



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Bioquímicas

Caracterización del perfil de glicosilación en subpoblaciones de linfocitos T murinos por citometría de flujo

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

María de Jesús Cachelín Albarrán

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Eda Patricia Tenorio Zumárraga- Facultad de Medicina
Rafael Saavedra – Instituto de Investigaciones Biomédicas
Arturo Edgar Zenteno Galindo- Facultad de Medicina

Ciudad de México. junio, 2022



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.



Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Eda Patricia Tenorio y el Dr. Edgar Zenteno Galindo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, UNAM.

La beca de estudios de posgrado fue otorgada por CONACYT con el número de registro de Becario 895813

Este trabajo fue apoyado por los proyectos:

- PAPIIT (DGAPA, UNAM): 218719
- PAPIIT (DGAPA, UNAM): IN213818
- PAPIIT (DGAPA, UNAM): 099-602-08.

AGRADECIMIENTOS

- A mi hija Julieta, por recordarme que la vida se trata de aprender y ser feliz. Su presencia ilumino este camino y mi vida entera.
- A mis papas, hermanos, Eduardo, Evelin y Rosi por su apoyo, cariño, y cuidados. Su mano en momentos difíciles ha hecho que nunca desista.
- A mis abuelitos, que desde pequeña creyeron en mí, me alentaron y siempre me acompañaron.
- A mi comité Tutoral, Dra. Eda Patricia Tenorio Zumárraga, Dr. Edgar Zenteno Galindo y Dr. Rafael Saavedra por haber dirigido este trabajo, por haber confiado en mí, por su apoyo, paciencia y los consejos en todo el proceso de elaboración de esta Tesis.

Contenido

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 6 |
| ABSTRACT..... | 8 |
| ABREVIACIONES..... | 10 |
| I.- INTRODUCCIÓN..... | 12 |
| 1.1 Linfocitos T | 12 |
| 1.2 Células de Memoria | 18 |
| 1.3 | 20 |
| Glicosilación | 20 |
| 1.4 Ácido siálico | 24 |
| 1.5 Glicosilaciones en las células T..... | 27 |
| 1.6 Lectinas | 29 |
| 2.-JUSTIFICACIÓN | 32 |
| 3.- HIPÓTESIS..... | 32 |
| 4.-OBJETIVO GENERAL | 32 |
| 4.1.-OBJETIVOS PARTICULARES: | 33 |
| 5.-MATERIAL Y MÉTODOS..... | 33 |
| 5.1 Animales..... | 33 |
| 5.2. Soluciones | 33 |
| 5.3 Obtención de esplenocitos de ratón..... | 34 |
| 5.4 Citometría de flujo | 34 |
| 5.4.1 Citómetro de flujo..... | 34 |
| 5.4.2 Anticuerpos, colorantes y lectinas..... | 35 |
| 5.4.3 Inmunofluorescencia Directa | 37 |
| 5.4.4 Inmunofluorescencia Indirecta. | 37 |
| 5.4.5 Determinación de Viabilidad..... | 37 |
| 5.4.6 Software de análisis FlowJo..... | 37 |
| 6.-RESULTADOS..... | 38 |
| 6.1 Titulación de anticuerpos y lectinas..... | 38 |

| | |
|---|----|
| 6.2 Estrategia de análisis..... | 43 |
| 6.3 Análisis de las Glicosilaciones en subpoblaciones de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ | 45 |
| 7.-DISCUSIÓN | 55 |
| 11.-CONCLUSIÓN | 64 |
| 11.-PERSPECTIVAS..... | 65 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 65 |

RESUMEN

La glicosilación es una de las modificaciones más importantes de proteínas y lípidos. Los glicoconjugados de la superficie celular desempeñan un papel importante en diversas funciones biológicas, como las interacciones célula con célula y señalización celular.

En el sistema inmunitario las proteínas secretadas y de superficie involucradas en la respuesta inmunitaria están glicosiladas. Los glicanos juegan un papel crucial en los contactos intercelulares y la migración de leucocitos, estas interacciones son importantes en la activación, proliferación de leucocitos y durante la respuesta inmunitaria. Las proteínas inmunitarias clave, como el TCR, los antígenos del MHC, los TLR y los anticuerpos también están glicosilados. En los linfocitos T las glicosilaciones son importantes para regular los pasos fisiológicos clave como el desarrollo y la selección de timocitos, la activación y la señalización, así como la diferenciación y proliferación. Sin embargo, hasta este momento hay algunos estudios previos que describen las glicosilaciones en las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, pero aún falta identificar y describir glicosilaciones presentes en linfocitos T de memoria.

La hipótesis es que cada población de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ *naïve*, memoria central, memoria efectora y linfocitos efectores tienen un perfil glucosídico particular. Por lo tanto, al identificar y analizar los perfiles de glicosilación en subpoblaciones *naïve*, memoria central, memoria efectora y linfocitos efectores T CD4⁺ y T CD8⁺ se puede contribuir a definir perfiles de glicosilación específicos para cada subpoblación, que favorezca el reconocimiento de estados funcionales celulares que no son actualmente identificables por estudios clásicos de fenotipificación.

En la etapa experimental se usaron esplenocitos de ratón recién obtenidos, se incubaron con las lectinas biotiniladas *Canavalia ensiformis* ConA, *Griffonia/Bandeiraea simplicifolia* I GSLI, *Vicia villosa* VVA, *Amaranthus leucocarpus* ALL, *Peanut agglutinin* PNA, *Sambucus nigra* SNA y *Maackia amurensis* II MAII y Streptavidine Brilliant Violet421. Posteriormente se realizó la incubación con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD44, anti-CD62L y anti-CD16/32. Las células incubadas fueron analizadas inmediatamente en el citómetro de flujo y posteriormente con el software FlowJo con una línea de análisis diseñada para identificar las subpoblaciones *naïve*, memoria central, memoria efectora/efectora con sus respectivas glicosilaciones.

En los resultados, se identificó la presencia de los glicanos α -manosas y N-acetilgalactosamina reconocidas por las lectinas Con A y VVA respectivamente en las subpoblaciones *naïve*, memoria central, memoria efectora y linfocitos efectores (Mem_{ef}/Ef) tanto de CD4⁺ como de CD8⁺. La

Isolectina GSLI-B4 que identifica al glicano α -Gal distingue una población negativa y una positiva en todas las subpoblaciones analizadas de CD4⁺ y CD8⁺. Específicamente en los linfocitos CD4⁺ el porcentaje de la población positiva de los linfocitos *naïve* fue de 89.9%, en Mem_{ef}/Ef de 95.2% y en los linfocitos de memoria central 96.2%. En los linfocitos CD8⁺, en la subpoblación *naïve* el porcentaje de población positiva fue de 82.3%, mientras que en Mem_{ef}/Ef fue de 97.9% y en memoria central de 88%. El patrón de expresión de las glicosilaciones a las que se une PNA también es semejante entre las poblaciones analizadas, en las cuales expresan una población positiva, excepto en los linfocitos CD4⁺ efectoras/memoria efectora, ya que, en esta, hay una población positiva de 94.3% y negativa de 5.7%. Las glicosilaciones reconocidas por ALL, tienen un patrón de expresión diferente entre linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. En las subpoblaciones CD4⁺ hay una población positiva y una negativa, mientras que todas las subpoblaciones de CD8⁺ son ALL+ con patrones de expresión semejantes. En las moléculas sializadas, observamos que las moléculas reconocidas por MAA II se expresan a muy altos niveles en todas las subpoblaciones de CD4⁺ y CD8⁺ mientras que las moléculas reconocidas por SNA fueron las únicas que muestran un patrón de expresión particular en cada subpoblación. En la subpoblación Mem_{ef}/Ef CD8⁺ se observa una población SNA++ con un porcentaje de 18.6% y una IMF de 14204 es decir con mayor nivel de expresión al glicano que reconoce SNA y otra población SNA+ con un porcentaje de 59.8% pero con una IMF de 507, es decir con menor expresión.

Lo cual quiere decir que la población SNA+ en los linfocitos de memoria efectora, pudiera corresponder a linfocitos efectoras que han perdido su ácido siálico al activarse, y producen citocinas como el IFN- γ o bien se convierten rápidamente en citotóxicos, sin embargo, no proliferan mucho, mientras que la población con alto nivel de expresión, es decir la población SNA++, podría considerarse linfocitos de memoria efectora, aun sin activarse. Esto es importante porque la lectina SNA podría utilizarse como un marcador fenotípico de diferenciación una célula de memoria efectora a una efectora en el modelo murino.

ABSTRACT

Glycosylation is one of the most important modifications of proteins and lipids. Glycoconjugates from the cell surface perform an important role in several biological functions, such as cell-cell interactions and cellular signalling.

The majority of cell surface and secreted proteins involved in the immune response are glycosylated. Glycans play a crucial role in intercellular contacts and leukocyte migration. These interactions are important in activation, proliferation of leukocytes, and during the immune response. The key immune proteins, such as TCR, MHC, TLR, and antibodies are glycosylated. Glycosylations are important in lymphocytes for regulating the key physiological steps within T cell biology, such as development and thymocyte selection, activation, and signalling, as well as differentiation and proliferation. However, there have been no prior studies until now that identify or describe glycosylations present in the subpopulations of CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells.

We therefore used recently derived mouse splenocytes to identify and analyze glycosylation profiles in naïve, central memory, and effector memory/effector subpopulations of the CD4⁺ and CD8⁺ T cells. These were stained with the biotinylated lectins *Canavalia ensiformis* ConA, *Griffonia/Bandeiraea simplicifolia* I GSLI, *Vicia villosa* VVA, *Amaranthus leucocarpus* ALL, *Peanut agglutinin* PNA, *Sambucus nigra* SNA, and *Maackia amurensis* II MAII and Streptavidina Brilliant Violet421. Staining was later performed with the antibodies CD3, CD4, CD44 CD62L, and CD16/32. The stained cells were immediately recorded in the flow cytometer and analyzed using FlowJo with a line of analysis designed to identify naïve, central memory, and effector memory/effector subpopulations with their respective glycosylations.

These results identified the presence of the α -mannose glycan and N-Acetylgalactosamine, recognized by the ConA and VV lectins respectively, in the naïve, central memory, and effector memory/effector subpopulations of both CD4⁺ and CD8⁺. The GSLI-B4 isolectin, which identifies the α -Gal/GalNAc glycan, expresses both a negative and a positive population in all subpopulations analyzed. The expression pattern of the glycosylations that PNA binds to is also similar among the populations analyzed, in which a positive population is expressed, except in the CD4⁺ effector memory/effector cells, as these have both a positive and a negative population. Moreover, the glycosylations recognized by ALL have a different expression pattern between CD4⁺ and CD8⁺ cells. Interestingly, a notably larger percentage of ALL⁻ cells are concentrated in the naïve population, while all CD8⁺ populations are ALL⁺ with similar expression patterns. In the sialylated molecules, we observe that the molecules recognized by MAA II are expressed at very

high levels in all CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations, while the molecules recognized by SN were the only ones to display a particular expression pattern in each subpopulation. In the CD4⁺ and CD8⁺ effector memory/effector cells, a population with a higher level of expression of the SN⁺⁺ lectin and another population with a lower SN⁺ expression are observed in both cell types. However, this is more evident in the CD8⁺ cells.

The above means that the SN⁺ population in the effector memory cells could correspond to activated cells, while the population with a high level of expression could be effector memory cells. This is important because the SNA lectin could be used as a phenotype marker to distinguish an effector memory cell from an effector in the murine model.

ABREVIACIONES

| | |
|-----------------------|--|
| AcMo | Anticuerpos monoclonales |
| ALL | Lectina <i>Amaranthus leucocarpus</i> |
| ConA | <i>Canavalina ensiformis</i> |
| CRD | Dominios de Reconocimiento de Carbohidratos |
| cECT | Células epiteliales de la corteza tímica |
| GalNAc | N-acetilgalactosamina |
| GBP | Proteínas de unión a glicanos |
| GlcNAc | N-acetilglucosamina |
| GSL-I | Lectina Griffonia/Bandeiraea simplicifolia I |
| IMF | Intensidad Media de Fluorescencia |
| Ig | Inmunoglobulinas |
| Linfocitos TC | Linfocitos T citotóxicos |
| Linfocitos TH | Linfocitos T cooperadores |
| Mem _{ef} /Ef | Células de memoria efectora y linfocitos efectores |
| MA II | Lectina <i>Maackia amurensis</i> II |
| ManNAc | N-acetilmanosamina |
| ManNAc-6P | N-acetilmanosamina-6-fosfato |
| mTEC | Células epiteliales de la médula tímica |
| Neu5Ac | Ácido N-acetilneuramínico |
| Neu5Ac-9P | Ácido N-acetilneuramínico-9-fosfato |
| Neu5Gc | Ácido N-glicolilneuramínico |

| | |
|------------|---|
| OST | Complejo Enzimático Oligosacariltransferasa |
| PNA | <i>Arachis hypogaea</i> (Peanut) |
| PSA | Ácido polisialico |
| SNA | Lectina <i>Sambucus nigra</i> |
| Tcm | Células T memoria central |
| Tem | Células T memoria efectora |
| Trm | Células T de memoria residentes |
| UDP-GlcNAc | UDP-N-acetilglucosamina |
| VVA | Aglutinina <i>Vicia villosa</i> |

I.- INTRODUCCIÓN

1.1 Linfocitos T

Los linfocitos T son células del sistema inmune adaptativo que maduran en el timo a partir de progenitores linfoides comunes provenientes de la médula ósea. Las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ egresan del timo y viajan a través del sistema circulatorio para poblar los órganos linfoides secundarios. Los linfocitos T expresan receptores de antígeno (TCR, por siglas en inglés) distribuidos de forma clonal, cada uno específico frente a un determinante antigénico diferente e inician la respuesta inmunitaria adaptativa al interactuar, por medio de su TCR, con complejos de MHC/péptido en células presentadoras de antígeno que han quedado expuestas a agentes patógenos.¹⁻³

Los linfocitos T se originan en la médula ósea y completan su maduración en el timo, donde existen tres tipos de células epiteliales tímicas que tienen funciones importantes en la producción de linfocitos T. Las células nodriza epiteliales, que están en la corteza exterior, células epiteliales de la corteza tímica (cECT), que forman una red epitelial y las TEC medulares, que se organizan principalmente en racimos. Estos tres tipos de células epiteliales tienen diferentes funciones en la proliferación, maduración y selección de los timocitos.³⁻⁴ Al ingresar al timo, los timocitos carecen de los correceptores CD4 y CD8. Pasan por cuatro estadios de maduración durante los cuales ocurre el reordenamiento de la cadena β del TCR seguida de la formación del pre-TCR. Al emitir señales el pre TCR promueve la maduración de las células y una rápida proliferación de estas en la corteza subcapsular, así como una supresión del reordenamiento de genes que codifica para la cadena β del TCR. Esto da lugar a la exclusión alélica del locus de la cadena β , y al inicio del reordenamiento de la cadena α del TCR²⁻⁵. Posteriormente, el timocito DP (Doble positivo, CD4+CD8+) expresa exitosamente una cadena TCR α que se asociará con la cadena TCR β dando lugar al TCR maduro que sustituirá al pre-TCR.²⁶ Estas células DP que expresan un complejo TCR $\alpha\beta$ son las más abundantes en el timo, residen en la corteza, se mueven activamente dentro del microambiente cortical buscando la interacción de su TCR con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por siglas en inglés) asociadas a péptidos propios, un proceso crucial para la selección tímica.⁵ En la selección positiva, se elegirá aquellos timocitos capaces de reconocer antígenos mostrados por moléculas del MHC propio, que se expresan en las células epiteliales de la corteza tímica. En esta etapa, el suceso crítico es que el TCR reconozca a las moléculas del MHC, con la intensidad correcta. El reconocimiento será exitoso en función de la avidéz del TCR por la molécula del MHC, ya que tanto las interacciones

con alta como con baja avidéz darán como resultado la eliminación de esos timocitos, y serán únicamente exitosos aquellos que hayan mostrado una avidéz intermedia, asegurando así la eficacia del reconocimiento de los linfocitos T a las moléculas del MHC propias⁴.

Los timocitos seleccionados positivamente se trasladan a la médula tímica donde interactúan con los auto-péptidos que se muestran en el microambiente medular, y continúan con el proceso de maduración fenotípica y funcional. Durante la selección negativa, las interacciones fuertes entre TCR y el péptido propio-MHC favorecen la apoptosis de los linfocitos T, evitando la maduración y la emigración de linfocitos T fuertemente autorreactivos y con el potencial de montar una respuesta autoinmune en la periferia.⁶⁻⁷

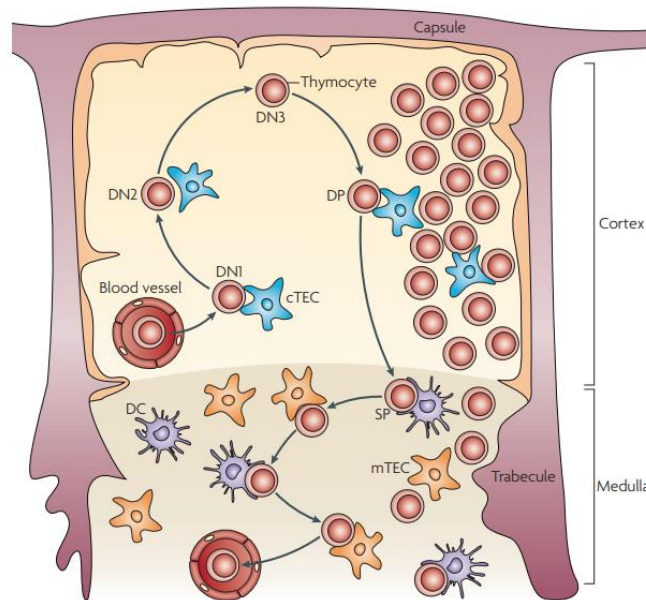


FIGURA 1. Maduración de los linfocitos T. Los progenitores de los linfocitos T ingresan al timo. El desarrollo de etapas secuenciales de timocitos doble negativos (DN) se acompaña de un movimiento hacia afuera de las células hacia la zona subcapsular. Las células doble positivas (DP) se mueven a través de la corteza y escanean las células epiteliales tímicas corticales (cTEC) para seleccionar moléculas MHC de clase I y II de manera positiva. Después de la selección positiva y el compromiso del linaje CD4 o CD8, los timocitos positivos simples (PS) se reubican rápidamente en la médula, donde analizan las células presentadoras de antígenos medulares en su mayoría células dendríticas (DC) y TEC medulares (mTEC). Figura tomada de Klein L. 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction.

Después de completar su maduración los timocitos SP maduros abandonan el timo como emigrantes tímicos recientes (RTE) y se unen a la población de linfocitos periféricos. Los RTE son funcionalmente diferentes de los linfocitos T *naïve* maduros, ya que los RTE muestran una menor capacidad de proliferación y producción de citocinas. Adquieren una competencia funcional completa en los órganos linfoides secundarios que se identifica por la expresión de

CD45RA en su superficie y circulan continuamente entre los órganos linfoides secundarios y la sangre a través del receptor de quimiocinas CCR7 y el ligando CD62L.^{6,8-9} En los seres humanos, los linfocitos T *naïve* expresan CD45RA y carecen de expresión del marcador asociado a la memoria CD45RO. Se requiere la expresión de al menos un marcador adicional de linfocitos T *naïve* como CCR7, CD62L o CD27 para distinguirlas.

El linfocito T *naïve*, circula continuamente por la sangre, linfa, tejidos linfoides secundarios y ganglios linfáticos, en busca de su antígeno. Cuando encuentra a una célula dendrítica (DC por sus siglas en inglés) que exprese un MHC-péptido al cual pueda unirse, iniciará un programa de activación donde se efectuará una polarización funcional en las células. Dependerán de las citocinas inductoras que estén presentes, el tipo de células que se formarán, por ejemplo, Th1, Th2, Th9, Th17¹²

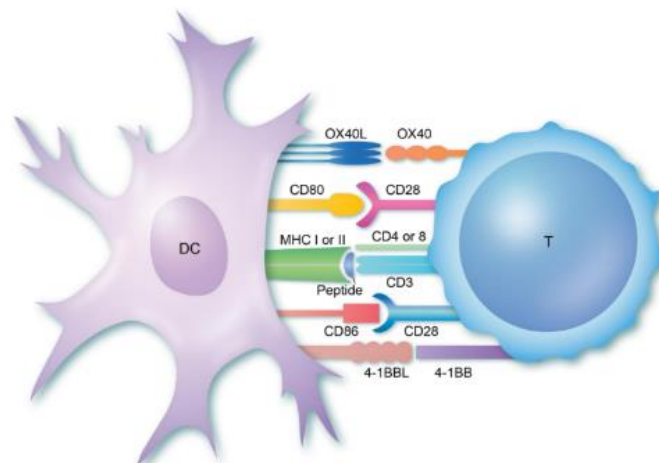


FIGURA 2. Moléculas involucradas en la activación de linfocitos T. La célula T reconoce el complejo MHC/péptido en la APC a través de su TCR y recibe señales adicionales por moléculas coestimuladoras. Figura tomada de Mary Cavanagh, Science Museum London, UK Updated by – Emily Gwyer Findlay, University of Edinburgh, UK. Bite sized Immunology. British society of immunology.

Durante una respuesta inmunitaria, las células presentadoras de antígenos (APC) procesan y presentan péptidos extraños en los surcos del MHC de clase I o clase II en su superficie celular, la expresión de MHC II está restringida a APC, mientras que MHC I está presente en la mayoría de las células nucleadas.¹¹ El TCR de los linfocitos T CD4⁺ reconoce péptidos unidos a moléculas

MHC II, mientras que el CD8⁺ reconoce péptidos unidos a moléculas MHC I. Las moléculas MHC I unen péptidos de proteínas intracelulares procesadas en el citoplasma de las células nucleadas por estructuras llamadas proteasomas, el acoplamiento del péptido ocurre en el retículo endoplásmico; Una vez formado el complejo péptido-molécula clase I, este se transporta a la membrana celular. El MHC II presenta péptidos de proteínas extracelulares endocitadas por las APC, procesadas en los lisosomas para obtener el péptido y acoplarlo dentro la vesícula previamente formada en el retículo endoplásmico. Las bases del reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T comprenden la interacción de diversas estructuras, entre ellas la molécula de MHC, el antígeno, la molécula correceptora CD4 o CD8 y el receptor de antígenos T (TCR)

Las DC migran desde la periferia a los ganglios linfáticos, aquí, las células hacen movimientos de rastreo, lo que proporciona un área extensa en la que los linfocitos *naïve* entran en contacto con las DC para explorar la amplia gama de antígenos. Los linfocitos T, se pueden encontrar en cualquier tejido, pero están más concentrados en los órganos linfoides secundarios.¹³ Cuando los linfocitos T reconocen el complejo MHC-Ag en la DC se forma la sinapsis inmunológica (SI) y comienza la activación de linfocitos T *naïve*. Esto requiere al menos dos señales, una desencadenada por el complejo MHC-péptido y otra por moléculas coestimuladoras como CD80/CD86 y su interacción con CD28. CD28 se expresa de forma constitutiva en linfocitos T humanos y murinos; y tras la unión con CD80 o CD86, CD28 entrega una señal coestimuladora positiva, induciendo la producción de IL-2 a través de mecanismos transcripcionales y postrcripcionales, e inicia señales de supervivencia para linfocitos T a través de la vía Bcl-XL.¹² Por su parte CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4), no se expresa en los linfocitos T *naïve*, pero se induce transcripcionalmente después de la activación de los linfocitos T¹⁴, emite una señal negativa, que antagoniza las señales de CD28 y, por lo tanto, limita la magnitud y duración de la activación de los linfocitos T.¹⁴⁻¹⁵

Las citocinas inductoras producidas durante la activación, provocan una diferenciación celular específicamente de los linfocitos CD4⁺ a Th1, Th2, Th9 y Th17.¹⁶

La diferenciación hacia Th1, es favorecida por la interleucina 12 (IL-12) y el interferón γ (IFN- γ). (Figura 3) El factor de transcripción involucrado en la diferenciación a Th1, es T-bet.¹⁶ Estos linfocitos participan en la eliminación de patógenos intracelulares y se asocian con autoinmunidad específica de órganos. IL-4 e IL-2 son fundamentales para la diferenciación de Th2 y el principal factor de transcripción implicado en la diferenciación del linaje es GATA 3, estos linfocitos generan una respuesta inmunitaria a los parásitos extracelulares, incluidos los helmintos, y

desempeñan un papel importante en la inducción y persistencia del asma y de otras enfermedades alérgicas.¹⁷⁻¹⁸ Los Th1 fueron inicialmente caracterizadas como un subconjunto de células Th2, se encontró que TGF- β desvía la diferenciación de Th2 hacia el desarrollo de células Th9. Además, TGF- β en combinación con IL-4 induce directamente la diferenciación de los linfocitos Th9. Los linfocitos Th9 se relacionan con enfermedades inflamatorias, incluidas las enfermedades alérgicas.¹⁶⁻¹⁹ Los linfocitos Th9 se relacionan con enfermedades inflamatorias, incluidas las enfermedades alérgicas.¹⁶⁻¹⁹ Las citocinas características producidas por el subconjunto Th9 son IL-9 e IL-10. La secreción de IL-9 dependiente de IL-2 se potencia sinérgicamente mediante una combinación equilibrada de TGF- β e IL-4 y se inhibe con IFN- γ . Se ha demostrado que el factor de transcripción activador de células B (BATF) es necesario para el desarrollo de linfocitos Th9, Th17, células auxiliares foliculares T y posiblemente linfocitos Th2. El factor de cambio entre los subconjuntos Th2 y Th9 es PU.1, que pertenece a una familia de factores de transcripción ETS. El PU.1 promueve específicamente el desarrollo de células secretoras de IL-9 y restringe el programa genético Th2.¹²¹

Finalmente, en la respuesta Th17, IL-6, IL-21, IL-23 y TGF- β son las principales citocinas de señalización implicadas en la diferenciación, su factor de transcripción característico es ROR- γ t y es responsable de montar la respuesta inmunitaria contra bacterias y hongos extracelulares. También participan en la generación de enfermedades autoinmunes.¹⁹⁻²⁰

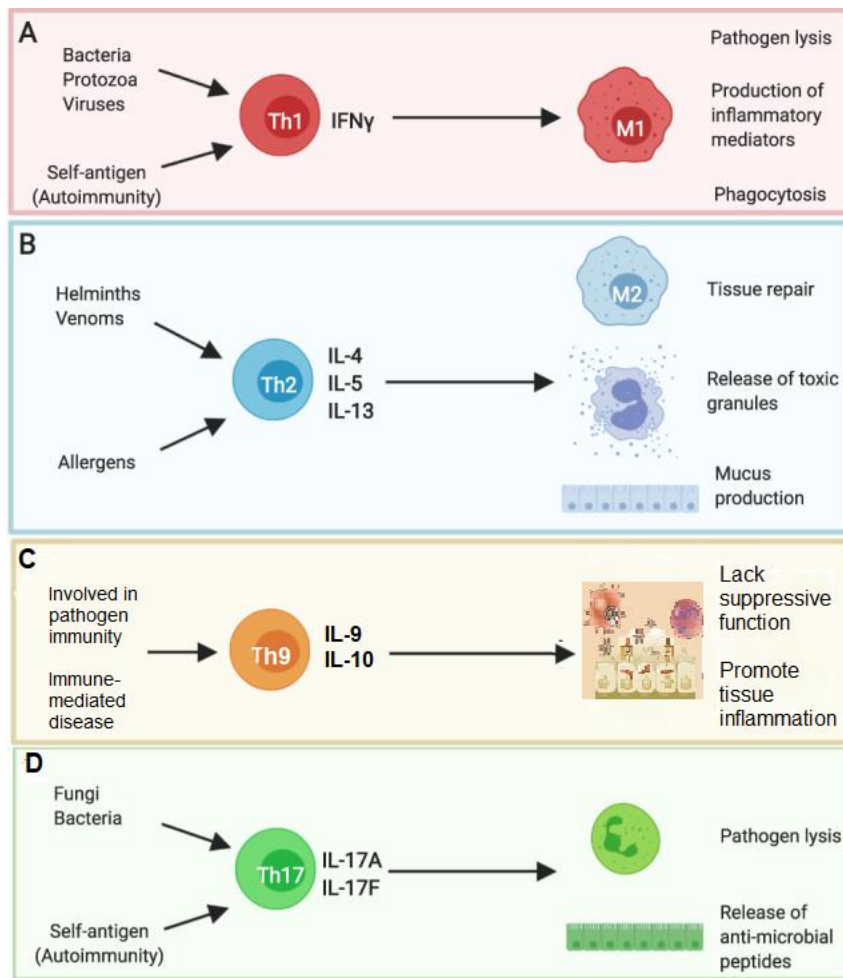


FIGURA 3. Los distintos fenotipos de células T CD4⁺ efectoras se asocian con diferentes tipos de patógenos y patologías inmunitarias. A) Las células Th1 están asociadas con infecciones bacterianas, protozoarias y virales. Producen INF-gamma, IL-2 y factor de necrosis tumoral beta (TNF- β) y promueven la actividad microbicida en los macrófagos. B) Las células Th2 producen IL-4/IL-5/IL-13+ que inducen la liberación de mediadores tóxicos de los mastocitos y los eosinófilos, promueven la contractilidad epitelial y la producción de moco. Las respuestas de Th2 están asociadas con la enfermedad alérgica. C) Las citocinas características producidas por el subconjunto Th9 son IL-9 e IL-10. Los linfocitos Th9 carecen de función supresora y promueven la inflamación de los tejidos. D) Las infecciones bacterianas y fúngicas extracelulares impulsan las células IL-17+ Th17 que promuevan la actividad de los neutrófilos y la liberación de péptidos antimicrobianos del epitelio. REF: Figura adaptada de Hilligan, K. L., & Ronchese, F. (2020). Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4⁺ T helper cell responses. *Cellular & molecular immunology*, 17(6), 587–599

Los linfocitos T CD8⁺ tienen un papel citotóxico importante en la protección contra infecciones y reinfecciones de patógenos intracelulares como virus. Cuando una célula T CD8⁺ reconoce su antígeno y se activa, tiene tres mecanismos principales para matar las células infectadas con virus. La primera es la secreción de citocinas como TNF- α e IFN- γ con efectos antitumorales y antimicrobianos, la segunda es vía producción y liberación de gránulos citotóxicos que contienen dos familias de proteínas, las perforinas y granzimas. Las perforinas forman un poro en la

membrana de la célula diana, similar al complejo de ataque a la membrana del complemento. Este poro permite que las granzimas entren en las células infectadas o malignas. Las granzimas son enzimas serina proteasas que procesan las proteínas en el interior celular, bloqueando la producción de proteínas virales, provocando la apoptosis de la célula diana. La tercera es a través de interacciones Fas/FasL activando la vía de caspasas. Finalmente, tras la eliminación de las células infectadas o transformadas, la población de linfocitos T CD8⁺ se contrae por apoptosis, dejando una pequeña población de células que se convierte en linfocitos T de memoria.¹³

1.2 Células de Memoria

La memoria es una de las principales características del sistema inmunológico adaptativo. Es el resultado de la expansión clonal y la diferenciación de linfocitos específicos de antígeno que, persisten durante toda la vida. Los linfocitos T de memoria confieren protección inmediata en los tejidos periféricos²⁸

Las células de memoria central (TCM) y las células de memoria efectora (TEM), se definieron inicialmente en humanos en función de dos criterios distintos: (a) la ausencia o presencia de función efectora inmediata y (b) la expresión de integrinas y receptores de quimioquinas que permiten que las células migren a órganos linfoides secundarios frente a tejidos no linfoides. Las TCM humanas son células de memoria CD45RO⁺ que expresan constitutivamente CCR7 y CD62L, (Ver Tabla 1) dos receptores que también son característicos de las células T *naïve*, necesarias para la extravasación celular a través de las vénulas del endotelio alto (HEV) y la migración a las áreas de células T de órganos linfoides secundarios.²⁹ En comparación con las células T *naïve*, las TCM tienen una mayor sensibilidad a la estimulación antigénica, son menos dependientes de la coestimulación y regulan positivamente el CD40L, proporcionando así una retroalimentación estimuladora más eficaz a las DC y las células B. Después de la activación del linfocito T por medio del TCR, la TCM produce principalmente IL-2, pero después de la proliferación se diferencian en células efectoras.³⁰⁻³¹ Las TEM humanas son células de memoria que han perdido la expresión constitutiva de CCR7, CD62L y CD27, pero expresan CD45RO⁺¹⁰⁻¹². En comparación con las TCM, las células TEM se caracterizan por una función efectora rápida. Los linfocitos CD8⁺ TEM transportan grandes cantidades de perforina, y tanto CD4⁺ como CD8⁺ producen IFN- γ , IL-4 e IL-5 pocas horas después de la estimulación antigénica. En los seres humanos, el grupo de TEM contiene Th1, Th2, Th9 y TH17. Las proporciones relativas de TCM y TEM en sangre varían en los compartimentos CD4⁺ y CD8⁺; TCM es predominante en linfocitos

CD4⁺ y TEM en linfocitos CD8⁺. Sin embargo, dentro de los tejidos, TCM y TEM se distribuyen en patrones característicos, ya que mientras las TCM se encuentran enriquecidas en ganglios linfáticos y amígdalas, los pulmones, el hígado y el intestino contienen mayores proporciones de TEM.³²

En resumen, los subconjuntos celulares funcionales para este trabajo de investigación, los podemos clasificar como TCM y TEM utilizando receptores de quimiocinas y otros marcadores. Sin embargo, cabe señalar que algunos de estos marcadores se modulan rápida y transitoriamente tras la activación celular.³²⁻³³

Las células T de memoria muestran un umbral de activación bajo y una proliferación vigorosa. Aunque tanto TCM como TEM tienen una alta capacidad de respuesta a la estimulación antigénica, el potencial de expansión disminuye de TCM a TEM. La capacidad proliferativa reducida se correlaciona con una disminución en la longitud de los telómeros y con una mayor propensión a sufrir apoptosis. Estas limitaciones intrínsecas pueden ser anuladas por la coestimulación, que induce la actividad de la telomerasa y la regulación positiva de las moléculas antiapoptóticas.³¹⁻³³

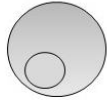
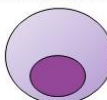
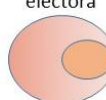

| Células | Naïve | Memoria central | Memoria efectora | Efectoras |
|---------------------|---|---|---|---|
| human |  |  |  |  |
| CD45RA | + | - | - | - |
| CD45RO | - | + | + | - |
| CCR7 | + | - | +/- | - |
| CD62L | + | +/- | - | - |
| CD127 | + | - | + | - |
| CD27 | + | - | + | - |
| CD103 | - | + | - | - |
| CD69 | - | + | - | + |
| CD28 | + | - | - | - |
| CD95 | - | + | + | - |
| mouse | | | | |
| CD44 | - | + | + | - |
| CD62L | + | - | - | - |
| CD127 | + | +/- | + | - |
| CD27 | + | +/- | + | - |
| KLRG1 | - | - | - | - |
| CD69 | - | + | - | + |
| CD103 | - | + | - | - |
| CCR7 | + | - | - | - |
| CD122 | - | +/- | + | - |
| Función | Reconocimientos de antígeno | Citotoxicidad +/- Proliferación ++ | Citotoxicidad ++ Proliferación +/- | Citotoxicidad ++ |
| Localización | Circulación y órganos linfoides | Circulación y órganos linfoides | Circulación | Circulación |

Tabla 1. Características de las células de Memoria. Ref. Adaptada de Busch et al. Role of memory T cell subsets for adoptive immunotherapy. Semin Immunol. 2016 February ; 28(1): 28–34.

1.3 Glicosilación

La glicosilación de proteínas es el proceso enzimático de agregar carbohidratos a sitios específicos en proteínas nacientes. Los glicanos unidos a las glicoproteínas se dividen en tres categorías: N-glicanos, enlazados con asparagina; O-glicanos de tipo mucina, unidos a serina/treonina y de tipo O-GlcNAc por N-acetilglucosamina enlazados con Ser/Thr. Muchas proteínas nucleares y citoplasmáticas se O-glicosilan mediante la adición de una sola N-acetilglucosamina (GlcNAc) a residuos de serina o treonina por la O-GlcNAc transferasa (OGT),

mientras que esencialmente todas las proteínas de membrana secretadas e integrales se glicosilan dentro del retículo endoplásmico (RE) y aparato de Golgi por enlaces N u O.³⁴

Los O-glicanos clásicos se construyen *de novo* directamente sobre la proteína dentro del aparato de Golgi, que se inicia mediante la adición de un grupo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) a un hidroxilo de la cadena lateral de los residuos de aminoácidos serina o treonina, por una enzima de la familia de transferasas polipeptídicas GalNAc (ppGalNAcTs), de ahí el nombre "O-enlazado". Si no se añaden más carbohidratos, la única GalNAc se conoce como antígeno Tn; sin embargo, estas estructuras generalmente se construyen mediante la acción secuencial de las enzimas residentes en Golgi para formar glicanos maduros, que se clasifican en ocho "núcleos" (Núcleo 1-8) dependiendo de los carbohidratos proximales y su enlace con el GalNAc inicial. Por ejemplo, la adición de un residuo de galactosa (Gal) por enlace β 1,3 a GalNAc convierte el antígeno Tn en el glucano Core 1 (también conocido como antígeno T). La adición de un residuo de GlcNAc al glucano Core 1 por enlace β 1,6 crea el glucano Core 2. Los otros glicanos del núcleo son variaciones sobre este tema, con diferentes carbohidratos y enlaces próximos a la GalNAc inicial. En todos los casos, estos glicanos se alargan aún más a estructuras muy complejas que llevan una variedad de carbohidratos en múltiples combinaciones y enlaces glicosídicos, incluidos los ácidos siálicos terminales, Gal, GalNAc, GlcNAc, fucosa (Fuc) y otros.^{38-39,43}

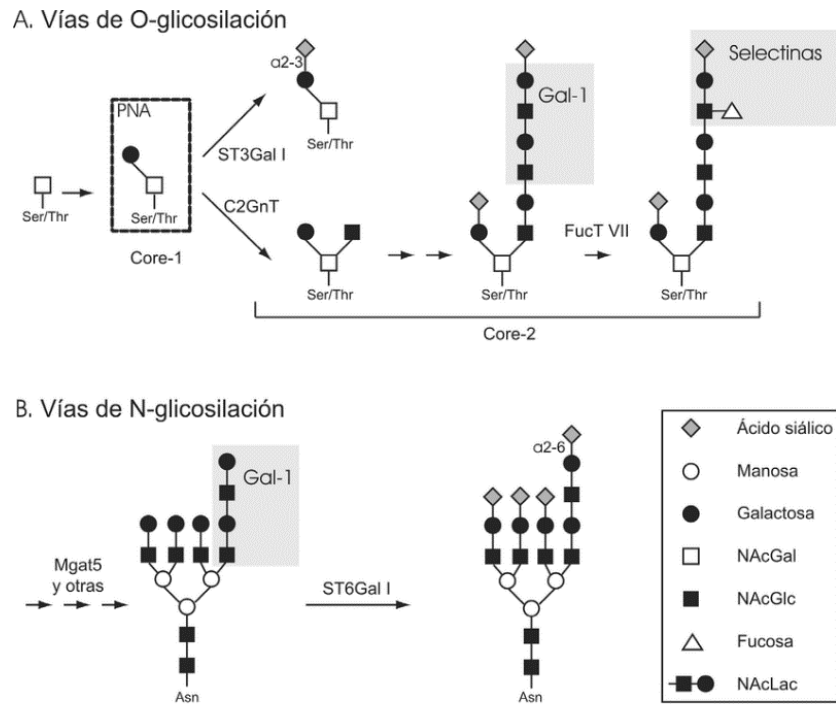


Figura 4. Esquema de las vías de O-glicosilación (A) y N-glicosilación (B). El esquema muestra simplificados los dos tipos de glicosilación principales sobre proteínas, la N- y la O-glicosilación. La O-glicosilación ocurre más tardíamente en el Golgi, sobre los aminoácidos serina y treonina. La N- glicosilación consiste en la adición de glicanos en un residuo de asparagina de una proteína alrededor de una región consenso -N-X-S/T (X no puede ser prolina), El proceso de N- glicosilación comprende la modificación secuencial de un glicano inicial básico rico en manosas por parte de distintas glicosidasas y glicosiltransferasas. Durante el proceso de formación de N glicanos complejos, es crítica la actividad secuencial de las enzimas N-acetilglucosaminiltransferasas (Mgat1; 2, 4 y 5)

Por el contrario, los N-glicanos comienzan como una estructura central relativamente grande que inicialmente se sintetiza como un precursor de lípidos en la cara citoplasmática de la membrana del RE, se mueve hacia el lumen del RE durante la síntesis por la flipasa localizada en el RE, y se añade a los polipéptidos nacientes en la amina primaria disponible en las cadenas laterales del residuo de asparagina dentro de la secuencia de consenso NxS/T. Aunque no todos los sitios NxS/T están glicosilados, esta transferencia se cataliza en el RE por el complejo enzimático oligosacariltransferasa (OST).⁴⁰

En el RE, los N-glicanos juegan un papel importante en el control de calidad del plegamiento de proteínas al mediar interacciones con chaperonas residentes en RE como calreticulina y calnexina; sin embargo, una vez fuera del RE y en el Golgi, los N-glicanos de las proteínas nacientes se recortan a estructuras de "alto contenido de manosa" dominadas por manosas terminales antes de reconstruirse en los complejos N-glicanos comunes a las glicoproteínas de

mamíferos.⁴² La transición entre un N-glicano con alto contenido de manosa y un N-glicano de tipo complejo es la adición de un GlcNAc en un brazo del núcleo de manosa por GlcNAcT1 (Mgat1). Esta estructura de glicano de transición con un solo GlcNAc (que puede alargarse con los otros carbohidratos) y residuos de manosa terminales en los otros brazos se denomina N-glicano "híbrido". Tras la adición posterior de residuos de GlcNAc, los N-glicanos entran en la categoría de "N-glicanos complejos", y cada GlcNAc adicional representa una nueva "rama" de glicanos. A medida que se agregan estas ramas de GlcNAc, es común denominar a los N-glicanos resultantes bi-, tri- y tetra-antenarios, basándose en cuántas ramas están presentes. Los N-glicanos se desarrollan típicamente en estructuras con al menos dos ramas (bi-antenarias) y se acumulan a través de la acción secuencial de las enzimas de Golgi de la misma manera que los O-glicanos.³⁸⁻⁴²

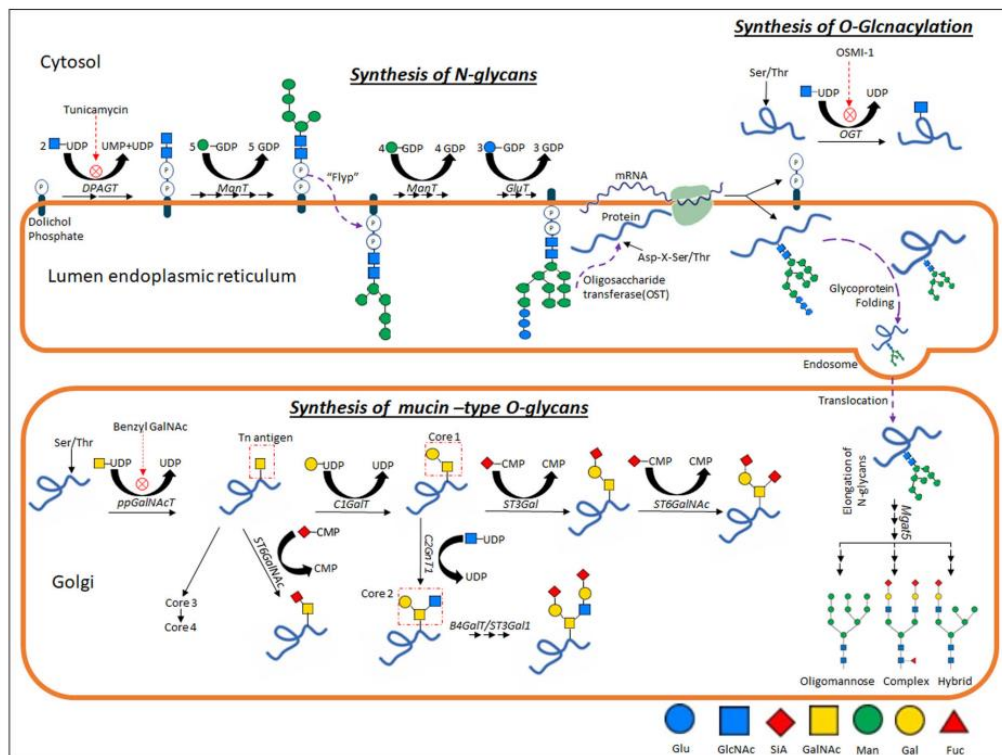


Figura 5. Síntesis de glicoproteínas. La glicosilación de tipo N se inicia en el retículo endoplásmico, donde se unen a la proteína diana transfiriendo el resto glicosídico presente en DoIP al residuo Asn en la secuencia Asn-X-Ser / Thr, y más tarde al aparato de Golgi, donde la porción glicosídica se alarga y adquiere una conformación de N-glicano de tipo oligomanosa o tipo híbrido o tipo complejo. Las glicoproteínas O GlcNAcadas se sintetizan en el citosol, núcleo o mitocondrias mediante la adición de GlcNAc en residuos de Ser / Thr. Los O-glicanos de tipo mucina se sintetizan y alargan en el aparato de Golgi, su síntesis ocurre en un residuo Ser / Thr formando el antígeno Tn, precursor del núcleo 1 o núcleo 3. Ref: Wilton Gómez-Henao , Eda Patricia Tenorio , (2020): Relevance of glycans in the interaction between T lymphocyte and the antigen presenting cell, International Reviews of Immunology ⁴⁵.

La glicosilación participa en el plegamiento de proteínas, además, tiene implicaciones directas para el desarrollo de procesos biológicos como diferenciación celular, apoptosis, transducción de señales, adhesión y migración celular; y los defectos en los procesos de glicosilación pueden conducir al desarrollo de enfermedades autoinmunes y otras patologías³⁸. Por ejemplo, el glucocálix que es la zona periférica rica en oligosacáridos, glicanos, lipopolisacáridos y proteoglicanos en las células eucariotas representa una barrera física de protección, así como elementos importantes para el mantenimiento de la estructura, porosidad y la integridad de los tejidos. Dichas moléculas también pueden contener sitios de unión para otros glicanos específicos, que, a su vez, ayudan a la organización general del glucocálix. La ubicación externa de los glicanos en la mayoría de las glicoproteínas puede proporcionar un escudo general, protegiendo el polipéptido subyacente del reconocimiento por las proteasas, bloqueando la unión de anticuerpos e incluso (en el caso de las mucinas) protegiendo superficies de tejido completas de la unión microbiana.³⁹⁻⁴⁰

Los glicanos tienen muchas funciones biológicas específicas en el reconocimiento célula con célula, un ejemplo es la familia de moléculas de adhesión selectina, que reconocen glicanos en ligandos y median interacciones críticas entre células sanguíneas y vasculares en una variedad de situaciones normales y patológicas. Algunos sitios de reconocimiento críticos son en realidad combinaciones de glicanos y proteínas. Por ejemplo, la P-selectina reconoce el ligando de selectina genérico sialil Lewis x con alta afinidad solo en el contexto de los 13 aminoácidos amino-terminales del ligando 1 de la glicoproteína de P-selectina (PSGL-1), que incluyen los residuos de tirosina sulfatados requeridos.⁴²⁻⁴³

1.4 Ácido siálico

Los ácidos siálicos son cetoácidos (ácidos orgánicos que contienen un grupo funcional cetona y un grupo carboxilo) con un esqueleto glucídico de nueve carbonos, están cargados negativamente y se descubrieron en mamíferos, tienen en su estructura un anillo piranósico constituido por cinco carbonos y un oxígeno formado por un hemiacetal en conformación en silla.⁴⁶ En los glicoconjugados que existen en la naturaleza, los ácidos siálicos se presentan sólo en la configuración α excepto en un donador rico en energía, el CMP-ácido siálico, donde el carbono anomérico se encuentra en configuración β . Los ácidos siálicos más abundantes en la naturaleza son el Neu5Ac y el ácido *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc) que difieren en el radical que se encuentra unido al carbono de la posición 5.⁴⁶⁻⁴⁷ (Ver figura 5)

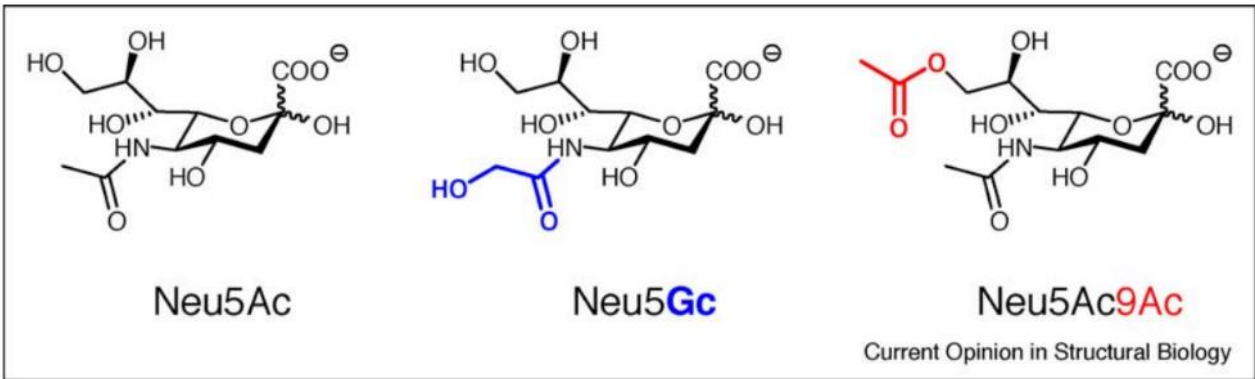


Figura 6. Los tres ácidos siálicos más frecuentes ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) y ácido N-acetil-9 O-acetilneuramínico (Neu5,9Ac2), en la figura denominada Neu5Ac9Ac. Ref: Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol.* 2009 Oct;19(5):507-14.

La biosíntesis de Neu5Ac comienza con la formación de *N*-acetil-D-manosamina (ManNAc) desde UDP-N-acetil-D-glucosamina (UDP-GlcNAc) en el citosol, por acción de la enzima UDP-GlcNAc-2-epimerasa. La ManNAc es fosforilada mediante ManNAc cinasa obteniéndose *N*-acetil-D-manosamina-6-fosfato (ManNAc-6P) que posteriormente se condensa con el fosfoenolpiruvato para generar ácido *N*-acetilneuramínico-9-fosfato (Neu5Ac-9P) mediante la Neu5Ac-9P sintasa. Este último compuesto (Neu5Ac-9P) es desfosforilado para obtener Neu5Ac por la enzima Neu5Ac-9P fosfatasa. La forma activa de ácido siálico, CMP-ácido siálico, es generada a partir de citidín trifosfato (CTP) y Neu5Ac en el núcleo mediante la CMP-Neu5Ac sintetasa. En su itinerario, el CMP-Neu5Ac puede ser modificado a CMP-Neu5Gc por la enzima CMP-NeuAc hidroxilasa en el citosol. El CMP-ácido siálico (CMPNeu5Ac y CMP-Neu5Gc) es el sustrato de las sialiltransferasas que incorporan los cetoácidos en cadenas nacientes de glicoproteínas y glicolípidos en el aparato de Golgi. La transferencia de ácido siálico a los oligosacáridos se da a partir de un azúcar donador activado (CMP-NeuAc), y es catalizada por una familia de enzimas llamadas sialil transferasas (STs), estas enzimas se encuentran ancladas a la membrana de la red trans del aparato de Golgi. A la fecha, se conocen 20 sialiltransferasas las cuales presentan diferencias en la afinidad por el sustrato que reconocen y se clasifican en función del tipo de enlace que forman⁴⁶⁻⁴⁸

La suma total de la diversidad de sialoglicanos en una célula u organismo se denomina "sialoma". Los ácidos siálicos se encuentran a menudo como el sacárido terminal (más externo) en las ramas de *N*-glicanos, *O*-glicanos, glicosfingolípidos y ocasionalmente cubren las cadenas laterales de los anclajes de GPI.⁵¹ Esta diversidad que existe en la superficie de las células a partir de la presencia de ácidos siálicos, contribuye a la formación de complejos heterogéneos que cumplen funciones específicas y esenciales que varían en cada célula. Lo que nos ofrece una oportunidad de estudio para dilucidar las funciones que tienen o en las que intervienen los ácidos siálicos solos o en conjunto con los glicanos.⁵²

Se ha comprobado que la interrupción de la síntesis de Sia en ratones da como resultado la letalidad en el día embrionario 8.5, con una mala diferenciación de las células nerviosas, así como de las células del músculo cardíaco y esquelético.⁵⁰⁻⁵³

1.5 Glicosilaciones en las células T

Los glicanos regulan procesos fisiológicos clave de los linfocitos T, entre estos se encuentran la maduración, migración, señalización, diferenciación y proliferación.⁵⁴

La maduración de los linfocitos T en el timo, es uno de los procesos donde mejor se han caracterizado los patrones de glicosilación⁵⁵ Estudios clásicos utilizando la lectina de cacahuate (PNA), que reconoce la estructura Gal β (1-3) GalNAc-Ser/Thr (llamado Core-1) presente en *O*-glicanos de tipo mucina, han demostrado que la lectina PNA reconoce y se une a ligandos que están en la superficie de los timocitos inmaduros dobles positivos (CD4+/CD8+) y a medida que se transforman en timocitos maduros simples positivos (CD8+) la unión de esta lectina disminuye. Esta disminución se correlaciona con la expresión de la enzima α -(2-3) sialiltransferasa (ST3Gal I) cuya función es catalizar la adición de ácido siálico (Sia) en unión α -(2-3) al residuo galactosa terminal de core-1 *O*-glicanos, produciendo el trisacárido Sia α (2-3) Gal β (1-3)GalNAc e inhibiendo de esta forma la unión de PNA.⁵⁵⁻⁵⁷ Cuando los timocitos culminan su proceso de maduración en el timo y egresan como linfocitos T *naïve*, estas no pueden sintetizar 2 *core* *O*-glicanos centrales, ni unirse a P (CD62P) y E-Selectina (CD62E), lo que esencialmente las excluye de entrar en tejidos no linfoides.⁵⁶ Sin embargo, después de la estimulación del receptor de linfocitos T, tanto CD8⁺ como las CD4⁺ aumentan la expresión del núcleo 2 β 1-6 *N* acetilglucosaminiltransferasa-I (GCNT1) α -1,3 fucosiltransferasa-VII (FUT7) y probablemente más enzimas que facilitan la síntesis de 2 *core* *O*-glicanos del núcleo. Esta modificación post-

traduccional transforma las proteínas de superficie tales como PSGL-1 y CD43 en ligandos de P- y E-Selectina para permitir su unión al endotelio vascular activado cruzando por extravasación y permitir la entrada en tejidos no linfoides.⁵⁸

Las glicoproteínas participan también en la regulación de la activación y el funcionamiento de los linfocitos T, principalmente mediante la *N*-glicosilación del TCR y los correceptores, donde los glicanos pueden actuar para estabilizar complejos en las sinapsis inmunológicas, sirviendo como una capa protectora para la proteína subyacente al inhibir la degradación por proteasas y pueden suprimir la agregación de TCR en la membrana, reduciendo así la autoactivación.⁵⁹⁻⁶⁰ La iniciación de las respuestas de los linfocitos T depende del reconocimiento de un epítipo antigénico presentado en el contexto de una molécula del MHC de clase I o clase II (MHC I / II). Los glicanos tanto en las cadenas de TCR $\alpha\beta$ como en MHCII pueden afectar la activación de los linfocitos T.⁶¹ Se cree que los *N*-glicanos presentes en el TCR desempeñan un papel en la localización de la superficie celular y en la orientación y organización de la propia molécula en lugar de influir directamente en las interacciones del MHC. La β -1,6-*N*-acetilglucosaminiltransferasa-V (MGAT5) es la enzima responsable del inicio de la ramificación GlcNAc- β - (1,6) - en los *N*-glucanos y participa en múltiples aspectos de la activación de los linfocitos T.⁶⁰⁻⁶² La ramificación de β - (1,6) -*N*-glicano conduce a un aumento en las modificaciones de *N* acetil-lactosamina, el ligando de las galectinas. Se ha demostrado que la ausencia de *Mgat5* y, por lo tanto, una disminución de *N*-acetil-lactosamina, reduce los umbrales de activación de los linfocitos T *in vitro* al mejorar el agrupamiento de TCR debido a la ausencia de formación de una red de glicoproteína-galectina. Esta red mediada por galectina es responsable de mantener CD45 y el complejo de señalización TCR en estrecha proximidad a través de sus glicanos O y *N*-ligados (respectivamente) para prevenir la activación de los linfocitos T de baja avididad.⁶³

El MHC I es un heterodímero compuesto por un péptido glicosilado de 45 kDa llamado cadena pesada y un polipéptido invariable de 12 kDa no glicosilado llamado β 2microglobulina. La cadena pesada α comprende tres dominios extracelulares, α 1, α 2 y α 3. Dentro de la cadena pesada, el único sitio conservado para la *N*-glicosilación en todos los alelos conocidos es Asn86. Los experimentos de inhibición de la *N*-glicosilación mostraron que la ausencia de *N*-glicanos no afecta la síntesis y expresión de MHC I, no aumenta su susceptibilidad a la degradación proteolítica y no modifica la aloantigenicidad de MHC I, ni su capacidad para interactuar con TCR. Por otro lado, los análisis computacionales de la dinámica molecular del MHC I sugieren que la

disposición espacial de los N-glicanos juega un papel en la orientación del MHC I perpendicularmente a la membrana celular y estabiliza los residuos de proteínas involucrados en la interacción TCR-pMHC I.

MHCII tiene tres sitios de *N*-glicosilación altamente conservados, dos en la cadena α (Asn78 y Asn118) y uno en la cadena β (Asn19). La glicosilación de MHCII no es necesaria para el plegamiento o tráfico adecuados de MHCII y muestra una gran variedad entre diferentes tipos de células, como diferencias en el grado de sialilación terminal y patrones de ramificación que pueden modular directamente la unión y presentación de los glicopéptidos, mientras que esto no tiene ningún impacto en la unión de los antígenos peptídicos no modificados.⁶⁵ Se especula que los glucanos sirven para extender la forma de plataforma de unión de MHCII para acomodar las moléculas de glucoantígeno más grandes.⁶⁶

Tradicionalmente, se ha descrito que TCR $\alpha\beta$ solo reconoce antígenos peptídicos no modificados, sin embargo, estudios realizados en los años 90 mostraron que los péptidos glicosilados pueden ser presentados por APC y reconocidos por linfocitos T, así, los péptidos glicosilados han abierto un nuevo escenario donde se puede observar que pueden ser presentados por APC y reconocidos por linfocitos T.⁶⁷ La formación del complejo pMHC es provocada por la interacción molecular entre una porción central del péptido, y los aminoácidos presentes en la hendidura del MHC; se ha demostrado que los glicoantígenos pueden ser cargados y presentados por el MHC al TCR, que reconoce los glicoantígenos e induce la activación de clones específicos de linfocitos T. Sin embargo, la presentación del antígeno y la activación del linfocito T se ven afectadas por la eliminación de la porción glicosídica ligada al antígeno, estos hallazgos sugieren que la glicosilación en el antígeno está directamente involucrada en la interacción TCR-pMHC. Por otro lado, se ha establecido que el TCR no reconoce péptidos antigénicos que poseen estructuras de glicanos grandes y altamente complejas, ya que generan un impedimento estérico en el anclaje molecular que permite la formación del complejo TCR-pMHC.⁶⁸⁻⁷⁰

1.6 Lectinas

Las lectinas constituyen un grupo de proteínas de origen no inmune con la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas. Contienen al menos 2 sitios de unión, de ahí que puedan enlazarse

en primer lugar a un azúcar específico y en forma secundaria a una molécula glicosilada. Estas proteínas se descubrieron a finales del siglo XIX, cuando se observó la presencia de proteínas con capacidad de aglutinar eritrocitos en extractos de plantas. Debido a esta propiedad, se les denominó en un inicio hemaglutininas o fitohemaglutininas¹¹²⁻¹¹³. Peter Hermann Stillmark en 1888, aisló la primera lectina de las semillas de ricino (*Ricinus communis*) a la cual llamó ricina desde entonces se han descubierto y caracterizado una gran cantidad de ellas^{110,111}. En 1930, Karl Landsteiner fue galardonado con el premio Nobel de Medicina y Fisiología, por el uso de lectinas para tipificar los grupos sanguíneos¹¹⁴. En la actualidad, las lectinas se utilizan como biomarcadores celulares y agentes terapéuticos, entre otros. También se ha establecido de manera más clara su efecto en el organismo como moduladoras de distintos procesos. Sin embargo, aún existen una gran cantidad de aplicaciones que podrían explorarse y explotarse con estas moléculas. Las lectinas se consideran útiles herramientas en el campo de la genética, la biomedicina y la inmunología. Su utilidad está basada en la propiedad que tienen de combinarse con varios tipos de glicoconjugados presentes en las superficies celulares y fluidos corporales.

Dentro de los estudios de membrana se ha reportado en la literatura el uso de lectinas para estudiar cambios estructurales en los glicoconjugados presentes en las superficies celulares y en ocasiones de esta forma detectar cambios morfológicos ocurridos, para analizar la distribución subcelular de epítomos y terminales glicoproteicos¹¹⁵. Las lectinas vegetales se han utilizado para estudiar cambios en las estructuras de carbohidratos de la superficie celular, identificar subconjuntos de células leucocitarias (Tabla 2) y como sustitutos de estímulos de activación de linfocitos T.

Tabla 2. Poblaciones Linfocitarias reconocidas por lectinas

| LECTINA | POBLACIÓN RECONOCIDA |
|---|--------------------------------|
| <i>Arachis hypogea</i> (PNA) | Timocitos corticales |
| <i>Amaranthus leucocarpus</i> (ALL) | Timocitos medulares |
| <i>Maackia amurensis</i> (MAA) | Timocitos corticales |
| <i>Sambucus nigra</i> (SNA) | Timocitos medulares |
| <i>Glycine max</i> (SBA) | Linfocitos T |
| <i>Vicia villosa</i> (VVL) | Linfocitos T Contra supresores |
| <i>Artocarpus integrifolia</i> (Jacalina) | Linfocitos T CD4+ |

Tabla adaptada del capítulo Proteínas y Glicoproteínas, del libro Macromoléculas de productos naturales e inmunomodulación. ⁹⁸

La lectina ALL, obtenida de la semilla de *Amaranthus leucocarpus* es una glicoproteína dimérica compuesta de subunidades de 35 kDa y existe en 3 isoformas principales que tienen un pI de 4.8, 4.9 y 5.2, respectivamente. Se une a Gal α 1,3GalNAc α 1,O-Ser/Thr y a GalNAc α 1,O-Ser/Thr).⁹⁰⁻⁹¹

Mackia amurensis II (MAII) se une ^{116,117} solo a estructuras de carbohidratos particulares que contienen ácido siálico en un enlace α -2,3. A diferencia de la lectina de *Sambucus nigra* (SNA), que se une a estructuras con ácido siálico en enlace α -2,6. La lectina de (SNA), aislada de la corteza de la baya del saúco, se une preferentemente al ácido siálico unido a la galactosa terminal en α -2,6 y, en menor grado, al enlace α -2,3. La unión también es inhibida por lactosa o galactosa. Esta lectina se une al ácido siálico unido a N-acetilgalactosamina o galactosa¹¹⁸

Concanavalina ensiformis (Con A) reconoce la α Man presente como parte de un oligosacárido central o core en muchas glicoproteínas de suero y membrana. *Vicia villosa agglutinin* (VVA) reconoce preferentemente GalNAc terminal unida con enlaces α o β a Ser/Thr o treonina en un polipéptido (conocido como antígeno Tn). La evidencia sugiere que esta lectina también puede

requerir secuencias de aminoácidos específicas en el sitio del receptor de glicosilación. El disacárido galactosil α -1,3 N-acetilgalactosamina también es un potente inhibidor de esta lectina¹¹⁸.

La PNA se une preferentemente a una estructura galactosils β -1,3 N-acetilgalactosamina en muchos glicoconjugados como los grupos sanguíneos M y N, gangliósidos y muchas otras glicoproteínas y glicolípidos solubles y asociados a la membrana. La presencia de ácido siálico en estas estructuras inhibe el reconocimiento de PNA.¹¹⁹

2.-JUSTIFICACIÓN

Las glicosilaciones presentes en los linfocitos T juegan un papel fundamental en numerosos eventos del sistema inmunitario, como la maduración, activación, migración, regulación y apoptosis, esto se logra a través de una amplia variedad de funciones, como la estabilidad estructural que los glicanos proporcionan a las proteínas, y su función como barrera biológica que media la interacción célula con célula. Una función importante de las glicoproteínas es su participación en la sinapsis inmunológica, donde los glicanos sintonizan la intensidad de activación de los linfocitos T. Sin embargo, se desconoce qué glicanos están presentes y cómo pueden influir, modular o cambiar en las funciones que estas células ejercen.

Identificar las glicosilaciones en estas subpoblaciones puede contribuir a definir perfiles de glicosilación específicos para cada subpoblación y poder diferenciar entre linfocitos de memoria efectora y efectoras, que son estados funcionales que no pueden distinguirse entre uno y otro con los estudios clásicos de fenotipificación. Asimismo, se pueden encontrar glicosilaciones fundamentales que posteriormente puedan relacionarse con alguna función específica de los linfocitos T de memoria.

3.- HIPÓTESIS

Cada población de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ *naïve*, memoria central, las subpoblaciones de memoria efectora y linfocitos efectoras (Mem_{ef}/Ef) tendrá un perfil glucosídico particular

4.-OBJETIVO GENERAL

Identificar y analizar los perfiles de glicosilación en subpoblaciones celulares *naïve*, de memoria central, Mem_{ef}/Ef de los linfocitos T CD4⁺ y TCD8⁺ en ratones sucios

4.1.-OBJETIVOS PARTICULARES:

- Definir paneles para análisis por citometría de flujo que permita identificar y analizar las subpoblaciones de linfocitos *naïve*, memoria central y Mem_{eff}/Ef de linfocitos T CD4⁺ y TCD8⁺
- Utilizar lectinas y anticuerpos contra moléculas fenotípicas que identifiquen los diferentes estadios celulares
- Analizar y comparar las glicosilaciones presentes en las subpoblaciones de linfocitos *naïve*, memoria central, Mem_{eff}/Ef de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

5.-MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales

Se utilizaron ratones macho Balb/c de 6-8 semanas, de 28-30 g. Los ratones fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Todos los protocolos fueron aprobados por la comisión de ética para la investigación con animales de la Facultad de Medicina bajo el número del proyecto 099-602-08

5.2. Soluciones

- DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
NaCl 138mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 8.1mM, KH₂PO₄ 1.2mM
- Solución de Lisis de Eritrocitos
NH₄Cl 0.15mM, KHCO₃ 10mM, EDTA-NA₂ 0.1mM
- Solución de lavado para Inmunofluorescencia
DPBS + 1% SFB (Suero fetal Bovino)

5.3 Obtención de esplenocitos de ratón

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo el bazo y se colocó en una caja Petri con 10ml de DPBS; las células se obtuvieron perfundiendo el órgano con 5ml del mismo PBS. La suspensión celular se colocó en un tubo de 15ml, se dejó sedimentar durante 5min y se transfirió la suspensión a un tubo nuevo. La muestra se centrifugó (490g, 5min), se retiró el sobrenadante y se lisaron los eritrocitos resuspendiendo el *pellet* en 1.5ml de solución de lisis e incubando 5min a temperatura ambiente (T.A.), para detener la lisis se agregaron 10 ml de DPBS y se centrifugó la muestra 5 min a 490g. Las células se lavaron dos veces más con 10 ml de PBS, se resuspendieron en 5ml de la misma solución, se contaron por tinción con azul tripano en una cámara de Neubauer y se utilizaron para el experimento correspondiente.

5.4 Citometría de flujo

5.4.1 Citómetro de flujo

Se utilizó un citómetro de flujo MACS Quant (Miltenyi Biotec Germany) con las siguientes características.

Tabla 2. Características del componente óptico del citómetro de flujo usado.

| Láser | Canales de detección | Filtro (nm) |
|---------------------|----------------------|-------------|
| Láser violeta 450nm | V1 | 405/50nm |
| Láser azul 488nm | B1 | 525/50 |
| | B2 | 655/40 |
| | B3 | 655-730 |
| | B4 | 750LP |
| Láser rojo 635nm | R1 | 655-730 |
| | R2 | 750 LP |
| Láser azul 488nm | FSC | 488/10 |
| | SSC | 488/10 |

5.4.2 Anticuerpos, colorantes y lectinas

Se utilizaron los siguientes reactivos. A estos se les hizo una titulación para su óptima concentración, detección y poder realizar la compensación de las señales fluorescentes. Los anticuerpos tienen las siguientes características:

Tabla 3. Características de los anticuerpos

| Anticuerpo | Clona | Fluorocromo | Fabricante |
|--------------|---------|---------------|------------|
| Anti-CD3 | REA 641 | APC VIO 770 | Miltenyi |
| Anti-CD4 | REA604 | PERCP VIO 700 | Miltenyi |
| Anti-CD8 | REA601 | PE VIO 770 | Miltenyi |
| Anti-CD44 | REA664 | PE | Miltenyi |
| Anti-CD62L | REA828 | APC | Miltenyi |
| Anti-CD16/32 | REA377 | FITC | Miltenyi |

Tabla 4. Características de las lectinas:

| Lectina | Especificidad | Fluorocromo | Fabricante |
|---------|---|---------------------------|------------|
| ALL | Gal β 1-3GalNAc-O-Ser /Thr | Biotina-Streptavidine 421 | NA |
| PNA | Gal- β (1,3)-GalNAc | Biotina-Streptavidine 421 | VECTOR |
| SNA | Ácido siálico- α -(2,6)-Gal/GalNAc | Biotina-Streptavidine 421 | VECTOR |
| MAII | Ácido siálico- α -(2,3)-Gal | Biotina-Streptavidine 421 | VECTOR |
| VV | GalNAc | Biotina-Streptavidine 421 | VECTOR |
| GSLI-B4 | α -Gal | Biotina-Streptavidine 421 | VECTOR |
| CON A | Manosa | Biotina-Streptavidine 421 | VECTOR |

Tabla 5. Características de los fluorocromos.

| Fluorocromo | Excitación máxima (nm) | Emisión máxima (nm) | Laser de excitación (nm) | Canal de detección |
|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| Streptavidine BV 421 | 407 | 421 | 405 | V1 |
| FITC | 490 | 525 | 488 | B1 |
| Zombie Green/FITC | 490 | 515 | 488 | B1 |
| PE | 496 | 488 | 488 | B2 |
| PERCP VIO 700 | 482 | 704 | 488 | B3 |
| PE VIO 770 | 565 | 775 | 488 | B4 |
| APC | 650 | 660 | 640 | R1 |
| APC VIO 770 | 652 | 775 | 640 | R2 |

Se utilizó el siguiente panel para el análisis celular.

| Canal | Anticuerpo |
|--------------|--------------------------------|
| V1 | Lectina Biotinilada-Strp BV421 |
| B1 | CD16/32 ZG FITC |
| B2 | CD44 PE |
| B3 | CD4 PERCP VIO 700 |
| B4 | CD8 PE VIO 770 |
| R1 | CD62L APC |
| R2 | CD3 APC VIO 770 |

Tabla 6. Panel . Las lectinas Biotiniladas utilizadas para realizar el análisis celular fueron Con A, VVA, GSLI-B4, PNA, ALL, SNA, y MAII.

5.4.3 Inmunofluorescencia Directa

Un millón de células se resuspendieron en 100µl de solución de lavado con la combinación de anticuerpos requerida para detectar las moléculas de superficie de interés. Las muestras se incubaron 30 minutos (4°C, oscuridad), se lavaron dos veces con 500µl de solución de lavado centrifugando por 5 min a 490g y se suspendieron en DPBS. Las células se analizaron inmediatamente en el FACS o se incubaron con Ghost Dye Red 780 o Zombie green para evaluar viabilidad según el experimento correspondiente.

5.4.4 Inmunofluorescencia Indirecta.

Un millón de células se resuspendieron en 100µl de solución de lavado con la respectiva concentración de lectinas biotiniladas. Las muestras se incubaron 30 minutos (4°C oscuridad), se lavaron con 100µl de solución de lavado (DPBS + 1% SFB Suero fetal Bovino) centrifugando por 5 min a 490g y después con 200µl de solución de lavado. Posteriormente se incubaron con Streptavidine Brilliant Violet 421 en 100µl de solución de lavado (30 min, 4°C, oscuridad), se lavaron con 100µl de solución de lavado centrifugando por 5min a 490xg. Las células se analizaron inmediatamente en el FACS o se incubaron con Ghost Dye Red 780 o Zombie green para evaluar viabilidad según el experimento correspondiente.

5.4.5 Determinación de Viabilidad

Las células previamente teñidas se resuspendieron en 100µl en DPBS con el colorante Zombie Green durante 20 minutos a 4°C en oscuridad, se centrifugaron (5min, 490g), y se resuspendieron en 200µl DPBS para analizarse inmediatamente en el FACS.

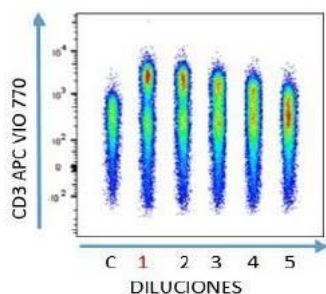
5.4.6 Software de análisis FlowJo

El análisis de los datos de citometría se realizó con el programa de FlowJo V. 10.2 (Becton Dickinson) y el análisis estadístico se realizó con el programa Prism 9 (GraphPad Software, USA).

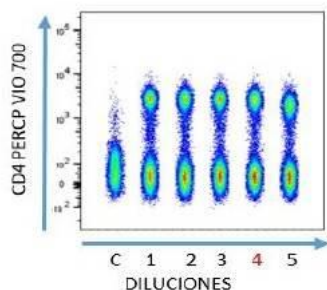
6.-RESULTADOS

6.1 Titulación de anticuerpos y lectinas

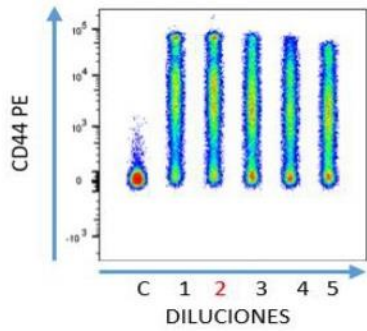
Los anticuerpos se titularon para encontrar la concentración óptima haciendo cinco diluciones seriadas. La figura 7 muestra los concatenados que permiten la comparación de las concentraciones evaluadas para cada caso. Las diluciones elegidas fueron las que presentaron un índice de separación alto entre la población positiva y la población negativa y fueran las concentraciones mínimas necesarias: 1:50 para anti-CD3, 1:400 para anti-CD4, 1:100 para anti-CD44, 1:200 para anti-CD62 L y 1:20 para CD16/CD32.



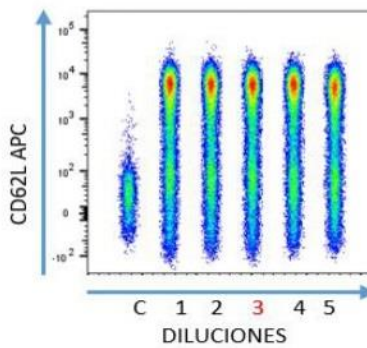
| CD3 APC VIO 770 | | | | | | | |
|-----------------|----------|---------------|------------------|------------------|------|------|------|
| No dilución | Dilución | Concentración | Mediana Positiva | Mediana Negativa | P.84 | IS | IMF |
| 1 | 1:50 | 3µg/ml | 2396 | 178 | 448 | 8.17 | 2384 |
| 2 | 1:100 | 1.5 µg/ml | 2097 | 212 | 634 | 4.44 | 2118 |
| 3 | 1:200 | 0.75 µg/ml | 1716 | 225 | 679 | 3.27 | 1773 |
| 4 | 1:400 | 0.375 µg/ml | 1469 | 246 | 688 | 2.75 | 1463 |
| 5 | 1:800 | 0.1875 µg/ml | 1339 | 258 | 617 | 3.00 | 1430 |



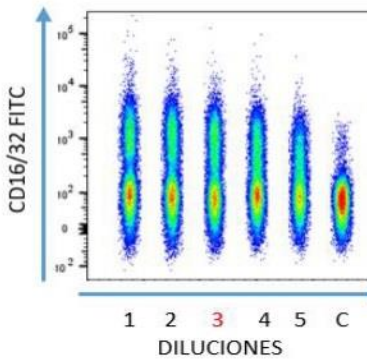
| CD4 PERCP VIO 400 | | | | | | | |
|-------------------|----------|---------------|------------------|------------------|------|------|------|
| No dilución | Dilución | Concentración | Mediana Positiva | Mediana Negativa | P.84 | IS | IMF |
| 1 | 1:50 | 3µg/ml | 2538 | 38.3 | 85.3 | 52.9 | 2260 |
| 2 | 1:100 | 1.5 µg/ml | 2531 | 32.5 | 76.8 | 56.1 | 2241 |
| 3 | 1:200 | 0.75 µg/ml | 2531 | 38.3 | 80.9 | 58.2 | 2208 |
| 4 | 1:400 | 0.375 µg/ml | 2456 | 35.8 | 76.5 | 59.2 | 2195 |
| 5 | 1:800 | 0.1875 µg/ml | 1806 | 32.0 | 72.3 | 43.8 | 1682 |



| CD44 PE | | | | | | | |
|-------------|----------|---------------|------------------|------------------|------|------|------|
| No dilución | Dilución | Concentración | Mediana Positiva | Mediana Negativa | P.84 | IS | IMF |
| 1 | 1:50 | 3µg/ml | 4778 | 79.8 | 174 | 49.6 | 4878 |
| 2 | 1:100 | 1.5 µg/ml | 4345 | 84.1 | 179 | 44.7 | 4581 |
| 3 | 1:200 | 0.75 µg/ml | 3066 | 71.3 | 169 | 30.5 | 3482 |
| 4 | 1:400 | 0.375 µg/ml | 2483 | 58.8 | 154 | 25.3 | 2836 |
| 5 | 1:800 | 0.1875 µg/ml | 2191 | 73.8 | 181 | 19.7 | 2546 |



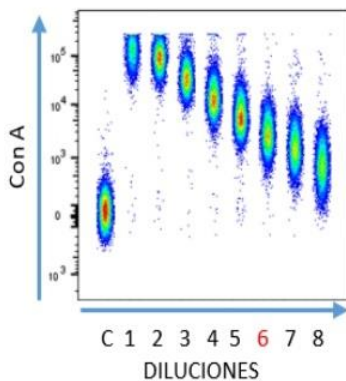
| CD62L APC | | | | | | | |
|-------------|----------|---------------|------------------|------------------|------|------|------|
| No dilución | Dilución | Concentración | Mediana Positiva | Mediana Negativa | P.84 | IS | IMF |
| 1 | 1:50 | 3µg/ml | 3671 | 37 | 102 | 55.6 | 2267 |
| 2 | 1:100 | 1.5 µg/ml | 3600 | 35.8 | 100 | 55.2 | 2260 |
| 3 | 1:200 | 0.75 µg/ml | 3719 | 36.2 | 99.3 | 58.1 | 2235 |
| 4 | 1:400 | 0.375 µg/ml | 3880 | 33.3 | 95.6 | 61.4 | 2104 |
| 5 | 1:800 | 0.1875 µg/ml | 3203 | 33.8 | 95.4 | 51.2 | 2091 |



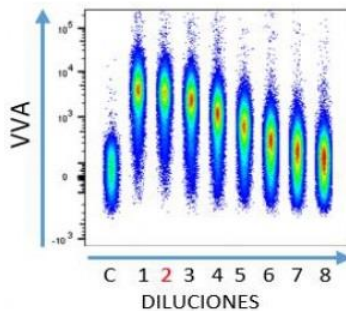
| CD16/32 FITC | | | | | | | |
|--------------|----------|---------------|------------------|------------------|------|------|------|
| No dilución | Dilución | Concentración | Mediana Positiva | Mediana Negativa | P.84 | IS | IMF |
| 1 | 1:5 | 6µg/ml | 1115 | 79.2 | 139 | 17.2 | 1106 |
| 2 | 1:10 | 3µg/ml | 1097 | 62.7 | 105 | 16.5 | 1084 |
| 3 | 1:20 | 1.5µg/ml | 1039 | 73.2 | 134 | 15.8 | 1007 |
| 4 | 1:40 | 0.75 µg/ml | 908 | 68.1 | 130 | 13.3 | 867 |
| 5 | 1:80 | 0.375 µg/ml | 736 | 79.0 | 144 | 10.1 | 738 |

Figura 8. Titulación de anticuerpos. Esplenocitos de ratón recién obtenidos se incubaron con las diluciones indicadas de anti-CD3, -CD4, CD44, CD62L o CD16/32 y Ghost dye Red 780 e inmediatamente analizados en el citómetro de flujo. Los linfocitos se definieron por características de tamaño y granularidad y posteriormente se seleccionaron los *singletes*, en esta región se evaluó la expresión de cada molécula. Las gráficas muestran concatenados con las diferentes concentraciones evaluadas. Las muestras con la letra C son los controles, se utilizó uno para cada titulación y fueron elaborados con esplenocitos recién obtenidos, Streptavidine Brilliant Violet 421 y Ghost Dye Red 780. Las tablas indican las diluciones y concentraciones evaluadas, la mediana positiva, negativa, percentil 84 y el índice de separación que se calculó con la siguiente fórmula $\text{Índice de separación} = \frac{\text{mediana positiva} - \text{mediana negativa}}{(\text{84\%Negativo} - \text{mediana negativa}) / 0.995}$. Así como la intensidad media geométrica de fluorescencia (IMF) de la región positiva de cada muestra. Las flechas rojas muestran la concentración óptima de trabajo.

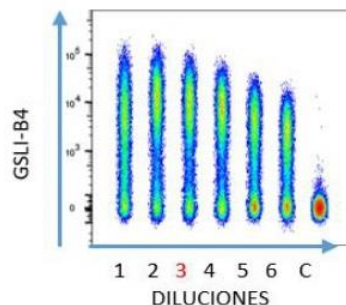
Las lectinas se titularon haciendo diluciones seriadas. La figura 8 muestra los concatenados que permiten la comparación de las concentraciones evaluadas para cada caso. Las diluciones elegidas fueron las que presentaron un índice de separación alto entre la población positiva y la población negativa y que fueran las concentraciones mínimas necesarias: 1:16000 para Con, 1:80 para VV, 1:500 para GSL-I, 1:2500 para PNA, 1:4000 para MAAlI y 1:2000 para SNA.



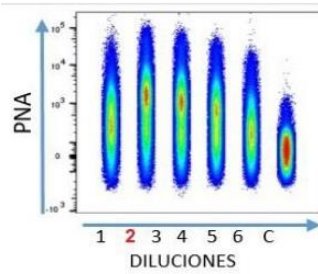
| Con A | | | | | | | |
|-------------|----------|----------------|------------------|------------------|------|-------|--------|
| No dilución | Dilución | Concentración | Mediana Positiva | Mediana Negativa | P.84 | IS | IMF |
| 1 | 1:500 | 10 µg/ml | 18748 | 304 | 480 | 104.2 | 134138 |
| 2 | 1:1000 | 5 µg/ml | 15635 | 270 | 428 | 98.4 | 98118 |
| 3 | 1:2000 | 2.5 µg/ml | 13786 | 310 | 462 | 89.8 | 39462 |
| 4 | 1:4000 | 1.25 µg/ml | 12409 | 164 | 307 | 86 | 16366 |
| 5 | 1:8000 | 0.652 µg/ml | 11003 | 120 | 250 | 83.7 | 7369 |
| 6 | 1:16000 | 0.3125 µg/ml | 10642 | 160 | 289 | 81.53 | 3320 |
| 7 | 1:32000 | 0.15625 µg/ml | 8054 | 90.7 | 242 | 52.9 | 2029 |
| 8 | 1:64000 | 0.078125 µg/ml | 4059 | 61.9 | 194 | 30.5 | 1245 |



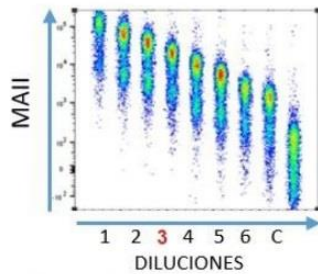
| VVA | | | | | | | |
|-------------|----------|----------------|------------------|------------------|------|------|-------|
| No dilución | Dilución | Concentración | Mediana Positiva | Mediana Negativa | P.84 | IS | IMF |
| 1 | 1:40 | 5 µg/ml | 2230 | 260 | 527 | 8.3 | 66543 |
| 2 | 1:80 | 2.5 µg/ml | 2093 | 249 | 542 | 7.1 | 64190 |
| 3 | 1:160 | 1.25 µg/ml | 1962 | 289 | 478 | 10.3 | 60348 |
| 4 | 1:320 | 0.652 µg/ml | 1778 | 235 | 507 | 6.5 | 53068 |
| 5 | 1:640 | 0.3125 µg/ml | 1407 | 278 | 569 | 4.8 | 50244 |
| 6 | 1:1280 | 0.15625 µg/ml | 1091 | 247 | 597 | 3.1 | 45609 |
| 7 | 1:2560 | 0.078125 µg/ml | 965 | 184 | 539 | 2.7 | 40071 |



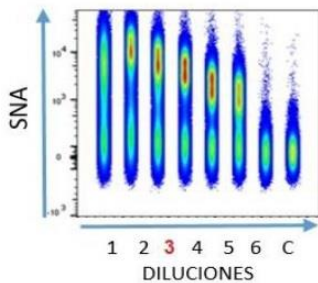
| GSLI B4 | | | | | | | |
|-------------|----------|---------------|------------------|------------------|------|------|------|
| No dilución | Dilución | Concentración | Mediana Positiva | Mediana Negativa | P.84 | IS | IMF |
| 1 | 1:125 | 8 µg/ml | 3306 | 40.3 | 115 | 43.5 | 4853 |
| 2 | 1:250 | 4 µg/ml | 7592 | 26.5 | 102 | 99.7 | 4741 |
| 3 | 1:500 | 2 µg/ml | 6234 | 25.7 | 100 | 83.1 | 4308 |
| 4 | 1:1000 | 1 µg/ml | 5121 | 22 | 91.2 | 73.3 | 3513 |
| 5 | 1:2000 | 0.5 µg/ml | 2648 | 26.1 | 91.6 | 39.8 | 1960 |
| 6 | 1:4000 | 0.25 µg/ml | 1742 | 22.4 | 84.9 | 27.4 | 1417 |



| No dilución | Dilución | Concentración | Mediana Positiva | Mediana Negativa | P.84 | IS | IMF |
|-------------|----------|---------------|------------------|------------------|------|------|------|
| 1 | 1:1250 | 0.8 µg/ml | 1092 | 214 | 418 | 4.28 | 2335 |
| 2 | 1:2500 | 0.4 µg/ml | 1775 | 221 | 439 | 7.09 | 2080 |
| 3 | 1:5000 | 0.2 µg/ml | 1422 | 211 | 439 | 5.28 | 1754 |
| 4 | 1:10000 | 0.1 µg/ml | 1149 | 217 | 439 | 4.18 | 1441 |
| 5 | 1:20000 | 0.05 µg/ml | 1071 | 172 | 359 | 4.78 | 1350 |



| No dilución | Dilución | Concentración | Mediana Positiva | Mediana Negativa | P.84 | IS | IMF |
|-------------|----------|-----------------|------------------|------------------|------|------|------|
| 1 | 1:1000 | 1 µg/ml | 90411 | 365 | 458 | 963 | 4965 |
| 2 | 1:2000 | 0.5 µg/ml | 47432 | 302 | 402 | 469 | 4237 |
| 3 | 1:4000 | 0.25 µg/ml | 27578 | 338 | 462 | 219 | 4119 |
| 4 | 1:8000 | 0.125 µg/ml | 15622 | 284 | 439 | 98.5 | 3976 |
| 5 | 1:16000 | 0.0625 µg/ml | 7429 | 346 | 468 | 57.8 | 3544 |
| 6 | 1:32000 | 0.03125 µg/ml | 4457 | 310 | 443 | 31.0 | 2890 |
| 7 | 1:64000 | 0.015625 µg/ml | 2086 | 218 | 391 | 10.7 | 2513 |
| 8 | 1:128000 | 0.0078125 µg/ml | 1306 | 171 | 368 | 5.71 | 2341 |



| No dilución | Dilución | Concentración | Mediana Positiva | Mediana Negativa | P.84 | IS | IMF |
|-------------|----------|---------------|------------------|------------------|------|------|------|
| 1 | 1:500 | 4 µg/ml | 4098 | 146 | 330 | 21.4 | 7893 |
| 2 | 1:1000 | 2 µg/ml | 4387 | 173 | 347 | 52.7 | 7615 |
| 3 | 1:2000 | 1 µg/ml | 5064 | 132 | 295 | 30.1 | 4609 |
| 4 | 1:4000 | 0.5 µg/ml | 3662 | 113 | 254 | 25.0 | 3600 |
| 5 | 1:8000 | 0.25 µg/ml | 1862 | 893 | 221 | 13.4 | 1857 |
| 6 | 1:16000 | 0.125 µg/ml | 1268 | 117 | 333 | 5.30 | 1300 |

Figura 9. Titulación de lectinas. Esplenocitos recién obtenidos se incubaron con cada lectina, el conjugado Streptavidine Brilliant Violet 421 y Ghost Dye Red 780 este último utilizado para la evaluar la viabilidad, e inmediatamente fueron analizados en el Citómetro de flujo. Los linfocitos se definieron por características de tamaño y granularidad y posteriormente se seleccionaron los *singlets*, en esta región se evaluó la expresión de receptores de cada lectina. Las gráficas muestran concatenados con las diferentes concentraciones evaluadas. Las muestras con la letra C son los controles, se utilizó uno para cada titulación y fueron elaborados con esplenocitos recién obtenidos, Streptavidine Brilliant Violet 421 y Ghost Dye Red 780. Las tablas indican las diluciones y concentraciones evaluadas, la mediana positiva, negativa, percentil 84 y el índice de separación que se calculó con la siguiente fórmula $\text{Índice de separación} = \frac{\text{mediana positiva} - \text{mediana negativa}}{(\text{84\%Negativo} - \text{mediana negativa}) / 0.995}$. Así como la intensidad media geométrica de fluorescencia (IMF) de la región positiva de cada muestra Las flechas rojas muestran la concentración óptima de trabajo.

En el caso de la lectina ALL ya se contaba con su estandarización y titulación. Esta fue utilizada con una dilución final de uso de 1:600.

Las diluciones elegidas en cada titulación de anticuerpos y lectinas, se enumeran en la siguiente tabla con su respectiva concentración.

| Anticuerpo/Lectina | Dilución | Concentración |
|---------------------------|-----------------|---|
| CD3 | 1:50 | 0.003 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
| CD4 | 1:400 | 0.000375 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
| CD44 | 1:100 | 0.0015 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
| CD62L | 1:200 | 0.00075 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
| CD16/32 | 1:20 | 0.0015 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
| GSLI | 1:500 | 0.002 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
| VV | 1:80 | 0.0025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
| PNA | 1:2500 | 0.0004 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
| Con A | 1:16000 | 31.25 $\times 10^{-5}\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
| SNA | 1:2000 | 0.001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |
| MAII | 1:4000 | 2.5 $10^{-4}\mu\text{g}/\mu\text{l}$ |

Tabla 7. Selección de Anticuerpos y lectinas.

6.2 Estrategia de análisis

La estrategia de análisis (Figura 10A) consistió en definir la región de linfocitos seguido de la selección de *singlets* y se utilizó una estrategia de *Dump channel*. (Figura 10B) la cual consistió en seleccionar solamente la región de células CD3 positivas y negativas a *Zombie Green* y CD16/32. Las células positivas a *Zombie Green* y CD16/32 se excluyeron al no ser seleccionadas en la región de interés con la que se continuo el análisis. Las células eliminadas con esta estrategia incluyen linfocitos B, monocitos / macrófagos, células NK, granulocitos, mastocitos y células dendríticas, así como células muertas. El *dump channel* analiza la expresión de CD3 para seleccionar claramente la población de linfocitos T.

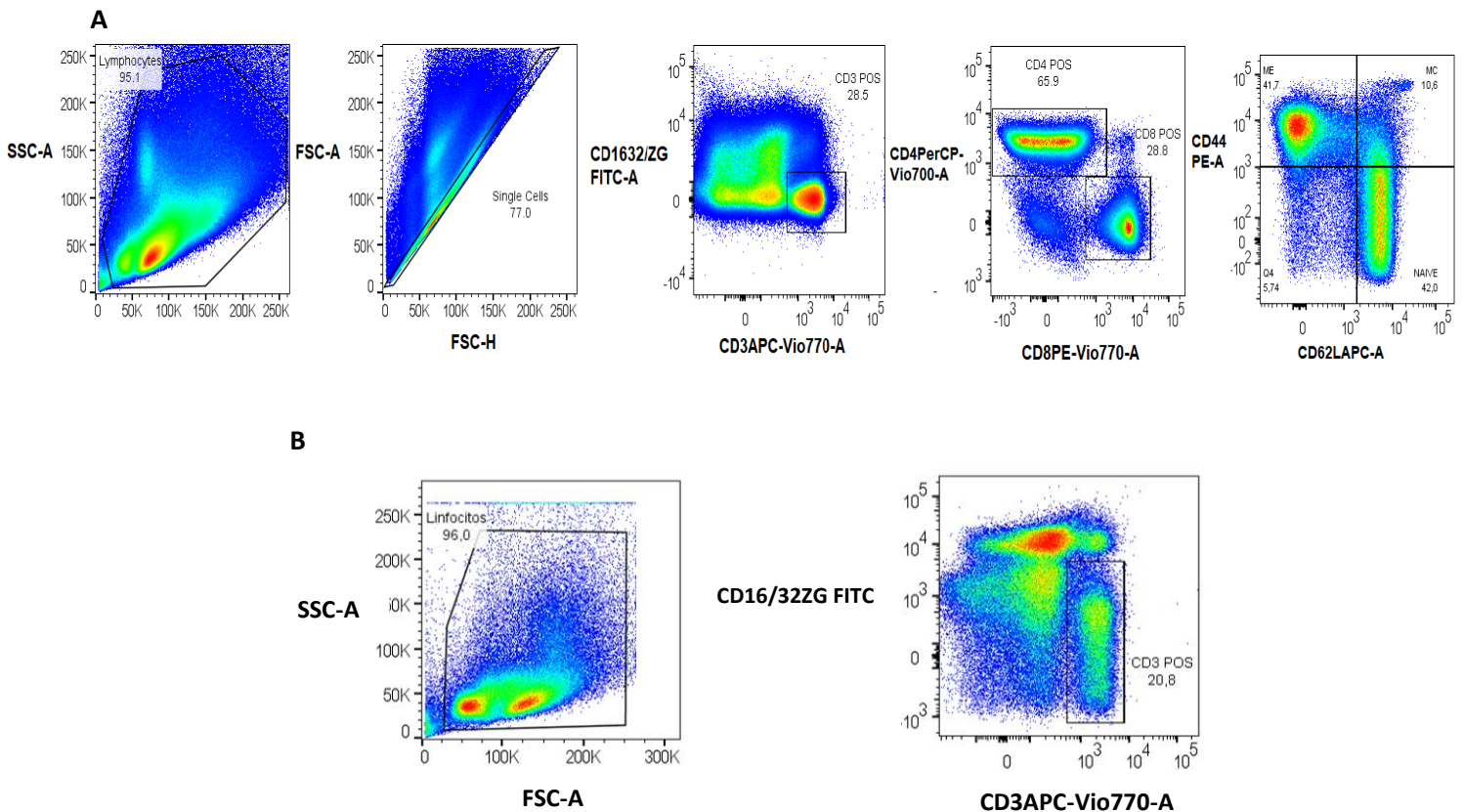


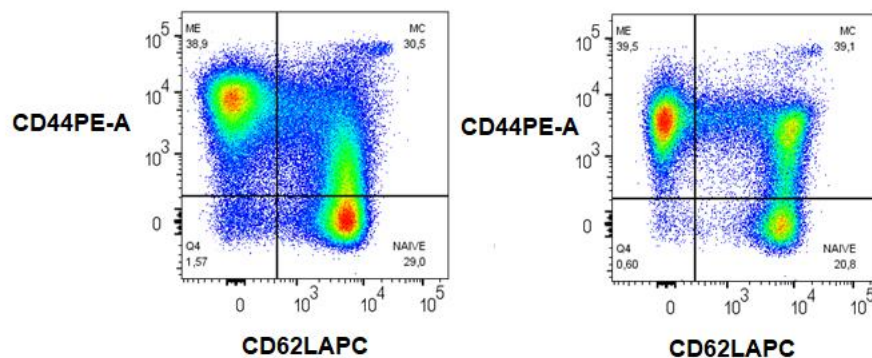
FIGURA 10. A-Estrategia de análisis. Los esplenocitos de ratón recién obtenidos se incubaron con los anticuerpos, los linfocitos se definieron por características de tamaño y granularidad y posteriormente se seleccionaron los *singlets*. Se estableció el *Dump Channel* con los parámetros de CD16/32 y CD3. Posteriormente se definió el linaje celular de CD4 y CD8, a partir de estas poblaciones se identificó a las subpoblaciones de memoria efectora, memoria central y *naïve*. Las incubaciones fueron analizadas en el citómetro y en Flow Jo. **B-DUMP CHANNEL.** Se seleccionó una región de linfocitos y posteriormente se estableció un canal de descarga o *Dump Channel* también llamado canal de descarga, que es utilizado para agrupar y excluir todo lo que no es de interés para nuestro estudio, para este fin utilizamos los parámetros de CD16/32 con *Zombie Green* y CD3, continuando el análisis con las células que solo eran positivas a CD3 y negativas a *Zombie Green*.

A continuación, con los parámetros CD4⁺ y CD8⁺, pudimos distinguir los subtipos de linfocitos T y finalmente con los parámetros de CD44 y CD62L, se diferenciaron las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria central con el fenotipo CD44⁺ y CD62L⁺, las subpoblaciones de memoria efectora y linfocitos efectores (Mem_{ef}/Ef), ambas con el fenotipo CD62L⁻ y CD44⁺ y linfocitos *naïve* CD62L⁺ y CD44⁻.

Se observó en la subpoblación *naïve* CD4⁺, un porcentaje aproximado de 43%, en cambio en la subpoblación *naïve* CD8⁺ fue de 20%. Entre estas subpoblaciones existe una diferencia estadística cercana al 20%, lo que significa que es más grande la población CD4⁺ que CD8⁺, lo cual concuerda con los porcentajes en sangre de ambos tipos celulares, en el cual CD4 tiene del 40-60% y CD8 20-40%. Mientras que el porcentaje de (Mem_{ef}/Ef), tanto de CD4⁺ como CD8⁺, está próximo al 40%, siendo las únicas subpoblaciones que tiene un porcentaje cercano entre sí y con una diferencia estadística menor. Lo cual podría deberse a una activación de los linfocitos T de memoria por una reinfección, aunque no tenemos certeza del estado de los ratones al tratarse de un modelo sucio. Tampoco se confirmó su estado con indicadores de infección.

Finalmente, la subpoblación de memoria central CD4⁺, tiene un porcentaje de células cercano al 10%, mientras que la subpoblación de CD8⁺, tiene un porcentaje mayor próximo al 38%. Estas subpoblaciones tienen una diferencia estadística cercana al 28%, esto puede significar que el modelo animal que se está utilizando, pasa por un proceso en donde los linfocitos T de memoria central CD8⁺ están activadas más que las CD4⁺, y pudiera tratarse de una reinfección de tipo viral, sin embargo, esto no se confirmó. (Figura 10 A y B).

A



B

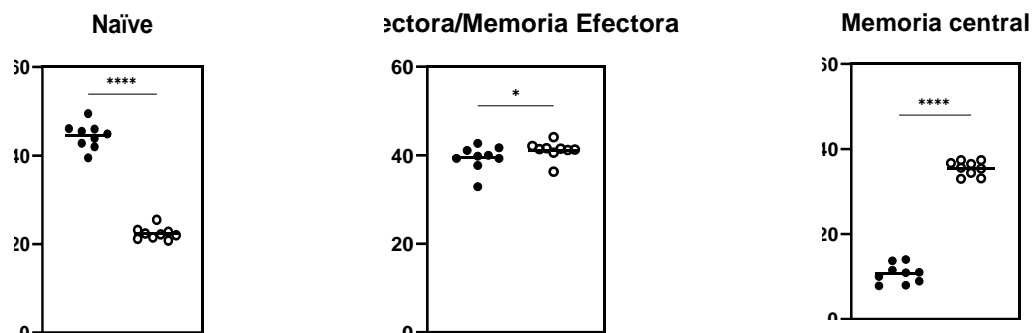


Figura 11. Subpoblaciones de linfocitos T de memoria. A- Los esplenocitos incubados con los anti-CD3, CD4, CD44 CD62L y CD16/32 fueron analizados en el citómetro. A partir de la población positiva a CD3 con los parámetros de CD4 y CD8 se seleccionaron las respectivas subpoblaciones. Posteriormente con los parámetros de CD62L Y CD44 se pudieron observar las subpoblaciones de las células de memoria central con el fenotipo CD62L + y CD44+, las células de memoria efectora CD44+ CD62L- y las células naïve CD62L+ CD44-. B- Porcentajes de las subpoblaciones naïve, memoria central y Mem_{ef}/Ef de linfocitos CD4 y CD8.

6.3 Análisis de las Glicosilaciones en subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ CD8⁺

Con el objetivo de analizar la presencia de glicanos en los linfocitos de memoria central, (Mem_{ef}/Ef), y naïve TCD4⁺ y TCD8⁺ se realizó un análisis del perfil de glicosilación usando lectinas biotiniladas.

Para cada subpoblación se analizó la unión de las siete lectinas seleccionadas. ConA en la figura 12 identifica la presencia del glicano α -manosas. En las subpoblaciones naïve, Mem_{ef}/Ef y memoria central de CD4⁺ y CD8⁺, se observa que todas las células son positivas para los glicanos reconocidos por Con A con altos niveles de expresión.

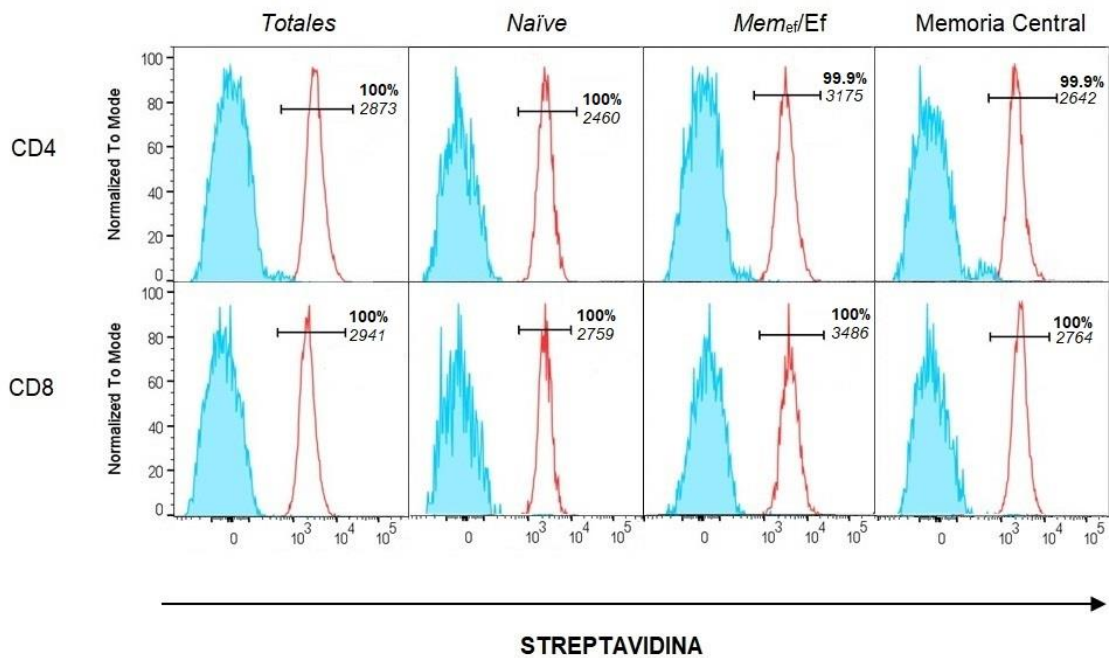


Figura 12: Linfocitos CD4+ y CD8+ expresan altos niveles de Manosa. Los esplenocitos se incubaron con la lectina Concanavalina Biotinilada, posteriormente con Streptavidine Brilliant Violet 421 y con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD44, anti-CD62L Y anti-CD16/32. Se capturaron inmediatamente en el citómetro de flujo y se analizaron como se indica en la Fig. 10 A. Las gráficas muestran el análisis representativo de la presencia de manosas que son reconocidas por Con A en células de memoria central, Mem_{ef}/Ef, y *naïve* de subtipo CD4+ y CD8+. En letras negras se muestra el porcentaje de las poblaciones positivas, en letras itálicas las IMF.

El glicano N-acetilgalactosamina que es reconocido por la lectina VVA, es identificado en todas las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+. En las subpoblaciones *naïve*, memoria central, Mem_{ef}/Ef, de CD4+ y CD8+ se observa que todas las poblaciones son positivas y dentro de las poblaciones positivas, hay una pequeña población con menor nivel de expresión. Así mismo, el patrón de expresión es similar entre las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ con excepción de la subpoblación de CD4+ de memoria efectora y linfocitos efectoros.

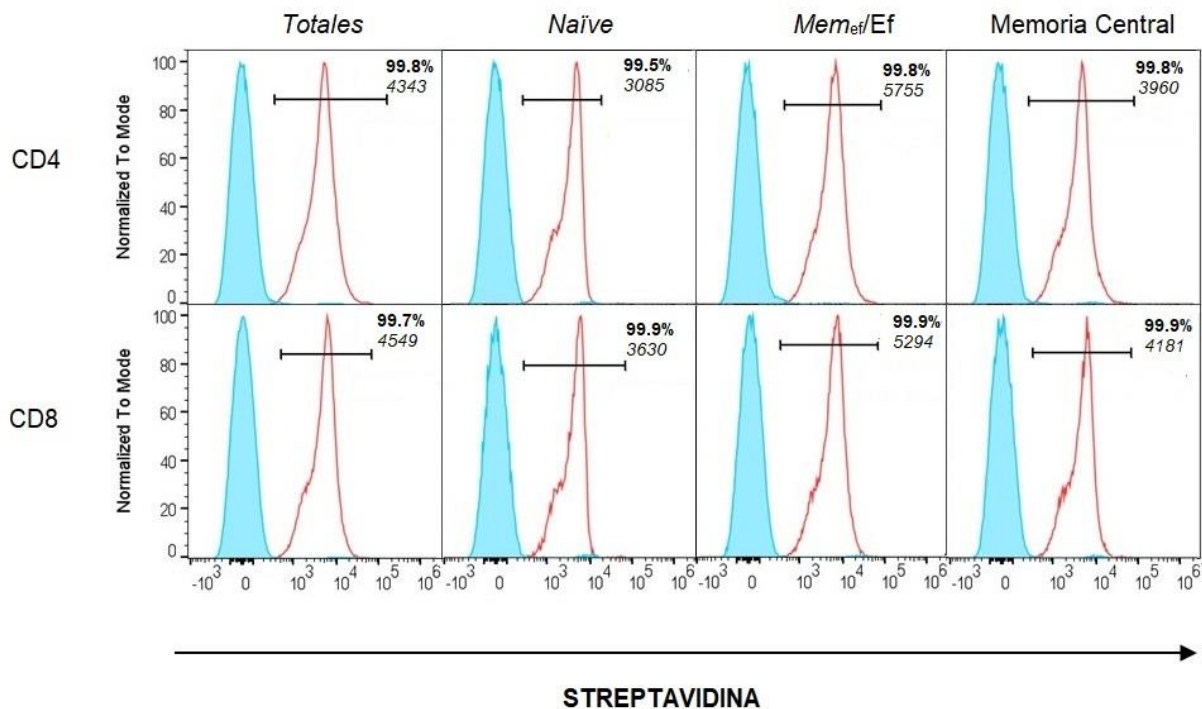


Figura 13. Linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ incluyen poblaciones positivas a N-acetilgalactosamina. Los esplenocitos se incubaron con la lectina *Vicia villosa*, posteriormente con Streptavidine Brilliant Violet 421 y con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD44, anti-CD62L y anti-CD16/32. Se capturaron inmediatamente en el citómetro de flujo y se analizaron como se indica en la Fig. 10 A. Las gráficas muestran el análisis representativo de la presencia de N-GalINAc que son reconocidos por VVA en naïve, células de memoria central, Mem_{ef}/Ef de subtipo CD4⁺ y CD8⁺. En letras negras se muestra el porcentaje de las poblaciones positivas y en letras itálicas las IMF.

La lectina GSLI-B4 que reconoce al glicano α -Gal identifica en las subpoblaciones *naïve*, memoria central, Mem_{ef}/Ef de CD4⁺ y CD8⁺, identifica una población positiva y una población negativa. (Figura 14)

En la subpoblación *naïve* CD8⁺, la población negativa tiene un porcentaje de 17.7% y es la población negativa con mayor porcentaje de linfocitos negativos comparada con las otras subpoblaciones. El patrón de expresión de la población positiva es más heterogéneo y tiene una IMF de 1075 mientras que la población positiva *naïve* de CD4⁺ tiene una IMF de 1894, lo que significa que la expresión del glicano α -Gal en la población positiva de CD8⁺ es más variable, es decir hay linfocitos *naïve* CD8⁺ que expresan menos el glicano que detecta la lectina GSLI-B4

Los linfocitos de Mem_{ef}/Ef CD4⁺ tienen una distribución del nivel de expresión más heterogénea con una IMF de 3206 comparada con la distribución de su homólogo en CD8⁺ con una IMF de 5644.

Los linfocitos de memoria central de CD4⁺, tienen una población negativa más pequeña que corresponde al 3.8% y el patrón de distribución del nivel de expresión de la población positiva es más homogéneo comparada con los linfocitos de memoria central CD8⁺ que tienen un patrón de expresión más heterogéneo.

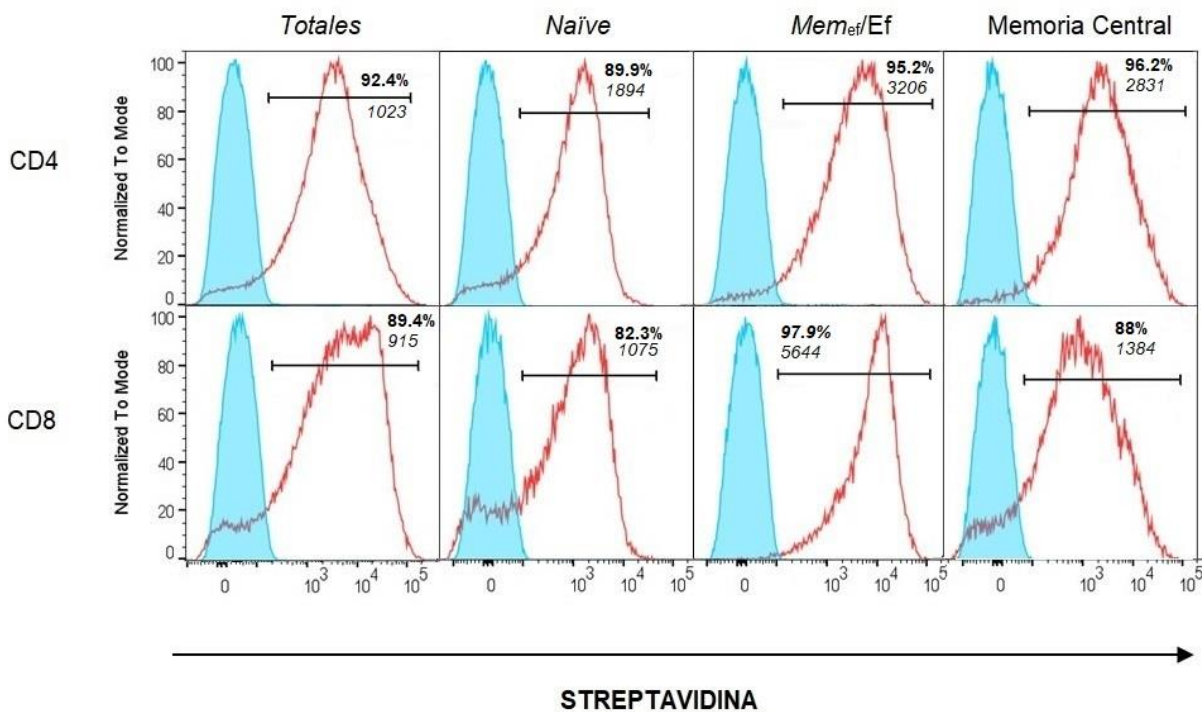


Figura 14. GSL-I distingue una población positiva y una negativa en los linfocitos CD8⁺ *naïve*. En las células de memoria central y Mem_{ef}/Ef CD4⁺ se observa una solo población con niveles distintos de unión a la lectina. Los esplenocitos se incubaron con la lectina GSL-I, posteriormente con Streptavidine Brilliant Violet 421 y con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD44 anti-CD62L y anti-CD16/32. Se capturaron inmediatamente en el citómetro de flujo y se analizaron como se indica en la Fig. 10 A. Las gráficas muestran el análisis representativo de la presencia de α- Gal/GalNAc que son reconocidas por GSLI en células *naïve*, memoria central, y Mem_{ef}/Ef de subtipo CD4⁺ y CD8⁺. En letras negras se muestra el porcentaje de las poblaciones positivas, en letras itálicas las IMF.

En la figura 15 PNA identifica la presencia del glicano Gal- β (1,3)-GalNAc. Las subpoblaciones de los linfocitos *naïve* CD4⁺ y CD8⁺ expresan una población positiva de 99.7% y 99.8% respectivamente, así como un patrón y nivel de expresión semejante.

Los linfocitos Mem_{ef}/Ef de CD4⁺, expresan una población negativa de 5.7% y una población positiva de 94.3%. La población negativa tiene una menor proporción de células y la positiva expresa un patrón de dispersión del nivel de expresión de IMF más heterogéneo. La población de linfocitos T CD8⁺ de Mem_{ef}/Ef, solo tiene una población positiva que expresa una dispersión del nivel de expresión de IMF más homogéneo.

Los linfocitos de memoria central CD4⁺ tienen una población negativa muy pequeña de 1.4% mientras que los linfocitos de memoria central CD8⁺ tiene únicamente una población positiva. Ambas subpoblaciones tienen un patrón y nivel de expresión similares entre sí.

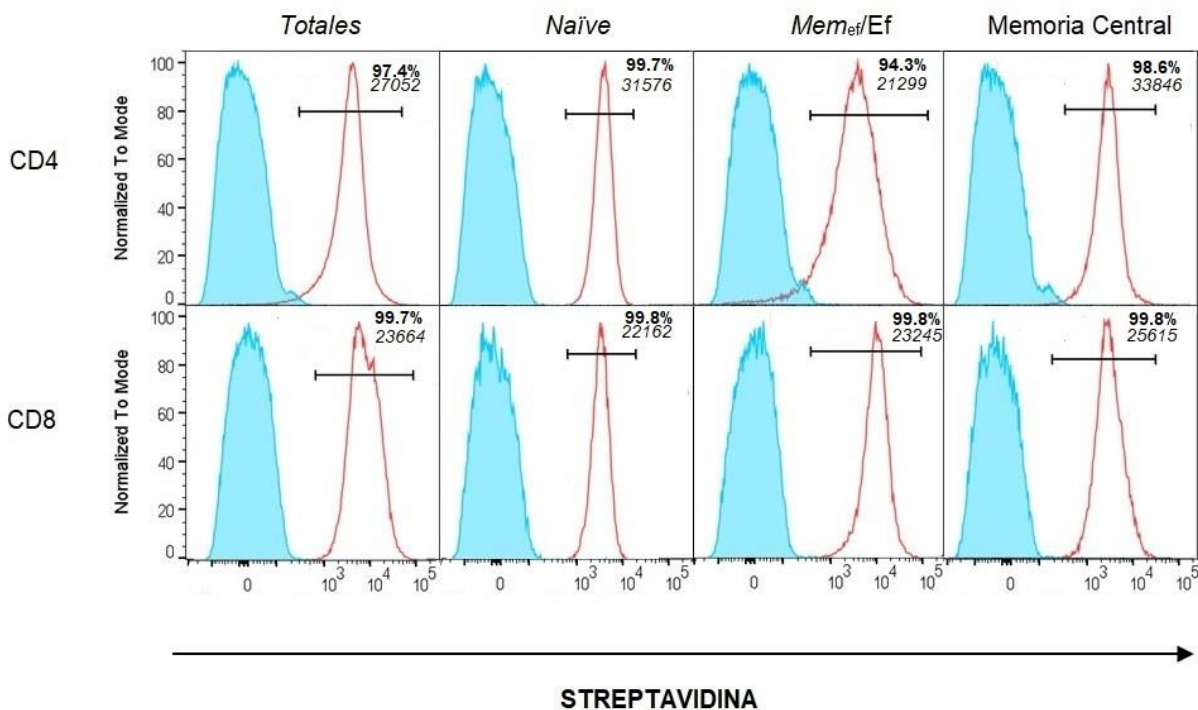


Figura 15. El patrón de expresión de la glicosilación Gal- β (1,3)-GalNAc que reconoce PNA es semejante excepto en los linfocitos CD4⁺ efectoras/memoria efectora. Los esplenocitos se incubaron con la lectina PNA, posteriormente con Streptavidine Brilliant Violet 421 y con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD44, anti-CD62L y anti-CD16/32. Se capturaron inmediatamente en el citómetro de flujo y se analizaron como se indica en la Fig. 10 A. Las gráficas muestran el análisis representativo de la presencia de Gal- β (1,3)-GalNAc que son reconocidas por PNA en linfocitos *naïve*, memoria central, y Mem_{ef}/Ef de subtipo CD4⁺ y CD8⁺. En letras negras se muestra el porcentaje de las poblaciones positivas, en letras *italicas* las IMF.

Por otro lado, las glicosilaciones reconocidas por ALL (Figura 16) en los linfocitos *naïve*, memoria central, Mem_{ef}/Ef CD4⁺, expresan dos poblaciones, una negativa y una positiva a diferencia de las subpoblaciones de CD8⁺, que solamente expresan poblaciones positivas. Los linfocitos *naïve* CD4⁺ expresan una población positiva con una mayor dispersión del nivel de expresión de la IMF, en cambio, los linfocitos CD8⁺ *naïve* tienen una población positiva conformada por una población ALL++ y una ALL+, la población ALL++ tiene un porcentaje de linfocitos de 32.1% y una IMF de 13467 y ALL+ posee un porcentaje de linfocitos de 62.4% y una IMF de 4468, lo cual representa que la población ALL++ tiene un nivel de expresión mayor del glicano que reconoce ALL.

La subpoblación CD4⁺ Mem_{ef}/Ef tiene un patrón de expresión de las glicosilaciones reconocidas por ALL más heterogéneo que las CD8⁺. Los linfocitos de memoria central CD4⁺ expresan una IMF con mayor dispersión, respecto a la población positiva de los linfocitos CD8⁺. Los linfocitos de memoria efectora CD8⁺ tienen un grupo de linfocitos con un mayor nivel de expresión del glicano que reconoce ALL.

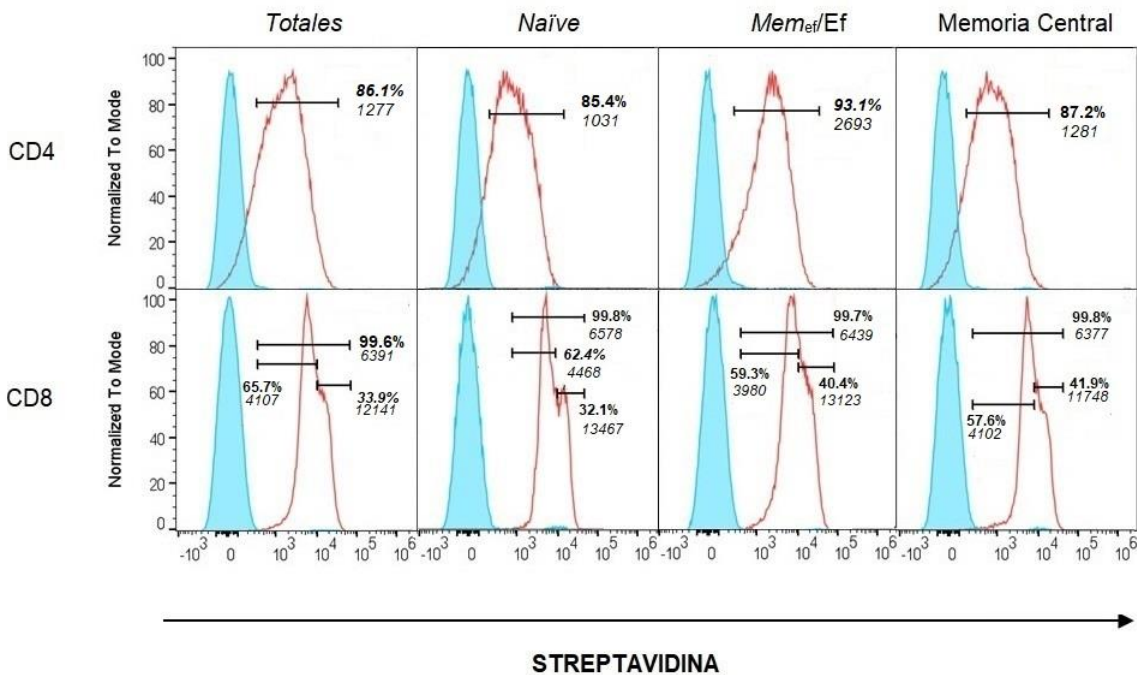


Figura 16. Las glicosilaciones reconocidas por ALL tienen un patrón de expresión diferente entre células CD4⁺ y CD8⁺. Los esplenocitos se incubaron con la lectina ALL, posteriormente con Streptavidine Brilliant Violet 421 y con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD44 anti-CD62L y anti-CD16/32. Se capturaron inmediatamente en el citómetro de flujo y se analizaron como se indica en la Fig. 10 A. Las gráficas muestran el análisis representativo de la presencia de Gal β 1-3GalNAc-O-Ser /Thr que son reconocidas por ALL en células de memoria central, Mem_{ef}/Ef y *naïve* de subtipo CD4⁺ y CD8⁺. En letras negras se muestra el porcentaje de las poblaciones positivas, en letras *italicas* las IMF.

Al analizar las moléculas de ácido siálico- α -(2,3)-Gal reconocidas por MA II (Figura 17), se observa que las subpoblaciones de linfocitos *naïve* y memoria central tanto CD4⁺ como CD8, expresan únicamente una población positiva, tienen un patrón de expresión semejante y un alto nivel de expresión del glicano.

La subpoblación Mem_{ef}/Ef CD4⁺, expresa exclusivamente una población positiva al igual que su correspondiente en CD8⁺, ambas expresan altos niveles de expresión del glicano. Aunque se diferencian en que los linfocitos Mem_{ef}/Ef CD4⁺ tienen una mayor dispersión del nivel de expresión de IMF comparada con las CD8⁺ de memoria efectora, cuya dispersión es más homogénea

Las moléculas de ácido siálico α -(2,6)-Gal reconocidas por SNA (Figura 18) en las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ *naïve*, conforman una población positiva, con un patrón y nivel de expresión semejantes. Los linfocitos CD4 de Mem_{ef}/Ef, tienen una población positiva que muestra una dispersión del nivel de expresión más homogéneo. En contraste, los linfocitos de Mem_{ef}/Ef CD8, tienen una población negativa de 20.1% y una población positiva de 79.9%, esta última tiene una población SNA⁺ con un menor nivel de expresión de IMF de 507, y una población SNA⁺⁺ con un mayor nivel de expresión de IMF de 14204. Finalmente, los linfocitos de memoria central CD4, expresan una población positiva de 99.8% con altos niveles de expresión del glicano que reconoce la lectina SNA por el contrario los linfocitos de memoria central CD8, muestran una población positiva de 97.3%, con una población SNA⁺ de 11.8% y una IMF de 675 y una SNA⁺⁺ de 85.5% y una IMF de 17563, esta última tiene un patrón y nivel de expresión similar a la población positiva de los linfocitos CD4 de memoria central.

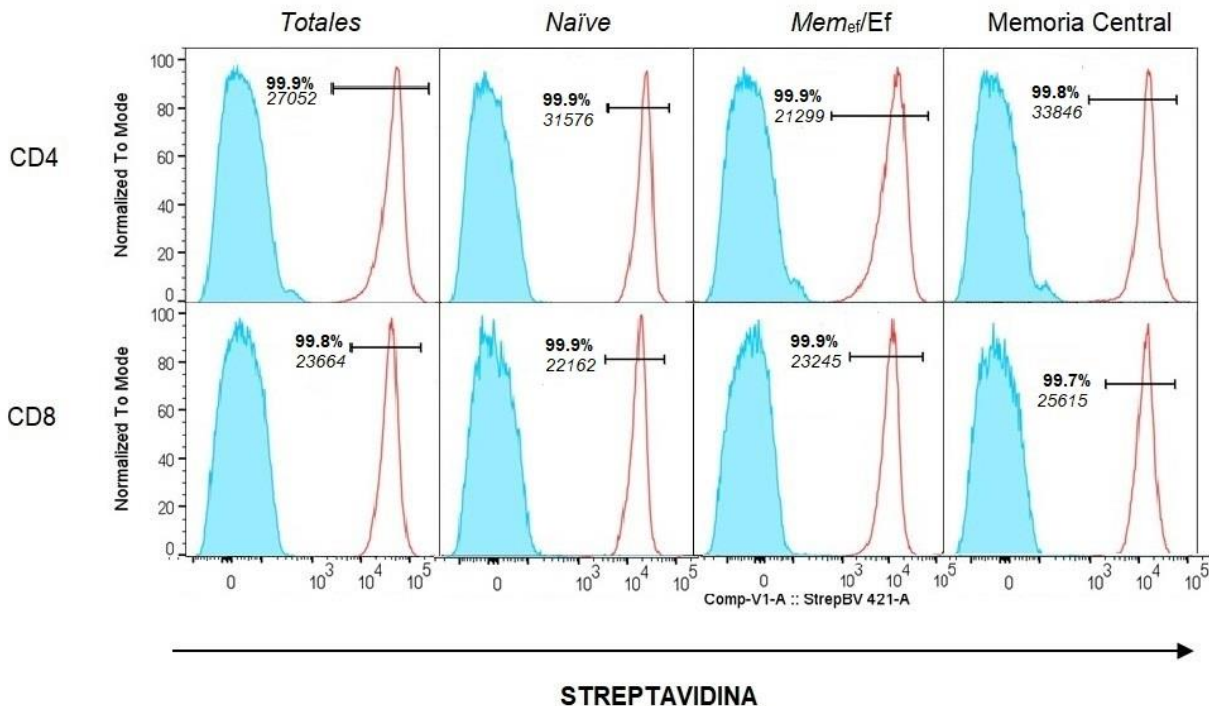


Figura 17. Las glicosilaciones reconocidas por MAII tienen un patrón de expresión diferente entre linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. Los esplenocitos se incubaron con la lectina MAII, posteriormente con Streptavidine Brilliant Violet 421 y con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD44 anti-CD62L y anti-CD16/32. Se capturaron inmediatamente en el citómetro de flujo y se analizaron como se indica en la Fig. 10 A. Las gráficas muestran el análisis representativo de la presencia de ácido siálico- α -(2,3)-Gal que son reconocidas por MAII en linfocitos de memoria central, Mem_{ef}/Ef y naïve de subtipo CD4⁺ y CD8⁺. En letras negras se muestra el porcentaje de las poblaciones positivas, en letras itálicas las IMF.

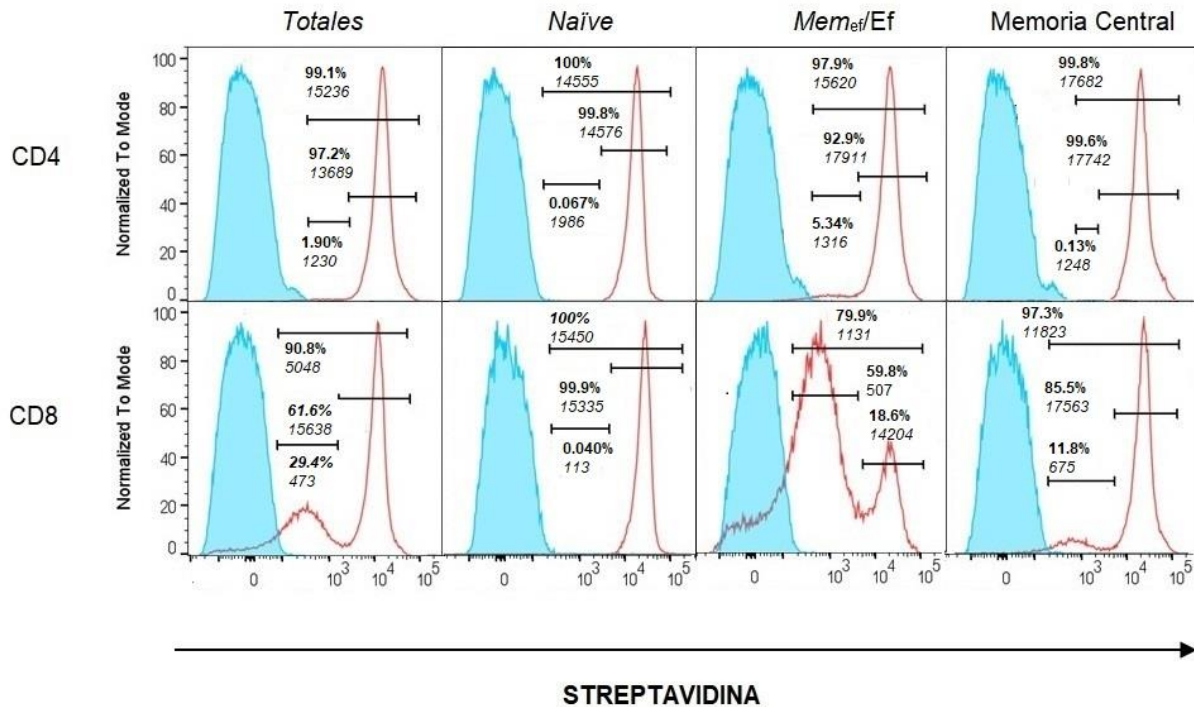


Figura 18. La lectina SN que reconoce a Ácido siálico- α -(2,6)-Gal muestran un patrón y niveles de expresión similares entre sí, excepto en los linfocitos de memoria efectora donde se observa dos poblaciones positivas una SN+ y otra SN ++. Los esplenocitos se incubaron con la lectina SN, posteriormente con Streptavidine Brilliant Violet 421 y con los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD44, anti-CD62L y anti-CD16/32. Se capturaron inmediatamente en el citómetro de flujo y se analizaron como se indica en la Fig. 10 A. Las gráficas muestran el análisis representativo de la presencia de Ácido siálico- α -(2,6)-Gal que son reconocidas por SN en linfocitos *naïve*, de memoria central, Mem_{ef}/Ef de subtipo CD4⁺ y CD8⁺. En letras negras se muestra el porcentaje de las poblaciones positivas, en letras itálicas las IMF.

Con el objetivo de observar de manera global el patrón de glicosilaciones de cada subpoblación se muestran un mapa de calor (Figura 19) dónde se graficó la Intensidad media de fluorescencia (IMF) de las glicosilaciones reconocidas por cada una de las lectinas utilizadas en las subpoblaciones *naïve*, Mem_{ef}/Ef y linfocitos de memoria central de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. En el caso de los linfocitos CD4⁺ (Figura 19A) los datos muestran que las glicosilaciones reconocidos por MA II y SN tienen valores más altos. Esto nos demuestra que existe mayor expresión de ácido siálico, comparado con las otras glicosilaciones. La glicosilación con ácido siálico- α -(2,3)-Gal, reconocido por *Maackia amurensis*, se expresa más en los linfocitos de memoria central, seguido de los linfocitos *naïve* y finalmente los de Mem_{ef}/Ef. La glicosilación con ácido siálico- α -

(2,6)-Gal que identifica la lectina de *Sambuccus nigra*, tiene una mayor cantidad de expresión en los linfocitos de memoria central y *naïve*, y menor expresión en los de Mem_{ef}/Ef.

Por otro lado, en el caso de los CD8⁺ (Figura 19B) se observa que los perfiles de glicosilación reconocidos por MAII tiene valores más altos. Esto demuestra que existe mayor expresión de glicosilaciones de Sia α 2,3Gal en las subpoblaciones *naïve*, memoria central y Mem_{ef}/Ef. Cabe destacar que la lectina SNA a pesar de identificar Acido siálico α 2,6 Gal, tiene menor expresión que la lectina MAII, sobre todo en la población de linfocitos Mem_{ef}/Ef, donde se observaba una población SN+ y una población SN++.

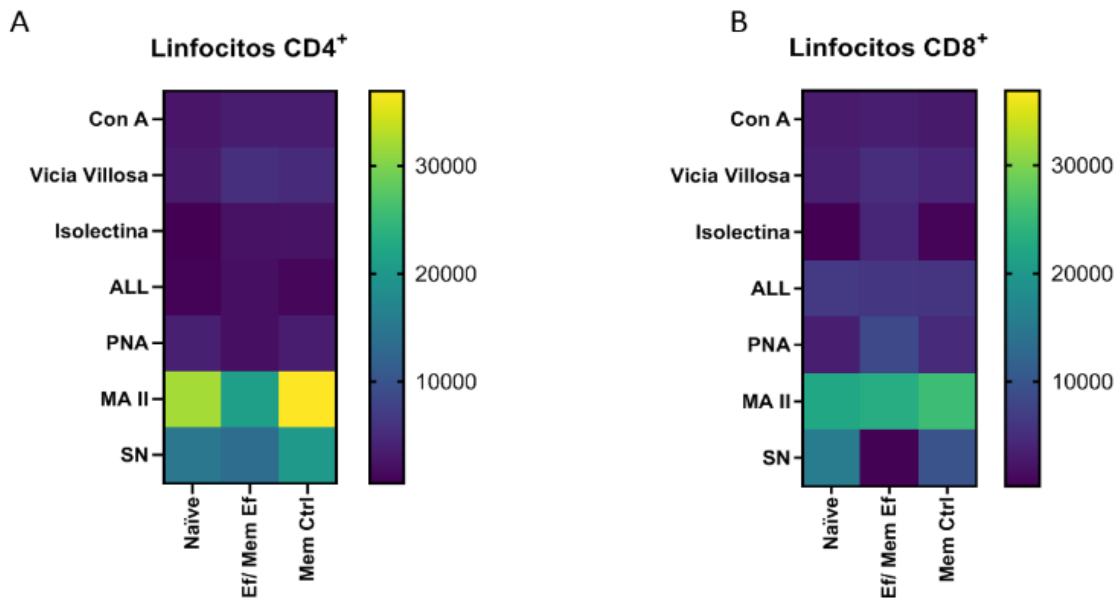


Figura 19. Heatmap demuestra que hay mayor cantidad de glicanos de ácido siálico tanto en CD4 como en CD8. Los datos de las IMF fueron obtenidos por el programa de análisis de Flow Jo y posteriormente con el Software prisma para analizar de forma global la expresión de los glicanos en CD4⁺ y CD8⁺.

A

| IMF Subpoblaciones CD4 | | | |
|------------------------|-------|-----------------------|-----------------|
| Lectina | Naïve | Mem _{ef} /Ef | Memoria Central |
| Con A | 2496 | 3333 | 3241 |
| VVA | 3035 | 5438 | 4864 |
| GSLI-B4 | 575 | 2100 | 2249 |
| PNA | 3645 | 1899 | 3392 |
| ALL | 768 | 1916 | 1143 |
| MAII | 31960 | 20879 | 36871 |
| SNA | 14887 | 13284 | 20074 |

B

| IMF Subpoblaciones CD8 | | | |
|------------------------|-------|-----------------------|-----------------|
| Lectina | Naïve | Mem _{ef} /Ef | Memoria Central |
| Con A | 2766 | 3271 | 2761 |
| VVA | 3434 | 4900 | 4044 |
| GSLI-B4 | 327 | 4154 | 583 |
| PNA | 3335 | 8348 | 4552 |
| ALL | 6239 | 5942 | 5803 |
| MAII | 22021 | 23001 | 25289 |
| SNA | 15450 | 383 | 9554 |

Tabla 7: A-IMF de las subpoblaciones *naïve*, Mem_{ef}/Ef y Memoria central de los linfocitos CD4⁺ y **B-**CD8⁺ correspondiente a cada lectina.

A

| Porcentajes celulares reconocidos por las diferentes lectinas. Linfocitos CD4 | | | |
|---|-------|-----------------------|-----------------|
| Lectina | Naïve | Mem _{ef} /Ef | Memoria Central |
| Con A | 100% | 99.9% | 99.9% |
| VVA | 99.5% | 99.8% | 99.8% |
| GSLI-B4 | 89.9% | 95.2% | 96.2% |
| PNA | 99.7% | 94.3% | 98.6% |
| ALL | 85.4% | 93.1% | 87.2% |
| MAII | 99.9% | 99.9% | 99.8% |
| SNA | 100% | 97.9% | 99.8% |

B

| Porcentajes celulares reconocidos por las diferentes lectina. Linfocitos CD8 | | | |
|--|-------|-----------------------|-----------------|
| Lectina | Naïve | Mem _{ef} /Ef | Memoria Central |
| Con A | 100% | 100% | 100% |
| VVA | 99.9% | 99.9% | 99.9% |
| GSLI-B4 | 82.3% | 97.9% | 88% |
| PNA | 99.8% | 99.8% | 99.8% |
| ALL | 99.8% | 99.7% | 99.8% |
| MAII | 99.9% | 99.9% | 99.7% |
| SNA | 100% | 79.9% | 97.3% |

Tabla 8: A-Porcentajes celulares reconocidos por las diferentes lectinas en linfocitos CD4. **B-**Porcentajes celulares reconocidos por las diferentes lectinas en linfocitos CD8-

7.-DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue analizar la presencia de diferentes glicosilaciones en subpoblaciones *naïve*, memoria central, Mem_{ef}/Ef de los linfocitos T CD4⁺ y TCD8⁺. Para esto, utilizamos como herramientas lectinas y anticuerpos cuya unión a los linfocitos fue analizada por citometría de flujo para determinar el fenotipo de los linfocitos T de interés, identificando los glicanos que están presentes en la superficie celular de estas subpoblaciones. ⁷⁰⁻⁷¹

Un aspecto importante para este análisis era poder utilizar ratones que tuvieran linfocitos en todos los estadios antes mencionados. En este sentido, nos resultó ventajoso que el bioterio al que tenemos acceso es de una sola barrera. Los animales de este tipo de bioterios se han clasificado como modelos murinos “sucios”, ⁷²⁻⁷³ se caracterizan por ser ratones que se encuentran en instalaciones que no son libres de patógenos específicos y tienen la ventaja de estar compuestos por una gran variedad de linfocitos T en tejidos periféricos. Además, presentan un mayor porcentaje de linfocitos T CD8⁺ de memoria efectora con mayor capacidad citolítica que los obtenidos de ratones de bioterios libres de patógenos específicos (SPF) ⁷²⁻⁷⁵. Esto nos permitió encontrar en nuestros análisis linfocitos T *naïve*, activadas y de memoria.

El análisis de glicofenotipos se realizó con lectinas que son proteínas de unión a carbohidratos a las que se les han atribuido una amplia gama de funciones y tienen una gran importancia en el área de la glicobiología y ofrecen muchas ventajas como disponibilidad inmediata, especificidades distintas y alta estabilidad.⁷⁹ La aplicación de las lectinas como herramientas analíticas en la glicobiología ha generado nuevas oportunidades para explorar nuevas propiedades y características, y en nuestro caso nos ayudan a comprender e identificar elementos en la superficie celular que pueden intervenir en diversos procesos celulares.⁷⁹⁻⁸⁰

Al analizar las muestras incubadas con ConA (Figura 12) observamos que el glicano manosa reconocido por dicha lectina se expresa un patrón y nivel de expresión similar entre las subpoblaciones de CD4⁺ y CD8⁺, esto se relaciona con la presencia de manosas en la molécula CD3. Se ha descrito en ensayos de inmunoprecipitación que ConA se une fuertemente al complejo TCR-CD3 a través de los N-glicanos de tipo oligomanosa presentes en CD3, un entrecruzamiento molecular lo suficientemente fuerte como para iniciar la activación. La glicosilación de CD3 juega un papel funcional importante como intermediario entre la señalización inicial del TCR y la activación de las vías de activación intracelular. La presencia de glicosilaciones con manosas en CD3 puede explicar porque en todas las subpoblaciones celulares *naïve*, memoria central, Mem_{ef}/Ef la expresión es similar, sin importar el tipo y/o estado de la célula. ⁸¹⁻⁸²

El glicano N-acetilgalactosamina que se identifica con la lectina VVA, (Figura 13) está presente en todas las subpoblaciones *naïve*, memoria central, memoria efectora y linfocitos efectores de CD4⁺ y CD8⁺. Tiene un patrón de expresión similar, excepto en la subpoblación Mem_{ef}/Ef CD4⁺.⁸³ Se ha reportado que esta lectina funciona como un marcador fenotípico de poblaciones celulares en enfermedades autoinmunes como Lupus Eritematoso y la enfermedad de Crohn, en donde la

lectina VV detecta glicanos N-acetilgalatosamina tanto en linfocitos T CD4⁺ como en CD8⁺, pero hay mayor porcentaje en las poblaciones CD8⁺. De acuerdo a nuestros resultados, esta glicosilación no es exclusiva de una sola población celular y tampoco observamos diferencias significativas entre la unión de lectina en linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, aunque lo reportado anteriormente especifica que esta diferencia es en enfermedades autoinmunes.⁸⁴⁻⁸⁵

El análisis de las glicosilaciones reconocidas por GSLI-B4 (IB4) (Figura 14) muestra que los residuos α -galactosil están presentes en todas las subpoblaciones con patrones y niveles de expresión similar, es decir su expresión es constante. Hasta el momento se ha reportado, que se expresa de forma constitutiva en diferentes tipos celulares como células endoteliales¹⁰⁶ en tejidos normales de ratón, conejo, rata y humanos, así como en macrófagos de rata.⁸⁶ También se ha detallado que esta lectina marca la microglía del SNC y ciertas neuronas periféricas, incluida una subpoblación de pequeñas células ganglionares de la raíz dorsal tipo B oscuras, algunos axones simpáticos posganglionares, y casi todos los axones gustativos periféricos en ratas.¹²⁵ Además está presente en las células tumorales de ascitis de Ehrlich, las cuales se aglutinan fuertemente con 0,4 microgramos/ml de isolectina I-B4 de *Griffonia simplicifolia*¹²⁶. Sin embargo, es la primera vez que se reporta en linfocitos T, específicamente en T de memoria CD4⁺ y CD8⁺ y a pesar de haberse identificado en diferentes especies y tipos celulares no se asocia aun a una función específica.

Por otra parte, la lectina PNA que reconoce Gal- β (1,3)-GalNAc (Figura 15) muestra que existe un patrón de expresión semejante entre las subpoblaciones de CD4⁺ y CD8⁺, en donde la población positiva de todas las subpoblaciones tiene casi la misma intensidad de fluorescencia, excepto en los linfocitos T CD4⁺ Mem_{ef}/Ef, donde se observa una dispersión más heterogénea del nivel de expresión de IMF.⁷⁷ Lo cual quiere decir que la subpoblación de linfocitos CD4⁺ Mem_{ef}/Ef tiene una unión a lectina más variable comparada con las otras subpoblaciones que presentan más uniformidad entre sí.

La expresión del glicano que reconoce PNA se relaciona con los cambios que ocurren durante el desarrollo y la activación de los linfocitos T, donde se desarrollan alteraciones en la estructura de las glicoproteínas de la superficie celular.⁷⁸ Por ejemplo, la conversión del fenotipo PNA+ a PNA- en timocitos durante su maduración se ha atribuido al enmascaramiento de los receptores de carbohidratos de la superficie celular por el ácido siálico durante la maduración intratímica de estas células.⁷⁷ Sin embargo cuando se activan los linfocitos T, los O-glicanos del núcleo de las glicoproteínas CD45 y CD43, pierden el ácido siálico y quedan con el glicano Gal- β (1,3)-GalNAc

expuesto, que posteriormente puede ser detectado por PNA, siendo un sello distintivo de los linfocitos T periféricas activadas.¹⁰⁷ Esto no coincide con lo que observamos en nuestros resultados, donde los linfocitos *naïve* si expresan este glicano, aunque de acuerdo con lo reportado al ser un linfocito que aún no está activada no tendría que serlo, pues el glicano Gal- β (1,3)-GalNAc que reconoce PNA debería estar enmascarado con un ácido siálico final, lo que impediría que PNA pueda reconocer y unirse al glicano específico, sin embargo en estudios futuros esto podría confirmarse cuantificando un marcador como CD69. También se ha propuesto que la pérdida de ácido siálico de la superficie celular durante la activación de los linfocitos T mejora la reactividad del TCR con el antígeno. Sin embargo, también se ha reportado que la activación de los linfocitos T da como resultado una mayor unión del anticuerpo CZ-1 que reconoce un epítipo que contiene ácido siálico en CD45RB. Esto indica que se produce un aumento de la sialilación del epítipo CZ-1 durante la activación de los linfocitos T, y que la pérdida de ácido siálico de la superficie celular durante la activación de los linfocitos T es un evento selectivo en lugar de afectar a todos los glicanos de la superficie celular. Dado que los glicanos específicos en los esqueletos de glicoproteínas controlan eventos críticos en la maduración y supervivencia de los linfocitos T, es importante comprender los mecanismos de glicosilación selectiva de glicoproteínas para regular el desarrollo y la función de los linfocitos T.¹²⁰

Particularmente CD45 (receptor con actividad de tirosina fosfatasa de proteínas) está formado por tres regiones, intracelular, transmembranal y extracelular. La región extracelular se caracteriza por estar glicosilada, y ser una región de constantes cambios durante la maduración, activación y diferenciación de los linfocitos T. Estos cambios son orquestados por glicosiltransferasas que modifican la composición, la carga y las dimensiones de los glucanos.

¹⁰⁸

Específicamente la porción extracelular de CD45 se compone de tres regiones similares a fibronectina (FN), un dominio rico en cisteína y tres dominios que surgen de ARNm empalmados alternativamente, denominados A, B y C. Toda la longitud de la porción extracelular está decorada con N-glicanos, mientras que los O-glicanos principalmente estructuras core-1 (Gal- β (1,3)-GalNAc) y core-2 (Gal β 1,3[GlcNAc- β 1,6]GalNAc) están presentes en los dominios A, B y C distales a la membrana.¹⁰⁸ Sin embargo, aunque la estructura del dominio extracelular no afecta directamente la actividad de la fosfatasa del dominio intracelular, las diversas isoformas

de CD45, al estar glicosiladas diferencialmente, pueden regular la unión del ligando y, en consecuencia, la señalización intracelular.

CD45 es considerado un regulador crítico del desarrollo y función de los linfocitos T. Su estado de glicosilación controla el reconocimiento, afecta la señalización intracelular por el dominio de tirosina fosfatasa citoplasmática y modula la respuesta del linfocito T al antígeno. Aunque se ha establecido la importancia de CD45 durante el desarrollo de los linfocitos T, es claro que la glicosilación de CD45 es un proceso dinámico que modifica la supervivencia, activación y función inmunológica de los linfocitos T⁷⁹. Esto se relaciona con lo observado en nuestros resultados, donde todas las subpoblaciones tanto CD4⁺ como CD8⁺ poseen la glicosilación Gal-β(1,3)-GalNAc, y posiblemente se debe a que las subpoblaciones *naïve* y los linfocitos de memoria central y Mem_{ef}/Ef, tienen diferentes isoformas de CD45, y estas a su vez una organización distinta del glicano de nuestro interés Gal-β(1,3)-GalNAc, dando una función en particular para cada subpoblación como la supervivencia o activación. Para corroborar esto último, en futuros estudios se podría cuantificar CD69, CD25, CD122 y HLA-DR para verificar la activación y para la supervivencia cuantificar Bcl-XI y Bcl-2 que son las proteínas antiapoptóticas que promueven la supervivencia de los linfocitos de memoria.

Por otro lado, también se ha demostrado que los linfocitos CD8⁺ originadas a partir de una infección, tienen un alto nivel de expresión del glicano reconocido por PNA, esto se debe a la expresión de la enzima neuraminidasa endógena que corta los residuos de ácido siálico dejando expuesto al glicano; estas condiciones perduran y se mantienen en linfocitos de memoria^{.77-80} Esto también coincide con lo observado en nuestros resultados, pues al ser los animales susceptibles a diversas infecciones, los linfocitos CD8 de memoria que han generado son positivas a PNA.^{81-82.}

Estas observaciones refuerzan la importancia de profundizar en los perfiles de glicosilación para aprender sus diferencias, desarrollo y la función que estos glicanos ejercen en los linfocitos T de memoria CD4⁺ y CD8⁺.⁸³

La lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) (Figura 16) reconoce específicamente O-glicanos del tipo Galβ1-3GalNAc-O-Ser /Thr, unidos a moesina, así como glicanos Galβ1-3GalNAc-O-Ser /Thr en presencia de residuos de ácido siálico.¹⁰⁰ Esta capacidad de reconocer su glicano a pesar de la presencia de ácidos siálicos, podría explicar porque identifica gran cantidad de glicanos en todas las subpoblaciones tanto de CD4⁺ como en CD8⁺.

En el timo de ratón, la lectina ALL reconoce los linfocitos T CD4⁺ en la médula y la unión corticomedular¹⁰⁴, lo que sugiere que las glicoproteínas identificadas por ALL se expresan hasta que los linfocitos T maduran, sin embargo con los resultados que nosotros obtuvimos podemos observar que el glicano no es exclusivo de una etapa inmadura de los linfocitos dentro del timo, ya que en los linfocitos *naïve* presentes en bazo, junto con los linfocitos Mem_{ef}/Ef y memoria central, también se expresa este glicano.¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ Probablemente esto se deba a que los glicanos que identifica ALL, forma parte de algún complejo proteico que se expresa de forma constitutiva en los linfocitos T.

Respecto a la cantidad de glicanos que reconoce ALL, se ha descrito que la proporción es diferente en los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ recién obtenidos, que es aproximadamente el 30% y el 90% respectivamente. Esta observación coincide con nuestros resultados, en los cuales observamos que las subpoblaciones de CD4⁺ tienen una población negativa, a diferencia de CD8 que solo posee poblaciones positivas. Esto quiere decir que los linfocitos CD4⁺, tienen menos células positivas a ALL. Si bien, no contamos con un porcentaje específico de estas subpoblaciones, si podemos observar una disminución del reconocimiento de este glicano en las subpoblaciones de CD4⁺.

Recientemente se ha reportado la dinámica de expresión de los glicanos que reconoce ALL después de su activación *in vitro* con anti-CD3/CD28, donde se observa un aumento de las células positivas a ALL, dentro de los subconjuntos CD4 y CD8. La mayor expresión de glicanos que reconocen ALL se alcanza 48h después de la activación. Esto reafirma que existen remodelaciones, en donde las glicosilaciones intracelulares se modifican y las moléculas que se expresan de *ново* traen consigo diferentes glicosilaciones ocasionando cambios en los linfocitos, como la activación, proliferación o apoptosis. En nuestro caso, detectar estos cambios en los linfocitos T de memoria nos daría la pauta para saber si los cambios en las glicosilaciones se pueden asociar a una función en particular.

Varios informes sugieren que las glicosilaciones de ALL están implicadas en la modulación de las interacciones célula con célula, en la maduración, activación y modulación de la apoptosis de los linfocitos T.^{83,77}

En estudios previos se ha detallado una estrecha relación entre los glicanos que reconoce ALL y una proteína en particular, tipo moesina. Recientemente se determinó que la proteína de 70 kDa reconocida por la lectina ALL en la membrana de los linfocitos T si es una forma O-glicosilada

de moesina. A esta proteína también se le atribuyeron otras funciones como proporcionar una señal coestimuladora previamente no descrita en los linfocitos T CD4 y CD8 que, junto con CD3, puede inducir la activación y la proliferación. También los autores sugieren que probablemente la o-moesina es parte de un complejo molecular donde otras moléculas comparten la misma O-glicosilación.⁸⁸⁻⁹¹

Específicamente de las glicosilaciones que reconoce ALL en linfocitos de memoria no hay ningún reporte, sin embargo, los avances que recientemente se han descrito, nos ayudan a reflexionar si estas mismas proteínas como la o-moesina están presentes en las moléculas de los linfocitos de memoria y si su función es la misma en los linfocitos CD4 y CD8. Estos avances que describen sobre cómo funcionan las glicosilaciones que se unen a ALL y las proteínas a las que están unidas, abre la posibilidad de investigar hechos similares en otras subpoblaciones y con otras lectinas, lo que favorece que se descubran nuevos mecanismos y funciones en los que están involucradas las glicosilaciones y sus remodelaciones.

La presencia de ácidos siálicos se pudo analizar a través de dos lectinas, MAII (Figura 17) que detecta Sia α 2,3Gal y SNA, Sia α 2,6Gal/GalNAc. (Figura 18) Aunque ambas lectinas identifican ácidos siálicos y la única diferencia entre estos glicanos es la posición del enlace, es interesante analizar y compararlos, ya que sutiles cambios como el enlace, puede ser suficientes para tener un efecto o función distinta. por ejemplo en el caso de Sia α 2,3Gal localizado en la superficie celular es bien conocido por ser el receptor de muchos microorganismos infecciosos como el virus de la influenza, así como la expresión anormal de Sia α 2,3Gal se ha observado con frecuencia en muchos carcinomas y la unión de lectina con leucoaglutinina (MAL I) y hemaglutinina (MAH o MAL II) de *Maackia amurensis* es el método principal para la detección de Neu5Ac α (2-3)Gal, mientras que la expresión de Sia α 2,6Gal/GalNAc no genera ninguno de estos acontecimientos. No obstante, en nuestro trabajo si hubo diferencias significativas entre estas dos uniones de lectinas afines a los ácidos siálicos, específicamente en la subpoblación de Mem_{ef}/Ef.

Un fenómeno importante donde podemos analizar la presencia de la glicosilación de ácidos siálico α -(2,3), es durante las etapas de maduración de los timocitos. Específicamente cuando los timocitos inmaduros DN están presentes en la corteza subcapsular expresan glicanos tipo O con unión a ácidos siálicos α -(2,3), posteriormente cuando pasan a la etapa DP, se pierden los residuos de ácido siálico terminales. En el momento en que los timocitos se convierten en SP, nuevamente expresan dicho glicano, siendo este el fenotipo de los linfocitos T *naïve* en la circulación periférica, antes de la estimulación antigénica.^{36, 122-124}

Estos hechos se correlacionan con la expresión de la enzima ST3Gal I. A mayor expresión de la enzima, más se identifica la presencia de ácidos siálicos, pero cuando la expresión es menor los ácidos siálicos no están presentes, es decir se pierden. Se sabe que la enzima ST3Gal I participa de forma crítica tanto en la maduración de los timocitos como en la supervivencia de los linfocitos T, ya que la pérdida de la expresión de ST3Gal I en ratones *knockout* provoca un aumento de la apoptosis y una reducción del número de linfocitos T CD8 en la periferia⁹²⁻⁹³

Además, la sialilación específica de O-glicanos en CD8 por ST3Gal I puede contribuir a la interacción adecuada de CD8 con complejos péptido-MHC en células presentadoras de antígeno, de modo que la pérdida de expresión de ST3Gal I puede alterar la señalización de los linfocitos T CD8 y contribuir así a la muerte de estos. Esto sugiere que el ácido siálico presente en estas subpoblaciones *naïve*, memoria central, y memoria efectora tanto de CD4 y CD8, se expresa constitutivamente para evitar procesos de apoptosis, y garantizar la supervivencia de los linfocitos de memoria.⁹⁴

Otros estudios demuestran que en los estadios iniciales de diferenciación los timocitos expresan en su superficie glicanos Sia α 2,3Gal y conforme pasan a etapas posteriores de maduración el patrón de sialilación cambia expresando Sia α 2,6Gal, esto probablemente se deba a la expresión de diferentes sialiltransferasas que están siendo reguladas diferencialmente.⁹³⁻⁹⁵

En conclusión, la presencia de este ácido siálico α -(2,3) en los linfocitos T *naïve* puede asociarse a fenotipos de linfocitos *naïve* que están en circulación y no han sido activadas. Por lo tanto, la expresión de este glicano podría asociarse a funciones como la supervivencia, evitando que ocurra un proceso de apoptosis celular.

En el caso de las subpoblaciones memoria central, Mem_{ef}/Ef tanto de CD4⁺ como CD8⁺, también observamos la presencia de este glicano, que puede estar relacionado con garantizar la supervivencia de estos linfocitos de vida larga, cuyas funciones no se han activado y se encuentran a la espera de una exposición secundaria a patógenos que previamente habían sido encontrados.^{92,96}

También, podemos observar que los ácidos siálicos son las glicosilaciones más abundantes en la superficie de todas las subpoblaciones analizadas, particularmente la del ácido siálico α 2,3 seguida por la del ácido siálico α 2,6. Retomando lo descrito anteriormente, podemos pensar que la presencia de estos ácidos siálicos modula una función de importancia como la activación, o la supervivencia en las subpoblaciones de los linfocitos T de memoria.

Los ácidos siálico con enlace $\alpha 2,6$ identificados por la lectina SNA, fueron los únicos que muestran un patrón de expresión diferente para cada subpoblación. Los linfocitos naïve $CD4^+$ y $CD8^+$ tienen un alto nivel de expresión de la glicosilación que reconoce SNA; en los linfocitos Mem_{ef}/Ef $CD4^+$ y $CD8^+$ se observa una población con alto nivel de expresión del glicano Sial $\alpha 2-6$ (SNA++) y otra con menor expresión (SNA+), sin embargo, esto es más evidente en los linfocitos $CD8^+$. Los linfocitos de memoria central $CD8^+$ tienen un nivel de expresión heterogéneo, y destaca una población con menor nivel de expresión a SNA.⁹²

Se conoce que la enzima ST6Gal I disminuye después de la activación general de los linfocitos T, y esta disminución tiene como resultado una reducción del ácido siálico ligado a $\alpha 2,6$ en los glicoconjugados de la superficie celular en los linfocitos T $CD4$ y $CD8$.⁹⁴ Específicamente los linfocitos T $CD4^+$ al activarse disminuye la sialilación $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$, pero esta disminución va acompañada de un aumento general de sialilación de novo de epítopos Sia- $\alpha 2,8$ ^{75,83}. Cabe destacar que el ácido siálico $\alpha 2,6$ se expresa menos en los linfocitos T $CD4$ polarizadas a Th1 y Th2. Sin embargo, entre estas dos subpoblaciones la población Th2, expresa más la enzima ST6Gal, por lo tanto, expresa mayor cantidad de ácido siálico unido a $\alpha 2,6$ en comparación con Th1. Este comportamiento descrito previamente en linfocitos $CD4^+$, puede ser similar al que nosotros observamos, pero en los linfocitos $CD8^+$ de Mem_{ef}/Ef , los cuales posiblemente al activarse pierden el ácido siálico por una disminución de la enzima ST6Gal y por esta razón podemos observar dos poblaciones, una con mayor unión a lectina y una con menor unión a la lectina SNA que reconoce el ácido siálico en posición $\alpha-(2,6)$. Desconocemos si esta disminución fue acompañada por un aumento general de sialilación de novo de epítopos Sia- $\alpha 2,8$ ya que esta glicosilación no formo parte de nuestro objeto de estudio, sin embargo, para los estudios siguientes puede ser un objeto de estudio importante para saber más acerca de las modificaciones de las glicosilaciones cuando se activan los linfocitos.

Por esta razón, los linfocitos Mem_{ef}/Ef $CD8^+$ probablemente, al pasar del estado de memoria al efector, podría sufrir una remodelación de los ácidos siálico que tienen en su superficie. La población SNA+, correspondería a los linfocitos que han perdido el ácido siálico $\alpha 2,6$ y que ahora son linfocitos activados, y la población SNA++ a la población que siguen siendo linfocitos de memoria efectora. Siendo la lectina SNA que identifica al Acido siálico $\alpha 2,6Gal$, un posible marcador fenotípico que diferencie una célula de memoria efectora de una efectora.⁹²⁻⁹⁴

Por otro lado, hasta el momento, no hay marcadores que nos ayuden a diferenciar entre linfocitos de memoria efectora de las efectoras. Ambas son poblaciones que sería interesante poder

caracterizar con un fenotipo en particular para cada uno, lo que nos ayudaría a distinguir sus diferencias y comparar las remodelaciones. Identificar sus respectivas glicosilaciones y como estas pueden interferir en las funciones que ejercen. Para validar si esta glicosilación podría servir como marcador, se propone hacer un panel de citometría de flujo para corroborar si la lectina SN puede ser un marcador que distinga entre estas subpoblaciones.

Los marcadores para dicho panel podrían ser los siguientes CD16/32, CD44, CD4/CD8, CD25, CD62L, CD3APC y la lectina SNA. Para la diferenciación de las subpoblaciones de linfocitos de memoria efectora, se podría observar un fenotipo CD62L⁻, CD44⁺ y CD25⁻, mientras que el fenotipo de los linfocitos efectores sería CD62L *low*, CD44⁺, CD25⁺.

La población SNA⁺ de la subpoblación Mem_{ef}/Ef CD8⁺, probablemente representan a linfocitos que han perdido el ácido siálico y ahora son linfocitos efectores. Lo que resulta interesante, ya que esta lectina estaría ayudando a diferenciar estas subpoblaciones desde las diferentes glicosilaciones.

Clásicamente, el análisis de las glicosilaciones se ha realizado utilizando lectinas en técnicas como microscopía, microarreglos y lectin-blot. Sin embargo, aún no se ha documentado una fenotipificación de lectinas en linfocitos T de memoria y sus subpoblaciones por citometría de flujo cuya ventaja es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad, así como cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo. Sin embargo, para realizar análisis más detallados estos estudios podrían complementarse con técnicas como cromatografía de alto rendimiento y la espectrometría de masas para dilucidar la estructura y secuencia molecular de estos glicanos.

Este trabajo, podría contribuir a crear perfiles fenotípicos que nos ayuden a identificar diferencias entre las subpoblaciones, así como enriquecer la información que podría ayudar a descubrir otros mecanismos implicados en la activación, mantenimiento y funciones vitales donde los glicanos tengan una participación fundamental.

11.-CONCLUSIONES

- Se estableció un panel de citometría que permite distinguir las subpoblaciones *naïve*, memoria central, Mem_{ef}/Ef de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ para posteriormente evaluar la presencia de diferentes glicosilaciones en cada subpoblación usando lectinas.
- Las glicosilaciones de Manosa, N-acetilgalactosamina, α -Gal/GalNAc, Gal- β (1,3)-GalNAc, y Ácido siálico- α -(2,3)-Gal se expresan en todas las subpoblaciones *naïve*, memoria central y Mem_{ef}/Ef de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ sin mostrar diferencias significativas.
- El análisis de la glicosilación ácido siálico α 2,6 reconocida por SNA muestra que en los linfocitos Mem_{ef}/Ef existe una población SNA⁺ y otra SNA⁺⁺. Lo anterior nos hace pensar que hacen falta más investigaciones para confirmar si la población SNA⁺, pudiera corresponder a linfocitos activados, mientras que la población con alto nivel de expresión pudieran ser linfocitos de memoria efectora. Entonces se podría evaluar la posibilidad de que la lectina SNA, sirve como un marcador fenotípico que diferencia entre la subpoblación de linfocitos de Memoria efectora de los efectores.

11.-PERSPECTIVAS

- Realizar repeticiones del análisis de las glicosilaciones de las subpoblaciones de linfocitos *naïve*, memoria central y Mem_{ef}/Ef, para darle poder estadístico a los resultados obtenidos.
- Generar un panel que podría diferenciar a los linfocitos de memoria efectora de los linfocitos efectores y a su vez incubar con la lectina SNA para comprobar la presencia o ausencia del ácido siálico α 2,6 en estas subpoblaciones de interés.
- Si la lectina SNA podría utilizarse como un marcador fenotípico sería de gran relevancia, ya que hasta el momento no hay una forma de diferenciar a estas dos subpoblaciones celulares.

BIBLIOGRAFIA

1. Villani AC, Sarkizova S, Hacohen N. Systems Immunology: Learning the Rules of the Immune System. *Annu Rev Immunol*. 2018 Apr 26;36:813-842.
2. Van den Berg HA, Rand DA. Antigen presentation on MHC molecules as a diversity filter that enhances immune efficacy. *J Theor Biol*. 2003 Sep 21;224(2):249-267.
3. Borgne, Marie Le, Ena Ladi, Ivan Dzhagalov, Paul Herzmark, Ying Fang Liao, K. Arup, Ellen A. Robey, and Cell Biology. 2010. "The Impact of Negative Selection on Thymocyte Migration in the Medulla." *Nat Immunol* 10(8):823–30.
4. Gabor, Melinda J., Dale I. Godfrey, and Roland Scollay. 1997. "Recent Thymic Emigrants Are Distinct from Most Medullary Thymocytes." *European Journal of Immunology* 27(8):2010–15.
5. Klein, Ludger, Maria Hinterberger, Gerald Wirnsberger, and Bruno Kyewski. 2009. "Antigen Presentation in the Thymus for Positive Selection and Central Tolerance Induction." *Nature Reviews Immunology* 9(12):833–44.
6. Li, Juan, Yan Li, Jin-yan Yao, Rong Jin, Ming-zhao Zhu, Xiao-ping Qian, Jun Zhang, Yang-xin Fu, Li Wu, Yu Zhang, and Wei-feng Chen. 2007. "Thymocytes during Mouse Ontogeny and Its Defect in Aire $\frac{-}{-}$ / $\frac{-}{-}$ Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(46):18175–80.
7. Lundberg, Vanja, Martin Berglund, Gabriel Skogberg, Susanne Lindgren, Christina Lundqvist, Judith Gudmundsdottir, Karolina Thörn, Esbjörn Telemo, and Olov Ekwall. 2016. "Thymic Exosomes Promote the Final Maturation of Thymocytes." *Scientific Reports* 6(November):1–12.
8. McCaughy, Tom M., Matthew S. Wilken, and Kristin A. Hogquist. 2007. "Thymic Emigration Revisited." *Journal of Experimental Medicine* 204(11):2513–20.
9. Takahama, Yousuke. 2006. "Journey through the Thymus: Stromal Guides for T-Cell Development and Selection." *Nature Reviews Immunology* 6(2):127–35.
10. Xu, Xi, Shusong Zhang, Pingping Li, Jin Lu, Qun Xuan, and Qing Ge. 2013. "Maturation and Emigration of Single-Positive Thymocytes." *Clinical and Developmental Immunology* 2013.
11. Ludger Klein¹, Bruno Kyewski², Paul M. Allen³, and Kristin A. Hogquist. 2011. "Positive and Negative Selection of the T Cell Repertoire: What Thymocytes See and Don't See Ludger." *Nat Rev Immunol* 176(10):139–48.
12. Pennock, N. D., White, J. T., Cross, E. W., Cheney, E. E., Tamburini, B. A., & Kedl, R. M. (2013). T cell responses: naive to memory and everything in between. *Advances in physiology education*, 37(4), 273–283.
13. Abbas K, Lichtman A. Pillai S. Cellular and molecular immunology. New York: Elsevier Saunders; 2011. p. 560. , and. 7th ed.
14. Nishimura Y. [Structure and function of MHC: molecular mechanisms for antigen processing and antigen presentation to T cells]. Tanpakushitsu Kakusan Koso. 2000 May;45(7):1205-1218. Japanese. PMID: 10806862.
15. Hilligan, K. L., & Ronchese, F. (2020). Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. *Cellular & molecular immunology*, 17(6), 587–599.
16. Flores-Langarica, A. et al. T-zone localized monocyte-derived dendritic cells promote Th1 priming to Salmonella. *Eur. J. Immunol.* 41, 2654–2665 (2011).
17. Godfrey DI, Rossjohn J, McCluskey J. The fidelity, occasional promiscuity, and versatility of T cell receptor recognition. *Immunity*. 2008 Mar;28(3):304-314.
18. Chakraborty AK. Lighting up TCR takes advantage of serial triggering. *Nat Immunol*. 2002 Oct;3(10):895-896.
19. Nakano, H. et al. Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat. Immunol.* 10, 394–402 (2009).
20. Chow, K. V., Lew, A. M., Sutherland, R. M. & Zhan, Y. Monocyte-derived dendritic cells promote Th polarization, whereas conventional dendritic cells promote Th proliferation. *J. Immunol.* 196, 624–636 (2016).
21. Yang Y, Best JA, Knell J, Yang E, Sheridan AD, Jesionek AK, et al. The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell subsets. *Nat Immunol.* (2011) 12:1221–1229.
22. Yamane H, Paul WE. Memory CD4+ T cells: fate determination, positive feedback and plasticity. *Cell Mol Life Sci*. 2012 May;69(10):1577-1583.
23. Hailman E, Allen PM. Self help for T cells. *Nat Immunol*. 2004 Aug;5(8):780-1.

24. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:925135
25. Santana, María Angélica, and Fernando Esquivel-Guadarrama. 2006. "Cell Biology of T Cell Activation and Differentiation." *International Review of Cytology* 250(06):217–74.
26. Saito, Takashi, Tadashi Yokosuka, and Akiko Hashimoto-Tane. 2010. "Dynamic Regulation of T Cell Activation and Co-Stimulation through TCR-Microclusters." *FEBS Letters* 584(24):4865–71.
27. McCaughy, Tom M., Matthew S. Wilken, and Kristin A. Hogquist. 2007. "Thymic Emigration Revisited." *Journal of Experimental Medicine* 204(11):2513–20. doi: 10.1084/jem.20070601.
28. Mayer, Andreas, Yaojun Zhang, Alan S. Perelson, and Ned S. Wingreen. 2019. "Regulation of T Cell Expansion by Antigen Presentation Dynamics." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116(13):5914–19. doi: 10.1073/pnas.1812800116.
29. Lewis, M., Tarlton, J.F. and Cose, S. (2008), Memory versus naive T-cell migration. *Immunol Cell Biol*, 86: 226-231
30. Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 2005 Jun;17(3):326-32.
31. Jameson SC, Masopust D. Understanding Subset Diversity in T Cell Memory. *Immunity*. 2018 Feb 20;48(2):214-226.
32. Sprent J, Surh CD: T cell memory. *Annu Rev Immunol* 2002, 20:551-579.
33. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A: Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004, 22:745-763.
34. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999, 401:708-712.
35. Toscano M. Ilarregui J. Bianco G. Rubinstein N. Rabinovich G. Interacción entre proteínas y glicanos en la regulación fisiológica de las células T. *Medicina* 2006; 66:357-362
36. Priatel JJ, Chui D, Hiraoka N, et al. The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8⁺ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity* 2000; 12: 273-283.
37. Tania M Villanueva-Cabello, Lya D Gutiérrez-Valenzuela, Delia V López-Guerrero, Mario E Cruz-Muñoz, Héctor M Mora-Montes, Iván Martínez-Duncker, Polysialic acid is expressed in human naive CD4⁺ T cells and is involved in modulating activation, *Glycobiology*, 2019, 29: 557–564
38. Varki A, Kornfeld S. Historical Background and Overview. 2017. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors.
39. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017 Drickamer K, Taylor ME. 1998. Evolving views of protein glycosylation. *Trends Biochem Sci* 23: 321–324
40. Spiro RG. 2002. Protein glycosylation: Nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12: 43R–56R
41. Aebi M. 2013. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta* 1833: 2430–2437
42. Stanley P, Taniguchi N, Aebi M. N-Glycans. 2017. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. Chapter 9.
43. Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology*. 2017 Jan;27(1):3-49.
44. Springer SA, Gagneux P. Glycomics: revealing the dynamic ecology and evolution of sugar molecules. *J Proteomics*. 2016 Mar 1;135:90-100.
45. Wilton Gómez-Henao , Eda Patricia Tenorio , Francisco Raúl Chávez Sanchez , Miguel Cuéllar Mendoza , Ricardo Lascrain Ledezma & Edgar Zenteno (2020): Relevance of glycans in the interaction between T lymphocyte and the antigen presenting cell, *International Reviews of Immunology*
46. Varki A, Schnaar RL, Schauer R. Sialic Acids and Other Nonulosonic Acids. 2017. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. Chapter 15.
47. Kelm S, Schauer R. 1997. Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol* 175: 137–240.
48. Schauer R. 2009. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol* 19: 507–514
49. Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol*. 2009 Oct;19(5):507-14. doi: 10.1016/j.sbi.2009.06.003. Epub 2009 Aug 19.
50. Chen X, Varki A. 2010. Advances in the biology and chemistry of sialic acids. *ACS Chem Biol* 5: 163–176

51. Tiralongo J, Martinez-Duncker I. 2013. Sialobiology: Structure, biosynthesis and function. Bentham, Oak Park, IL
52. Bi S, Baum LG. Sialic acids in T cell development and function. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Dec;1790(12):1599-1610.
53. Hombu, R.; Neelamegham, S.; Park, S. Cellular and Molecular Engineering of Glycan Sialylation in Heterologous Systems. *Molecules* **2021**, 26, 5950.
54. De Bousser E, Meuris L, Callewaert N, Festjens N. Human T cell glycosylation and implications on immune therapy for cancer. *Hum Vaccin Immunother*. 2020 Oct 2;16(10):2374-2388.
55. Starr TK, Daniels MA, Lucido MM, Jameson SC, Hogquist KA. Thymocyte sensitivity and supramolecular activation cluster formation are developmentally regulated: a partial role for sialylation. *J Immunol*. 2003;171:4512–20.
56. Hobbs SJ, Nolz J. Regulation of T cell trafficking by enzymatic synthesis of O-glycans. *Front Immunol*. 2017;8:600. doi:10.3389/fimmu.2017.00600.
57. Aguilar AL, Gao Y, Hou X, Lauvau G, Yates JR, Wu P. Profiling of protein O-GlcNAcylation in murine CD8+ effector- and memory-like T cells. *ACS Chem Biol*. 2017;12:3031–38. doi:10.1021/acscchembio.7b00869.
58. Dennis JW, Lau KS, Demetriou M, Nabi IR. Adaptive regulation at the cell surface by N-Glycosylation. *Traffic*. 2009;10:1569–78.
59. Rossi FMV, Corbel SY, Merzaban JS, Carlow DA, Gossens K, Duenas J, So L, Yi L, Ziltener HJ. Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat Immunol*. 2005;
60. Sultana DA, Zhang SL, Todd SP, Bhandoola A. Expression of functional PSGL-1 on hematopoietic progenitors is developmentally regulated. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012;188:4385–93.
61. Moody AM, North SJ, Reinhold B, Dyken SJV, Rogers ME, Panico M, Dell A, Morris HR, Marth JD, Reinherz EL. Sialic acid capping of CD8 β core 1-O-glycans controls thymocytemajor histocompatibility complex class I interaction. *J Biol Chem*. 2003;278:7240–46.
62. Pappu BP, Shrikant PA. Alteration of cell surface sialylation regulates antigen-induced naive CD8+ T cell responses. *J Immunol*. 2004;173:275–84.
63. Cobb BA, Kasper DL. Characteristics of carbohydrate antigen binding to the presentation protein HLA-DR. *Glycobiology*. 2008;18:707–18.
64. Ryan SO, Cobb BA. Roles for major histocompatibility complex glycosylation in immune function. *Semin Immunopathol*. 2012;34:425–41
65. Smith LK, Boukhaled GM, Condotta SA, Mazouz S, Guthmiller JJ, Vijay R, Butler NS, Bruneau J, Shoukry NH, Krawczyk CM, et al. Interleukin-10 Directly Inhibits CD8+ T Cell Function by Enhancing N-Glycan Branching to Decrease Antigen Sensitivity. *Immunity*. 2018;48:299–312.e5
66. Golks A, Tran -T-T-T, Goetschy JF, Guerini D. Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation. *Embo J*. 2007;26:4368–79.
67. Horlacher T, Oberli MA, Werz DB, Kröck L, Bufali S, Mishra R, Sobek J, Simons K, Hirashima M, Niki T, et al. Determination of carbohydrate-binding preferences of human galectins with carbohydrate microarrays. *Chembiochem Eur J Chem Biol*. 2010;11:1563–73
68. Baum LG, Cobb BA. The direct and indirect effects of glycans on immune function. *Glycobiology*. 2017;27:619–24. doi:10.1093/glycob/cwx036
69. Daniels MA, Devine L, Miller JD, Moser JM, Lukacher AE, Altman JD, Kavathas P, Hogquist KA, Jameson SC. CD8 binding to MHC class I molecules is influenced by T cell maturation and glycosylation. *Immunity*
70. Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, Silvescu CI, Reinhold VN, Demetriou M, Dennis JW. Complex N-Glycan Number and Degree of Branching Cooperate to Regulate Cell Proliferation and Differentiation.
71. Baum LG, Cobb BA. The direct and indirect effects of glycans on immune function. *Glycobiology*. 2017 Jul 1;27(7):619-624.
72. Bi S, Baum LG. Sialic acids in T cell development and function. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Dec;1790(12):1599-1610
73. Graham, D. Los ratones sucios podrían ser mejores modelos. *Lab Anim* **45**, 198 (2016).
74. Beura, L., Hamilton, S., Bi, K. et al. La normalización del medio ambiente recapitula los rasgos inmunitarios humanos adultos en ratones de laboratorio. *Nature* **532**, 512–516
75. Masopust, D., Sivula, C. P., & Jameson, S. C. (2017). Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using Mice To Understand Human Immunology. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 199(2), 383–388.

76. Garcia, G. G., Berger, S. B., Sadighi Akha, A. A., & Miller, R. A. (2005). Age-associated changes in glycosylation of CD43 and CD45 on mouse CD4 T cells. *European journal of immunology*, 35(2), 622–631.
77. 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. *International immunology*, 19(7), 847–856.
78. 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(2), 641–648.
79. Wu, A. M., & Sugii, S. J. (1988). Differential binding properties of Ga1NAc and/or Ga1 specific lectins. *Advances in experimental medicine and biology*, 228, 205–263
80. Hirabayashi J. (2008). Concept, strategy and realization of lectin-based glycan profiling. *Journal of biochemistry*, 144(2), 139–147.
81. Dietrich, J., Neisig, A., Hou, X., Wegener, A. M., Gajhede, M., & Geisler, C. (1996). Role of CD3 gamma in T cell receptor assembly. *The Journal of cell biology*, 132(3), 299–310.
82. Rossi, N. E., Reiné, J., Pineda-Lezamis, M., Pulgar, M., Meza, N. W., Swamy, M., Risueno, R., Schamel, W. W., Bonay, P., Fernández-Malavé, E., & Regueiro, J. R. (2008). Differential antibody binding to the surface alpha-betaTCR.CD3 complex of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is conserved in mammals and associated with differential glycosylation. *International immunology*, 20(10), 1247–1258.
83. Kaladas PM, Kabat EA, Kimura A, Ersson B. The specificity of the combining site of the lectin from *Vicia villosa* seeds which react with cytotoxic T-lymphoblasts. *Mol Immunol*. 1981 Nov;18(11):969-977.
84. Conzelmann A, Pink R, Acuto O, Mach JP, Dolivo S, Nabholz M. Presence of T 145 on cytolytic T cell lines and their lectin-resistant mutants. *Eur J Immunol*. 1980 Nov;10(11):860-868.
85. Peters BP, Ebisu S, Goldstein IJ, Flashner M. Interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid. *Biochemistry*. 1979 Nov 27;18(24):5505-55011
86. Hayes CE, Goldstein IJ. An alpha-D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. Isolation by affinity chromatography and characterization. *J Biol Chem*. 1974 Mar 25;249(6):1904-1914.
87. Paessens, L. C., García-Vallejo, J. J., Fernandes, R. J., & van Kooyk, Y. (2007). The glycosylation of thymic microenvironments. A microscopic study using plant lectins. *Immunology letters*, 110(1),65–73.
88. Alvarez G, Lascrain R, Hernández-Cruz P, Tetaert D, Degand P, Gorocica P, Espinosa B, Zenteno E, Chávez R. Differential O-glycosylation in cortical and medullary thymocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Aug;1760(8):1235-1240
89. Jiménez-Martínez MC, Lascrain R, Méndez-Reguera A, Estrada-Parra S, Estrada-García I, Gorocica P, Martínez-Cairo S, Zenteno E, Chávez R. O-glycosylation of NnTreg lymphocytes recognized by the *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:506807.
90. Arenas-Del Ángel M, Legorreta-Herrera M, Mendoza-Hernández G, et al. *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes a moesin-like O-glycoprotein and costimulates murine CD3-activated CD4(+) T cells. *Immun Inflamm Dis*. 2015;3(3):182-195.
91. Porras F, Urrea F, Ortiz B, Martínez-Cairo S, Bouquelet S, Martínez G, Lascrain R, Zenteno E. Isolation of the receptor for the *Amaranthus leucocarpus* lectin from human T lymphocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jun 20;1724(1-2):155-162.
92. Wen DX, Svensson EC, Paulson JC. Tissue-specific alternative splicing of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene. *J Biol Chem*. 1992 Feb 5;267(4):2512-2518.
93. E.M. Comelli, M. Sutton-Smith, Q. Yan, et al., Activation of murine CD4+ and CD8+T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans, *J. Immunol*. 177 (2006) 2431–2440.
94. T. Hennet, D. Chui, J.C. Paulson, J.D. Marth, Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 4504–4509.
95. J.H. Marino, C. Tan, B. Davis, et al., Disruption of thymopoiesis in ST6Gal I deficient mice, *Glycobiology* 18 (2008) 719–726.
96. M. Fukuda, S. Tsuboi, Mucin-type O-glycans and leukosialin, *Biochim. Biophys. Acta* 1455 (1999) 205–217.
97. Hu, D., Tateno, H., & Hirabayashi, J. (2015). Lectin engineering, a molecular evolutionary approach to expanding the lectin utilities. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(5), 7637–7656.
98. Castrillon R, Izquierdo T. Macromoléculas de productos naturales e inmunomodulación. CDMX. Serie académico CBS. Universidad Autónoma Metropolitana, División ciencias Biológicas y de la Salud.
99. Martin MD and Badovinac VP (2018) Defining Memory CD8 T Cell. *Front. Immunol*. 9:2692

100. Urrea F, Ortiz-Quintero B, Sanchez-Garcia FJ, Blanco-Favela F, Garfias Y, Lascurain R, et al. The Amaranthus Leucocarpus Lectin Enhances the AntiCD3 Antibody-Mediated Activation of Human Peripheral Blood CD4+ T Cells. *Tohoku J Exp Med* (2010) 221(4):271–9.
101. Urrea F, Zenteno E, Avila-Moreno F, Sanchez-Garcia FJ, Zuniga J, Lascurain R, et al. Amaranthus Leucocarpus Lectin (ALL) Enhances Anti-CD3- Dependent Activation of Murine T Cells and Promotes Cell Survival. *Immunol Invest* (2011) 40(2):113–29.
102. Hernandez P, Tetaert D, Vergoten G, Debray H, del Carmen Jimenez M, Fernandez G, et al. Specificity of Amaranthus Leucocarpus Syn. Hypocondriacus Lectin for O-Glycopeptides. *Biochim Biophys Acta* (2004) 1674(3):282–90.
103. Ortiz B, Porras F, Jimenez-Martinez MC, Montano LF, Martinez-Cairo S, Lascurain R, et al. Differential Expression of a 70 kDa O-Glycoprotein on T Cells: A Possible Marker for Naive and Early Activated Murine T Cells. *Cell Immunol* (2002) 218(1-2):34–45.
104. Alvarez G, Lascurain R, Hernandez-Cruz P, Tetaert D, Degand P, Gorocica P, et al. Differential O-Glycosylation in Cortical and Medullary Thymocytes. *Biochim Biophys Acta* (2006) 1760(8):1235–40.
105. Arenas-Del Angel M, Legorreta-Herrera M, Mendoza-Hernandez G, Garfias Y, Chavez R, Zenteno E, et al. Amaranthus Leucocarpus Lectin Recognizes a Moesin-Like O-Glycoprotein and Costimulates Murine CD3- Activated CD4 (+) T Cells. *Immun Inflammation Dis* (2015) 3(3):182–95.
106. Gomez-Henao W, Saavedra R, Cha´ vez-Sanchez FR, Lascurain R, Zenteno E and Tenorio EP (2021) Expression Dynamics of the O-Glycosylated Proteins Recognized by Amaranthus leucocarpus Lectin in T Lymphocytes and Its Relationship With Moesin as an Alternative Mechanism of Cell Activation. *Front. Immunol.* 12:788880
107. 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. *International immunology*, 19(7), 847–856.
108. Earl, L.A. and Baum, L.G. (2008), CD45 Glycosylation controls T-cell life and death. *Immunol Cell Biol*, 86: 608-615.
109. Simon, R. H., McCoy, J. P., Jr, Chu, A. E., Dehart, P. D., & Goldstein, I. J. (1986). Binding of Griffonia simplicifolia I lectin to rat pulmonary alveolar macrophages and its use in purifying type II alveolar epithelial cells. *Biochimica et biophysica acta*, 885(1), 34–42.
110. Stillmark, H.: Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einige anderen Euphorbiaceen. Tesis de doctorado, Universidad de Dorpat, Dorpat, Estonia (1888)
111. Dixson T. *Ricinus communis*. *agosto Medicina. Gazz.* 1887; 6 :137–138. [[Google académico](#)]
112. Hartmut F. *Advances in lectin research*. Vol 1, Berlín: Springer-Verlag, 1988
113. Sharon N, Lis H. Lectins cell agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* 1972;177:949-58
114. Landsteiner, K., Raubitschek, H.: Beobachtungen über Hämolyse und Hämagglutination. *Zentralbl. Bacteriol. Parasitenk. Infecionesskr. Hig. aprox.* 1: Original **45**, 660–667 (1907)
115. Tsaneva, M. y Van Damme, E. (2020). 130 años de investigación sobre lectinas vegetales. *Glycoconjugate journal*, 37 (5), 533–551. <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09942-y>
116. Yamamoto, K., Konami, Y., & Irimura, T. (1997). Sialic acid-binding motif of Maackia amurensis lectins. *Journal of biochemistry*, 121(4), 756–761. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021650>
117. Vierbuchen, M. J., Fruechtnicht, W., Brackrock, S., Krause, K. T., & Zienkiewicz, T. J. (1995). Quantitative lectin-histochemical and immunohistochemical studies on the occurrence of alpha(2,3)- and alpha(2,6)-linked sialic acid residues in colorectal carcinomas. Relation to clinicopathologic features. *Cancer*, 76(5), 727–735. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19950901\)76:5<727::aid-cnrcr2820760504>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19950901)76:5<727::aid-cnrcr2820760504>3.0.co;2-r)
118. Lectins and glycobiology, Vector laboratories
119. <https://vectorlabs.com/products/glycobiology/biotinylated-peanut-agglutinin-pna>
120. 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. *International immunology*, 19(7), 847–856
121. Beňová, K., Hancková, M., Koči, K., Kúdelová, M., & Betáková, T. (2020). T cells and their function in the immune response to viruses. *Acta virologica*, 64(2), 131–143.
122. Reisner Y, Linker-Israeli M, Sharon N. Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cell Immunol* 1976; 25: 129-34.
123. Gillespie W, Paulson JC, Kelm S, Pang M, Baum LG. Regulation of alpha 2,3-sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin (PNA)+ to PNA- phenotype in developing thymocytes. *J Biol Chem* 1993; 268: 3801-4

124. Baum LG, Pang M, Perillo NL, et al. Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J Exp Med* 1995; 181: 877-87
125. Petruska, J. C., Streit, W. J., & Johnson, R. D. (1997). Localization of unmyelinated axons in rat skin and mucocutaneous tissue utilizing the isolectin GS-I-B4. *Somatosensory & motor research*, 14(1), 17–26
126. Eckhardt, A. E., & Goldstein, I. J. (1983). Occurrence of alpha-D-galactosyl-containing glycoproteins on Ehrlich tumor cell membranes. *Biochemistry*, 22(23), 5280–5289.