., (2002) reportaron que la O-glicosilación de CD45 participaba en la regulación negativa de la función de fosfatasa de CD45 disminuyendo la activación de células T. En resumen los O-glicanos participan en la modulación de las señales mediadas por CD43 y CD45 en el proceso de activación del linfocito T y en la susceptibilidad a la muerte mediada por apoptosis.

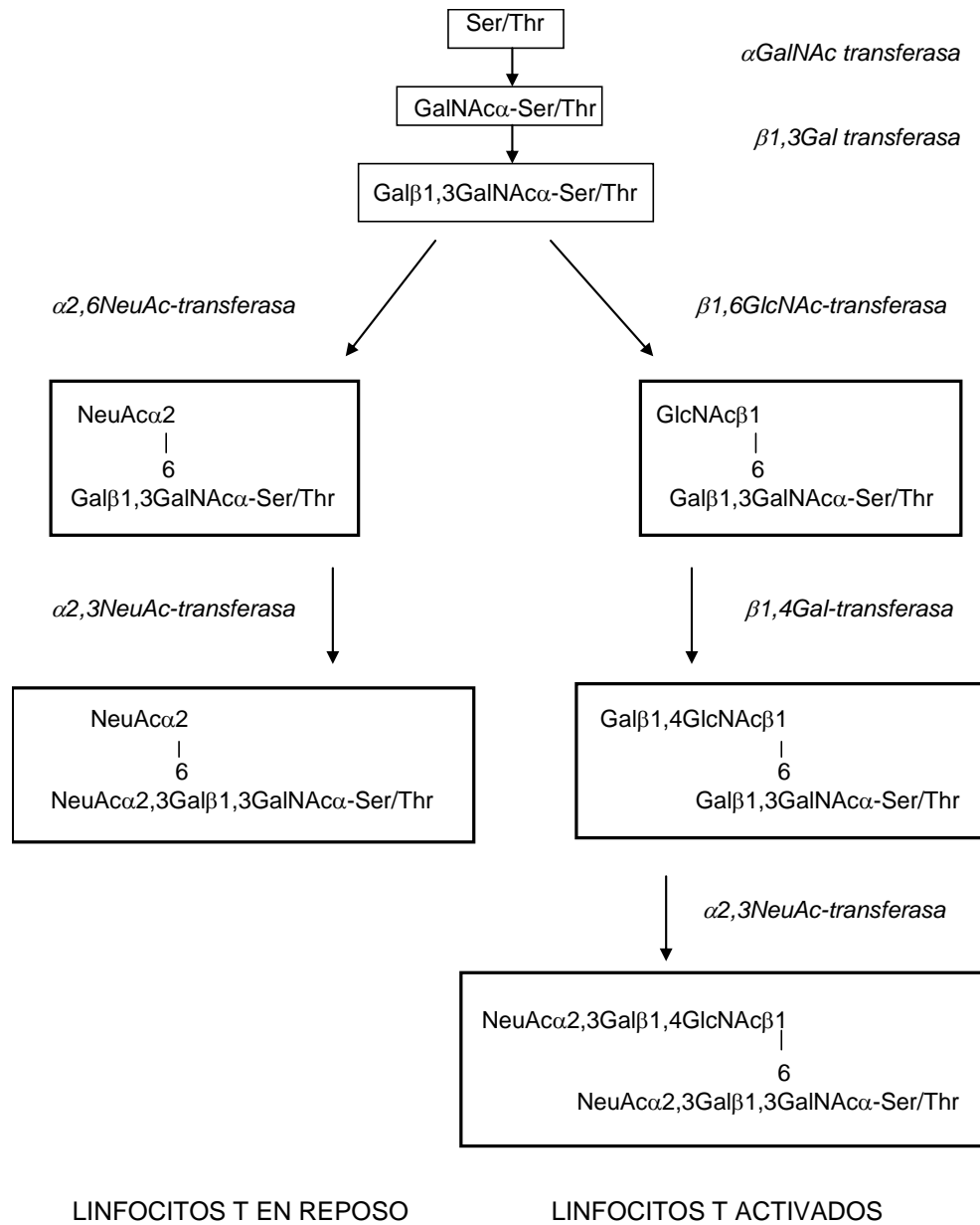


Figura 3. Modificaciones en la estructura oligosacáridica de la leucosialina (CD43). La biosíntesis de los diferentes O-glicanos se lleva a cabo en distintos estados fisiológicos del linfocito T. Cuando las células están en reposo, muestran la forma simple tetrasacárida o antígeno disialil T, y una vez que se han activado expresan la estructura ramificada hexasacárida núcleo tipo 2.

Antecedentes

En nuestro laboratorio se ha utilizado a la lectina de la semilla del *Amaranthus leucocarpus* (ALL) para estudiar los patrones de O-glicosilación de superficie de los LT CD4⁺ y sus implicaciones funcionales, tanto en modelo murino como humano. La lectina ALL es una glicoproteína homodimérica con un peso molecular por subunidad de 35 kDa (Hernández et al., 2001). ALL presenta afinidad por las secuencias Gal β 1,3GalNAc-1,0Ser/Thr y GalNAc1,0Ser/Thr, y es inhibida por GalNAc (Zenteno et al., 1992; Hernández et al., 2004). Se ha identificado que ALL reconoce timocitos medulares murinos (Lascurain et al., 1994) y LT CD4⁺ humanos pero no reconoce linfocitos B (Lascurain et al., 1997). Por cromatografía de afinidad utilizando ALL-agarosa se aisló una glicoproteína (ALL-r) de ~70 kDa a partir de timocitos murinos, siendo el 20% de su peso la porción sacarídica. El análisis de la huella peptídica del ALL-r no mostró homología con ninguna molécula de membrana del linfocito T murino, analizado por MALDI-TOF, lo cual sugería que el ALL-r no había sido reportado en ninguna base de datos al momento del estudio (Porrás et al., 2000). Posteriormente, Ortiz y cols., (2002) encontraron que la ALL reconoce un 12-40% de los LT CD4⁺ de ganglios linfáticos de ratón y que este porcentaje se incrementa de 2 a 3 veces después de un estímulo mitogénico con Con A. Además se encontró que la ALL reconoce linfocitos T CD4⁺ CD69⁺ CD25⁺ murinos después de un estímulo de activación, sugiriendo que ALL reconoce patrones de O-glicosilación asociados a la activación del linfocito T murino (Ortiz et al., 2002). Estos datos sugieren que la ALL es una herramienta potencial para el estudio de los patrones de O-

glicosilación asociados a los procesos de activación del LT CD4⁺. Sin embargo, no se había aislado a la glicoproteína reconocida por ALL ni analizado el reconocimiento de ALL sobre los LT CD4⁺ activados de origen humano o los posibles efectos de la unión de ALL sobre los linfocitos T. Por lo anterior, en este trabajo planteamos aislar a la glicoproteína reconocida por ALL sobre la membrana de los linfocitos T, así como analizar el reconocimiento de ALL sobre los LT CD4⁺ humanos activados y el efecto de la ALL sobre dicha población celular.

JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de la respuesta inmunológica adaptativa depende de la activación del LT CD4⁺. Dicho proceso involucra el reconocimiento de receptores de superficie los cuales en su mayoría se encuentran glicosilados. Se ha demostrado que la activación del linfocito T induce cambios en el patrón de O-glicosilación de receptores de superficie, y que dichos cambios están involucrados en la regulación del proceso de activación celular. Por lo anterior, el análisis de los mecanismos por los cuales la O-glicosilación afecta el proceso de activación celular ha adquirido importancia, así como el desarrollo de nuevas herramientas para ese tipo de estudios.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios con lectinas indican que algunas, por su especificidad por secuencias oligosacáridicas, presentan la capacidad de entrecruzar receptores sobre la superficie del linfocito T mediante un reconocimiento dependiente de carbohidratos y de esta manera desencadenan estímulos de activación. La ALL puede detectar patrones de O-glicosilación de superficie celular asociados a la activación del LT CD4⁺ de ratón y reconocer a un receptor de 70 kDa sobre la membrana de los LT CD4⁺ en reposo. Sin embargo, no se sabe si la ALL reconoce a un receptor o patrones de O-glicosilación asociados al proceso de activación de los LT CD4⁺ humanos, ni si la unión de la ALL a los linfocitos T ejerce algún efecto sobre ellos.

HIPÓTESIS

La lectina de *Amaranthus leucocarpus* reconoce un patrón de O-glicosilación en receptores de los LT CD4⁺ humanos que participa en la activación celular.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar los receptores O-glicosilados reconocidos por la lectina *Amaranthus leucocarpus* en LT CD4⁺ en reposo y determinar su participación en el proceso de activación celular.

Objetivos específicos

1. Aislar a la(s) glicoproteína(s) de membrana reconocida(s) por la ALL sobre los LT humanos en reposo.
2. Analizar peso molecular, punto isoelectrico, composición de aminoácidos, de carbohidratos, e identificar por secuenciación de aminoácidos o huella peptídica la(s) glicoproteína(s) de membrana reconocida(s) por la ALL.
3. Analizar la expresión de marcadores de activación (CD69, Ki-67) y la proliferación en la subpoblación de LT CD4⁺ en reposo y activados reconocidos por ALL mediante citometría de flujo.
4. Analizar si la ALL afecta la expresión del marcador de activación CD25 en LT CD4⁺ cultivados en presencia o ausencia de anticuerpos anti-CD3, por citometría de flujo.

5. Analizar si la ALL afecta la proliferación de LT CD4⁺ cultivados en presencia o ausencia de anticuerpos anti-CD3, por citometría de flujo.
6. Analizar si la ALL afecta la producción de citocinas tipo TH1 (IL-2 e IFN- γ) y TH2 (IL-4 e IL-10) en LT CD4⁺ cultivados en presencia o ausencia de anticuerpos anti-CD3, por citometría de flujo.
7. Analizar si la ALL altera la movilización del calcio intracelular en LT CD4⁺ cultivados en presencia o ausencia de anticuerpos anti-CD3, por citometría de flujo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos y anticuerpos

Albumina sérica bovina fracción V, carbohidratos y reactivos químicos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) para CD4, IL-2, Ki-67, Anticuerpos marcados con ficoeritrina (PE) para CD4, CD25, IL-10, CD69, IFN- γ y anticuerpos marcados con PE-CY7 para IL-4 se obtuvieron de e-Biosciences (San Diego, CA, USA). Anticuerpos anti-CD3, anti-CD28, estreptavidina-PE y -CyChr fueron comprados en PharMingen (New York, NY, USA). CFDA-SE (Carboxifluorescein diacetate, succinimidyl éster) fue obtenido de Molecular Probes (Eugene Oregon, USA). El kit de aislamiento de linfocitos T CD4⁺ II de MiniMACS system se adquirió de Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany).

Purificación de la lectina

Las semillas de *A. leucocarpus* se colectaron en Tulyehualco (México) y se identificaron en el Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur, México. La lectina ALL fue purificada por cromatografía de afinidad utilizando una columna de estroma de eritrocitos humanos tipo "O", como fue descrito por Zenteno y Ochoa, (1988). Posterior a su purificación ALL fue entonces marcada con éster de N-hydroxysuccinimida (biotina) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) en una relación 2:1 de biotina/proteína (Savage et al., 1992).

Células

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donadores sanos del banco de sangre se obtuvieron por un gradiente de densidad en Ficoll-hypaque mediante centrifugación a 1700 rpm por 30 min a 18°C. Posteriormente, las células se lavaron, y resuspendieron en solución salina en amortiguadores de fosfatos (PBS; NaCl 0.15 M, fosfato de sodio 0.05 M, pH 7.2). Los linfocitos T CD4⁺ fueron purificados de las CMSP por separación magnética negativa usando el sistema MiniMACS (Miltenyi Biotec). La pureza de los linfocitos T CD4⁺ fue de >95%, determinada por citometría de flujo usando anticuerpos anti-humano CD4-FITC y PE. La viabilidad celular (>90%) se determinó por el método de exclusión de Azul de Tripano.

Obtención de células ALL-r⁺

Se obtuvieron células mononucleares (CMN) de sangre venosa periférica de donadores sanos mediante centrifugación a 1700rpm por 30min en un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque. Las células recuperadas de la interfase se lavaron y resuspendieron en Dulbecco's modified Eagle's medio (D-MEM) suplementado con 5% de suero fetal de cabra (FCS; inactivado por calor a 56°C por 30min). Posteriormente, las células obtenidas se contaron en un hemocitómetro y se ajustaron a 1×10^8 células por ml. Estas células se introdujeron a una columna de fibra de nylon; 0.6g de fibra de nylon empacada en un barril de una jeringa de 10ml tratada previamente con medio de cultivo, se incubó a 37°C por 30min, y se recobró solo las células que pasaron a través de

ella las cuales eran células enriquecidas con linfocitos T. La subpoblación de células T ALL⁺ se obtuvieron por aglutinación selectiva utilizando ALL-biotina (ALL-B) la cual se incubo con las células enriquecidas de células T por 15min a 37°C obteniéndose un botón de LT ALL⁺ y un sobrenadante no aglutinado ALL-.

Purificación del ALL-r

Células enriquecidas con linfocitos T se aglutinaron y marcaron con ALL-B, el botón obtenido fue lisado en una solución de PBS conteniendo 1ug/ml de aprotinina, 1ug/ml de pepstatina, 2ug/ml de leupeptina, 2mM de PMSF y 1% de Tritón X-100 (amortiguador de lisis) por 30 min a 4°C en movimiento constante. Los detritos celulares, núcleos y mitocondrias fueron retirados por centrifugación primero a 250 x g por 10 min y después a 18,000 x g por 30min. El botón fue eliminado y el sobrenadante fue cargado a una columna de agarosa-avidina (3x1cm), la cual se equilibró previamente con buffer de lisis de PBS con 0.1% de Tritón X-100 (PBS-T) a 4°C. El material no retenido por la columna fue eluído con PBS-T y la fracción correspondiente a la proteína unida a la matriz fue eluída con 0.2M de GalNAc en PBS-T. La lectina marcada con biotina fue eluída de la columna de agarosa-avidina mediante la adición de 0.2M de glicina-HCl, pH 2.8. Las fracciones colectadas se dializaron contra PBS y su absorbancia se determinó a 280nm. Finalmente la fracción eluída con GalNAc (ALL-r), fue colectada, dializada contra agua destilada y liofilizada para sus análisis posteriores.

Peso molecular y homogeneidad de la muestra del ALL-r.

La determinación del peso molecular y homogeneidad de la muestra se obtuvo después de someter la muestra purificada (ALL-r) en un SDS-PAGE (Gel de Electroforesis de Poliacrilamida al 10% con 0.1% de dodecil sulfato de sodio, el cual fue visualizado con tinción de plata.

Análisis de composición de carbohidratos del ALL-r.

La composición de carbohidratos se determinó en los derivados O-metil-glicósidos del ALL-r y sus glicopéptidos obtenidos después de metanólisis en 0.5M de metanol-HCl por 24h a 80°C, utilizando lisina como estándar interno. Posteriormente, la muestra fue analizada por cromatografía de gases usando una columna capilar (25 x 0.32mm) de 5% de Silicona OV210 en un Cromatógrafo de gas Varian 2100 (Orsay, Francia).

Composición de aminoácidos del ALL-r

La composición de aminoácidos del ALL-r se determinó a partir de 100 µg de muestra, la cual fue hidrolizada al vacío con 2ml de 6M de HCl a 110°C en tubos sellados por 24, 48 y 72h. Las muestras se introdujeron en un analizador de aminoácidos automático (acid analyzer Durrum 500), usando a Nor-Leucina como estándar interno. Las concentraciones de Prolina, Triptófano y Cisteína, se obtuvieron determinando el coeficiente de extinción como fue indicado por Pace et al., (1995).

Determinación de la huella peptídica de ALL-r

La huella peptídica del ALL-r se determinó de la banda de 70 kDa aislada de LT mediante cromatografía de afinidad con ALL, esta fracción se transfirió a PVDF y se pretendió secuenciar en primera instancia por el método de Edman en un secuenciador de proteínas Beckman modelo LF3000. El análisis de los fragmentos peptídicos del ALL-r se analizó por espectrometría de masas en el sistema MALDI-TOF (“matrix assisted laser desorption ionization-time of flight”). La banda de 70 kDa correspondiente al ALL-r se cortó con un bisturí de un gel de SDS-PAGE y se sometió a digestión con 0.5 μ g de tripsina en 500ml de bicarbonato de amonio, pH 8, a 37°C, por 24 h. La reacción se inhibió por almacenamiento a 4°C y fue evaporada usando un Gyrovap (Howe, London). La muestra obtenida se mezcló a razón de 1 μ l de los productos de la reacción (conteniendo 50ug) mas 1 μ l de 2,5-matriz de acido dehidroxibenzoico (12mg/ml en CH₃OH/H₂O, 70:30, v/v), y finalmente esta mezcla se cristalizó a temperatura ambiente. Los iones positivos [M+H]⁺ de los péptidos se determinaron por MALDI-TOF en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Vision 2000 (Finnigan MAT, Bremen, Germany) equipado con un láser UV de 337nm. El espectro de masa se adquirió en modo Reflectron con voltaje de aceleración 8 keV y detección positiva. El ensayo control se realizó usando tripsina sola para identificar la masa de los péptidos propios liberados por auto digestión y con Angiotensina-I como estándar. La masa de [M+H]⁺ iones de péptidos producidos por la digestión con tripsina fue comparada con las obtenidas de la base de datos NCBIInr (profound 2004/06/01).

Electroforesis bidimensional

Se llevó a cabo el análisis de doble dimensión en un sistema de capilar con un gradiente de pH de 3-10 como primera dimensión y un gel SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras como la segunda dimensión, en un equipo Mini-Protean II 2-D Cell (Biorad Lab., Richmond Ca), según las especificaciones de los fabricantes. Las muestras del ALL-r obtenidas por cromatografía de afinidad se trataron (1:1) con el regulador de muestra que contiene urea 9.5 M, tritón X-100 2.0%, β -mercaptoetanol 5% y 0.4% de anfolitos en el rango de pH 3-10 (ICN Biomedicals Inc.), durante 15 min a temperatura ambiente. La muestra tratada se sometió a un isoelectroenfoque (primera dimensión) en geles contenidos en tubos capilares (urea 9 M, acrilamida-bis-acrilamida 30:54 al 4%, Tritón X-100 20%, anfolitos 3-10 0.4%, persulfato de amonio 0.01% y TEMED 0.1%). Al término del isoelectroenfoque los geles fueron extraídos de los capilares, sumergidos en regulador de equilibrio (Tris-HCl 0.065 M pH 6.8, SDS 2.3%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol) durante 15 min y sometidos a electroforesis en condiciones reductoras SDS-PAGE al 10% en mini-geles (60x60x1.5 mm, Biorad) y se revelaron por tinción de plata.

Cromatografía de intercambio iónico

El receptor de la ALL fue cargado a una columna mono-P HR 5/20mm (Pharmacia, Uppsala. Sweden), en forma aniónica, previamente equilibrada con un amortiguador de Imidazol, pH 7.1, con un rango de flujo de 1ml/min, presión máxima de 40 bars y en un programa de 60 min usando un sistema FPLC

(Pharmacia, Uppsala. Sweden). Las fracciones del ALL-r se eluyeron de la columna con un gradiente de NaCl de 0- a 1-M en amortiguador de Imidazol. Las fracciones se colectaron (1ml) y la absorbancia fue monitoreada A_{280} . Cada pico eluído fue dializado contra agua destilada antes de la liofilización para otros análisis.

Cultivo celular

Las CMSP o los linfocitos T $CD4^+$ (2×10^5) se cultivaron en placas planas de 96 pozos (Costar, Cambridge, MA, USA) en medio RPMI-1640 suplementado con 1 mM de piruvato de sodio, 2 mM de L-glutamina, 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina y 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (cRPMI), posteriormente, los cultivos se incubaron a 37°C con una concentración de 5% de CO_2 en una incubadora humidificada.

Reconocimiento de LT $CD4^+$ por ALL

Para analizar la unión de ALL a los LT $CD4^+$, las CMSP se cultivaron con 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos anti-CD3 solubles por 24, 48, 72 y 96 h. En cada uno de los tiempos señalados se cosecharon y lavaron las células con PBS conteniendo 1% de albumina sérica bovina y 0.1% de azida de sodio (PBA). Posteriormente, las células se incubaron con ALL-B por 20 min a 4°C , se lavaron e incubaron nuevamente con anticuerpos anti-CD4-PE y estreptavidina-CyChr por 15 min a 4°C . La unión de ALL-B en la región de linfocitos T $CD4^+$ fue analizada por citometría de flujo. Células no tratadas se usaron como control de células no activadas. La especificidad de unión de ALL a los LT $CD4^+$ fue determinada por

ensayos de inhibición competitiva agregando 200 mM de GalNAc (Zenteno y Ochoa, 1988; Hernández et al., 2001) a 37°C por 30 min posterior a la adición de ALL-B.

Expresión de CD69 y Ki-67.

Las CMSP se cultivaron en presencia de 10 µg/ml de anticuerpos anti-CD3 por 48 h a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron con PBA y se marcaron con ALL-B por 20 min a 4°C, seguido por tinción con estreptavidina-CyChr. Después se adicionaron anticuerpos anti-CD4 y anti-CD69 por 15 min a 4°C. La expresión de CD69 y la unión de ALL a la región de LT CD4⁺ se analizaron por citometría de flujo. Células no tratadas se usaron como control de células no estimuladas. Para analizar la expresión de la molécula nuclear Ki-67, las CMSP se cultivaron en las condiciones descritas anteriormente, se marcaron con ALL-B y anticuerpos anti-CD4 como se describió. Las células marcadas se lavaron con PBS y se fijaron con 4% (peso/volumen) de *p*-formaldehído en PBS por 10 min a 4°C. Posteriormente, las células se permeabilizaron con un buffer de saponina 1 (0.1% saponina, 0.01% pig IgG, 10 mM HEPES, 10% BSA in PBS) por 10 min a 4°C (Jung et al., 1993; Prussin y Metcalfe, 1995). Las células obtenidas se incubaron con anticuerpo anti-Ki-67-FITC por 30 min a 4°C, se lavaron con buffer de saponina 2 (0.1% saponina, 10 mM HEPES, 10% BSA in PBS) por 10 min a 4°C y se fijaron con 1% (peso/volumen) de *p*-formaldehído en PBS por 10 min a 4°C. La expresión intracelular de Ki-67 y el marcaje de superficie realizado con ALL-B en la región de células T CD4⁺ se analizó por citometría de flujo.

Proliferación de LT CD4⁺

Linfocitos T CD4⁺ (1×10^7) fueron incubados con 1 μ M de CFDA-SE (Molecular Probes, Eugene, Oregon) por 15 min a 37°C en oscuridad, dicha reacción de marcaje se detuvo al incubar la muestra con cRPMI por 10 min adicionales (Hasbold et al., 1999). Posteriormente, las células se cultivaron en una placa de 96 pozos en presencia de ALL a diferentes concentraciones, o de anticuerpos anti-CD3 inmovilizados (2.5 μ g/mL), o de ALL y anticuerpos anti-CD3 inmovilizados por 72 h. Posteriormente las células se cosecharon y se marcaron con anticuerpos anti-CD25-PE por 15 min a 4°C. La proliferación y la expresión de CD25 se analizaron por citometría de flujo. Algunos experimentos incluyeron la presencia de un anticuerpo anti-CD28 (1.0 μ g/mL). Células no tratadas se usaron como control. El CFDA-SE es un colorante celular permeable que se une a proteínas citoplasmáticas y es dividido en partes iguales en cada una de las células que sufren mitosis, el remanente de CFDA-SE emite fluorescencia que va en disminución por cada división mitótica, dicha disminución en la fluorescencia es detectable por citometría de flujo.

Detección de citocinas intracelulares

Para analizar la producción de citocinas, LT CD4⁺ purificados se cultivaron en presencia de ALL, anticuerpos anti-CD3, o ALL y anticuerpos anti-CD3 por 24, 48 y 72 h. Cinco horas antes del término del cultivo se agregaron al cultivo 10 μ g/ml de brefeldina A. Las células entonces se cosecharon, se lavaron con PBS y se fijaron con 4% (peso/volumen) de *p*-formaldehído en PBS por 10 min a 4°C.

Después de fijadas, las células se permeabilizaron con un buffer de saponina 1 (0.1% saponina, 0.01% de IgG de cerdo, 10 mM HEPES, 10% BSA in PBS) por 10 min a 4°C (Jung et al., 1993; Prussin y Metcalfe, 1995), se incubaron con anticuerpos anti-IL-2, IL-4, IL-10 o IFN- γ por 30 min a 4°C, se lavaron con un buffer de saponina 2 (0.1% saponina, 10 mM HEPES, 10% BSA in PBS) por 10 min a 4°C y se fijaron con 1% (peso/volumen) de *p*-formaldehído en PBS por 10 min a 4°C. Finalmente las células se analizaron por citometría de flujo.

Citometría de flujo

Las células se lavaron con PBS conteniendo 1% de albumina sérica bovina y 0.1% de azida de sodio (PBA), se incubaron con los anticuerpos indicados por 15 min a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron con PBA y se analizaron por citometría de flujo. Un mínimo de 1×10^4 células se adquirieron en todos los experimentos. Se analizó la región correspondiente a los linfocitos considerando tamaño y granularidad celular, de la misma forma se excluyeron los análisis de células muertas y los detritos. Las mediciones se realizaron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y los datos se analizaron con el software FlowJo (TreeStar Inc. Ashland Oregon). En los análisis por citometría de flujo de las CMSP, se analizó la región correspondiente a los LT CD4⁺ y posteriormente la unión de ALL. La densidad del ALL unido a la superficie celular se expresó como la media de la intensidad de fluorescencia relativa (MFI-R) de acuerdo a la siguiente fórmula: $MFI-R = MFI \text{ de la muestra} / MFI \text{ del control}$ (unidades arbitrarias tomadas del histograma).

Ca²⁺ intracelular

LT CD4⁺ purificados (1×10^7) se incubaron con 1 mM Fluo-4 (Molecular Probes) por 30-45 min a temperatura ambiente en movimiento constante y en oscuridad. Después de la incubación, las células se lavaron y resuspendieron en RPMI sin SFB. Se analizaron 1×10^6 células mediante citometría de flujo por 30 a 40 seg para definir los niveles de calcio intracelular basal antes de la estimulación con 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos anti-CD3 solubles en presencia o ausencia de ALL (5 $\mu\text{g/ml}$ de ALL), posteriormente se analizó la movilización de calcio intracelular por un periodo de 5 min (Gee et al., 2000). Se utilizaron células estimuladas con ionomicina como control positivo.

Análisis estadístico

La significancia estadística fue determinada mediante el software SPSS14 (Chicago, IL, USA) usando la prueba de t (student's t-test) con una distribución de doble cola. Los valores se consideraron estadísticamente significativos con una $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

*Aislamiento del ligando de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL-r) por cromatografía de afinidad*

Para identificar al posible ligando de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL-r) en la membrana del linfocito T, se obtuvieron lisados celulares a partir de células enriquecidas de linfocitos T los cuales fueron previamente incubados con ALL-B. El lisado total fue introducido a una columna de avidina-agarosa, posteriormente, la columna fue lavada con PBS-T y las proteínas retenidas reconocidas por ALL fueron eluidas mediante la adición de 200 mM de GalNAc mas PBS-T. (**Figura 4**). La concentración de proteínas del lisado celular total obtenido de 1×10^8 células T fue de 5.8 mg, el cual dio un rendimiento de proteína purificada de 50 μ g, correspondiente a menos del 1% de la concentración de proteínas totales introducidas a la columna. En la **figura 4** se observa un ejemplo de la obtención de la proteína purificada por elución con GalNAc.

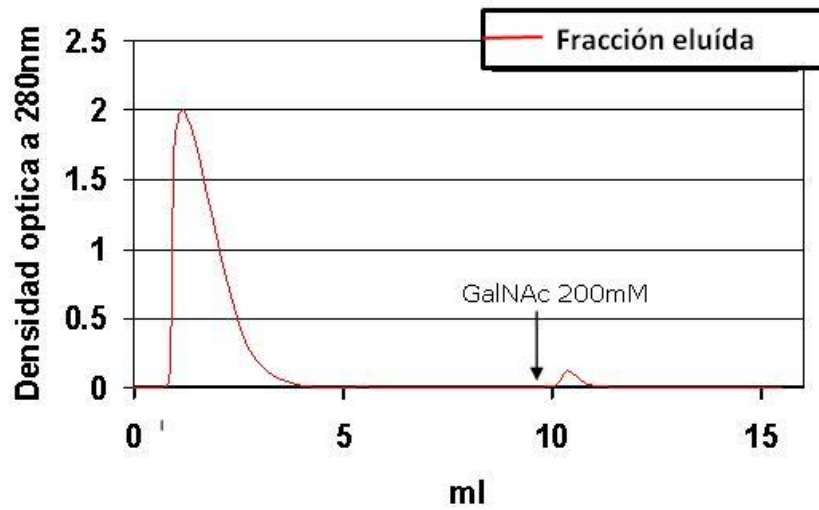


Figura 4.

Aislamiento del ligando para ALL a partir de linfocitos T, por cromatografía de afinidad. La gráfica muestra la densidad óptica a 280nm de las fracciones eluídas que se obtuvieron secuencialmente mediante el lavado con PBS-T y posteriormente con 200mM de GalNAc-PBS-T para la elución de los ligandos de la ALL (ALL-r).

Métodos analíticos

Para caracterizar al receptor de ALL se hicieron análisis de composición de carbohidratos y aminoácidos a partir de la proteína purificada por cromatografía de afinidad. De igual forma la pureza y el peso molecular fue determinado por análisis electroforéticos, nuestros resultados indicaron una sola banda de 70 kDa (**Figura 5**). Al examinar el receptor de ALL por cromatografía de intercambio iónico, se encontraron cuatro fracciones (FI, FII, FIII y FIV) que se eluyeron a diferentes concentraciones de un gradiente de NaCl (**Figura 6**). La fracción FI se eluyó a una concentración de 0.15M, FII a 0.17M, FIII a 0.3M y FIV a 0.5M. Los resultados obtenidos por la electroforesis de doble dimensión en un gradiente de pH de 3.5 a 10 (**Figura 7**) identificó que la banda de 70 kDa tiene 4 diferentes puntos isoeléctricos los cuales estaban localizados en un rango de pH de 4.5 a 6.0. La composición de carbohidratos mostró que el ALL-r es una glicoproteína que posee 20% de su peso total en carbohidratos compuesta principalmente por GalNAc (49%, **Figura 8**) y en menor concentración galactosa, N-acetilglucosamina, manosa y ácido Siálico (**Tabla 1**). La composición de aminoácidos identificó que el receptor está compuesto principalmente por serina, glicina, ácido glutámico, alanina y prolina como los mayores componentes de ALL-r, y en menor proporción lisina y fenilalanina, no se identificaron residuos de cisteína (**Tabla 2**).

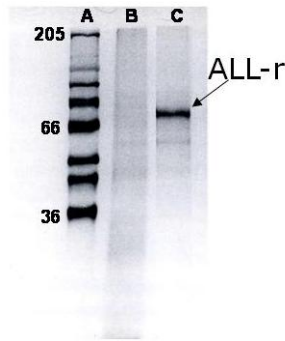


Figura 5. Análisis electroforético del ligando para ALL aislado por cromatografía de afinidad. Para conocer la existencia de proteínas y la homogeneidad de la muestra obtenida por la ALL a partir de los linfocitos T, se realizó un gel de electroforesis en condiciones reductoras al 10%. En **A)** se observan los pesos moleculares, en **B)** 50 μ g de lisado total de linfocitos T y en **C)** 10 μ g de la fracción purificada por ALL (ALL-r).

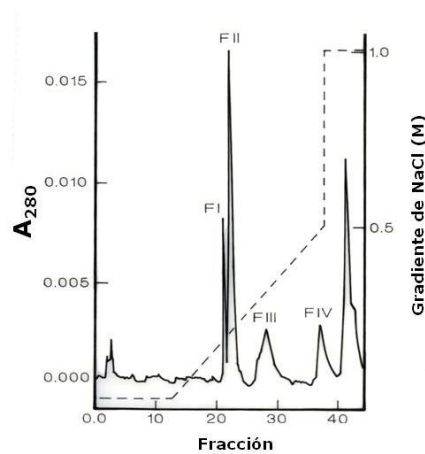


Figura 6. Análisis cromatográfico del ALL-r usando una columna de intercambio iónico, en un sistema FPLC. Para realizar el análisis se agregaron 500 μ g del ALL-r a una columna previamente equilibrada con 10 mM de amortiguador de Imidazol, pH 7. Las diferentes fracciones retenidas fueron eluidas con un gradiente discontinuo de NaCl (línea punteada). La detección de la densidad óptica de cada mililitro fue a 280nm (línea continua).



Figura 7. Electroforesis bidimensional del ALL-r. 50µg del ALL-r se aplicaron en primera dimensión, conteniendo anfólitos en rango de pH 3-10 en un cilindro de gel de poliacrilamida al 5% conteniendo 1% de tritón x-100 y 2% (v/v) de anfólitos en un rango de pH de 3.5 a 10. Los geles fueron corridos a 600 V por 14 a 16 h a 4°C y posteriormente el gel fue depositado para una segunda dimensión sobre un SDS-PAGE al 10 %.

Tabla 1. Composición de Carbohidratos del ALL-r

Monosacárido	Res/Mol*
Gal	16.3
Man	11.3
GalNAc	31.0
GlcNAc	7.3
NeuAc	1.8

*Los residuos de azúcares por mol está representado considerando el 20% de azúcares en una proteína de peso molecular de 70 kDa

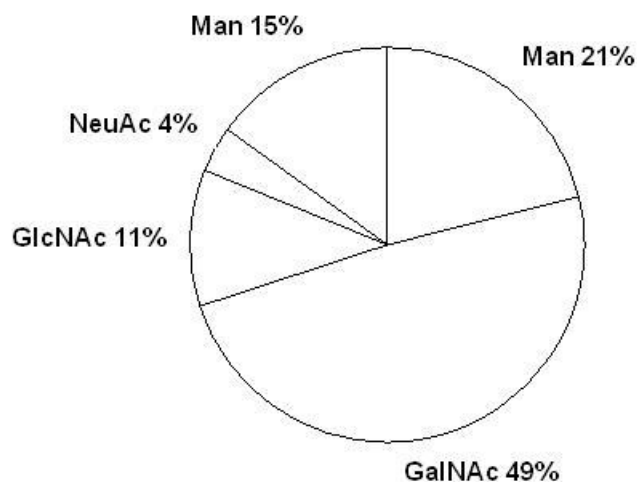


Figura 8. Porcentaje de carbohidratos del ALL-r.

Tabla 2. Composición de aminoácidos del ALL-r

Aminoácido	% de A.A. por molécula	Res/mol*
Asp	6.2	36.2
Glu	16.4	95.7
Ser	21.4	125.4
Gly	20.1	117.8
His	2.6	15.2
Arg	1.2	7.0
Thr	3.9	22.8
Ala	9.3	54.2
Pro	3.3	19.2
Tyr	1.1	6.4
Val	3.8	22.2
Met	0.7	4.1
Ile	3.0	17.4
Leu	2.9	16.9
Phe	1.5	9.1
Lys	2.7	15.8
Total	100	585.4

Composición de aminoácidos obtenida del ALL-r de 70 kDa purificado. *Los residuos de aminoácidos por mol está representado considerando el 80% de A.A. en una proteína de peso molecular de 70 kDa.

Secuenciación de aminoácidos del ALL-r

El estudio de la secuencia de aminoácidos del ALL-r así como de las diferentes fracciones no fue posible por el método de Edman debido a que su grupo amino terminal se encontraba aparentemente bloqueado. Por este motivo, se procedió a realizar una digestión con tripsina del ALL-r y analizaron los péptidos resultantes por medio de espectrometría de masas. La digestión con tripsina produjo 65 péptidos y la relación m/z de las fracciones identificadas estuvo comprendida entre 791.3 a 3478.3. Los iones moleculares $[M+H]^+$ producidos en el espectro de MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption-Time of Flight) se compararon con los valores relativos obtenidos de la base de datos de NCBI (ProFound 2004/06/01). Los péptidos identificados mostraron un 54% de homología con una chaperona molecular de núcleo DnaK (Vandenbroeck *et al.*, 2002), 47% con una proteína hipotética KIAA 0123 (Ishikawa *et al.*, 1998) y un 44% con una proteína de choque térmico humana (Gross *et al.*, 2003) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Secuencia de aminoácidos obtenida de ALL-r por MALDI-TOF.

m/z	Secuencia peptídica	Proteína relacionada
2697.9	VEIANDQGNRTTPSYVAFTDTER	¹ dnaK-type
2775.0	QTQTFTTYSNDQPGVLIQVYEGER	² Heat shock protein 54
2982.2	TLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITR	¹ dnaK-type
3175.6	MLRGKPAVAALGDLTDLPTYEDIQT ALSSK	³ KIAA0123t
3257.7	FSSGGAYPNIPSSPLPGVPKPVFA TVDGQEK	³ KIAA0123
3404.8	AAAVGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEII ANDQGNR	¹ dnaK-type

El análisis por MALDI-TOF de los péptidos del receptor de ALL de Células T obtenidos por digestión con Tripsina, fue comparado con los valores relativos obtenidos de la base de datos NCBI. Las principales Homologías fueron encontradas con: ¹DnaK-type molecular chaperone HSPA1L-human (54%), ² Heat shock protein 54 (44%), and ³KIAA0123 gene product (47%).

Reconocimiento de LT CD4⁺ por ALL

Estudios previos en ratón demostraron que ALL reconoce LT CD4⁺ que expresan receptores asociados a la activación como el CD25 y el CD69 (Ortiz et al., 2002). Para analizar el reconocimiento de LT CD4⁺ humanos por ALL, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (CMSP), se cultivaron en presencia de anticuerpos anti-CD3 solubles por 24, 48, 72 y 96 h, y se analizó la unión de ALL a los LT CD4⁺ por citometría de flujo (**Figura 9**). Se utilizaron células con medio de cultivo como control de LT CD4⁺ no activados. Los resultados indicaron que ALL se unió al $48.7 \pm 8.7\%$ de los LT CD4⁺ no activados y al $81.2 \pm 3.3\%$ de las células activadas a las 72 h de cultivo, (**Figura 9A y B**). El análisis de la media de la intensidad de fluorescencia relativa (MFI-R) indicó que la ALL se unió a los LT CD4⁺ en reposo con un $MFI-R = 0.96 \pm 0.03$ y a los LT CD4⁺ activados a las 72 h de cultivo con un $MFI-R = 1.60 \pm 0.25$ (**Figura 9C**). En conjunto, los datos del porcentaje de células reconocidas por el ALL y los datos de MFI-R indican que la ALL se une a un mayor número de células activadas así como a un mayor número de ligandos por célula, en comparación con las células en reposo.

Para analizar si la unión de ALL a los LT CD4⁺ era dependiente de sacáridos, se realizaron ensayos de inhibición competitiva utilizando el monosacárido GalNAc. Los resultados mostraron que GalNAc inhibe la unión de ALL a los LT CD4⁺ activados y no activados, indicando una interacción dependiente de carbohidratos (**Figura 10B**).

Para determinar las características fenotípicas de las poblaciones de LT CD4⁺ reconocidas por ALL, se examinó la expresión de moléculas asociadas con la activación como el CD69 y el Ki-67. El CD69 es un receptor de la superficie del linfocito T y Ki-67 una proteína nuclear, ambas se encuentran relacionadas con el proceso de activación celular (Ziegler et al., 1993; Winking et al., 2004; Shedlock et al., 2010). Los resultados indicaron que ALL se une al 88.7 ± 3.6% de los LT CD4⁺ que expresaron la molécula CD69 (**Figura 10A**, sección superior) y al 59.65 ± 2.7% de los LT CD4⁺ que expresaron la molécula Ki-67, a las 48 h del cultivo (**Figura 10A**, sección inferior). Estos datos sugieren que ALL reconoce LT CD4⁺ que expresan marcadores asociados con la activación.

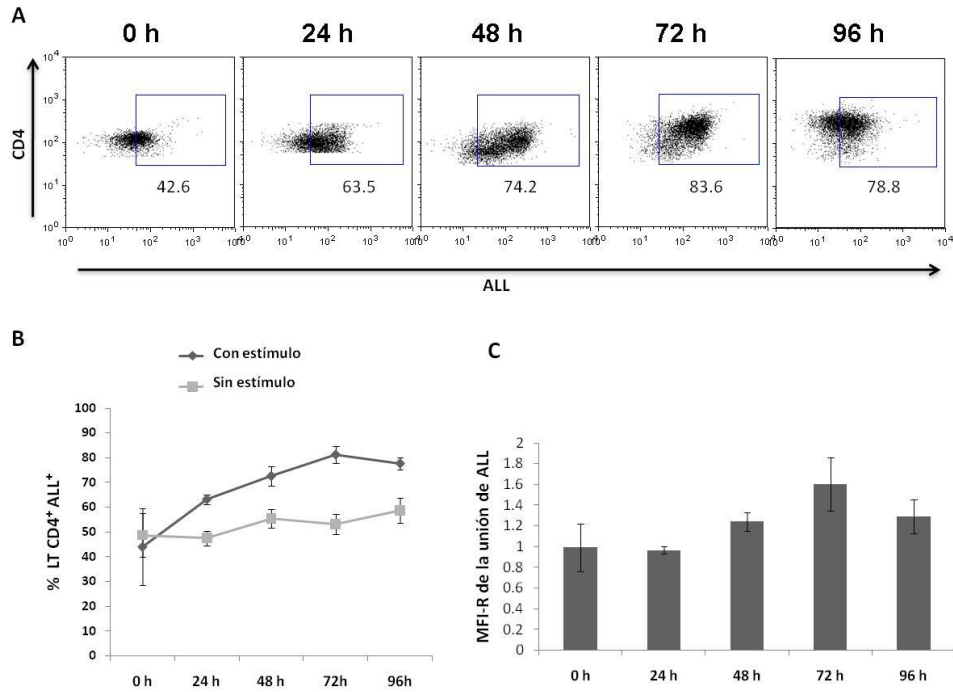


Figura 9. Reconocimiento de LT CD4⁺ por ALL. Las CMSP se estimularon con anti-CD3 soluble por 24, 48, 72 y 96 h; posteriormente, las células fueron cosechadas, teñidas con ALL-B seguido por estreptavidina acoplada a CyChr y anticuerpos anti-CD4. La unión de ALL a los LT CD4⁺ se analizó por citometría de flujo. **A)** Dot plot representativo del análisis por citometría de flujo de la unión de ALL en la región de LT CD4⁺ (recuadros), estimulados en los tiempos indicados. Los números representan el porcentaje de LT CD4⁺ reconocidos por ALL (LT CD4⁺ ALL⁺). **B)** Gráfica del porcentaje de LT CD4⁺ ALL⁺ no estimulados (cuadros grises) y después de la estimulación con anticuerpos anti-CD3 (diamantes negros). Los datos son expresados como la media \pm desviación estándar (n = 4). **C)** Gráfica del análisis de la media de la intensidad de fluorescencia relativa (MFI-R) de la unión de ALL a LT CD4⁺ después de un estímulo con anticuerpos anti-CD3 a las 0, 24, 48, 72 y 96 h (n = 3).

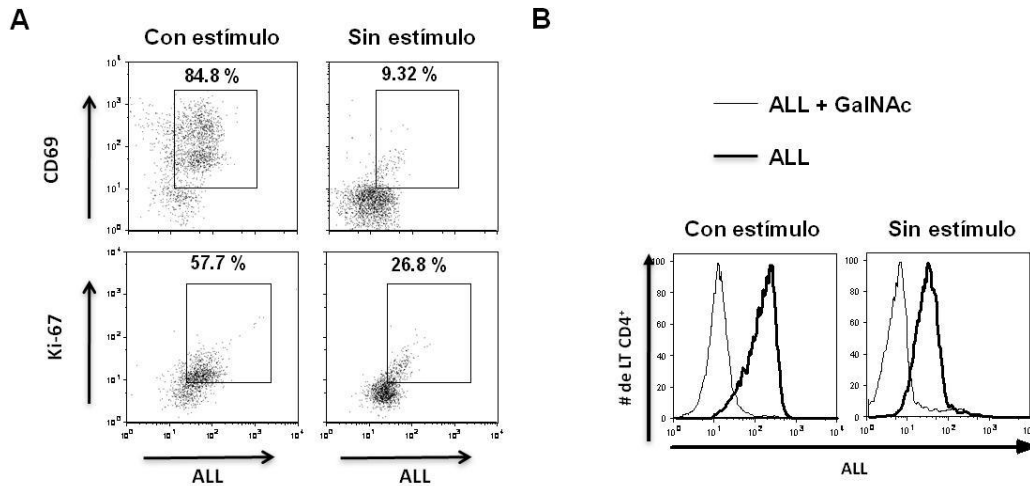


Figura 10. Reconocimiento de LT CD4⁺ CD69⁺ y Ki-67⁺ por ALL. CMSP se estimularon con anti-CD3 soluble por 48 h; posteriormente las células fueron cosechadas y teñidas con ALL-B seguido por estreptavidina acoplada a CyChr, anticuerpos anti-CD4 y anti-CD69 o anticuerpos anti-CD4 y anti-Ki-67. La unión de ALL a los LT CD4⁺ se analizó por citometría de flujo. **A)** Dot plot representativo del análisis por citometría de flujo que muestra la unión de ALL a LT CD4⁺ (recuadrados) que expresan las moléculas CD69 (sección superior) o Ki-67 (sección inferior) a las 48 h (n = 4). **B)** Histogramas representativos del análisis por citometría de flujo que muestran la unión de ALL a LT CD4⁺ no estimulados y estimulados con anticuerpos anti-CD3, en presencia (línea delgada) o ausencia (línea gruesa) de 200 mM de GalNAc.

ALL incrementa la proliferación y la expresión de CD25 en LT CD4⁺ activados por anticuerpos anti-CD3.

Para analizar el efecto de ALL sobre los LT CD4⁺, purificamos LT CD4⁺ y analizamos, por citometría de flujo, la proliferación y la expresión de CD25. Para estos análisis las células se marcaron con CFDA-SE y, posteriormente, se cultivaron en presencia de ALL a diferentes concentraciones, con el anticuerpo anti-CD3 o en presencia de ALL y anticuerpo anti-CD3. Las células no tratadas se usaron como control negativo. Se incluyeron controles adicionales de activación con anticuerpos anti-CD28 y anti-CD3 más anti-CD28. Cuando los LT CD4⁺ fueron tratados únicamente con ALL (en un rango de 2.5 a 20 µg/mL), no mostraron un incremento significativo en la proliferación comparado con el control de células no tratadas (**Figura 11A y B**). Sin embargo, la presencia de ALL incrementó significativamente la proliferación inducida por el anticuerpo anti-CD3 comparado con la proliferación inducida únicamente por anticuerpo anti-CD3. ($p = 0.028$) (**Figura 11B**). La presencia de ALL en los cultivos celulares incrementó significativamente la expresión de CD25 en los LT CD4⁺ estimulados con anticuerpos anti-CD3 comparado con la expresión de CD25 inducida únicamente por el anticuerpo anti-CD3 ($p = 0.05$) (**Figura 12A y B**). Estos efectos fueron dosis dependientes (datos no mostrados), identificándose que la concentración óptima de ALL es de 5 µg/mL. De manera interesante, la proliferación inducida por ALL mas anticuerpos anti-CD3 fue similar a la proliferación inducida por los anticuerpos anti-CD3 mas anti-CD28 (**Figura 11A y B**). Estos datos sugieren que ALL por si misma no induce proliferación o expresión de CD25 en los LT CD4⁺, pero

incrementa la proliferación y la expresión de CD25 inducida por los anticuerpos anti-CD3.

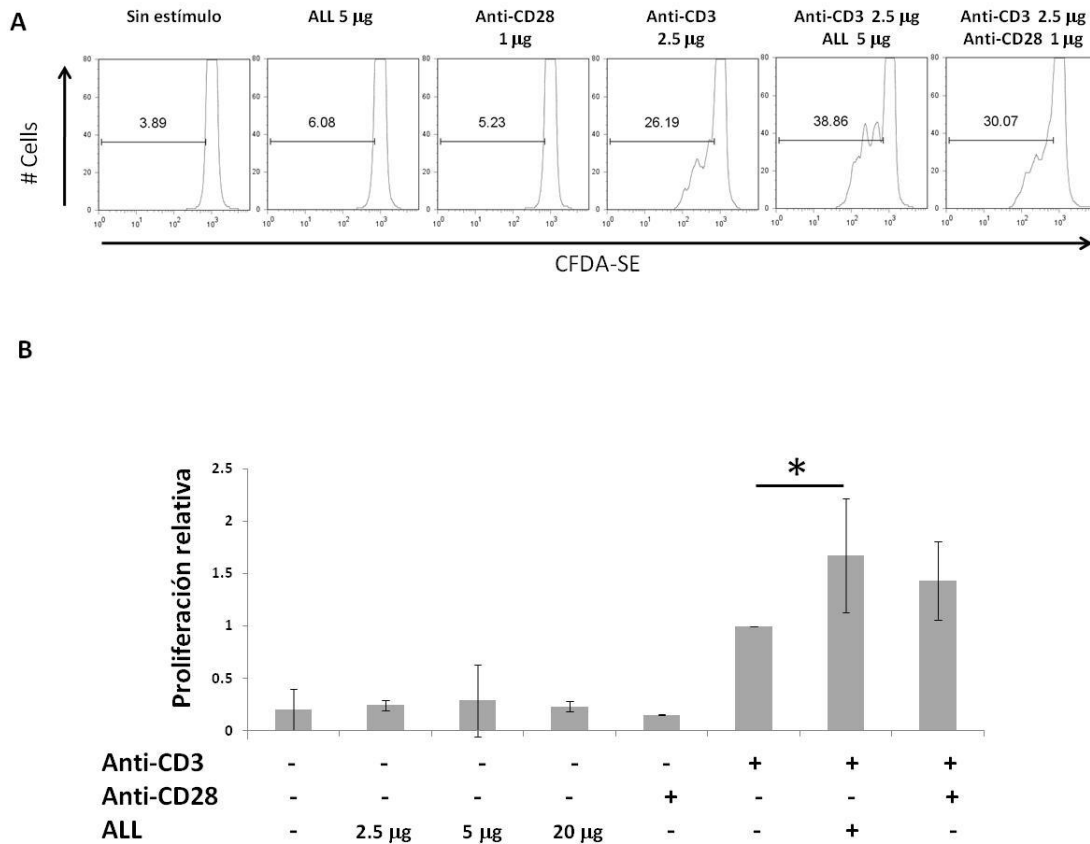


Figura 11. ALL incrementa la proliferación en LT CD4⁺ activados por anticuerpos anti-CD3. LT CD4⁺ fueron teñidos con CFDA-SE y cultivados en presencia de ALL a diferentes concentraciones o de anticuerpos anti-CD3, o de ALL más anticuerpos anti-CD3, o de anticuerpos anti-CD28, o de anti-CD3 más anti-CD28 por 72 h. Se analizó la proliferación celular mediante citometría de flujo. **A)** Histogramas representativos de proliferación de los LT CD4⁺. Los números representan el porcentaje de proliferación. **B)** Gráfica de barras de la proliferación relativa de los LT CD4⁺ en diferentes condiciones de cultivo (n=5). Las barras representan la media ± desviación estándar. *diferencia significativa ($p < 0.05$) usando la prueba t de Student. Proliferación relativa = LT CD4⁺ activados con anticuerpos anti-CD3 / LT CD4⁺ en otras condiciones.

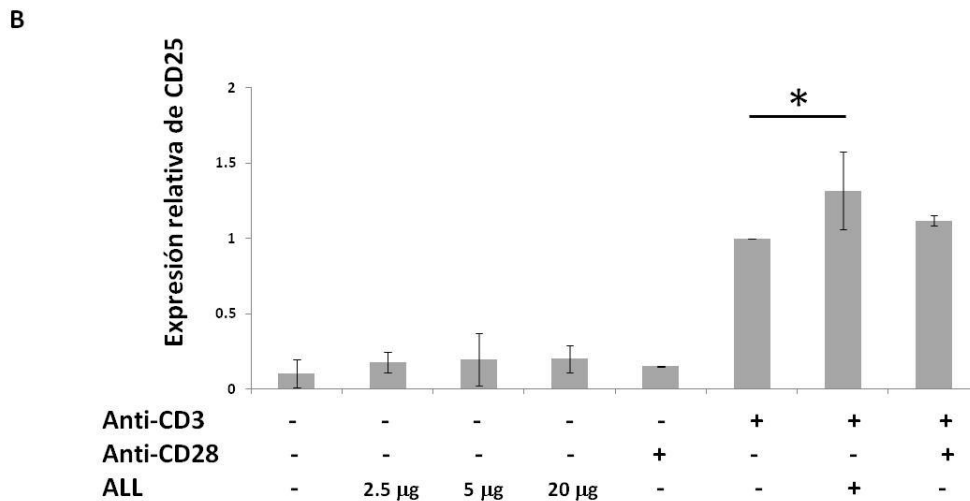
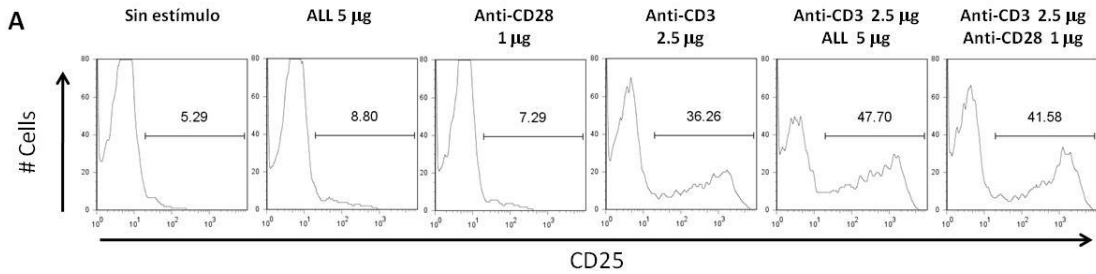


Figura 12. ALL incrementa la expresión de CD25 en LT CD4⁺ activados por anticuerpos anti-CD3. LT CD4⁺ cultivados con ALL (a las concentraciones indicadas), o de anticuerpo anti-CD3, o de ALL más anticuerpos anti-CD3, o de anticuerpos anti-CD28, o de anti-CD3 más anti-CD28 por 72 h. Se analizó la expresión de CD25 por citometría de flujo. **A)** Histogramas representativos de la expresión de CD25. Los números representan el porcentaje de expresión de CD25. **B)** Gráfica de barras de la expresión relativa de CD25 en los LT CD4⁺ en diferentes condiciones de cultivo (n=5). Las barras representan la media \pm desviación estándar. *diferencia significativa ($p < 0.05$) usando la prueba t de Student. Expresión relativa de CD25 = LT CD4⁺ activados con anticuerpos anti-CD3 / LT CD4⁺ en otras condiciones.

ALL incrementa la producción intracelular de IL-2 e IFN- γ de LT CD4⁺ activados por anticuerpos anti-CD3.

La activación de linfocitos T es caracterizada por la producción de IL-2, la cual provee una señal necesaria para la proliferación celular (Burchill et al., 2007). Además, los linfocitos T pueden producir un patrón de citocinas que determina una respuesta tipo Th1 (IL-2 e IFN γ ,) o TH2 (IL-4 e IL-10). Para determinar el tipo de citocinas inducidas por la presencia de ALL, LT CD4⁺ fueron cultivados en presencia de ALL, o anticuerpo anti-CD3, o con ALL más anticuerpo anti-CD3 por 24, 48 y 72 h, posteriormente la producción de citocinas intracelulares como IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10 fue valorada por citometría de flujo. La **figura 13** muestra un análisis por citometría de flujo representativo de la producción de citocinas intracelulares a 24 h de cultivo, no se encontraron diferencias significativas a las 48 y 72 h (datos no mostrados). Los datos a 24 h mostraron un incremento significativo en la producción de citocinas IL-2 e IFN- γ cuando las células fueron incubadas con anticuerpos anti-CD3 más ALL ($p=0.042$ y 0.044 respectivamente), comparado con el tratamiento utilizando solo el anticuerpo anti-CD3 a 24 h de cultivo (**Tabla 4 y Figura 13**). En contraste, no encontramos diferencias significativas en la producción de IL-4 o IL-10 en ninguna de las condiciones de cultivo en los tres periodos de tiempo probados. Los niveles de producción de IL-2 e IFN- γ por los LT CD4⁺ estimulados con anti-CD3 más ALL fueron similares a los producidos por los LT CD4⁺ estimulados con anticuerpos anti-CD3 más anti-CD28 (**Tabla 4**). Estos datos sugieren que la co-estimulación con ALL participa en el balance TH1-TH2 favoreciendo la secreción de citocinas tipo TH1.

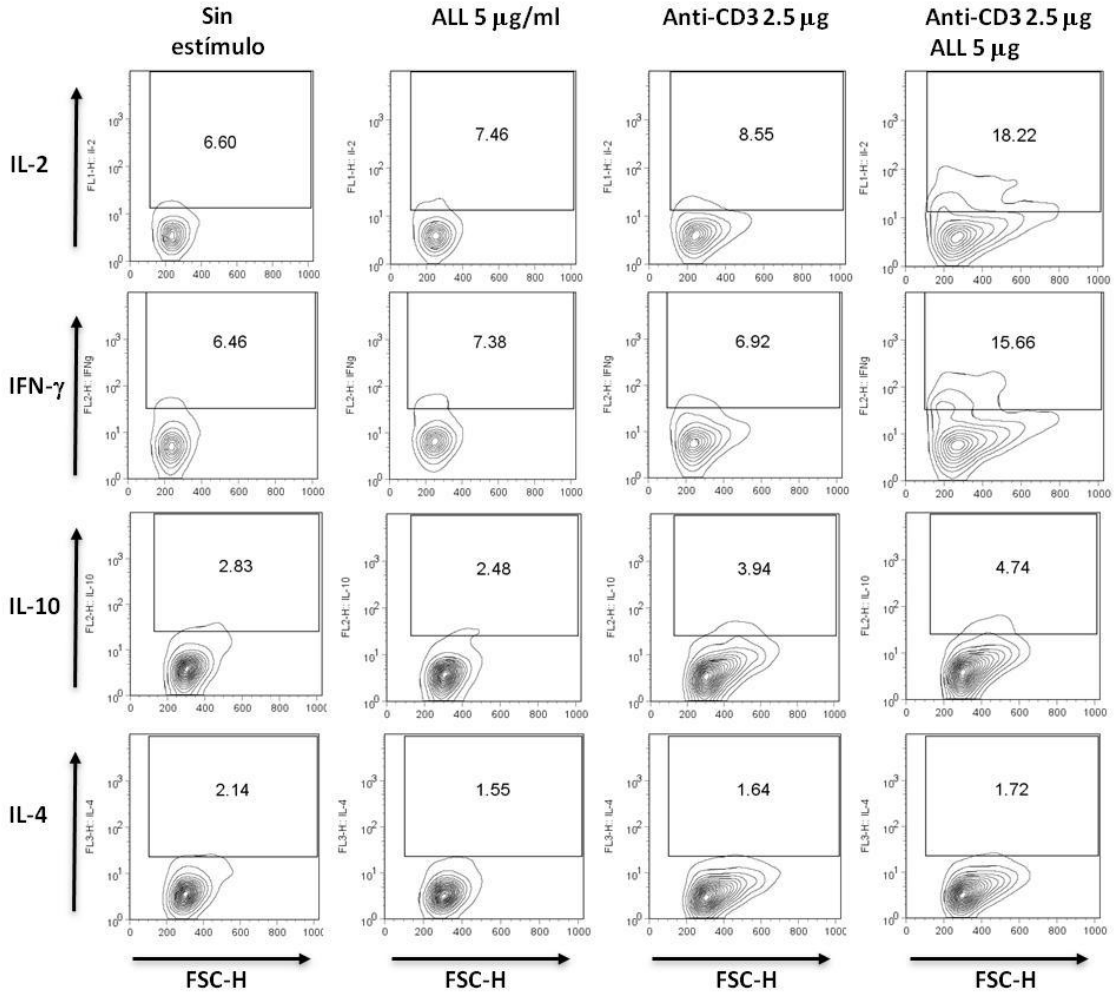


Figura 13. ALL incrementa la producción de IL-2 e IFN- γ de LT CD4⁺ activados por anticuerpos anti-CD3. LT CD4⁺ fueron cultivados en la presencia de ALL, o anticuerpo anti-CD3, o con ALL más anticuerpos anti-CD3 por 24 h. La producción intracelular de IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10 se analizó por citometría de flujo. La figura muestra un análisis representativo de la producción de citocinas intracelulares a 24 h de cultivo. Los números en los recuadros indican el porcentaje de células productoras de la citocina indicada (n = 4).

Citocinas	Medio	ALL	Anti-CD3 + Anti-CD28	Anti-CD3	Anti-CD3 + ALL
IL-2	4.9 ± 1.2	5.39 ± 1.3	6.34 ± 1.7	5.75 ± 0.7*	8.32 ± 1.6*
IFN- γ	6.13 ± 1.7	6.57 ± 0.6	10.01 ± 3.6	7.85 ± 1.3**	12.06 ± 2.7**
IL-10	4.4 ± 1.3	6 ± 2.3	4.77 ± 1.3	6.25 ± 0.4	7.19 ± 2.2
IL-4	4.98 ± 1.7	5.06 ± 1.4	4.87 ± 1.5	6.08 ± 1	6.16 ± 1.8

Tabla 4. ALL incrementa la producción de IL-2 e IFN- γ de los LT CD4⁺ activados por anticuerpos anti-CD3. Producción de citocinas intracelulares de LT CD4⁺ cultivados en presencia de ALL, o anticuerpo anti-CD3, o con ALL más anticuerpos anti-CD3 por 24 h. Los datos representan la media del porcentaje \pm desviación estándar de las células productoras de la citocina indicada (n = 4). * y ** = $p \leq 0.05$ usando la prueba t de Student.

ALL incrementa la concentración de Ca²⁺ intracelular en LT CD4⁺ activados por anticuerpos anti-CD3.

En la activación de linfocitos T, la unión del antígeno-MHC al complejo TCR-CD3, incrementa el Ca²⁺ intracelular el cual favorece la activación de importantes factores de transcripción (Savignac et al., 2007). Por este motivo, estimulamos LT CD4⁺ con anticuerpos anti-CD3 en presencia o ausencia de ALL y se determinó la movilización de Ca²⁺ intracelular por citometría de flujo. Nuestros resultados mostraron que la presencia de ALL incrementa significativamente la movilización de Ca²⁺ intracelular de los LT CD4⁺ estimulados con anticuerpos anti-CD3 comparado con los LT CD4⁺ estimulados únicamente con anticuerpos anti-CD3 (**Figura 14**). ALL por sí misma no indujo ningún cambio en la movilización del Ca²⁺ intracelular de los LT CD4⁺. Estos datos sugieren que el ALL-r podría estar participando en mecanismos que regulan la movilización de calcio y no directamente en el incremento de este ion.

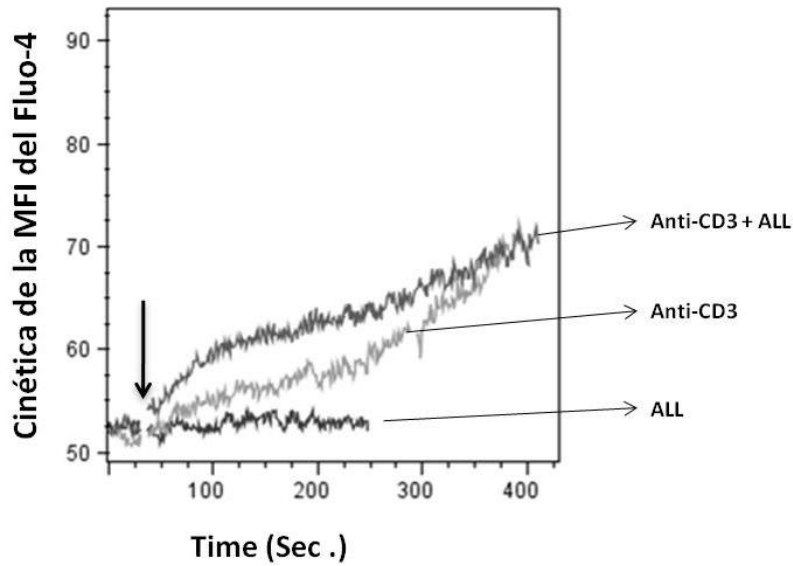


Figura 14. ALL incrementa la movilización de Ca^{2+} intracelular de los LT CD4^+ activados por anticuerpos anti-CD3. LT CD4^+ fueron estimulados con anticuerpos anti-CD3 en la presencia o ausencia de ALL o únicamente en presencia de ALL. Se analizó la movilización de Ca^{2+} intracelular mediante citometría de flujo ($n = 3$). La flecha gruesa indica el inicio de la estimulación y las delgadas los estímulos usados.

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que los oligosacáridos de la superficie celular sufren cambios estructurales a través del proceso de activación de linfocitos T (Piller et al., 1988), y evidencias indican que estos cambios están involucrados en la regulación de la activación celular. Al respecto, Tsuboi y Fukuda (1998) reportaron que la glicosilación alterada de CD43 puede provocar un daño en las interacciones entre los linfocitos T y B los cuales disminuyen la respuesta inmune adaptativa tipo TH2. Golks y cols., (2007) demostraron que la O-glicosilación en el linfocito T efector es necesaria para el funcionamiento de factores de transcripción como NF- κ B y NFAT y consecuentemente para la secreción de IL-2. Xu y Weiss, (2002), y Earl y Baum, (2008), han reportado que los cambios en la O-glicosilación de CD45 pueden regular su función de fosfatasa durante el proceso de activación celular y su participación en la inducción de muerte. La adecuada activación del LT CD4⁺ incide directamente en la eficacia de la respuesta inmunológica adaptativa, por lo anterior, el estudio acerca del papel de los O-glicanos en la regulación de las funciones del LT CD4⁺ ha adquirido gran importancia. En el presente estudio se muestra que la lectina específica para O-glicanos, obtenida de *Amaranthus leucocarpus* (ALL), reconoce a una O-glicoproteína de membrana de 70 kDa (ALL-r) cuya participación en la fisiología de los linfocitos es aún desconocida. Además, reportamos que el receptor para ALL está presente en LT CD4⁺ humanos en reposo y activados e induce un incremento en la activación de los LT CD4⁺ estimulados vía CD3.

La estimulación con ALL indujo un efecto tipo co-estimulador al incrementar a diferentes niveles celulares los efectos de los anticuerpos anti-CD3. La co-estimulación con ALL incremento la movilización de Ca^{2+} intracelular durante los primeros segundos después de la estimulación, posteriormente incrementó la producción de IL-2 e $\text{IFN}\gamma$, la expresión de CD25 y la proliferación celular sugiriendo que el ALL-r se encuentra participando en el proceso de activación del LT CD4^+ .

Los análisis realizados al ALL-r sugieren que se trata de una molécula principalmente O-glicosilada, con un peso molecular (PM) de 70 kDa, del cual 20% constituye su porción glicosilada. De manera interesante, ninguna de las O-glicoproteínas más abundantes del linfocito T concuerda con el PM de 70 kDa reportado para el ALL-r, CD43 posee un PM de 95-135 kDa, CD45 de 180-220 kDa, CD8 de 30-40 kDa y CD2 de 30-40 kDa. La identificación del ALL-r por secuenciación de aminoácidos mediante el método de Edman no fue posible debido a que el grupo amino terminal se encuentra bloqueado, sin embargo, el análisis de los péptidos del ALL-r por MALDI-TOF encontró que éste solo tiene algún grado de identidad con tres proteínas humanas: un 54% con una chaperona llamada DNaK, 47% con la proteína KIAA0123 y un 44% con una proteína de choque térmico. Ninguna de estas 3 proteínas poseen un grado de identidad lo suficientemente alto para poder decir que sea una de ellas ya que se necesita un porcentaje por arriba del 90% para poder hablar de una homología. Otro dato importante es que de las proteínas que reportaron algún porcentaje de identidad con el ALL-r ninguna se encuentran en la membrana de los linfocitos T. Esto datos

sugieren que el ALL-r se trata de una glicoproteína no reconocida en la membrana del linfocito T. No obstante, para poder afirmar que el ALL-r se trata de una molécula no descrita se requiere la secuencia de sus aminoácidos.

El estudio de carbohidratos y aminoácidos del ALL-r mostró que contiene una alta proporción de GalNAc, Gal y Ac. Siálico, sugiriendo la presencia de O-glicanos en su estructura. En cuanto a la composición total de aminoácidos del ALL-r, se observó que tiene una alta cantidad de residuos de Serina (125), Treonina (22) y Prolina (19), los dos primeros son importantes para generar sitios donde se puede llevar a cabo la O-glicosilación y la prolina se ha observado que es necesaria para la unión de la glicosiltransferasa inicial (ppGalNAcT) (Brockhausen, 1999). La alta proporción de sitios con potencial para la O-glicosilación abre la posibilidad de que este receptor sufra más modificaciones durante el proceso de activación, como ya ha sido reportado por diversos autores para moléculas como el CD43 que cambia su peso molecular en función de la porción sacarídica (ver Figura 3): la glicofoma de 115 kDa de CD43 es expresada por el linfocito T virgen, mientras que los linfocitos T activados expresan la glicofoma de 130 kDa (Piller et al., 1988). Se ha reportado que la adquisición de ácidos siálicos en los O-glicanos puede provocar cambios en la carga neta de una molécula y por tanto generar glicofomas en un isoelectroenfoque o bien que cambios en ciertos aminoácidos por splicing alternativos otorguen cargas diferentes a una proteína dando isoformas, como es el caso para CD45. Estos reportes respaldan parcialmente la posibilidad de que las 4 fracciones del ALL-r encontradas en el isoelectroenfoque y en la cromatografía de intercambio iónico pueden corresponder a otras glico o

isoformas. No obstante, para determinar qué tipo de cambios estructurales determinan dichas fracciones con puntos isoeléctricos diferentes, se necesita estudiar a todas las fracciones obtenidas del ALL-r, verificando los aminoácidos y azúcares presentes en su estructura. Por último, será necesario analizar si estas fracciones se encuentran relacionadas con otros procesos funcionales del linfocito T.

Existen varios reportes en donde se ha encontrado que las estructuras O-glicosídicas como el Core1 ($\text{Gal}\beta 1,3\text{GalNAc}\alpha 1$) pueden ser modificadas debido a una disminución de la actividad de sialiltransferasas como ST3Gal1 y a un incremento de la core1 N-acetilglucosaminiltransferasa durante el proceso de activación del LT CD4^+ (Priatel et al., 2000; Chervenak et al., 1982). También pueden ocurrir cambios más específicos y microheterogéneos sobre una misma glicoproteína, como es el caso de CD45 que sufre incrementos específicos de sialilación durante la activación, mientras que en la superficie celular en general ocurre lo contrario (Hernández et al., 2007). Estos reportes son semejantes a los que obtuvimos usando la ALL, los cuales sugieren que los cambios en la O-glicosilación de membrana inducidos por la activación generan una remodelación de la glicosilación de membrana que favorece el reconocimiento de un mayor número de LT CD4^+ por parte de la ALL y el incremento en la expresión de los ligandos para la ALL. Sin embargo, no podemos precisar si el incremento en el reconocimiento de la ALL es debido a la acción de una glicosiltransferasa sobre varias moléculas de la superficie del linfocito T o por la sobre-expresión del ALL-r, por tanto, se necesitan realizar otros ensayos para identificar qué tipo de

glicosiltransferasas o moléculas se encuentran participando en la generación de nuevos ligandos para la ALL en los linfocitos T activados.

De acuerdo a nuestros primeros resultados, proponemos un modelo de expresión de los ligandos de la ALL. En dicho modelo se muestra que la ALL reconoce al ALL-r sobre los LT CD4⁺ en reposo (**Figura 15A**) y que durante la activación el ALL-r puede aumentar su expresión (**Figura 15B**), o bien, que nuevos ligandos sacarídicos de la ALL son expresados en moléculas diferentes al ALL-r en los LT CD4⁺ activados (**Figura 15C**), lo cual sugiere la participación de nuevas glicosiltransferasas. Con nuestros resultados no es posible discernir quienes son los portadores de los ligandos para la ALL durante la activación, por tal motivo, es necesario realizar ensayos adicionales para identificar a la(s) molécula(s) reconocida(s) por la ALL en los LT CD4⁺ activados. La **figura 15** muestra los modelos probables para la generación de nuevos ligandos para la ALL en los LT CD4⁺ activados.

El proceso de activación del LT CD4⁺, además de cambiar los patrones de O-glicosilación, también puede incrementar la expresión de ciertas moléculas como el CD69 y el Ki-67, mismas que ayudan a la identificación de dicho proceso. El CD69 es un receptor de la superficie del linfocito T expresado durante las primeras 48 h después de un estímulo de activación (Ziegler et al., 1993), y el Ki-67 es una proteína nuclear asociada al proceso de proliferación celular (Winking et al., 2004; Shedlock et al., 2010). La ALL reconoció preferentemente a LT CD4⁺ CD69⁺ y en un menor porcentaje a Ki-67⁺ después de un estímulo con anticuerpos anti-CD3, lo

cual sugiere que la ALL reconoce un patrón de O-glicosilación asociado al proceso de activación celular del LT CD4⁺ humano.

El uso de la ALL como estímulo indicó que esta lectina no es mitogénica para los LT CD4⁺ debido a que no es capaz de inducir la proliferación de linfocitos T de manera directa, pero induce una potenciación de los efectos generados vía CD3 (incremento de la expresión de CD25, incremento de la proliferación y producción de IL-2), sugiriendo que el ALL-r por sí mismo no induce primeras señales de activación como el TCR, sino que su efecto es semejante a una segunda señal de generada por moléculas co-estimuladoras como el CD28 (Acuto y Michel, 2003). Estos hechos sugieren que los O-glicanos reconocidos por la ALL se encuentran asociados a una molécula (el ALL-r) relacionada con la generación de segundas señales. Respecto a los posibles ligandos de la ALL relacionados con la generación de co-estimulación, se descartan aquellas O-glicoproteínas mencionadas anteriormente (CD43, CD45, CD8, CD2) debido a las diferencias en cuanto a su PM. CD28 se excluye ya que este se encuentra en casi todos los LT CD4⁺ y pesa aproximadamente 45 kDa, ICOS tiene un PM=56 y no se encuentra presente en linfocitos T en reposo (Hutloff et al., 1999). La familia de receptores TNFR tampoco corresponden al receptor identificado en este trabajo, debido a que tienen un PM bajo y la mayoría de ellos no se expresan en linfocitos T en reposo. Sin embargo, con nuestros resultados no podemos descartar que el ALL-r pueda pertenecer a una nueva molécula de la familia de CD28 o del TNFR ya que el ALL-r posee características funcionales, como la potenciación de la activación, proliferación y la producción de citocinas, semejantes a estos dos grupos de

moléculas co-estimuladoras. Por otro lado, existe la posibilidad de que alguno de los ligandos mencionados anteriormente pueda estar siendo reconocido por la ALL en los LT CD4⁺ activados, ya que como se mencionó, puede haber cambios de la glicosilación de membrana de los LT CD4⁺ activados que favorezca el reconocimiento de nuevos ligandos por parte de la ALL.

En los linfocitos T, la unión del complejo antígeno-MHCII al complejo TCR-CD3 (primera señal) inicia la activación celular mediante una serie de eventos intracelulares como el incremento del Ca²⁺ intracelular que favorecen la activación de factores de transcripción (Smith-Garvín et al., 2009; Savignac et al., 2007). Las moléculas co-estimuladoras como CD28 tienen la capacidad de incrementar la activación, proliferación, secreción de citocinas y sobrevida a través de la potenciación de la primera señal (Watts y DeBenedette, 1999; Song et al., 2008). A nivel de señales intracelulares encontramos que la interacción de la ALL con su ligando en los linfocitos T en reposo (ALL-r) participa en la potenciación de señales mediadas por los anticuerpos anti-CD3, ya que se observó que la presencia de ALL incrementó la movilización del calcio intracelular en los primeros segundos de la estimulación con anti-CD3, lo cual hace improbable que nuevos ligandos para ALL puedan contribuir en dicha señalización en ese lapso de tiempo. Estos resultados sugieren que el ALL-r reconocido por ALL sobre los LT CD4⁺ en reposo se encuentra favoreciendo señales intracelulares semejante a otras moléculas co-estimuladoras.

Se ha mostrado que algunas moléculas co-estimuladoras pueden participar en la inducción de determinadas citocinas e incluso participar en el balance TH1/TH2,

como el CD28 que induce IL-2 o ICOS que induce IL-10 (Van Berkel y Oosterwegel, 2006; Hutloff et al., 1999). En este estudio se mostró que la presencia del ALL favoreció la producción de IL-2 e IFN γ en las células estimuladas con anti-CD3, pero no así la secreción de IL-4, sugiriendo la inducción de un balance de citocinas tipo TH1. La inducción de citocinas tipo TH1 por la ALL se relaciona indirectamente con otros reportes en donde se menciona que las subpoblaciones de linfocitos T TH1 poseen un perfil de O-glicosilación más denso que aquellas que poseen el sub-tipo TH2 (Toscano et al., 2007), lo cual permite sugerir que el ALL-r puede tener un mayor efecto sobre sub-poblaciones tipo TH1 o bien sobre moléculas que participan principalmente en este balance, sin embargo, esto solo es una especulación que sienta las bases para otros experimentos que analicen los efectos del ALL-r sobre estas subpoblaciones.

Jacalina es una lectina que tiene la misma afinidad que la ALL, reconoce linfocitos T y sus ligandos al igual que los de la ALL también se encuentran sobre moléculas de membrana participantes en el proceso de activación de los LT CD4⁺ humanos (Tamma et al., 2006a; Tamma et al., 2006b). Sin embargo, a diferencia de la ALL, la Jacalina es capaz de inducir directamente la proliferación de LT CD4⁺ e inducir la síntesis de IL-4, a través de la interacción con CD45 (Baba et al., 2007; Tamma et al., 2006a). Nuestros resultados y los reportados para Jacalina apoyan el hecho de que la ALL representa una herramienta muy útil en el análisis de los cambios en la O-glicosilación, debido a que ALL tiene la capacidad de ser específica para una estructura sacarídica diferente a la reconocida por Jacalina, la cual reconoce CD45, y evidenciado también por la discrepancia en cuanto a sus efectos

biológicos. Existen reportes de otras lectinas con especificidad semejante por azúcares simples pero con diferentes efectos sobre los linfocitos T. Tal es el caso de la lectina Morniga M (aislada de *Morus nigra*) y la lectina Artocarpina (aislada al de *Artocarpus integrifolia*) que presentan afinidad por manosa. Estas lectinas ejercen un efecto mitogénico sobre los linfocitos T pero únicamente Morniga M es capaz de inducir apoptosis mediada por caspasas (Benoist et al., 2009). Estos datos apoyan el hecho de que ALL y Jacalina a pesar de tener la misma especificidad pueden reconocer glicoproteínas distintas. El reconocimiento diferencial por la ALL, pueden explicarse con el hecho de que su capacidad de reconocimiento por O-glicanos está determinada por la conformación espacial de los sacáridos presentes en la estructura proteica, sugiriendo que la ALL presenta restricciones alostéricas que permiten la unión a diferentes dominios del ligando (Hernández et al., 2004).

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con un estudio que realizamos recientemente donde se demostró que la ALL incrementó la activación de LT CD4⁺ de ratón estimulados con anticuerpos anti-CD3, sin presentar una actividad mitogénica por sí misma. Este estudio también reportó que la ALL favorece la secreción de citocinas tipo TH1 y además reduce el número de LT CD4⁺ apoptóticos (Urrea et al., 2011). La semejanza en los efectos de la ALL sobre linfocitos T CD4⁺ de humano y de ratón, así como los datos obtenidos por Porras en donde se muestra que las glicoproteínas reconocidas por ALL (ALL-r) en ratón y humanos son muy semejantes, hacen pensar que se trata de la misma

molécula, sin embargo, esto solo podrá ser confirmado cuando ambas moléculas sean aisladas y secuenciadas.

Los resultados de los ensayos funcionales utilizando a la ALL nos ayudan a proponer un modelo de activación en donde una primera señal inducida por los anticuerpos anti-CD3 genera la movilización del calcio intracelular y como consecuencia la expresión de CD25, la proliferación y una baja producción de citocinas (**Figura 16A**), y cuando a este primer estímulo le sumamos el estímulo con la ALL se observa cómo se incrementa significativamente la movilización del calcio intracelular y posteriormente la expresión de CD25, la proliferación y la secreción de citocinas TH1 (**Figura 16C**). Este modelo propone la co-estimulación a través del ALL-r como un mecanismo potenciador semejante a la función de una molécula co-estimuladora, ya que por sí mismo no genera efectos detectables en nuestros parámetros analizados (**Figura 16B**), pero potencia a la primera señal de activación inducida por los anticuerpos anti-CD3.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la ALL reconoce a una O-glicoproteína de 70 kDa no reconocida en la membrana de los Linfocitos T (el ALL-r), y que la estimulación a través de ella como un estímulo primario, no tiene efectos detectables, pero induce un estímulo co-estimulador que mejora la eficiencia de una primera señal de activación. Dicho efecto co-estimulador fue detectado desde los primeros segundos de la estimulación utilizando anticuerpos anti-CD3, ya que se observó un incremento en la concentración del calcio intracelular, sin embargo, aun se necesita investigar el mecanismo responsable. Este último resultado sugiere una capacidad de señalización por parte del ALL-r

en los LT CD4⁺ en reposo. Posteriormente, se analizó el efecto de la co-estimulación con ALL a las 24, 48 y 72 h y se encontró que puede incrementar citocinas como IL-2 y su receptor (CD25) los cuales participan en la inducción de activación y proliferación celular, mismos que fueron encontrados incrementados en los linfocitos T co-estimulados con la ALL.

Este estudio es uno de los primeros que reporta a una lectina específica para O-glicanos que incrementa la activación inducida por anticuerpos anti-CD3 en LT CD4⁺ humanos, pero que es incapaz de inducir por si sola una actividad mitogénica. Nosotros proponemos que la molécula involucrada en dichos efectos es el ALL-r una O-glicoproteína que no había sido identificada o analizada previamente en la membrana del LT CD4⁺, esta identificación se realizó debido a la especificidad que la lectina ALL posee por estructuras O-glicosiladas. Por esta razón, consideramos que estamos aportando una herramienta para el análisis de los mecanismos de activación de los LT CD4⁺ que involucra el reconocimiento de oligosacáridos de la superficie celular y una primera señal de activación.

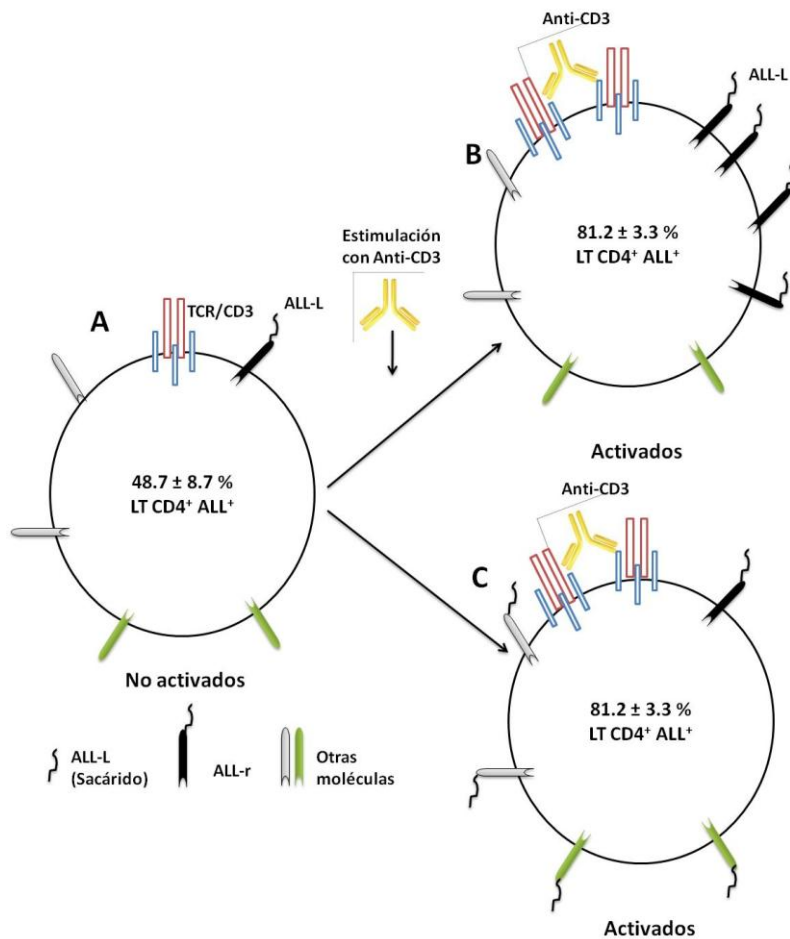


Figura 15. Modelo de la generación de ligandos sacarídicos del ALL (ALL-L) en LT CD4⁺ activados. La figura muestra dos posibles modelos para la generación de ALL-L en los LT CD4⁺ cultivados en presencia de anticuerpos anti-CD3. **A)** En el LT CD4⁺ en reposo se observa la expresión del ALL-r que expresa el ALL-L. **B)** El estímulo de activación induce la expresión *de novo* de un mayor número de moléculas de ALL-r que expresan el ALL-L. **C)** El estímulo de activación induce la generación del ligando sacarídico (ALL-L) en moléculas ya expresadas en la superficie del linfocito T. Cabe mencionar que las 2 posibilidades podrían ocurrir a la vez.

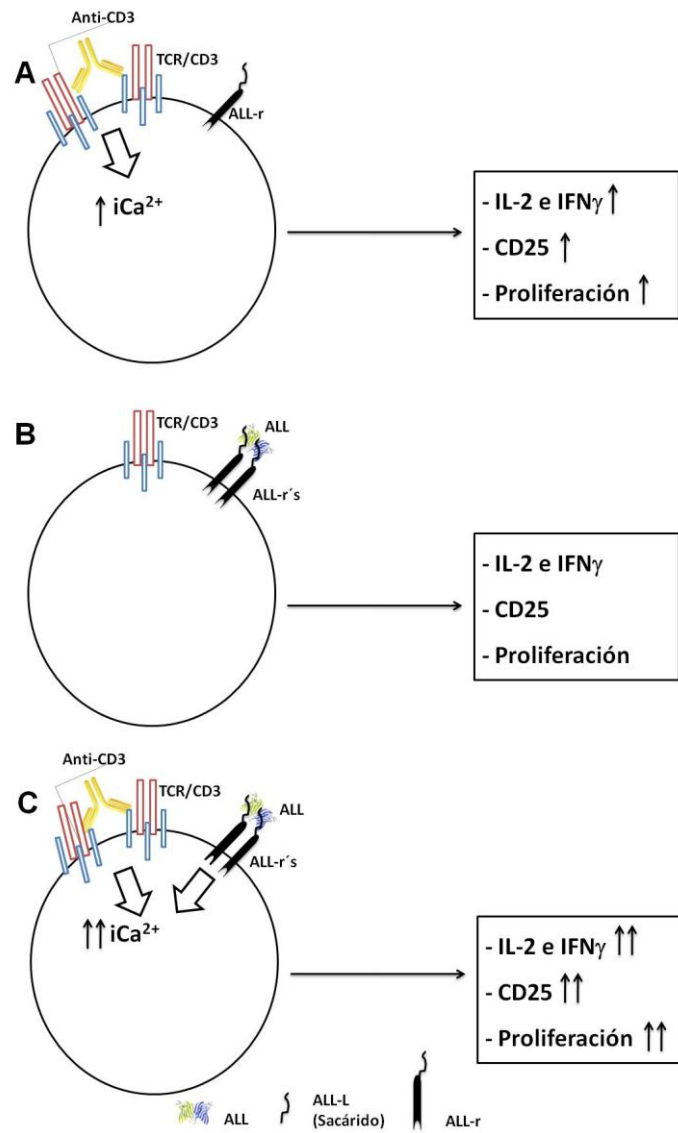


Figura 16. Efecto de la ALL sobre los LT CD4⁺. La figura muestra **A)** el efecto de los anticuerpos anti-CD3 sobre la movilización de Ca²⁺ intracelular y posteriormente sobre la producción de citocinas, expresión de CD25 y proliferación; **B)** La carencia de efecto de ALL sobre los linfocitos T CD4⁺; y **C)** el efecto potenciador del ALL sobre la activación mediada por los anticuerpos anti-CD3. En este último modelo se sugiere que la ALL podría inducir segundas señales de activación (co-estimulación).

CONCLUSIONES

ALL reconoce a una O-glicoproteína de 70 kDa en la membrana de los Linfocitos T la cual no ha sido caracterizada previamente.

ALL es una lectina no mitogénica para LT CD4⁺ humanos.

En LT CD4⁺ humanos activados después de un estímulo con anti-CD3, se sobreexpresa el receptor para ALL con un reconocimiento dependiente de estructuras O-glicosiladas.

La ALL induce efectos sobre la activación de los LT CD4⁺ semejantes a una molécula co-estimuladora.

La ALL incrementa la producción de citocinas tipo TH1 de LT CD4⁺ estimulados con anticuerpos anti-CD3.

La ALL reconoce un patrón de O-glicosilación específico sobre la membrana de los LT CD4⁺ en reposo el cual se asocia a un efecto co-estimulador.

PERSPECTIVAS

Identificar si los ligandos de la ALL presentes en la membrana de los LT CD4⁺ humanos en reposo corresponden a los mismos receptores en LT activados.

- Caracterizar al receptor ALL-r.
- Crear anticuerpos para el bloqueo específico del ALL-r.
- Identificar el gen del ALL-r.

Analizar las vías de señalización afectadas por la estimulación a través del ALL-r.

- Fosforilación de Tirocinas
- PI3K, AKT, PLC, LCK, RAS, RAC, NFAT, NF- κ B, AP-1.

Analizar el efecto de la estimulación con ALL sobre los LT CD4⁺ humanos tipo TH1 y sobre el proceso de muerte por apoptosis.

Analizar las consecuencias de la ausencia del ALL-r en los LT CD4⁺ mediante el silenciamiento del gen para el ALL-r utilizando un RNA de interferencia.

REFERENCIAS

Acuto, O., Michel, F. (2003) CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, **12**: 939-51.

Allenspach, E. J., P. Cullinan, J. Tong, Q. Tang, A. G. Tesciuba, J. L. Cannon, S. M. Takahashi, R. Morgan, J. K., Burkhardt, and A. I. Sperling. (2001) ERM dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity*, **15**: 739–750.

Ashraf, M.T. & Khan, R.H. (2003) Mitogenic lectins. *Med. Sci. Monit.*, **9**: RA265-RA269.

Baba, M., Yong, Ma., B., Nonaka, M., Matsuishi, Y., Hirano, M., Nakamura, N., Kawasaki, N., Kawasaki, N. & Kawasaki, T. (2007) Glycosylation-dependent interaction of Jacalin with CD45 induces T lymphocyte activation and Th1/Th2 cytokine secretion. *J. Leukoc. Biol.*, **81**: 1002–1011.

Baum, L.G., Derbin, K., Perillo, N.L., Wu, T., Pang, M., Uittenbogaart, C. (1996) Characterization of terminal sialic acid linkages on human thymocytes. Correlation between lectin-binding phenotype and sialyltransferase expression. *J. Biol. Chem.*, **271**: 10793-10799.

Benoist, H., Culerrier, R., Poiroux, G., Ségui, B., Jauneau, A., Van, Damme, E.J., Peumans, W.J., Barre, A., Rougé, P. (2009) Two structurally identical mannose-specific jacalin-related lectins display different effects on human T lymphocyte activation and cell death. *J. Leukoc. Biol.*, **86**: 103-114.

Bekri, S. (2006) Importance of glycosylation in enzyme replacement therapy. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS. Oxford: Oxford PharmaGenesis; Chapter 5.

Biselli, R., Matricardi, P.M., D'Amelio, R., Fattorossi, A. (1992) Multiparametric flow cytometric analysis of the kinetics of surface molecule expression after polyclonal activation of human peripheral blood T lymphocytes. Scand. J. Immunol., **4**: 439-447.

Brockhausen, I. (1999) Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. Biochim. Biophys. Acta, **1473**: 67-95.

Brockhausen, I., Schachter, H. and Stanley, P. O-GalNAc Glycans. In: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E., editors. (2009) Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; Chapter **9**.

Burchill, M.A., Yang, J., Vang, K.B., Farrar, M.A. (2007) Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. Immunol. Lett., **114**: 1-8.

Carlsson, S.R., Sasaki, H. and Fukuda, M. (1986) Structural variations of O-linked oligosaccharides present in leukosialin isolated from erythroid, myeloid and T-lymphoid cell lines. J. Biol. Chem., **261**: 12787-12795.

Carreno, B.M., Collins, M. (2002) The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, **20**: 29-53.

Chervenak, R. and Cohen, J. J. (1982) Peanut lectin binding as a marker for activated T-lineage lymphocytes. *Thymus*, **4**: 61-67.

Comelli, E.M., Sutton-Smith, M., Yan, Q., Amado, M., Panico, M., Gilmartin, T., Whisenant, T., Lanigan, C.M., Head, S.R., Goldberg, D., Morris, H.R., Dell, A. & Paulson, J.C. (2006) Activation of murine CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. *J. Immunol.*, **177**: 2431-2440.

Cruz-Munoz, M. E., E. Salas-Vidal, N. Salaiza-Suazo, I. Becker, G. Pedraza-Alva, and Y. Rosenstein. (2003) The CD43 coreceptor molecule recruits the ζ -chain as part of its signaling pathway. *J. Immunol.*, **171**: 1901–1908.

Earl, L.A., Baum, L.G. (2008) CD45 glycosylation controls T-cell life and death. *Immunol. Cell Biol.*, **86**: 608-15.

Feldmann, M., Londei, M., Haworth, C. (1989) T cells and lymphokines. *Br. Med. Bull.*, **45**: 361-370.

Fortune, F., Lehner, T. (1988) Phenotypic expression of *Vicia villosa* binding T cell subsets, as markers of contrasuppressor cells in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.*, **74**: 100-104.

Galvan, M., Murali-Krishna, K., Ming, L.L., Baum, L., Ahmed, R. (1998) Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from virally infected mice can distinguish effector/memory CD8+ T cells from naive cells. *J. Immunol.*, **161**: 641-648.

Gee, K.R., Brown, K.A. & Chen, W.N., Bishop-Stewart, J., Gray, D., Johnson, I. (2000) Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca (2+)-indicator dyes. *Cell Calcium*, **27**: 97-106.

Gillespie, W., Paulson, J.C., Kelm, S., Pang, M., Baum, L.G. (1993) Regulation of alpha 2,3-sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin (PNA)+ to PNA- phenotype in developing thymocytes. *J Biol Chem.* **268**: 3801-3804.

Golks, A., Thao, Tran, T.T., Goetschy, J.F. & Guerini, D. (2007) Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation. *European Molecular Biology Organization J.*, **26**: 4368-4379.

Gross, C., Schmidt-Wolf, I.G., Nagaraj, S., Gastpar, R., Ellwart, J., Kunz-Schughart, L.A., Multhoff, G. (2003). Heat shock protein 70-reactivity is associated with increased cell surface density of CD94/CD56 on primary natural killer cells. *Cell Stress Chaperones*, **8**: 348-360.

Hasbold, J., Gett, A.V., Rush, J.S., Deenick, E., Avery, D., Jun, J. & Hodgkin, P.D. (1999) Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol. Cell Biol.*, **77**: 516-522.

Hernández, J., Garfias, Y., Reyes-Leyva, J., Chávez, R., Lascurain, R., Vargas, J., Zenteno, E. (2002) Peanut and *Amaranthus leucocarpus* lectins discriminate between memory and naive/quiescent porcine lymphocytes. Vet. Immunol. Immunopathol., **84**: 71-82.

Hernandez, J.D., Klein, J., Van, Dyken, S.J., Marth, J.D., Baum, L.G. (2007) T-cell activation results in microheterogeneous changes in glycosylation of CD45. Int. Immunol., **19**: 847-856.

Hernandez, J.D., Nguyen, J.T., He, J., Wang, W., Ardman, B., Green, J.M., Fukuda, M., Baum, L.G. (2006) Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death. J. Immunol., **177**: 5328-5336.

Hernandez, P., Debray, H., Jaekel, H., Garfias, Y., Jimenez-Martinez, M.C., Martinez-Cairo, S. & Zenteno, E. (2001) Chemical characterization of the lectin from *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* by 2-D proteome analysis. Glycoconj. J., **18**: 321-329.

Hernandez, P., Tetaert, D., Vergoten, G., Debray, H., Porras, F., Alvarez, G., Agundis, C., Degand, P. & Zenteno, E. (2004) Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin for O-glycopeptides. Biochim. Biophys. Acta, **1674**: 282-290.

Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., Kroczeck, R.A. (1999) ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. Nature, **397**: 263-6.

Ishikawa, K., Nagase, T., Suyama, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nombra N., and Ohara, O. (1998). Prediction of the coding sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins *in vitro*. DNA Res., **5**: 169-176.

Jung, T., Schauer, U., Heusser, C., Neumann, C. & Rieger, C. (1993) Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. J. Immunol. Methods, **159**: 197-207.

Lascurain, R., Chavez, R., Gorocica, P., Perez, A., Montaña, L.F. & Zenteno, E. (1994) Recognition of a CD4⁺ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. Immunology, **83**: 410-413.

Lascurain, R., Porras, F., Báez, R., Chávez, R., Martínez-Cairo, S., Alvarez, G., Zenteno, E. (1997) *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes human naive T cell subpopulations. Immunol. Invest., **26**: 579-87.

Lefrancois, L. (1987) Expression of carbohydrate differentiation antigens during ontogeny of the murine thymus. J. Immunol., **139**: 2220-2229.

Ilani, T., Khanna, C., Zhou, M., Veenstra, T.D., Bretscher, A. (2007) Immune synapse formation requires ZAP-70 recruitment by ezrin and CD43 removal by moesin. J. Cell Biol., **179**: 733-746.

Nel, A.E. (2002) T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. J. Allergy Clin. Immunol., **109**: 758-70.

Ortiz, B., Porras, F., Hernández, P., Martínez-Cairo, S., Lascurain, R. & Zenteno, E. (2002) Differential expression of a 70 kDa O-glycoprotein on T cells: a possible marker for naive and early activated murine T cells. *Cell. Immunol.*, **218**: 34-45.

Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.*, **4**: 2411-2423.

Pace, K.E., Hahn, H.P., Pang, M., Nguyen, J.T., and Baum, L.G. (2000) Cutting edge: CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1 induced T cell death. *J. Immunol.*, **165**: 2331-2334.

Pereira, M.E., Kabat, E.A., Lotan, R., Sharon, N. (1976) Immunochemical studies on the specificity of the peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. *Carbohydr. Res.*, **51**: 107-118.

Perillo, N.L., Uittenbogaart, C.H., Nguyen, J.T., Baum, L.G. (1997) Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J. Exp. Med.*, **185**: 1851-1858.

Perillo, N.L., Pace, K.E., Seilhamer, J.J., Baum, L.G. (1995) Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, **378**: 736-739.

Piller, F., Piller, V., Fox, R.I., Fukuda, M. (1988) Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **15**: 15146-15150.

Porras, F., Lascurain, R., Chávez, R., Ortiz, B., Hernández, P., Debray, H., Zenteno, E. (2000) Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine naive thymocytes. *Glycobiology*, **10**: 459-465.

Porras, F., Urrea, F., Ortiz, B., Martínez-Cairo, S., Bouquelet, S., Martínez, G., Lascurain, R., Zenteno, E. (2005) Isolation of the receptor for the *Amaranthus leucocarpus* lectin from human T lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1724**: 155-162.

Priatel, J.J., Chui, D., Hiraoka, N., Simmons, C.J., Richardson, K.B., Page, D.M., Fukuda, M., Varki, N.M., Marth, J.D. (2000) The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity*, **12**: 273–283.

Prussin, C. & Metcalfe, D.D. (1995) Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J. Immunol. Methods*, **188**: 117-128.

Pulido, R., Sánchez-Madrid, F. (1990) Glycosylation of CD45: carbohydrate composition and its role in acquisition of CD45RO and CD45RB T cell maturation-related antigen specificities during biosynthesis. *Eur. J. Immunol.*, **20**: 2667-2671.

Ralph, S.J., Thomas, M.L., Morton, C.C., Trowbridge, I.S. (1987) Structural variants of human T200 glycoprotein (leukocyte-common antigen). *EMBO J.*, **6**: 1251-1257.

Reisner, Y., Linker-Israeli, M., Sharon, N. (1976) Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cell. Immunol.*, **25**: 129-134.

Saitoh, O., Piller, F., Fox, R.I., and Fukuda, M. (1991) T-lymphocytic leukemia expresses complex, branched O-linked oligosaccharides on a major sialoglycoprotein, leukosialin. *Blood*, **77**: 1491-1499.

Savage, D., Mattson, G., Desai, S., Nielander, G., Morgensen, S. & Conklin, E. (1992) *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*, Pierce Chemical Company, Rockford, IL, pp 25–42.

Savignac, M., Mellström, B., Naranjo, J.R. (2007) Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflugers Arch.*, **454**: 523-33.

Sette, C. (2010) Post-translational regulation of star proteins and effects on their biological functions. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **693**: 54-66.

Sharon, N., Lis, H. (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, **14**: 53R-62R.

Shedlock, D.J., Talbott, K.T., Morrow, M.P., Ferraro, B., Hokey, D.A., Muthumani, K., Weiner, D.B. (2010) Ki-67 staining for determination of rhesus macaque T cell proliferative responses ex vivo. *Cytometry A.*, **77**: 275-84.

Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., Jordan, M.S. (2009) T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.*, **27**: 591-619.

Song, J., Lei, F.T., Xiong, X., Haque, (2008) Intracellular signals of T cell costimulation. *Cell. Mol. Immunol.*, **5**: 239-247.

Symons, A., Barclay, A.N. (2000) Molecular basis of antigenic differences between the RT7 alleles of rat CD45. *Immunogenetics*, **51**: 747-750.

Tamma, S.M., Balan, S.P., Chung, K.W., Pahwa, S. (2006a) The lectin jacalin plus costimulation with anti-CD28 antibody induces phosphorylation of p38 MAPK and IL-4 synthesis-I. *J. Leukoc. Biol.*, **79**: 876-880.

Tamma, S.M., Chung, K.W., Patel, T., Balan, S.P., Pahwa, S. (2006b) p38 MAPK plays a role in IL-4 synthesis in jacalin plus CD28-stimulated CD4+ T cells--II. *J. Leukoc. Biol.*, **79**: 1339-1347.

Tonks, N.K., Diltz, C.D., Fischer, E.H. (1988) Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.*, **263**: 6731-6737.

Toscano, M.A., Bianco, G.A., Ilarregui, J.M., Croci, D.O., Correale, J., Hernandez, J.D., Zwirner, N.W., Poirier, F., Riley, E.M., Baum, L.G., Rabinovich, G.A. (2007) Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat. Immunol.*, **8**: 825-834.

Trinchieri, G., Peritt, D., Gerosa, F. (1996) Acute induction and priming for cytokine production in lymphocytes. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **7**: 123-132.

Tsuboi, S., Fukuda, M. (1997) Branched O-linked oligosaccharides ectopically expressed in transgenic mice reduce primary T-cell immune responses. *EMBO J.*, **16**: 6364-6373.

Tsuboi, S., Fukuda, M. (1998) Overexpression of branched O-linked oligosaccharides on T cell surface glycoproteins impairs humoral immune responses in transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, **273**: 30680-30687.

Urrea, F., Zenteno, E., Avila-Moreno, F., Sanchez-Garcia, F.J., Zuñiga, J., Lascurain, R., and Ortiz-Quintero, B. (2011) *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) enhances anti-CD3-dependent activation of murine T cells and promotes cell survival. *Immunol. Invest.***40**: 113-29.

Watts, T.H., DeBenedette, M.A. (1999) T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr. Opin. Immunol.*, **11**: 286-93.

Winking, H., Gerdes, J., Traut, W. (2004) Expression of the proliferation marker Ki-67 during early mouse development. *Cytogenet. Genome Res.*,**105**: 251-256.

Van, Berkel, M.E., Oosterwegel, M.A. (2006) CD28 and ICOS: similar or separate costimulators of T cells? *Immunol. Lett.*, **105**: 115-22.

Vandenbroeck, K., Alloza, I., Brehmer, D., Billiau, A., Proost, P., McFerran, N., Rudiger, S., Walker, B. (2002). The conserved helix C region in the superfamily of interferon-gamma/interleukin 10-related cytokines corresponds to a high affinity binding site for HSP70 chaperone DnaK. *J. Biol. Chem.*, **277**: 25668-25676.

Viola, A., Lanzavecchia, A. (1996) T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science*, **273**: 104-106.

Xu, Z., Weiss, A. (2002) Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. *Nat. Immunol.*, **3**: 764-771.

Zenteno, E., Lascurain, R., Montaña, L.F., Vázquez, L., Debray, H. & Montreuil, J. (1992) Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj. J.*, **9**: 204-208.

Zenteno, E. & Ochoa, J.L. (1988) Purification of a lectin from *Amaranthus leucocarpus* by affinity chromatography. *Phytochemistry*, **27**: 313-317.

Ziegler, S.F., Ramsdell, F., Hjerrild, K.A., Armitage, R.J., Grabstein, K.H., Hennen, K.B., Farrah, T., Fanslow, W.C., Shevach, E.M., Alderson, M.R. (1993) Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. *Eur. J. Immunol.*, **23**: 1643-1648.