

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO



00551
34

297358

DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

MARCADORES OLIGOSACARÍDICOS
DE LINFOCITOS T HUMANOS
ASOCIADOS A LA FUNCIÓN CELULAR

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A
BIÓL. JAVIER VARGAS SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F., SEPTIEMBRE DEL 2001



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 de investigación se realizó en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, con la dirección del Dr. Raúl Chávez Sánchez y del Dr. Ricardo Lascurain Ledesma. El financiamiento para su realización, fue de CONACYT (34814M) y de DGAPA PAPIT UNAM (IN224598).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me ha permitido crecer.

Al Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo por la dirección de esta tesis y por el apoyo económico recibido.

A la Dra. Irma Bernal, a la Dra. Victoria Chagoya, a la Dra. Iris Estrada, al Dr. Pascal Herion, al Dr. Ignacio Camacho y al Dr. José Pedraza Chaverri, por la revisión de esta tesis y por sus útiles comentarios.

Al Dr. Jesús Manuel León Cázares, a la Lic. María Teresa Elizabeth Flores Rodríguez, al Dr. José Pedraza Chaverri y al Dr. Raúl Barrera; también, por la revisión de esta tesis y por sus útiles comentarios.

Al Dr. Raúl Eguía Liz Cedillo y al Dr. Jorge Menéndez por el apoyo brindado en la obtención de las muestras sanguíneas de cordón umbilical en la Clínica 4 del IMSS; así mismo, al personal del quirófano por las facilidades prestadas en la toma de las muestras.

A la Dra. Amelia Farrés y a Lety García por el apoyo y la confianza que me brindaron.

A Claudia Berenice Hernández, Flor Porras, Concepción Agundis, Blanca Espinosa, Blanca Ortiz, Gisela, Rosa Nieto, Candelaria, Patricia Gorocica, Maricarmen Jiménez, Jesús Hernández, Yonathan Garfías, Enrique Rojas, Pedro Hernández, Roberto Zenteno y Ali Pereira por su compañerismo y apoyo en el trabajo de laboratorio.

A Laura Mendicuti, Martha Quezada, Eloisa García, Patricia Ramos, Carolina Salvador, Ivón Sánchez, Allete Ortega, Lilian Valencia, Gabriela Montero, Alejandra López, Lupita Hiriart, Lourdes, Audelia, Lorena, Norma Millán, Coni, Yunuen, Ricardo Iglesias, José Seberino, Ricardo Pantoja, Julio, Roberto Maldonado, César, Rogelio López, Odilón, Miguel, Hugo Bernal, Roberto Morán, Jesús Manuel León y Elizabeth Flores por su amistad.

A Lupita Sánchez Arredondo y Raúl Vargas Mejía por el apoyo y la confianza que siempre me han tenido.

A María Elena Vargas, Jacqueline Vargas, Raúl Vargas y Gustavo Vargas por su apoyo y hermandad.

A Cristina Alcántara, Griselda Montes de Oca, Itzel Lluvia Vargas, Aline Soledad Vargas, Gustavo Sebastián Vargas, Raúl Enrique Vargas y Luis Daniel Vargas por su amistad y su presencia.

A María de Jesús César Hernández por ser quien es.

*Este trabajo de investigación se lo dedico con
todo mi cariño y respeto a Mamá y Papá:*

Lupita Sánchez Arredondo

y

Raúl Vargas Mejía

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas.....	7
Resumen.....	8
Introducción.....	9
Los oligosacáridos.....	9
El proceso de glicosilación.....	10
Las lectinas.....	12
La actividad mitogénica de las lectinas.....	13
Las lectinas son una herramienta para el estudio de los oligosacáridos..	14
Justificación.....	16
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	18
Materiales y Métodos.....	19
Reactivos y anticuerpos.....	19
Muestras biológicas.....	20
Células mononucleadas.....	20
Purificación de la lectina ALL.....	22
Determinación de la actividad específica de la lectina ALL.....	22
Conjugación de la lectina ALL a biotina.....	23
Conjugación de la lectina ALL a FITC.....	23
Purificación del receptor de la lectina ALL.....	23
Caracterización química del receptor para la lectina ALL.....	24
Titulación de los anticuerpos.....	24
Determinación de isotipos.....	27
Aislamiento de los linfocitos T.....	27
Especificidad de la unión de la lectina ALL.....	29
Inmunofluorescencia indirecta.....	29
Inmunofluorescencia directa.....	31
Titulación de la Con-A.....	31
Cultivos celulares y activación de los linfocitos T.....	32
Análisis estadístico.....	33
Resultados.....	34
Purificación del receptor de la lectina ALL en humano.....	34
Peso molecular del ALL-R.....	34
Composición de aminoácidos del ALL-R.....	34
Secuenciación de aminoácidos del ALL-R.....	38
Fenotipo de CMN de adulto y de cordón umbilical.....	38
Especificidad de la unión de la lectina ALL.....	38
Fenotipo de linfocitos T de adulto y de cordón umbilical.....	38
Fenotipo de linfocitos T ALL ⁺	41

Expresión de ALL-R durante la activación y en las fases del ciclo celular	41
Discusión.....	47
Conclusiones.....	55
Perspectivas.....	56
Glosario.....	57
Apéndice A: citometría de flujo.....	59
Apéndice B: respuesta inmune.....	63
Referencias.....	65

ABREVIATURAS

ALL	Lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i>
ALL+	Células reconocidas por ALL
ALL-B	ALL-biotina
ALL-R	Receptor de la lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i>
Anti-CD	Anticuerpo monoclonal anti-CD
APC	Célula presentadora de antígeno
CD	Molécula (Cluster) de diferenciación
CMN	Células mononucleadas
Con-A	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i> (Concanavalina A)
SBF	Suero bovino fetal
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Gal	D-Galactosa
GalNAc	N-acetil-D-galactosamina
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
Glc	D-Glucosa
IP	Ioduro de propidio
L-Fuc	L-Fucosa
Man	Manosa
MAA	Lectina de <i>Maackia amurensis</i>
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
Neu5Ac	Ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico)
ASF	Amortiguador salino fosfato
PE	Ficoeritrina
PHA	Fitoheماغlutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PNA	Lectina de <i>Arachis hypogaea</i>
PWM	Mitógeno de <i>Phytolaca americana</i> (Pokeweed mitogen)
SBA	Lectina de <i>Glycine max</i>
TCR	Receptor de linfocitos T

RESUMEN

Las estructuras O-glicosídicas se han asociado con estadios de inmadurez en linfocitos, con transformación tumoral en células no linfoides y con la activación linfocitaria. En estas estructuras, el antígeno T (Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr) es reconocido específicamente por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL), la cual permite identificar poblaciones linfocitarias en los últimos estadios de madurez con fenotipo de células vírgenes. Para acercarnos al conocimiento de la función de la estructura oligocarídica y de la molécula, reconocidas por la lectina ALL, en este trabajo: a) se caracterizó fisicoquímicamente al receptor de la lectina ALL (ALL-R); b) se caracterizó el fenotipo de los linfocitos T, reconocidos por la lectina ALL y se hizo un estudio comparativo entre las células del adulto y las del cordón umbilical; y c) se estudió la unión de la lectina ALL a linfocitos activados. La caracterización fisicoquímica del ALL-R mostró que ésta es una glicoproteína de 70 kDa, con 24% de aminoácidos hidrofóbicos y 76% de hidrofílicos. Los aminoácidos más abundantes fueron la Ser y la Gly, y los menos abundantes, la Met y la Arg. En la caracterización fenotípica, en el adulto, 8% de los linfocitos T se unieron a la lectina ALL, de estos, 61% presentaron la molécula de superficie CD4; 68%, la CD45RO, y 83%, el TCR $\alpha\beta$. En cordón umbilical, 9% de los linfocitos T se unieron a la lectina ALL, de estos, 65% presentaron la molécula de superficie CD4; 90%, la CD45RA y 84%, el TCR $\alpha\beta$. En estos ensayos, se demostró la especificidad de la unión entre ALL-R y la lectina ALL, inhibiéndola con N-acetil-galactosamina (GalNAc). En cultivo, después 36 horas de activación, la unión de la lectina a los linfocitos T se incrementó a 40%; así mismo, en las mismas condiciones, los linfocitos T que estuvieron en la fase S del ciclo celular, fueron 32%. Lo anterior sugiere, que los linfocitos T en fase S son reconocidos por la lectina ALL, y que el proceso de glicosilación identificado por la lectina ALL, se presenta en células vírgenes, en reposo o en los estadios tempranos de activación celular.

INTRODUCCIÓN

Los oligosacáridos

Los oligosacáridos son cadenas lineales o ramificadas de carbohidratos de hasta 20 monómeros, unidos por enlaces glicosídicos. En los oligosacáridos, los carbohidratos están en forma de anillo (furanano o pirano), lo que determina un centro quiral (carbón anomérico). Las uniones entre monosacáridos son catalizadas por glicosiltransferasas que unen un monómero al hidroxilo de otro monómero, por medio del grupo hidroxilo del carbón anomérico, el cual puede estar en posición α o β (Voet y Voet, 1990). Las posibles combinaciones entre dos o más monosacáridos, son mayores que las posibles combinaciones entre dos o más aminoácidos o dos o más nucleótidos, así se origina una gran variedad de estructuras sacarídicas que pueden participar en las interacciones celulares (Varki *et al.*, 1999).

Durante mucho tiempo se pensó que los carbohidratos tenían únicamente un papel estructural o de almacén de energía, pero ahora, se reconoce su importancia en diversos procesos celulares: al encontrarse unidos a lípidos o proteínas en la superficie celular, participan como receptores de hormonas, toxinas, virus y microorganismos (Varki, 1997); regulan el reconocimiento de proteínas virales por el sistema inmune del hospedero, ya que enmascaran o alteran la naturaleza de los sitios antigénicos de las glicoproteínas de la envoltura viral, así desempeñan un papel importante en el mecanismo de evasión; estabilizan la conformación tridimensional de las glicoproteínas y protegen al polipéptido contra el ataque proteolítico; así mismo, por el mismo sistema de protección, los carbohidratos, también llamados glicanos u oligosacáridos, son responsables de la antigenicidad y reactividad débil de los anticuerpos contra glicoproteínas; determinan el tiempo de circulación de glicoproteínas y células; participan en el control de la permeabilidad de la membrana y consecuentemente intervienen en la regulación del metabolismo y de la división celular (Montreuil, 1995); participan en el reconocimiento intercelular o en la inhibición por contacto celular. Se ha demostrado que las estructuras sacarídicas de los glicolípidos o glicoproteínas de las células cancerosas, están modificadas y pueden actuar como señales de no

reconocimiento, lo que puede explicar la ausencia de inhibición por contacto, la evasión de la respuesta inmune y la metástasis. Las estructuras glicosídicas modificadas en los tumores, pueden ser señales de reconocimiento por células endoteliales y esto puede explicar el origen de tumores secundarios (Montreuil, 1995; Varki *et al.*, 1999).

Los oligosacáridos también son importantes en la respuesta inmune; por ejemplo, las inmunoglobulinas necesitan ser glicosiladas para que las células plasmáticas las secreten (Muraoka y Shulman, 1989) y el correceptor CD4 requiere estar glicosilado para que sea expresado en la superficie de los linfocitos T cooperadores (Tiff *et al.*, 1992). Los macrófagos, por medio de sus receptores con actividad de lectina, reconocen manosa (Man), L-fucosa (L-Fuc) o N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) en la superficie de microorganismos o células sanguíneas envejecidas (Taylor *et al.*, 1990). Por medio de este reconocimiento, los macrófagos pueden fagocitar inmunógenos, digerirlos y presentar las correspondientes fracciones peptídicas, asociadas a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), de manera que puedan ser reconocidas por los linfocitos T cooperadores (Th) específicos, promoviendo la respuesta inmune adaptativa (Goodman, 1996).

El proceso de glicosilación

La glicosilación de proteínas puede ser de enlace tipo N u O. Los N-glicanos se unen durante el proceso de traducción de las proteínas; son agregados a la cadena polipeptídica por medio de un enlace β -N-glicosídico al grupo amino, de una Asn en la secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr (Voet y Voet, 1990), donde X es cualquier aminoácido excepto Pro (**figura 1A**). La biosíntesis del N-glicano ocurre inicialmente por una transferencia secuencial de carbohidratos nucleotídicos al dolicol fosfato, que actúa como lípido acarreador (**figura 1B**). El oligosacárido unido al dolicol fosfato, es transferido en bloque, a la cadena polipeptídica nascente. Posteriormente, al oligosacárido se le agregan o eliminan monómeros, por medio de reacciones enzimáticas. Finalmente el procesamiento puede continuar con la adición de azúcares en el Aparato de Golgi (Voet y Voet, 1990). Todos los N-glicanos cuentan con un centro

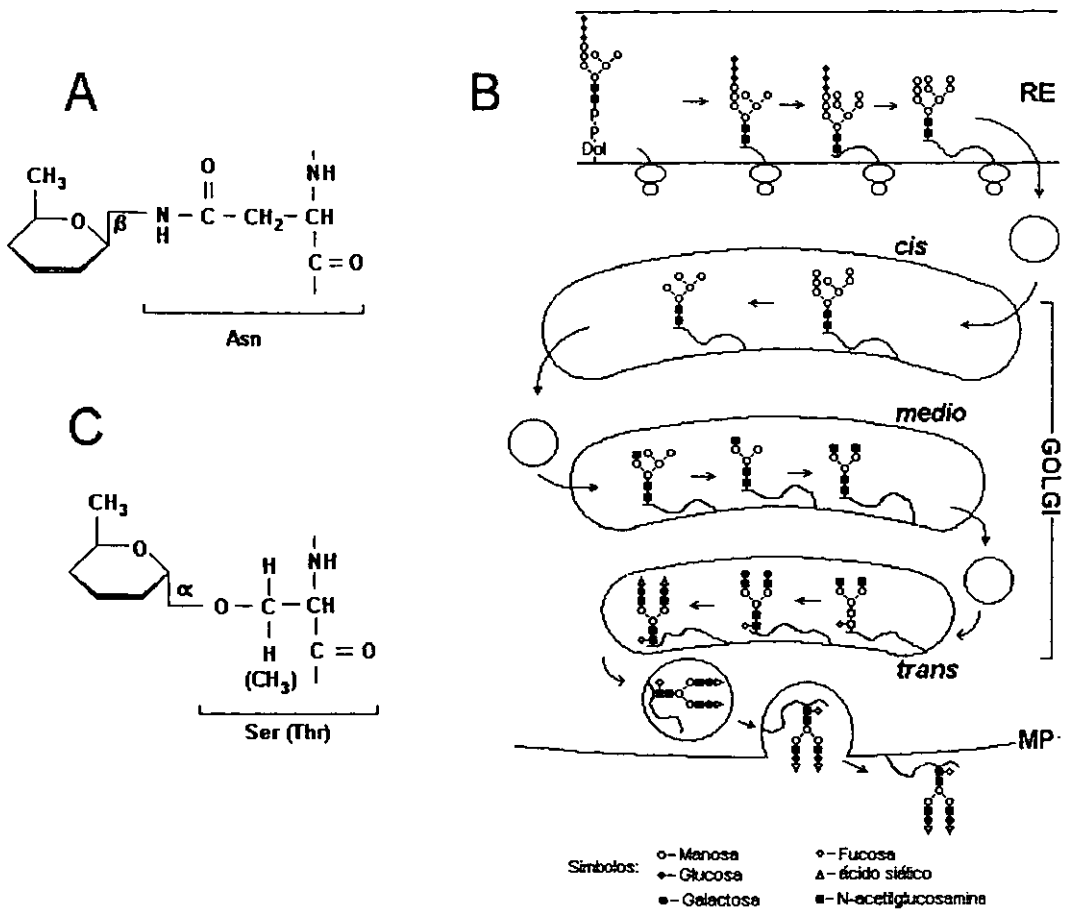


Figura 1- La glicosilación de proteínas. A) Los N-glicanos se unen a una Asn de la cadena polipeptídica, por medio de un enlace β -N-glicosídico. B) La N-glicosilación se inicia en el retículo endoplásmico y continúa en las regiones del Aparato de Golgi. RE, retículo endoplásmico; Dol-PP, acarreador dolicol bifosfato; MP, membrana plásmica. C) Los O-glicanos se unen a una Ser o Thr del polipéptido, por medio de un enlace α -O-glicosídico. Este proceso es postraduccional y se realiza en las regiones de Aparato de Golgi.

común compuesto de dos residuos de GlcNAc y tres residuos de Man (Montreuil, 1995).

Los O-glicanos se unen a una Ser o Thr de las cadenas polipeptídicas por un enlace α -O-glicosídico (Voet y Voet, 1990; **figura 1C**). Los O-glicanos se caracterizan porque contienen un centro común formado por GalNAc α 1-O-Ser/Thr (Montreuil, 1995). La O-glicosilación de las proteínas es un proceso postraducciona que se realiza en los diferentes niveles del Aparato de Golgi: en el nivel Cis, una glicosiltransferasa cataliza el enlace glicosídico que une la molécula de GalNAc al hidroxilo (OH) de la Ser o Thr; otros residuos como D-galactosa (Gal) o ácido siálico (Neu5Ac) se agregan en los niveles Medio o Trans respectivamente (Montreuil, 1995). El interés en las estructuras O-glicosídicas que contienen Gal/GalNAc, surge porque tales estructuras han sido asociadas frecuentemente, con estadios de inmadurez celular en linfocitos o de transformación tumoral en células no linfoides. Así mismo, se ha reportado que en linfocitos maduros, las estructuras O-glicosídicas más complejas experimentan cambios durante la activación celular (Piller *et al.*, 1988).

Las lectinas

Las lectinas son un grupo heterogéneo de proteínas oligoméricas que varían extensamente en tamaño, estructura y organización molecular; están presentes en virus, bacterias, plantas, hongos, y animales (Lis y Sharon, 1998). Las lectinas vegetales tienen una función que aún no se ha identificado claramente; sin embargo, en diversos organismos animales, tienen funciones biológicas importantes como lo son: la señalización intercelular, la remoción de glicoproteínas del sistema circulatorio, el control del tráfico de glicoproteínas, la adhesión de agentes infecciosos y el reclutamiento de leucocitos a sitios de inflamación (Lis y Sharon, 1998); además, estas proteínas muestran *in vitro*, la capacidad de aglutinar eritrocitos y células linfoides, la de inducir la síntesis y liberación de citocinas y la de activar linfocitos T (Licastro *et al.*, 1993).

La aglutinación de eritrocitos es el principal atributo de las lectinas y es usada comúnmente para su detección y caracterización. Cada lectina contiene típicamente

dos o más sitios de unión a carbohidratos, así, al interactuar con células, por ejemplo eritrocitos, pueden causar su hemaglutinación y precipitación. Estas reacciones, de aglutinación y precipitación, son inhibidas por el carbohidrato al cual se une específicamente la lectina (Lis y Sharon, 1998).

Las lectinas reconocen específicamente secuencias de oligosacáridos y se unen a ellas, por enlaces no covalentes, como lo son: puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y enlaces de coordinación, entre otros. Los puentes de hidrógeno se forman entre los grupos hidroxilo del carbohidrato y los grupos NH, hidroxilo y átomos de oxígeno de la proteína. También se pueden formar enlaces cooperativos, en los que el grupo hidroxilo actúa simultáneamente como donador y como aceptor. Las fuerzas de van der Waals aunque son débiles, son numerosas frecuentemente; juntas, hacen una contribución significativa a la unión. Aunque los carbohidratos son moléculas altamente polares, la disposición estérica de los grupos hidroxilo, crea zonas hidrofóbicas sobre la superficie del azúcar que puede formar contactos con regiones hidrofóbicas de la proteína, que puede llevar al apilamiento de un monosacárido sobre las cadenas laterales de aminoácidos aromáticos, tales como la Phe, la Tyr o el Trp. El agua puede participar como relleno molecular por su tamaño pequeño y por su habilidad de funcionar como aceptor y donador de hidrógeno. Las interacciones iónicas comúnmente no participan en la formación de las uniones, porque la mayoría de los carbohidratos no tienen carga (Lis y Sharon, 1998).

La actividad mitogénica de las lectinas

Los linfocitos pueden ser estimulados *in vitro* para proliferar cuando son activados por ciertas lectinas; por ejemplo, la PHA (fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*), la PWM (mitógeno de *Phytolaca americana*) y la Con-A (Nowell, 1960; Lis y Sharon, 1998). El mecanismo de activación del linfocito T, se desencadena cuando un antígeno extraño ingresa al cuerpo; entonces, las células presentadoras de antígeno lo capturan, lo procesan y presentan algunos de sus péptidos en su superficie, en unión con el MHC (Bjorkman *et al.*, 1987). Posteriormente, los linfocitos T, por medio de su receptor de antígeno (TCR), interactúan con los péptidos expuestos, y de esta

interacción molecular se genera la activación de una clona de linfocitos T específicos para ese antígeno (**figura 2A**). En las vías de señalización para la activación del linfocito T, algunas lectinas mitogénicas como la PHA, interactúan con el heterodímero $\alpha\beta$ del TCR (**figura 2B**), mientras que otras lectinas como la Con-A (**figura 2C**), se unen con alta afinidad tanto al heterodímero $\alpha\beta$ como a la cadena γ del CD3 en el TCR (Chilson *et al.*, 1984; Chilson y Kelly-Chilson, 1989). En las vías de señalización, la molécula de superficie CD3 es muy importante; ésta, es una estructura compleja que forma parte del TCR y es la que transmite la señal que induce la mitosis de los linfocitos T (Clevers *et al.*, 1988; Kanellopoulos *et al.*, 1985). Las lectinas mitogénicas, se unen a todos los linfocitos que presenten en su superficie carbohidratos determinados; así, pueden activar diversas clonas de linfocitos T. Por esta razón, son conocidas como mitógenos policlonales.

Las lectinas son una herramienta para el estudio de los oligosacáridos

Las lectinas, por su especificidad por los carbohidratos, se han empleado para: aislar y purificar glicoproteínas, glicopéptidos y oligosacáridos; conjugadas a moléculas fluorescentes, se han utilizado para investigar rutas metabólicas de glicosilación de proteínas, para detectar glicoconjugados en tejidos; también se han utilizado para inducir aglutinación y como mitógenos (Roth, 1987; Lis y Sharon 1998; así mismo, con el uso de lectinas, se han caracterizado químicamente: factores de crecimiento, neurotransmisores y toxinas. Clínicamente son de interés, por la capacidad de algunas de ellas para reconocer específicamente subpoblaciones de linfocitos; por ejemplo, la lectina de *Glycine max* (SBA) se ha utilizado en transplantes de médula ósea, para eliminar los linfocitos T y así evitar una reacción autoinmune (Lis y Sharon, 1998).

Con el uso de algunas lectinas, se ha observado que las estructuras sacarídicas de la superficie celular, cambian durante la activación o el desarrollo celular. Por ejemplo, los timocitos de corteza tímica expresan inicialmente el antígeno Tn (GalNAc α 1-O-Ser/Thr). Posteriormente, se incorpora una Gal y se forma el disacárido Gal β 1,3GalNAc α 1-O-Ser/Thr (antígeno T o antígeno de Thomsen-Friedenreich) que

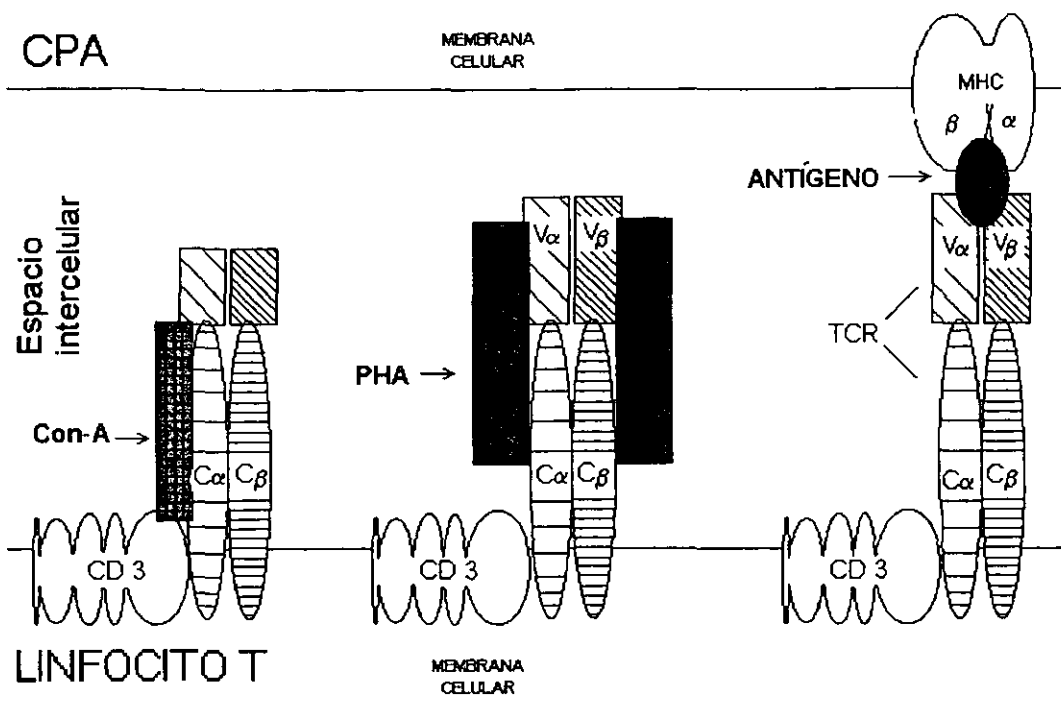


Figura 2- Mecanismos de activación de los linfocitos T. A) Vía el complejo antígeno-MHC. B) Vía la interacción con la PHA. La PHA se une al TCR por medio de las cadenas α y β . C) Vía la Con-A. La Con-A se une al TCR y además al complejo CD3. TCR, receptor de célula T; C α o C β , dominios constantes α o β ; V α o V β , dominios variables α o β ; MHC, complejo principal de histocompatibilidad; PHA, fitohemaglutinina. Modificado de Licastro *et al.*, 1993.

puede identificarse también en timocitos corticales. Después, la estructura se expresa con Neu5Ac en enlace $\alpha 2,6$ en la GalNAc y/o en enlace $\alpha 2,3$ en la Gal y se forma el antígeno sialil-T y disialil-T respectivamente (**figura 3**). En el modelo murino, estas modificaciones sacarídicas pueden ser detectadas con la lectina del cacahuate, *Arachis hypogaea* (PNA), que reconoce timocitos de la corteza tímica, porque se une a la Gal terminal del antígeno sialil-T (Reisner *et al.*, 1976a; De Maio *et al.*, 1986); o con la lectina ALL, que reconoce timocitos más diferenciados en la médula tímica, porque se une a GalNAc en el antígeno disialil-T (Lascurain *et al.*, 1994). El tipo de enlace que presenta Neu5Ac también está relacionado con los procesos de maduración, los enlaces $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$ se presentan de manera diferente sobre el timo. El enlace $\alpha 2,6$ es reconocido principalmente en la corteza tímica, por la lectina de *Maackia amurensis* (MAA), mientras que el enlace $\alpha 2,3$ es reconocido en la médula por la lectina de *Sambucus nigra* (SNA) (Kaku *et al.*, 1993; Mrkoci *et al.*, 1996; Alvarez *et al.*, 1999). De igual forma en el bazo murino, los linfocitos T se pueden distinguir de los linfocitos B, por las diferencias en sus oligosacáridos que son detectadas por medio de la lectina SBA (Reisner *et al.*, 1976b). Por estas razones, las lectinas son una herramienta de gran utilidad, en el estudio del papel de los oligosacáridos en los procesos celulares.

Justificación

Hasta el momento, no se ha logrado identificar qué factores participan en el proceso de regulación, de la expresión de estructuras O-glicosiladas en los linfocitos activados tras un estímulo antigénico. Sin embargo, se han identificado estructuras O-glicosídicas que están relacionadas con procesos de interacción entre receptores celulares, tal como ocurre con los marcadores fenotípicos CD43 y CD22. La alteración en las estructuras O-glicosiladas, como producto del proceso de estimulación, tal vez favorece la regulación de la actividad de los linfocitos T o B.

En trabajos previos, en modelo murino, se identificó una subpoblación de timocitos que presenta una estructura sacarídica, posiblemente relacionada con procesos de maduración, ésta es reconocida por la lectina ALL. La estructura reconocida se encuentra en una O-glicoproteína de 70 kDa. Esta lectina es específica para GalNAc en el antígeno Tn (GalNAc $\alpha 1$ -O-Ser/Thr) o en el antígeno T (Gal $\beta 1,3$ GalNAc- $\alpha 1$ -O-Ser/Thr) (Zenteno *et al.*,

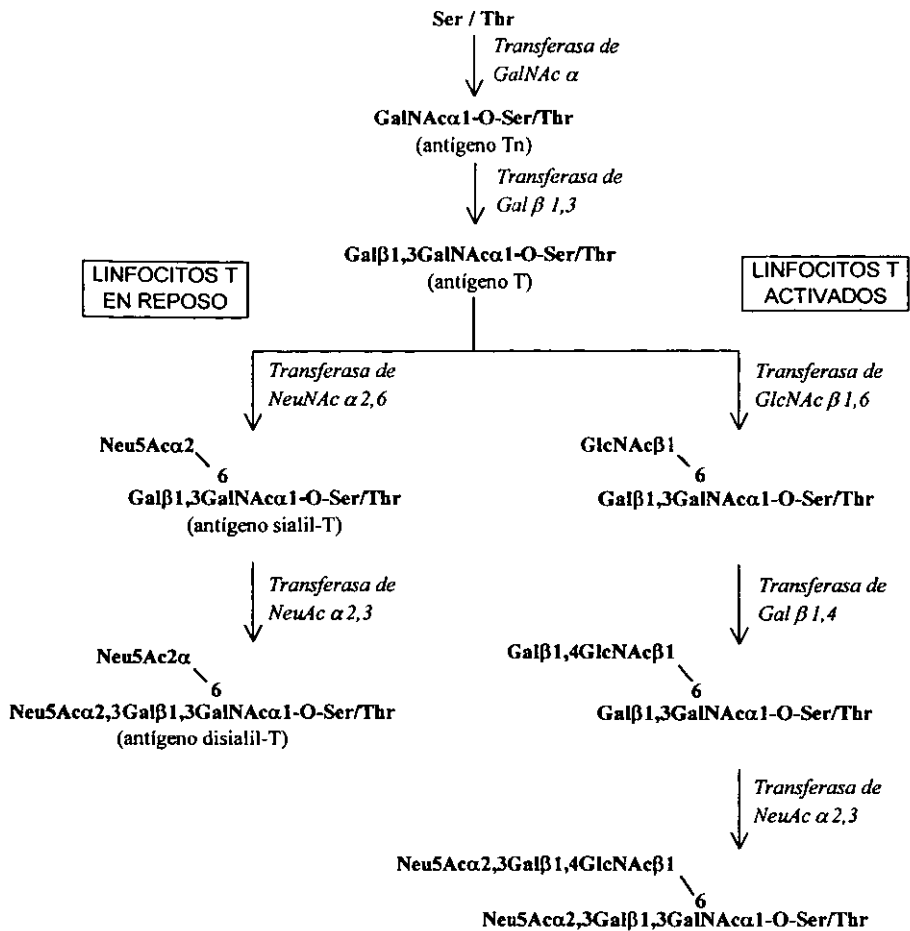


Figura 3- Cambios en la glicosilación en los linfocitos T activados. En estado de reposo los linfocitos T expresan el antígeno disialil T; cuando se activan, se desencadenan un cascada de señales que determina que la transferasa de GluNAc β1,6 añada un residuo en el antígeno T. Luego sobre este monosacárido, la transferasa de galactosa β1,4 añade un residuo, y finalmente la sialiltransferasa α2,3 añade un par de ácidos siálicos sobre las galactosas terminales. Tomado de Piller et al., 1988.

1992). En células mononucleadas (CMN) no adherentes de sangre venosa humana, la subpoblación celular reconocida por la lectina, corresponde a células que poseen el fenotipo CD4/CD45RA (linfocitos cooperadores, maduros y sin activar) (Lascurain *et al.*, 1997).

Con el propósito de acercarnos al conocimiento de la función del receptor reconocido por la lectina ALL (ALL-R) en humanos, en este trabajo se inició la caracterización fisicoquímica del ALL-R en células humanas; se determinó la expresión del ALL-R en la superficie de linfocitos T en reposo y activados; y se hizo una caracterización fenotípica de los linfocitos T reconocidos por la lectina ALL, así como un estudio comparativo entre los linfocitos T de humanos adultos y los de cordón umbilical que al momento del estudio no han tenido contacto alguno con antígenos exógenos.

Hipótesis

Si las estructuras sacarídicas en glicoproteínas de la superficie celular, son importantes en los procesos inmunológicos y se encuentran asociadas a la función y a la identidad celular; entonces, es posible que el ALL-R en la superficie de los linfocitos T, esté asociado a la función de estos linfocitos en la respuesta inmune.

Objetivos

Purificar y caracterizar fisicoquímicamente al ALL-R en linfocitos T humanos; caracterizar el fenotipo de los linfocitos T reconocidos por la lectina ALL en adulto y en cordón umbilical; establecer la asociación entre ALL-R y la activación de linfocitos T.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y anticuerpos

Se usaron anticuerpos monoclonales conjugados a los fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE). Los anticuerpos de ratón contra humano, que reconocen moléculas en la superficie celular: anti-CD3-PE, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE, anti-CD45RA-FITC, anti-CD45RO-PE, anti-TCR $\alpha\beta$ -FITC, anti-TCR $\gamma\delta$ -PE, anti-Ki-67-FITC, anti-TCR $\alpha\beta$, anti-TCR $\gamma\delta$; los anticuerpos para testigo de isotipo de la inmunoglobulina de ratón IgG1, IgG2a e IgM, y la estreptavidina-Cunida al compuesto fluorescente Cychrome, fueron obtenidos de PharMingen (San Diego CA, USA). Los anticuerpos de conejo contra IgG de ratón conjugado a PE; los anticuerpos de rata contra ratón anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgM; y los anticuerpos de ratón contra humano: anti-CD4, anti-CD14, anti-CD45RA y anti-CD45RO fueron de Serotec (Raleigh, NC, USA). La sulfo-NHS-biotina y el FITC fueron de Pierce (Rockford IL, USA), el Lymphoprep fue de Nicomed Pharma As. (Oslo, Noruega). Los siguientes reactivos fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA): azul tripano, tritón 100-X, aprotinina, pepstatina A, leupeptina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), azida de sodio, β -mercaptoetanol, GalNAc, *p*-formaldehído, agarosa-avidina, ácido etilendiaminotetracético (EDTA), urea, ácido 2-etilensulfónico 2-hidroxietilpiperazina (HEPES), tetrametiletildiamina (TEMED), nitrato de plata, Con-A, medio de cultivo RPMI-1640, dodecil sulfato de sodio (SDS), marcadores de peso molecular alto, trizma base, fluoresceína, saponina y la enzima ARNsa. El paquete de separación de linfocitos T (Pan T cell isolation kit), con los anticuerpos unidos a un hapteno anti-CD11b, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36 y anti-cd56 y las microperlas magnéticas unidas a un anticuerpo anti-hapteno, fueron de Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania). La acrilamida, bisacrilamida y persulfato de sodio fueron de Bio-Rad (Hercules CA, USA). El suero bovino fetal (SBF) y la albúmina sérica bobina (BSA) fracción V fueron de Gibco BRL (Rockville, MD, USA). La glicina, NaHCO₃, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NH₄Cl y borato de sodio fueron de Baker (Xalostoc, México). El KH₂PO₄ fue de Merck México, S.A. (Estado de México, México). El paquete de proliferación celular

"Cell proliferation kit 1" fue de Productos Roche S.A. (D.F, México). La solución amortiguadora FACS flow de Becton Dickinson (San José CA, USA).

Muestras biológicas

Se obtuvieron de 5 a 10 mL de sangre de donadores adultos sanos recolectada en tubos heparinizados de vidrio estériles Vacutainer (Becton Dickinson. NJ, USA). Para los estudios comparativos, se obtuvieron 30 muestras de 5 a 20 mL de sangre de cordón umbilical de recién nacidos humanos, producto de embarazo normal a término, por parto natural o, mediante operación cesárea debido a desproporción céfalo pélvica, sin sufrimiento fetal agudo y atendidos en el Hospital de Gineco Obstetricia "LUIS CASTELAZO AYALA" del Instituto Mexicano del Seguro Social. El procedimiento se realizó en condiciones asépticas y la sangre se recolectó en tubos de vidrio con heparina como anticoagulante. Para cada muestra se registró el nombre de la madre, edad, número de hijos, estado nutricional, historia clínica resumida, número de registro y peso del niño. Los criterios de inclusión fueron: mujeres y productos sanos, embarazo a término de 38 a 40 semanas. Los criterios de no inclusión fueron enfermedades que puedan comprometer el estado inmune del producto; para la madre: infección vaginal, enfermedades sistémicas, infecciones intrauterinas, diabetes, pre-eclampsia o eclampsia, enfermedades endocrinológicas; para el producto: sufrimiento fetal (agudo o crónico), enfermedades genéticas, malformaciones, pesos extremos (bajo peso o macrosómicos), infección neonatal; así como, muestra insuficiente y toma de muestra inadecuada.

Los métodos usados se muestran en la **figura 4**.

Células mononucleadas

La sangre heparinizada se diluyó 1:2 con ASF (amortiguador salino fosfato) y se colocó cuidadosamente sobre Lymphoprep (con densidad 1.077) en una relación de 3:1, en un tubo cónico de 50 mL de capacidad, el cual se centrifugó durante 30 minutos a 500g a 16°C. Después de la centrifugación, las células CMN se recuperaron de la interfase y se resuspendieron en 5 mL de solución amortiguadora salina fosfatos (ASF, fosfato de sodio 0.01 M; fosfato de potasio 0.001 M; NaCl 0.14 M y KCl 0.003 M, pH

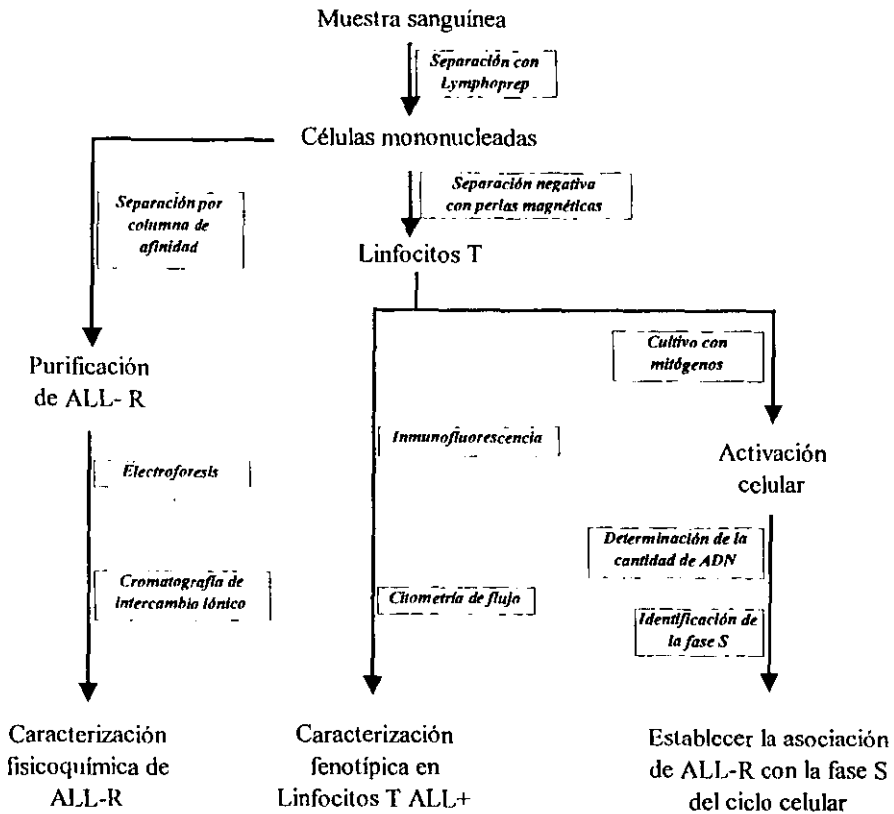


Figura 4- Métodos. Las células mononucleadas se separaron por medio de Lymphoprep (densidad 1.077). Para la purificación y caracterización fisicoquímica de ALL-R, se utilizó una cromatografía de afinidad y de intercambio iónico. Los linfocitos T se aislaron por selección magnética negativa. La caracterización fenotípica se hizo con inmunofluorescencia y se analizó por citometría de flujo. Para establecer la asociación de ALL-R con la activación y con las fases del ciclo celular, se hicieron cultivos con células activadas, inmunofluorescencia y se analizó por citometría de flujo.

7.2). Se realizaron 3 lavados con ASF centrifugando la muestra a 400xg durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Para eliminar los eritrocitos, que comúnmente se encontraron entre las CMN del cordón umbilical, éstas se incubaron con una solución de lisis de eritrocitos (17 mM de NH_4Cl y 155 mM de trizma base, con pH 7.33) a 4°C durante 10 minutos. Luego de incubar, las células se lavaron 2 veces como se indicó y se resuspendieron en 1 mL de ASF para cuantificar en un hemocitómetro la viabilidad celular con azul tripano.

Purificación de la lectina ALL

La lectina fue purificada de las semillas de *Amaranthus leucocarpus* (obtenidas en Tulyehualco, México) por cromatografía de afinidad en una columna de Sephadex G-25, con estroma de eritrocitos humanos O⁺ de acuerdo a Hernández *et al* (1999). La concentración de proteína de la fracción que contiene la lectina, se determinó por el método de Bradford (1976) en un lector de ELISA Labsystems Multiskan MS (Finlandia).

Determinación de la actividad específica de la lectina ALL

La actividad hemaglutinante de la lectina se obtuvo por la técnica de doble dilución seriada. En esta técnica, se usaron placas para hemaglutinación (placas de 96 pozos de fondo en "U"); en todos los pozos de las líneas A y B se les colocaron 25 μL de ASF, enseguida al primer pozo de la línea A se le agregaron 25 μL de la solución de la lectina sin diluir y se procedió a mezclar homogéneamente. Luego se tomaron 25 μL del primer pozo para agregarlos al segundo pozo y se mezcló nuevamente. El procedimiento se repitió con el tercer y los siguientes pozos. Los 25 μL retirados del último pozo de la línea, se desecharon. De igual forma, en el primer pozo de la línea B, se adicionaron 25 μL de una solución sin lectina y se realizaron las mismas diluciones usando esta línea como testigo negativo del ensayo. Finalmente, a cada pozo se le agregaron 25 μL de una suspensión de eritrocitos humanos tipo O Rh⁺ al 2% en ASF y se incubó a 25°C durante 45 minutos. La actividad hemaglutinante se reportó como la mayor dilución en la que aún se observó hemaglutinación.

En los experimentos se trabajó con lotes de lectina, con igual actividad específica (AE). La AE de la lectina es el cociente del inverso de la actividad hemaglutinante por mL de solución y la concentración de proteína.

Conjugación de la lectina ALL a biotina

La lectina se resuspendió en amortiguador de carbonatos (50 mM de carbonato de sodio, ajustando con bicarbonato de sodio a pH 8.5). Por cada mg de lectina se agregaron 0.07 mg de sulfo-NHS-biotina y se incubó a 25°C durante 2 horas y luego la sulfo-NHS-biotina no unida a la lectina se eliminó dializando contra ASF. Se cuantificó la cantidad de proteína, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su uso (Savage *et al.*, 1992). La lectina conjugada a biotina se denominó ALL-B.

Conjugación de la lectina ALL a FITC

La lectina se resuspendió en amortiguador de carbonatos (50 mM de carbonato de sodio, ajustando con bicarbonato de sodio a pH 9). Por cada mg de lectina, se agregaron 0.05 mg de FITC y se incubó a 4°C durante toda la noche en agitación. El FITC no unido a la lectina se separó por diálisis o por filtración en una columna de Sephadex G-25 estabilizada con ASF (The y Feltkamp, 1970). La lectina conjugada a FITC se denominó ALL-FITC.

Purificación del receptor de la lectina ALL

Para la purificación de ALL-R se utilizó un método de cromatografía de afinidad indirecto (Buckie y Cook, 1986). Para esto, se incubaron 10^8 CMN durante 15 minutos con 10 µg de ALL-B. La suspensión celular se colocó sobre 5 mL de una solución de BSA al 7% en ASF, a temperatura ambiente y después de 30 minutos, las células aglutinadas por la lectina, se recuperaron del fondo del tubo. Las células se lavaron con ASF y se lisaron con una solución de Tritón X-100 al 1% (v/v) con inhibidores de proteasas (1 µg/ml de aprotinina, 1 µg/ml de pepstatina A, 2 µg/ml de leupeptina y 2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo), durante 30 minutos a 4°C, en agitación constante. La solución resultante se centrifugó en una centrifuga Eppendorf modelo

5804 (Hamburgo, Alemania) a 500xg durante 5 minutos para eliminar residuos celulares y a 14,000 rpm durante 30 minutos para eliminar mitocondrias y otros orgánulos celulares. El sobrenadante (2 mL) se pasó a través de una columna de agarosa-avidina estabilizada con ASF-tritón al 0.1%. La columna se lavó con ASF-tritón para eluir la fracción no retenida, hasta que la densidad óptica (280 nm) llegara a cero. La densidad óptica se registró en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-65 (Palo Alto CA, USA). Posteriormente se agregaron 3 mL de una solución de GalNAc 0.2M en ASF para eluir al receptor de ALL por competencia (**figura 5**). Las fracciones de 1 mL con una densidad óptica positiva a 280 nm, se recogieron del colector de fracciones Gilson FC modelo 203B (Middleton WI, USA), se dializaron contra NaCl 5 mM y se concentraron por liofilización.

Caracterización química del receptor para la lectina ALL

La fracción purificada (ALL-R) por cromatografía de afinidad, se analizó para determinar el peso molecular y el grado de homogeneidad mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (0.1%), en condiciones reductoras (β -mercaptoetanol 5% y urea 8 M) en una cámara Dual Gel Caster (Hoefer. San Francisco CA, USA). La concentración del gel separador fue de 12.5%, se empleó el sistema desarrollado por Laemmli (1970). Las bandas electroforéticas se revelaron mediante el método de tinción con nitrato de plata.

También se analizó la composición de aminoácidos de la fracción purificada. En un frasco sellado se hidrolizaron 50 μ g de proteína, con HCl 6N durante 24, 36 y 48 horas a 110°C. La mezcla de aminoácidos se analizó en una columna de intercambio iónico Pico-Tag C-18, 3.9 x 150 mm (Bidlemeier *et al.*, 1984). La secuenciación de aminoácidos del receptor purificado se realizó por el método de Edman en un secuenciador de aminoácidos automatizado Beckman 3000.

Titulación de los anticuerpos

Para determinar la dilución en la que se usaron los anticuerpos, dado que muchos de los proveedores únicamente recomiendan alguna dilución a la que se

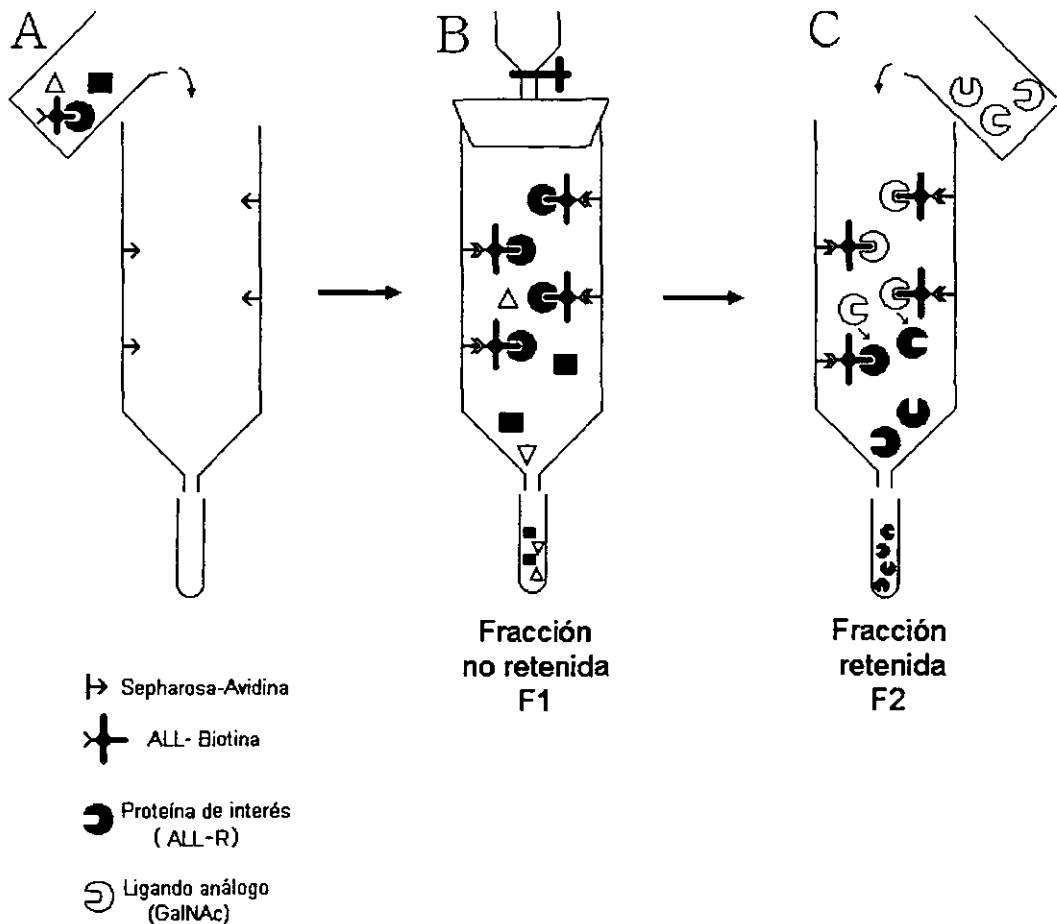


Figura 5- Purificación de ALL-R por cromatografía de afinidad. A) Se agrega el lisado celular con el ALL-R, unido a la lectina biotinilada (ALL-B), a una columna con matriz de Sepharosa-Avidina. B) Lavado de la columna para recuperar la fracción no retenida, F1. C) Elución con GalNAc 0.2M, para recuperar la fracción retenida, F2.

pueden usar sus productos, se procedió de la siguiente manera: Se incubaron 10^6 CMN con concentraciones diferentes de anticuerpo, en tubos para microcentrífuga durante 15 minutos a 4°C en oscuridad. En el caso de la mezcla de anticuerpos "Pan T" para la selección negativa de linfocitos T, en primer lugar, las células se incubaron con la mezcla de anticuerpos conjugados a un hapteno durante 10 minutos a 4°C . Después de lavar dos veces, se incubaron con anticuerpo anti-hapteno conjugado a perlas magnéticas durante 15 minutos a 4°C . Después de la incubación con los anticuerpos, las células se lavaron dos veces con PBA, se resuspendieron en 1 mL de solución amortiguadora FACS flow y se analizaron en el citómetro de flujo. Durante el análisis, se estudiaron 10^4 células como población representativa. En primer lugar se generó una ventana de análisis de tamaño contra granularidad (apéndice A: citometría de flujo; dispersión de luz). En esta ventana, se eligió la región de los linfocitos para generar una segunda ventana de análisis. Con base en esta segunda ventana, se generaron histogramas de frecuencia para analizar las fluorescencias detectadas por medio de los canales FL1, FL2 y FL3 (apéndice A: citometría de flujo: análisis de fluorescencia). Con estos histogramas, se determinaron los porcentajes óptimos del anticuerpo para la población celular (porcentajes fenotípicos). Con el criterio de observar dos poblaciones claramente definidas, se determinó que la dilución en que se deben usar los anticuerpos, fue: para anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD45RA y anti-CD45RO: 10 μL de una dilución 1:10; para anti-TCR $\gamma\delta$: 20 μL de la solución sin diluir; y para anti-TCR $\alpha\beta$: 20 μL de una dilución 1:2. Para el anticuerpo secundario, la concentración óptima de anti-IgG de conejo contra ratón, conjugado a PE, fue de 10 μL de una dilución 1:300. Para los anticuerpos conjugados: anti-CD3-PE, anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE, anti-CD14-PE, anti-TCR $\alpha\beta$ -FITC y anti-TCR $\gamma\delta$ -PE: 10 μL de una dilución 1:10; para el anti-CD45RA-FITC: 10 μL de una dilución 1:20; y para el anti-CD45RO-PE se usaron 10 μL sin diluir. La mezcla de anticuerpos conjugados a hapteno y los anticuerpos anti-hapteno, del paquete Pan T: 20 $\mu\text{L}/10^7$ linfocitos T de la solución sin diluir.

Determinación de isotipos

Conocer el isotipo de los anticuerpos fue importante para utilizar correctamente el anticuerpo secundario en la inmunofluorescencia indirecta, o para usar el testigo de isotipo en la inmunofluorescencia directa. Cuando el isotipo de algún anticuerpo no se conocía, se determinó de la siguiente manera: Se incubaron 10^6 CMN con $10 \mu\text{L}$ del anticuerpo durante 15 minutos a 4°C . Después de lavar dos veces con PBA, las células se incubaron con $10 \mu\text{L}$ de anticuerpo de rata contra ratón, conjugado a un fluorocromo: anti-IgG1 o anti-IgG2a o anti-IgG2b o anti-IgM, durante 15 minutos a 4°C . Posteriormente, se lavaron dos veces con PBA y se analizaron por citometría de flujo (Citómetro de flujo FACSCalibur, Becton Dickinson. San José CA, USA).

Aislamiento de los linfocitos T

Los linfocitos T se obtuvieron por selección magnética negativa a partir de CMN humanas de individuos adultos y de cordón umbilical. Las CMN se ajustaron a una concentración de 10^7 células/ $80 \mu\text{L}$ de ASF con EDTA 5 mM y BSA 0.5% (ASF-EDTA-BSA) y se incubaron con $20 \mu\text{L}$ de una mezcla de anticuerpos conjugados a un hapteno, y dirigidos contra células NK, células mieloides, neutrófilos, macrófagos, monocitos, linfocitos B, plaquetas y células endoteliales (anti-CD56, anti-CD11b, anti-CD16, anti-CD19 y anti-CD36) durante 10 minutos a 4°C . Después de lavar dos veces, las células se resuspendieron en $80 \mu\text{L}$ de ASF-EDTA-BSA y se incubaron con $20 \mu\text{L}$ de anticuerpos anti-hapteno conjugados a perlas magnéticas durante 15 minutos a 4°C . Luego, las células se lavaron con ASF-EDTA-BSA y después de centrifugar, se resuspendieron en un 1 mL del mismo amortiguador. La suspensión celular, se colocó en una columna magnetizada donde se retuvieron las células reconocidas por los anticuerpos, pasando libremente la fracción no retenida (linfocitos T; **figura 6**). Después de lavar la columna con 6 mL de ASF-EDTA-BSA, la columna se retiró del campo magnético y la fracción retenida se recuperó con la adición de 3 mL de ASF-EDTA-BSA. Para establecer la eficiencia de este sistema de separación, ambas fracciones (la retenida y la no retenida) se lavaron 2 veces con PBA (BSA, 0.2%; azida de sodio, 0.2%; ASF, pH 7.2) centrifugando a $400\times g$ durante 5 minutos. Se incubaron

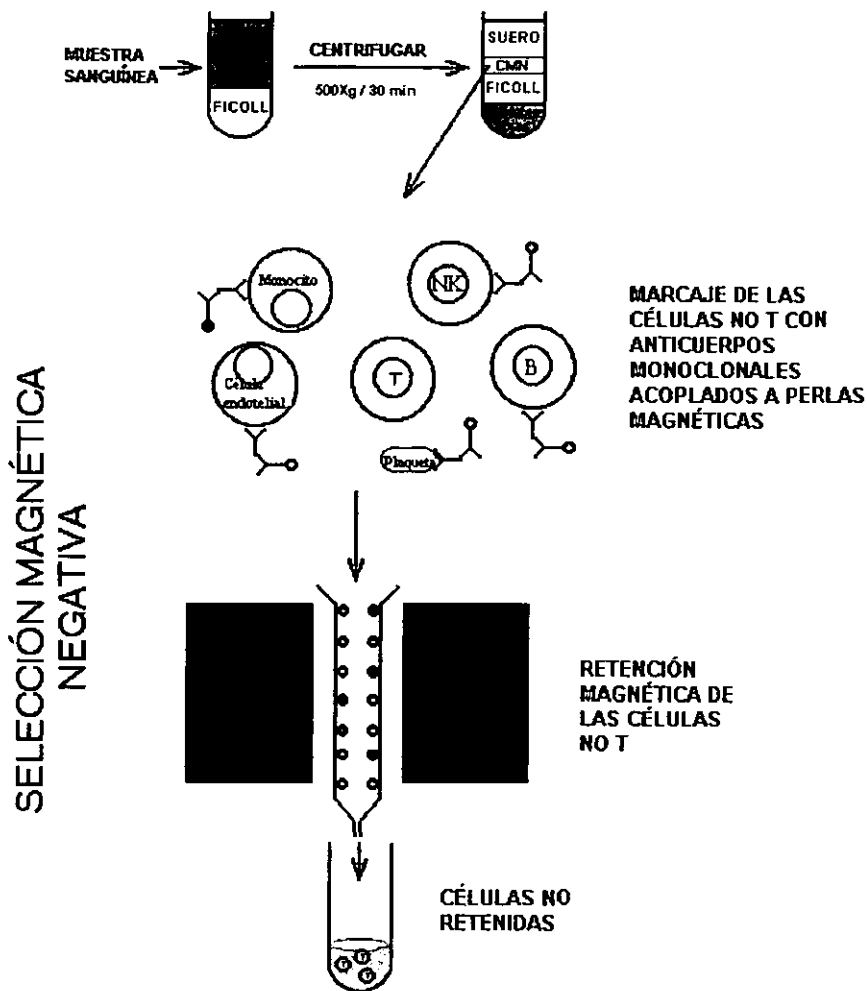


Figura 6- La selección magnética negativa. Las células mononucleadas se incubaron con una mezcla de anticuerpos unidos a un hapteno, contra las células NK, macrófagos, monocitos, linfocitos B, plaquetas y células endoteliales (anti-CD56, anti-CD11b, anti-CD16, anti-CD19 y anti-CD36); luego se incubaron con un anticuerpo anti-hapteno unido a perlas magnéticas. Al pasar la suspensión celular a través de un imán, se retuvieron las células reconocidas por los anticuerpos y unidas a las perlas magnéticas, y únicamente se recuperaron las células T.

10^6 células de cada fracción, con $10 \mu\text{L}$ de anti-CD3 humano conjugado a FITC durante 15 minutos a 4°C en oscuridad y después se lavaron dos veces con PBA. La muestra se analizó por citometría de flujo. Con este sistema de selección magnética negativa la pureza de los linfocitos T (fracción no retenida) fue del 95%; mientras que, en la fracción retenida, fue del 5% (figura 7). La viabilidad celular se determinó con azul tripano.

Especificidad de la unión de la lectina ALL

Para confirmar la interacción específica de la lectina con las poblaciones celulares, se realizaron ensayos de inhibición. Para esto, se incubaron 10^6 linfocitos T en tubos para microcentrifuga con $0.1 \mu\text{g}$ de ALL-B en $10 \mu\text{L}$ de PBA durante 30 minutos a 4°C . Las células se lavaron dos veces con PBA y luego se incubaron con una solución de GlcNAc, glucosa (Glc), Gal, o GalNAc 0.2 M en ASF durante 30 minutos a 4°C . Las células se lavaron dos veces con PBA y se incubaron con estreptavidina conjugada al compuesto fluorescente Cychrome ($10 \mu\text{L}$ en una dilución 1:2000). Finalmente, las células se lavaron 2 veces con PBA y se analizaron por citometría de flujo.

Inmunofluorescencia indirecta

Se incubaron 10^6 células por tubo para microcentrifuga, con los anticuerpos de ratón contra moléculas de superficie celular de humano: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD57, anti-CD45RA, anti-CD45RO, anti-TCR $\alpha\beta$ y anti-TCR $\gamma\delta$ durante 15 minutos a 4°C ; después, se lavaron 2 veces con PBA, centrifugando a 400xg durante 5 minutos. En seguida, las células se incubaron con un anticuerpo de conejo contra el anticuerpo de ratón, conjugado a PE, se lavaron 2 veces con PBA y se analizaron por citometría de flujo. Para estos ensayos se utilizaron los siguientes testigos: a) Se incubaron 10^6 CMN siguiendo el procedimiento anterior pero, sin tratarlas con el anticuerpo primario, ni con el anticuerpo secundario y durante el análisis sirvieron como referencia para registrar la autofluorescencia de las células; b) Se incubaron 10^6 CMN igual que las células experimentales pero, no se incubaron con

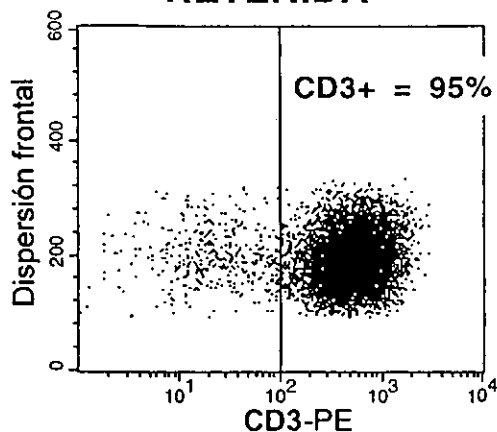
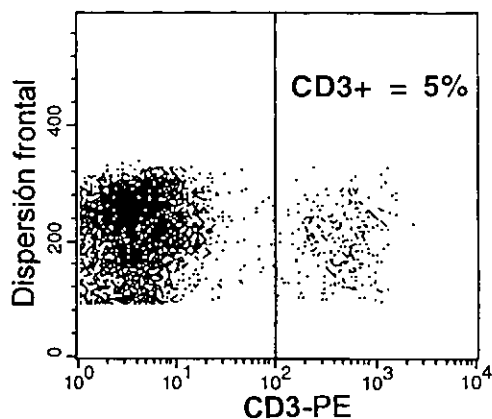
A**FRACCIÓN NO
RETENIDA****B****FRACCIÓN
RETENIDA**

Figura 7- Porcentaje de pureza de linfocitos T ($CD3^+$) en la selección magnética negativa. Las células, en las fracciones recuperadas durante la selección, se incubaron con el anticuerpo anti-CD3 y se analizaron por citometría de flujo. El cuadrante derecho de cada gráfico, muestra el porcentaje de linfocitos T en cada fracción. Los cuadrantes se generaron tomando como referencia la ubicación de linfocitos T recuperados durante la selección, pero no incubados con el anticuerpo. A) La fracción no retenida contiene 95% de linfocitos T. B) La fracción retenida contiene 5% de linfocitos T.

el primer anticuerpo. Estas células sirvieron para conocer la fluorescencia generada por la unión inespecífica del anticuerpo secundario a las células; y c) Se incubaron 10^6 células con un anticuerpo de ratón del mismo isotipo, pero con diferente especificidad, para conocer la unión inespecífica de isotipo.

Inmunofluorescencia directa

En la caracterización fenotípica de los linfocitos T purificados mediante selección magnética negativa, se usaron los anticuerpos de ratón contra las moléculas de superficie celular de humano: anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RA, anti-CD45RO, anti-TCR $\alpha\beta$ y anti-TCR $\gamma\delta$ y la lectina ALL-B. Todas las incubaciones se realizaron en tubos de microcentrifuga durante 15 minutos a 4°C; los lavados celulares se llevaron a cabo centrifugando a 400xg durante 5 minutos. Se incubaron 10^6 linfocitos T con ALL-B simultáneamente con dos anticuerpos monoclonales conjugados, uno a FITC y otro a PE. Después de la incubación, las células se lavaron 2 veces con PBA y se incubaron con estreptavidina conjugada a Cychrome, como tercer fluorocromo. Al término de la incubación las células se lavaron 2 veces y se analizaron por citometría de flujo. Para estos ensayos los testigos fueron: a) células no incubadas con el anticuerpo primario, ni con el anticuerpo secundario que sirvieron como referencia, para registrar la autofluorescencia; y b) células incubadas con dos testigos de isotipo (IgG1-PE, IgG1-FITC, IgG2a-PE, IgG2a-FITC o IgM-FITC) y la estreptavidina conjugada a Cychrome, que sirvieron para conocer la fluorescencia generada por la unión inespecífica del isotipo del anticuerpo, a las células.

Titulación de la Con-A

Para conocer la concentración óptima de Con-A, en la que los linfocitos proliferan, se cultivaron 10^6 linfocitos T en 1 mL de medio con SBF durante 12, 24, 36 y 48 horas y se estimularon con 0.1 hasta 10 μg de Con-A. Después de recolectar las células de los pozos de cultivo, se lavaron dos veces con ASF, se fijaron con *p*-formaldehído al 4% en ASF (10^6 células/500 μL) durante 10 minutos a 4°C y se volvieron a lavar dos veces con ASF. Las células se resuspendieron en 500 μl del

amortiguador A (saponina 0.1%, BSA 10%, HEPES 0.01 M, IgG de cerdo 100 µg/mL en ASF) y se incubaron 10 minutos a 25°C con agitación lenta. Posteriormente, las células se centrifugaron a 400xg y se eliminó el sobrenadante. Las células se incubaron con el anticuerpo anti-Ki-67 conjugado a FITC, durante 30 minutos a 25°C en oscuridad y después, se lavaron con el amortiguador B (saponina 0.1%, HEPES 0.1M en ASF). Las células se analizaron por citometría de flujo.

Cultivos celulares y activación de los linfocitos T

Los linfocitos T se cultivaron y se activaron en presencia de células presentadoras de antígeno; para esto, en primer lugar se incubaron 2×10^6 CMN por pozo, en placas para cultivo de 24 pozos Falcon (Becton Dickinson NJ, USA), durante 1 hora a 37°C con 5% de CO₂. Después, para eliminar las células no adherentes, los pozos se lavaron tres veces con 1 mL de medio de cultivo con 10% de SBF. En cada uno de estos pozos, se sembraron 10^6 linfocitos T en 1 mL de medio de cultivo con SBF y se estimularon con 1 µg de Con-A. Los linfocitos T, se recolectaron cada 12 horas hasta completar 48, se lavaron dos veces con ASF y se determinó su viabilidad con azul tripano. Las células se fijaron en una solución de etanol al 70% y glicina 50 mM y se almacenaron a -20°C hasta la parte siguiente del experimento.

Los linfocitos T activados con Con-A, recolectados cada 12 horas y fijados en solución de etanol y glicina, se lavaron dos veces con ASF, se incubaron con ALL-FITC (0.1 µg para 10^6 células en 10 µL de ASF) durante 15 minutos a 4°C y después se lavaron dos veces con ASF. Enseguida, se incubaron con 100 µL de ARNasa (1 µg/mL) durante 30 minutos a 37°C, se lavaron dos veces con ASF. Las células se incubaron con 300 µL de HCl 4 M durante 12 minutos a 25°C; inmediatamente después, se agregaron 3 mL de borato de sodio 0.1 M en ASF, para neutralizar el ácido, agregando 10 mL más, de ASF. La suspensión se centrifugó a 400xg durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se adicionaron 100 µL de permeabilizante del paquete de proliferación celular "Cell proliferation kit 1", durante 10 minutos a 25°C. Se lavó una vez con ASF, se agregaron 500 µL de una solución de yoduro de propidio (50 µg/mL) y se analizó por citometría de flujo en los canales FL1 para detectar las células unidas a

ALL-FITC y FL2 para detectar el ADN (apéndice A: citometría de flujo, análisis de las fases del ciclo celular).

La fase S del ciclo celular en linfocitos T, se determinó de la siguiente manera: se cultivaron 10^6 linfocitos T durante 0, 24 y 36 horas y se activaron de acuerdo al protocolo previamente descrito. Antes de finalizar el cultivo, 30 minutos, se agregaron 100 μ L de bromuro de uridina (BrdU. Del paquete de proliferación celular. Este compuesto es un análogo de la timina que se incorpora a la cadena desoxirribonucleotídica durante la síntesis de ADN) en una dilución 1:100 en ASF, a cada pozo, se continuó la incubación y luego se recolectaron las células. Las células recolectadas se fijaron en solución de etanol y glicina, y se almacenaron a -20°C . Posteriormente, las células se lavaron dos veces con ASF y se incubaron con 100 μ L de ARNasa (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 30 minutos a 37°C . Las células se lavaron dos veces con ASF, el botón celular se incubó con 300 μ L de HCl 4 M durante 12 minutos a 25°C y después se agregaron 3 mL de borato de sodio 0.1 M en ASF agregando 10 mL de ASF. La suspensión se centrifugó a 400xg durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se adicionaron 100 μ L de permeabilizante del paquete de proliferación celular, durante 10 minutos a 25°C . Se lavó una vez con ASF y las células se incubaron con 50 μ L de anti-BrdU, durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Se lavaron con ASF y se agregaron 500 μ L de una solución de yoduro de propidio (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se analizó por citometría de flujo en los canales FL1 para detectar las células teñidas con BrdU y FL2 para detectar el ADN.

Análisis estadístico

En todos los ensayos se reporta la media y la desviación estándar ($X \pm DS$).

RESULTADOS

Purificación del receptor de la lectina ALL en humano

Para purificar y caracterizar fisicoquímicamente al ALL-R, las CMN se incubaron con ALL y se aislaron por aglutinación. Estas células se lisaron y el lisado se fraccionó a través de una cromatografía de afinidad, en la cual ALL-R se eluyó por competencia mediante la adición de GalNAc 0.2 M. Se aplicaron 35 mg de proteína a la columna y la fracción no retenida (F1) contuvo 34.0 mg de proteína correspondiente al 98% de la proteína aplicada a la columna, mientras que la fracción eluida con GalNAc (F2), contuvo 35 µg de proteína, que corresponden al 0.1% del total de proteína aplicada a la columna (**figura 8**).

Peso molecular de ALL-R

El peso molecular y el grado de homogeneidad de ALL-R, purificado por cromatografía de afinidad, se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida. Como se identifica en la **figura 9**, la fracción purificada por cromatografía de afinidad mostró una sola banda, y al hacer la comparación con marcadores de peso molecular conocido, se determinó que ALL-R tiene un peso molecular de 70 kDa.

Composición de aminoácidos de ALL-R

La fracción eluida conteniendo ALL-R, se hidrolizó con HCl y analizó por cromatografía de intercambio iónico para determinar la composición de aminoácidos. Los cromatogramas obtenidos muestran que el 24% de los aminoácidos de ALL-R son no polares y el 76% son polares o con carga neta. Los aminoácidos más abundantes son la Ser y la Gly (125 y 118 residuos por molécula respectivamente), los residuos menos abundantes son la Met (4), la Tyr (6) y la Arg (7) y se identificó un residuo de Cis. La composición de aminoácidos en número de residuos por molécula se presenta en la **tabla 1**.

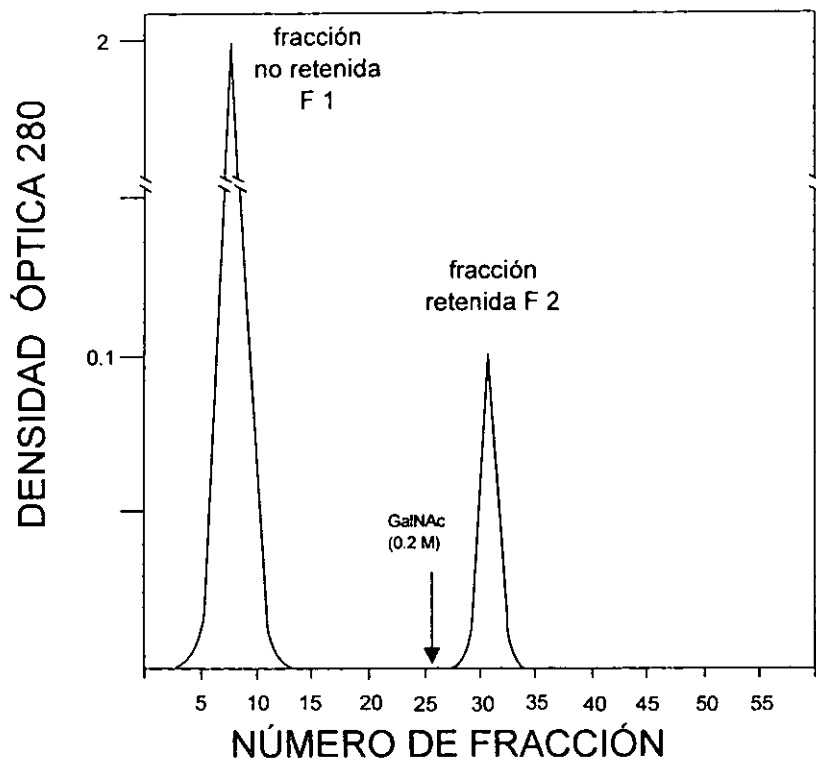


Figura 8- Perfil cromatográfico de la purificación de ALL-R. Después de aplicar a la columna de afinidad, el lisado que contenía el ALL-R unido a la lectina biotinilada, se recuperó la fracción no retenida en las primeras 17 fracciones. Después de lavar la columna, se aplicó una solución de GalNAc 0.2 M y la fracción eluida con el azúcar, se recuperó a partir de la fracción 27. El contenido de proteína de las fracciones se analizó en un espectrofotómetro a 280 nm.

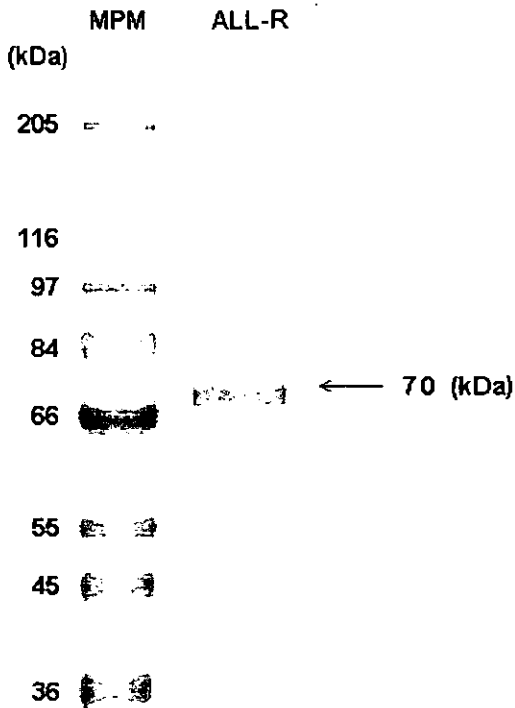


Figura 9- Perfil electroforético de ALL-R de humano. Se analizó la fracción eluida con GalNAc durante la cromatografía de afinidad, F2. Esta fracción tiene un alto grado de homogeneidad ya que presenta una sola banda en la electroforesis. La banda observada, correspondiente al ALL-R, tiene un peso molecular de 70 kDa. En la foto digitalizada de la electroforesis, se muestran los carriles para los marcadores de peso molecular (MPM) y para ALL-R. Las bandas se revelaron con nitrato de plata.

Tabla 1- Composición de aminoácidos del ALL-R.

	residuo aminoácido	residuos por molécula
Hidrofóbicos (24%)	Met	4
	Ala	54
	Pro	19
	Val	22
	Ile	17
	Leu	17
	Phe	9
Hidrofílicos (76%)	Ser	125
	Thr	23
	Glu	96
	Asp	36
	Gly	118
	His	15
	Arg	7
	Lys	16
	Tyr	6
	Cys	1

Secuenciación de aminoácidos de ALL-R

Se realizaron cuatro ensayos para secuenciar el amino terminal del receptor de la lectina ALL; sin embargo, posiblemente el extremo amino terminal de la cadena polipeptídica, esté substituido con algún grupo (por ejemplo: acetilo, glicosilo, piroglutamato, etc), que haya impedido el inicio de la secuenciación.

Fenotipo de CMN de adulto y de cordón umbilical

Se trabajó con 8 muestras sanguíneas de cordón umbilical y ocho muestras de adulto. De cordón se recuperaron $4 \pm 1.6 \times 10^6$ CMN por mL, mientras de adulto fueron $1.7 \pm 0.39 \times 10^6$ CMN por mL. La comparación de los porcentajes fenotípicos mostró diferencias únicamente para los marcadores CD45RA (molécula de superficie de células maduras no activadas) y CD45RO (molécula de superficie de células de memoria). Las células mononucleadas que presentaron el marcador CD45RA fueron, $82 \pm 12\%$ en el cordón y $45 \pm 12\%$ en el adulto; mientras que, las que presentaron el marcador CD45RO fueron, $11 \pm 6\%$ en el cordón y $39 \pm 15\%$ en el adulto (**tabla 2**).

Especificidad de la unión de la lectina ALL

La especificidad de la unión entre la lectina ALL y los linfocitos T, se analizó tratando de inhibir la unión con azúcares competidores; para esto, después de incubar 10^6 linfocitos T con la lectina ALL y lavarlos dos veces con ASF, se incubaron con los azúcares: GlcNAc, glucosa (Glc), Gal, o GalNAc 0.2 M en ASF durante 30 minutos a 4°C. Como se muestra en la **figura 10**, la incubación con GalNAc inhibió la unión de la lectina a los linfocitos T. Los otros azúcares no inhibieron la unión.

Fenotipo de linfocitos T de adulto y de cordón umbilical

La caracterización fenotípica de los linfocitos T del adulto y del cordón umbilical, mostró que la mayor parte de los linfocitos T en cordón y en adulto expresan el fenotipo CD4: 64% en cordón y 55% en adulto, TCR $\alpha\beta$: 85% en cordón y 89% en adulto; sin embargo, en células del cordón, el fenotipo predominante fue CD45RA (88%) mientras que en el adulto fue CD45RO (68%). El porcentaje de los linfocitos T reconocidos por

Tabla 2- Porcentaje fenotípico de CMN del cordón umbilical y del adulto.

	CMN del cordón	CMN del adulto
CD3+	62±8	67±5
CD4+	37±10	40±9
CD8+	29±7	29±5
RCTαβ+	58±10	61±11
RCTγδ+	6±3	4±2
CD45RA+	82±12	45±12
CD45RO+	11±6	39±15
CD14+	17±7	12±5
CD19+	12±4	10±2
CD57+	11±9	22±6

X±DE; n=8

Tabla 3- Porcentaje fenotípico de linfocitos T del cordón umbilical y del adulto.

	Linfocitos T del cordón	Linfocitos T del adulto
ALL+	9±3	8±3
CD 4+	64±6	55±6
CD 8+	29±5	41±7
CD 45RA+	88±3	29±9
CD 45RO+	16±8	68±7
RCTαβ+	85±5	89±3
RCTγδ+	2±1	1±1

X±DE; n=8 en el cordón, n=7 en el adulto

Tabla 4- Porcentaje fenotípico de linfocitos T ALL+ del cordón umbilical y del adulto.

	Linfocitos T ALL+ en el cordón	Linfocitos T ALL+ en el
CD 4+	65±11	61±13
CD 8+	20±7	25±12
CD 45RA+	90±3	30±5
CD 45RO+	15±7	68±10
RCTαβ+	84±5	83±10
RCTγδ+	2±0.5	3±2

X±DE; n=8 en el cordón, n=7 en el adulto

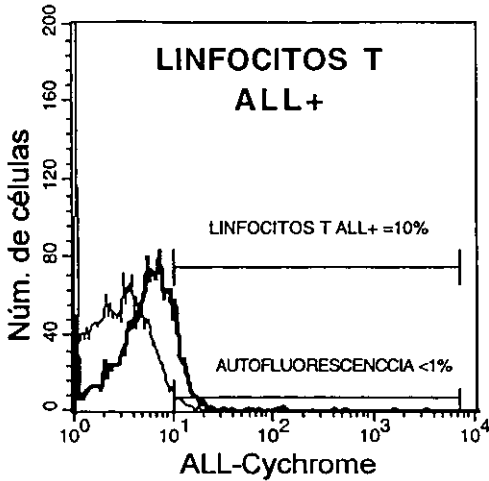
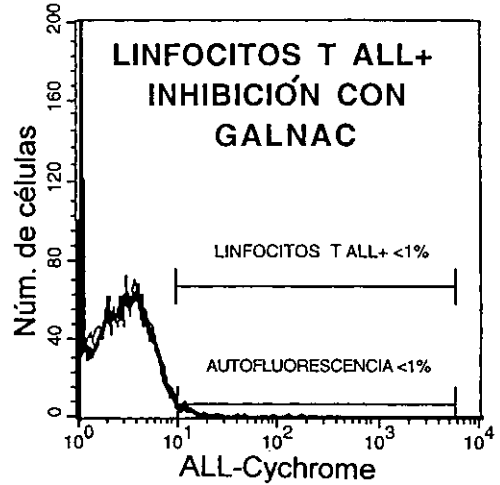
A**B**

Figura 10- Inhibición de la unión de los linfocitos T con la lectina ALL. Los linfocitos T aislados mediante selección magnética negativa, se incubaron con ALL-B. Posteriormente, se incubaron con los azúcares Gal, GalNAc, Glc y GlcNAc. El porcentaje de linfocitos T ALL⁺ fue del 8±3% (A); después de incubar las células con el azúcar GalNAc, se inhibió la unión y el reconocimiento fue <1% (B). Cuando los linfocitos T después de unirse a ALL-B, se incubaron con los otros azúcares, no cambio el porcentaje de reconocimiento (datos no mostrados).

la lectina ALL (ALL⁺), es comparable en ambas muestras, en el cordón son 9±3% y en adulto son 8±3% (tabla 3). En la figura 11 se muestran los gráficos de los análisis fenotípicos, obtenidos por citometría de flujo, de un experimento representativo.

Fenotipo de linfocitos T ALL⁺

El fenotipo de los linfocitos T reconocidos por la lectina ALL, se determinó con triple inmunofluorescencia usando ALL-B y anticuerpos conjugados a PE y a FITC y se analizó por citometría de flujo. En la muestra del cordón y en la del adulto, los linfocitos T ALL⁺ presentaron el fenotipo predominante CD4/TCRαβ; CD4: 65% en el cordón y 61% en el adulto y TCRαβ: 84% en el cordón y 83% en el adulto. No obstante, el fenotipo predominante en la muestra de cordón umbilical fue CD45RA (90%) y en adulto fue CD45RO (68%) (tabla 4).

Expresión de ALL-R durante la activación y en las fases del ciclo celular

La concentración de la lectina Con-A que induce máxima proliferación en los linfocitos T, se determinó por la detección del antígeno Ki-67; para esto, se realizó una cinética de activación con cantidades diferentes de la lectina. A las 48 horas de cultivo, hay 5% de proliferación basal, pero en linfocitos estimulados con Con-A (1 µg/mL para 10⁶ linfocitos T), el porcentaje de proliferación se incrementó a 63%.

Para determinar si la expresión de ALL-R se encuentra asociada a la activación y a las fases del ciclo celular, se hizo una cinética de activación de los linfocitos T. Las células se recolectaron cada 12 horas y mediante doble inmunofluorescencia, se detectó la cantidad de ADN en el interior de cada célula, para determinar la fase del ciclo celular en la que se encontraba, y la unión de la lectina ALL. La población de linfocitos T que se unieron a la lectina ALL, se incrementó durante la activación. En células activadas, la cantidad de linfocitos T ALL⁺ se incrementó progresivamente de 5% a las 0 horas, a 42% a las 36 horas y luego, disminuyó a 32% a las 48 horas. En células no activadas la población de linfocitos T ALL⁺ se mantuvo en un intervalo del 5 al 10% durante las 48 horas de cultivo (tabla 5, figura 12).

LINFOCITOS T

CORDÓN

ADULTO

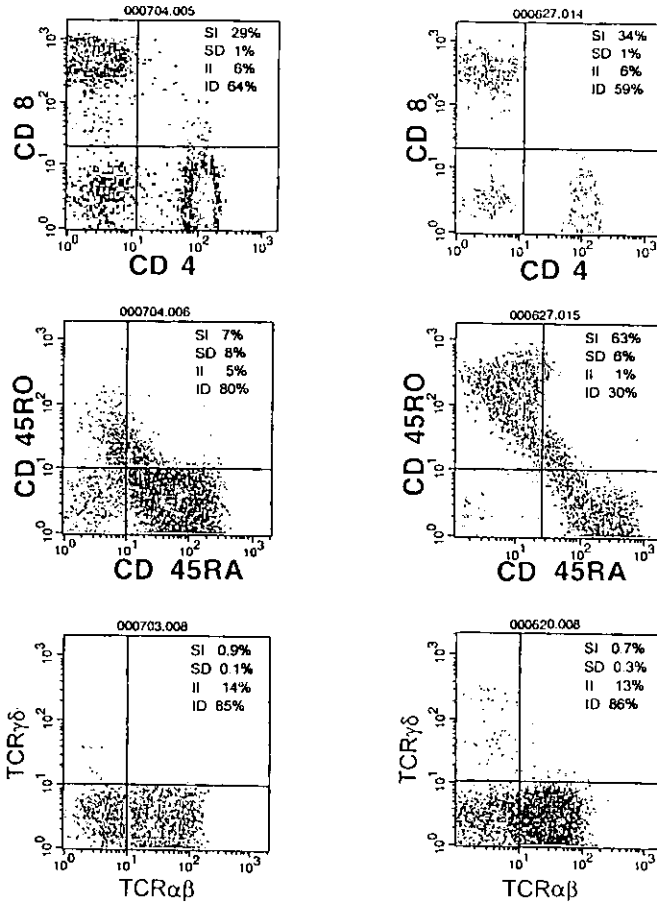


Figura 11- Gráficos de puntos de un experimento representativo del fenotipo de los linfocitos T. En este estudio comparativo entre los linfocitos T del adulto y del cordón, se analizaron los marcadores fenotípicos CD4 y CD8, característicos de células cooperadoras y citotóxicas; CD45RA y CD45RO, característicos de células vírgenes y de memoria; y el TCRαβ y el TCRγδ.

Tabla 5- Porcentaje de los linfocitos T ALL+ durante 48 horas de activación.

Tiempo de activación (horas)	Linfocitos T ALL+ no activados	Linfocitos T ALL+ activados
0	5±3	6±1
12	10±6	8±4
24	7±3	17±5
36	9±4	40±5
48	10±4	32±7

X±DE; n=3

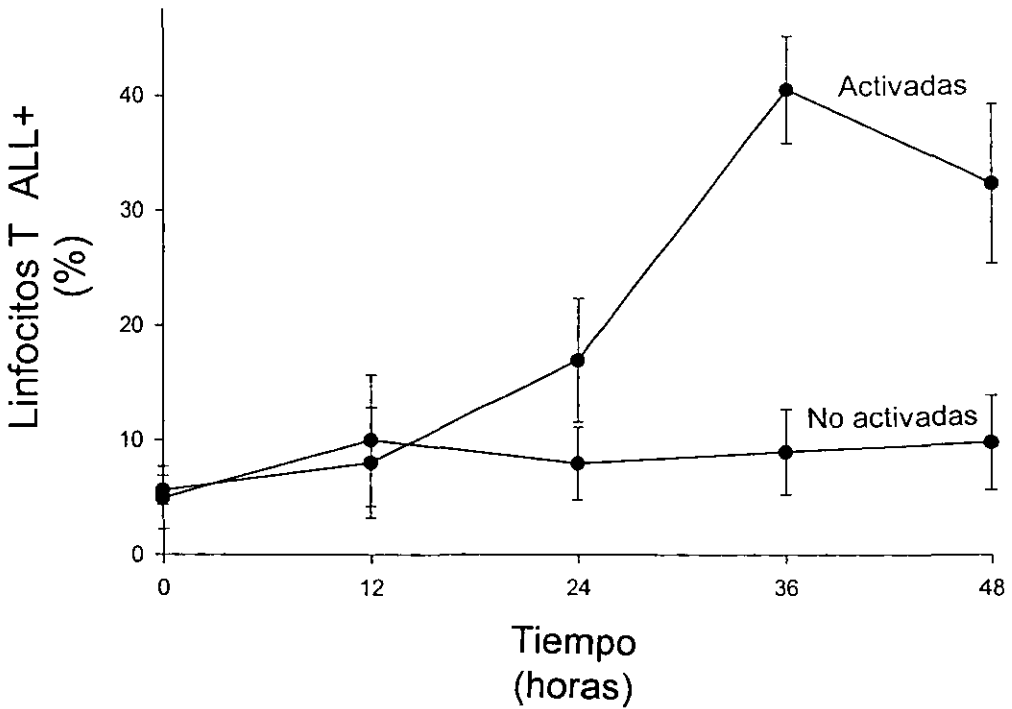


Figura 12- Linfocitos T ALL+ activados con Con-A durante 48 horas. En el gráfico se muestra los linfocitos T reconocidos por la lectina ALL en función del tiempo de activación. Al tiempo cero, los linfocitos T tienen un reconocimiento de menos de 10%. Después de 36 horas de activación, las células reconocidas por la lectina se incrementaron al 40% y luego a las 48 horas, fueron el 32%; mientras que, las células no activadas se mantuvieron con un reconocimiento menor al 10%. (X±DE, n=3).

En el análisis del ADN para el estudio de las fases del ciclo celular (**figura 13**), la mayoría de los linfocitos T ALL⁺ activados (85%) presentaron las fases S y las de G₂+M a partir de 36 horas, en cambio los linfocitos T ALL⁻ activados se mantuvieron en las fases G₀+G₁. Todos los linfocitos T no activados, ALL⁺ y ALL⁻ se mantuvieron en las fases G₀+G₁.

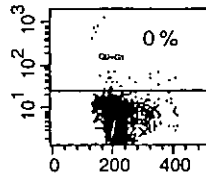
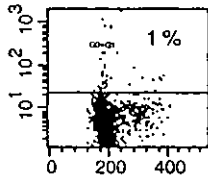
Para determinar con más precisión la cantidad de linfocitos T que se encuentran en la fase S, se hizo una cinética de activación de 0, 24 y 36 horas en cultivo; en ésta cinética, las células se incubaron con BrdU y después de recolectarlas, se hizo un análisis de inmunofluorescencia, para detectar las células que incorporaron el análogo de la timina durante la síntesis de ADN. En el tiempo cero, 4.7±2.5% de los linfocitos T se encontró en fase S, a las 24 horas, 8.3±1.5% y a las 36 horas, 32.3±4.7% (n=3) (**figura 14**).

ALL-FITC

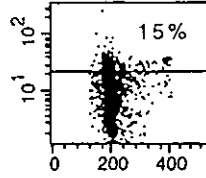
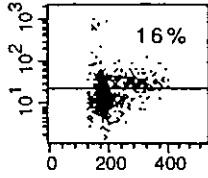
Linfocitos T
no activados

Linfocitos T
activados

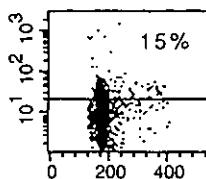
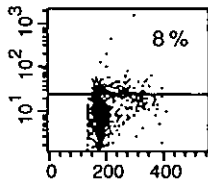
horas



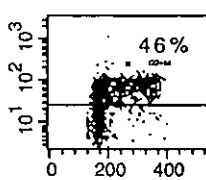
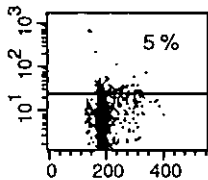
0



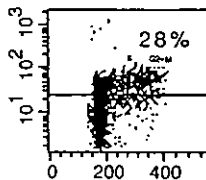
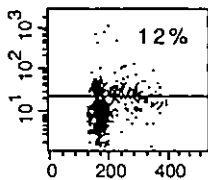
12



24



36



48

ADN-IP

Figura 13- Gráficos de puntos de un experimento representativo de linfocitos T cultivados durante 48 horas, para el análisis de las fases del ciclo celular y la unión de la lectina ALL. En los cuadrantes superiores se observan las células ALL⁺ y la cantidad de ADN en las fases del ciclo celular. Ver el apéndice A: Citometría de flujo, análisis por citometría de las fases del ciclo celular. En linfocitos T no activados la unión con la lectina es del 10% en promedio, pero, en linfocitos activados la unión con la lectina se incrementa después de 36 horas de activación y luego disminuye. En linfocitos activados después de 36 horas, se presentan las fases S y G₂+M.

DISCUSIÓN

La diferenciación y la maduración de los linfocitos T, se caracteriza no solo por la expresión de los co-receptores CD4/CD8 o el incremento en la densidad de expresión del receptor de linfocitos T (TCR), sino también por los cambios en los patrones de glicosilación, como hemos tratado de demostrar en este trabajo. La presencia de receptores sacarídicos como el antígeno T ($\text{Gal}\beta 1,3 \text{GalNAc}\alpha\text{-1-O Ser/Thr}$) y el Tn ($\text{GalNAc}\alpha\text{-1-O Ser/Thr}$), tienen una particular importancia debido a que estas estructuras pueden ser substituidas por Neu5Ac, originando variantes sialiladas de dichas estructuras. Se ha reportado que una de las modificaciones más importantes durante la maduración celular en el timo, es el incremento de Neu5Ac expresado en la superficie de los timocitos y que la expresión de un derivado O-acetilado de Neu5Ac (9-O-acetil-siálico, Neu5,9Ac), también es regulada durante la maduración y activación de los linfocitos T (Krishna y Varki, 1997). En este trabajo se utilizó a la lectina ALL, específica para la GalNAc en el antígeno T, que reconoce timocitos murinos en las últimas etapas de maduración.

Para la purificación de ALL-R se utilizó una cromatografía de afinidad; en éste método, se utilizó la afinidad de la lectina ALL, por el antígeno T en el ALL-R de los linfocitos. La electroforesis en gel de poliacrilamida de la fracción retenida F2, en la cromatografía de afinidad, mostró una sola banda revelada con nitrato de plata; lo que sugiere que la lectina ALL se une de manera específica a una proteína o a proteínas con semejante peso molecular. Nuestros resultados sugieren que el contenido total, en CMN, de este receptor es inferior al 1%. El procedimiento de cromatografía de afinidad indirecta, en el que se usó a la lectina marcada con biotina y a la avidina-agarosa, nos permite el aislamiento del receptor para la lectina aparentemente intacto, ya que en primer lugar se mantiene a la célula reconocida viable (Lis y Sharon, 1998) y posteriormente se induce la lisis de las células reconocidas con inhibidores de proteasas, así se evita el contacto con enzimas proteolíticas. Lo que sugiere que este sistema de separación podría ser de gran utilidad para el aislamiento y caracterización de receptores linfocitarios.

El análisis electroforético del receptor, mostró una sola banda de 70 kDa. La composición de aminoácidos de ALL-R muestra 24% de aminoácidos hidrofóbicos. Es posible que estos aminoácidos constituyan parte del ALL-R que está embebida en la membrana celular o formen parte de dominios extracelulares en regiones hidrofóbicas, como se ha observado con la leucosialina (Piller *et al.*, 1988). El 76% de los aminoácidos son hidrofílicos por lo que pueden ser parte de dominios extracelulares o citoplásmicos que estén en contacto con el medio. ALL-R tiene 125 residuos de Ser y 23, de Thr lo que equivale al 25% de los aminoácidos totales, los que son potencialmente O-glicosilados. Trabajos recientes indican que, la O-glicosilación requiere la presencia de una Pro adyacente a la Ser o Thr; aunque se desconoce la función de este residuo, puede inducir una organización tridimensional específica en el péptido glicosilable (Hernández, comunicación personal). Por esta razón, consideramos que ALL-R tiene 19 O-glicosilaciones en su estructura, por lo que es susceptible a ser reconocido por la lectina ALL.

El bloqueo del grupo amino terminal impidió la secuenciación de ALL-R, esto se puede deber a que la región amino terminal, esté acetilada o glicosilada, por ejemplo. Los estudios siguientes, en esta línea de investigación, se dirigirán en liberar esta región; así mismo, se utilizarán otros métodos de secuenciación.

Existen diversos ejemplos de estructuras O-glicosiladas en la superficie de los linfocitos, tales como CD45, CD4, el CD8 de células activadas y efectoras, o la leucosialina (CD43 o Sialoforina). La leucosialina es la glicoproteína con mayor potencial para ser O-glicosilada, ya que en su dominio extracelular, uno de cada tres aminoácidos, es Ser o Thr, 137 en total. Esta cantidad es semejante a la de ALL-R, pero la leucosialina tiene 38 residuos de Pro, lo que duplica las posibilidades de O-glicosilación. La comparación en la composición de aminoácidos entre ALL-R y la Leucosialina muestra que estas, son dos glicoproteínas diferentes (tabla 6).

La estructura Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr (antígeno-T), ha sido asociada con estadios de inmadurez en linfocitos y transformación tumoral en células no linfoides. La lectina ALL reconoce este antígeno y en CMN reconoce células con fenotipo CD4/CD45RA (Lascurain *et al.*, 1997). Por lo anterior, resultó de interés la

Tabla 6- Composición de aminoácidos de ALL-R y de la Leucosialina. Se muestra el número de residuos por molécula.

residuo aminoácido	ALL-R (residuos por molécula)	Leucosialina (residuos por molécula)
Asp	36	36
Glu	96	55
Ser	125	87
Gly	118	71
His	15	10
Arg	7	18
Thr	23	50
Ala	54	37
Pro	19	38
Tyr	6	6
Val	22	29
Met	4	6
Ile	17	16
Leu	17	32
Phe	9	100
Lys	16	3
Cys	1	ND

ND-no descrito.

caracterización del fenotipo de los linfocitos T reconocidos por la lectina ALL en una muestra enriquecida con células CD45RA, la muestra sanguínea de cordón umbilical.

La muestra de cordón se considera que no ha tenido contacto previo con estímulos antigénicos (Almici *et al.*, 1997; Lucivero *et al.*, 1996; Gardner *et al.*, 1998). Los linfocitos T ALL⁺ en cordón presentan el fenotipo CD4/CD45RA con TCR $\alpha\beta$ y en adulto el fenotipo es CD4/CD45RO con TCR $\alpha\beta$, esto sugiere que en linfocitos T humanos la expresión de ALL-R se encuentra asociada al fenotipo CD4 con el TCR $\alpha\beta$. Los linfocitos T ALL⁺ en cordón, tuvieron un fenotipo CD45RA predominante tal como se esperaba en esta muestra enriquecida con células vírgenes; sin embargo, resultados del fenotipo de los linfocitos T ALL⁺ en adulto, contrasta con el fenotipo reportado en CMN previamente. Las diferencias pueden ser ocasionadas por los métodos diferentes de estudio. En el estudio previo, se aislaron las células ALL⁺ por aglutinación y sedimentación a partir de CMN y posteriormente se determinó su fenotipo. En tal método, las células al unirse a la lectina y aglutinarse entre sí, alteran su membrana y esto puede generar señales al interior que determinen cambios fenotípicos. Así mismo, durante la sedimentación se pueden acarrear células no reconocidas por la lectina ALL. En este estudio, se usó un método que permite aislar linfocitos T sin que sean tratados ni unidos a moléculas, por lo que no se tiene el riesgo de alteraciones de membrana por esta causa. Además el tiempo de tratamiento y manipulación de las células es menor. Es posible que estos factores contribuyan a las diferencias antes mencionadas.

La selección magnética negativa permitió aislar linfocitos T con un alto grado de pureza (95%) y sin tratarlas con anticuerpos. Las células no tratadas es un aspecto importante, porque con esto se elimina la posibilidad de que, al ser reconocidos por anticuerpos para su purificación, se activen. La activación celular genera diversas vías de señalización que cambian el patrón de expresión de proteínas y esto puede alterar los resultados de la caracterización fenotípica. El 5% de la fracción no retenida no son linfocitos T, este porcentaje no afecta los resultados para casi todos los marcadores usados; sin embargo, la población de linfocitos T con TCR $\gamma\delta$ es menor a 5%. Los

valores obtenidos para esta subpoblación es comparable con otros previamente reportados (Harris *et al.*, 1992), por lo que el 5% de contaminación parece no afectar estos resultados.

En el análisis fenotípico, para verificar el sistema de marcaje se comparó el fenotipo de CMN de cordón y adulto con los resultados reportados por Harris *et al.* (1992) y por Motley *et al.* (1995, **tabla 7**). Las semejanzas en los porcentajes nos sugieren que el sistema de marcaje y análisis es adecuado.

En cultivo, el reconocimiento de ALL-R de los linfocitos T sin activar es del 8%; mientras que, en linfocitos T con 36 horas de activación el reconocimiento se incrementó al 40% y a las 48 horas, disminuyó al 32%. Lo anterior significa que por la activación, ALL-R se une a la lectina cinco veces más que en reposo. Lo que sugiere que esta glicoproteína se encuentra asociada a los procesos de activación de los linfocitos T en la respuesta inmune. El incremento en el reconocimiento de ALL-R se puede deber a toda la glicoproteína o únicamente a la porción sacarídica. La glicoproteína en la cual se encuentra el antígeno T, puede incrementar su expresión en la población de linfocitos T después de la activación. Aunque no se descarta la posibilidad de que se expresen otras glicoproteínas en los linfocitos T que lo contengan. Por otro lado, la parte proteica de la glicoproteína puede mantener su nivel de expresión y ser la región sacarídica, la parte que experimente modificaciones. Por ejemplo, que se exprese *de novo* sobre la proteína, o bien, que en estado de reposo alguna estructura impida el reconocimiento y por la activación se modifique o se elimine permitiendo un mayor reconocimiento. Lo anterior se ha observado con el decaacárido biantenarico $\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 3(\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 2\text{Man}\alpha 6)\text{Man}\beta 4\text{GlcNAc}\beta 4(\text{Fuc}\alpha 6)\text{GlcNAc}$ donde la adición de $\text{GlcNAc}\beta 4$ a la $\text{Man}\beta 4$, fija la posición del brazo $\text{Man}\alpha 6\text{Man}$ en una de las dos posibles conformaciones, lo que disminuye el reconocimiento del decaacárido por la lectina Con-A (Piller *et al.*, 1988).

Se han demostrado cambios en las estructuras sacarídicas durante la activación de los linfocitos T, estos incluyen variaciones de la expresión de glicosidasas y glicosiltransferasas. Por ejemplo, la activación de los linfocitos T humanos, determina un decremento en la movilidad electroforética de la leucosialina por la modificación

Tabla 7- Fenotipo de CMN del cordón y del adulto. Comparación con los datos reportados por Harris (1992) y por Motley (1995).

	CMN del cordón			CMN del adulto		
	Vargas J*	Harris et al.	Motley et al.	Vargas J*	Harris et al.	Motley et al.
CD4	37	29		40	38	
CD8	29	17		29	22	
TCR $\alpha\beta$	58	45		61	63	
TCR $\gamma\delta$	6	1		4	3	
CD45RA	82	84	87	55	53	50

* Resultados obtenidos en el presente trabajo.

de su estructura sacarídica y esto es causado aparentemente por un decremento de actividad de la transferasa de siálico α 2-6 y paralelamente por la activación de la transferasa de GlcNAc β 1-6 (Piller *et al.*, 1988). Así mismo, los linfocitos T CD8⁺ muestran un incremento en el reconocimiento de Gal mediante la lectina PNA en la estructura Gal β 1-3GalNAc-O-Ser/Thr por efecto de la activación. Este incremento correlaciona con la actividad de la neuraminidasa, la que posiblemente contribuye al fenotipo PNA⁺ (células reconocidas por la lectina PNA), al cortar residuos de Neu5Ac que impiden el reconocimiento por la lectina (Galvan *et al.*, 1998). También se ha mostrado la modulación negativa de las estructuras sacarídicas por la activación. La 9-O-acetilación sobre Neu5Ac de mucinas de células T CD4⁺, de modelo murino, disminuye su expresión del 95 al 60% por la activación (Krishna y Varki, 1997).

En modelos murinos, ALL-R no se detecta en timocitos corticales pero es detectada en timocitos medulares que están más maduros (Lascurain *et al.*, 1994; Lascurain *et al.*, 1997). En humanos, cuando los linfocitos T salen a circulación, la glicoproteína es detectada en un 8% de ellos y cuando son activados, en un 40%. Esto sugiere que ALL-R puede tener un papel en la regulación celular, modulando el desarrollo y la activación temprana de los linfocitos T. El análisis de doble inmunofluorescencia con ALL-FITC y ADN-IP, mostró que los linfocitos T ALL⁺ después de 36 horas de activación, presentaron las fases G₀-G₁, S y G₂-M. Para determinar si el incremento en el reconocimiento de ALL-R se debe a que las células entran en fase S se hicieron estudios con doble inmunofluorescencia con Brdu-FITC y ADN-IP. En linfocitos T en estado de reposo (no activados), el reconocimiento del ALL-R es del 8% pero, después de 36 horas de activación, es del 40% (figura 15). Esto indica un incremento de 32% en el reconocimiento por efecto de la activación. Por otro lado, a las 36 horas de activación las células en fase S son 32%. En este período, el porcentaje de células en fase S correlaciona con el incremento en el reconocimiento de ALL-R. Estos resultados sugieren que en los procesos tempranos de activación, los linfocitos T que están en la fase S del ciclo celular, expresan el ALL-R.

Los datos anteriores fueron confirmados mediante la determinación del antígeno Ki-67, el cual es parte de la subunidad alfa de la topoisomerasa II. Esta subunidad se

sintetiza únicamente durante la duplicación del ADN cuando la célula se va a dividir, por lo que su detección con anticuerpos es una señal confiable de que la célula está en proceso de proliferación.

La lectina ALL no induce proliferación linfocitaria, como se ha demostrado con trabajos previos en el laboratorio, por lo que se puede usar como marcador de activación sin tener el problema de que sea un agente mitogénico. Tal como se ha mostrado en este y otros trabajos, las lectinas son una de las herramientas más importantes para el estudio de las estructuras sacarídicas y de sus modificaciones. Por esta razón el área de investigación en lectinas está en constante crecimiento. En particular, la lectina ALL que reconoce la estructura Gal β 1-3GalNAc-O-Ser/Thr y como se ha mostrado en este trabajo, está asociada a la activación y a la fase S del ciclo celular, resulta ser una herramienta en el estudio de los procesos tempranos de activación y de la regulación celular.

CONCLUSIONES

1- El receptor linfocitario para ALL es una glicoproteína de 70 kDa y tiene una composición de 148 residuos aminoácidos de Ser y Thr y 19, de Pro por molécula, lo que sugiere, que el receptor tiene posibles sitios de O-glicosilación.

2- En el adulto humano, los linfocitos T ALL⁺ tienen un fenotipo predominante CD4/CD45RO con TCR $\alpha\beta$; mientras que en el cordón umbilical, el fenotipo predominante es CD4/CD45RA con TCR $\alpha\beta$.

3- ALL-R se encuentra asociado a los procesos de activación temprana de los linfocitos T en la respuesta inmune.

4- ALL-R se encuentra asociado a la fase S del ciclo celular de linfocitos T de humano adulto.

5- ALL-R se expresa en linfocitos T vírgenes, en reposo y que se encuentran en las primeras fases de activación celular.

PERSPECTIVAS

Determinar en linfocitos T de cordón umbilical, si hay incremento en el reconocimiento de ALL-R durante la activación temprana y si el incremento está asociada a la fase S.

Determinar si el incremento en el reconocimiento de ALL-R durante la activación de linfocitos T, se debe a una sola glicoproteína, a isoformas de la misma o a otras glicoproteínas. Esto se puede determinar con el perfil electroforético, perfil electroforético bidimensional o una cromatografía de intercambio iónico (FPLC, fast protein liquid chromatography) de un lisado de linfocitos T activados.

Comprobar la asociación ALL-R con la fase S con triple inmunofluorescencia con ALL-B, ADN-IP y Brdu-FITC.

Determinar la secuencia de ALL-R con el uso de compuestos o enzimas para liberar el grupo amino terminal, o con el uso de otros métodos de secuenciación.

Determinar cuales glicosiltransferasas o glicosidasas participan en el incremento del reconocimiento de ALL-R.

Determinar si hay una expresión diferencial de ALL-R en corteza y en médula tímica humana, tal como sucede en murinos.

GLOSARIO

Anticuerpos Glicoproteínas del suero sanguíneo que se unen a moléculas específicas llamadas antígenos y son producidas en respuesta a su presencia. Los anticuerpos se unen a los patógenos portadores del antígeno y los neutralizan o los preparan para que sean destruidos por células fagocíticas o neutrófilos. Cada molécula de anticuerpo tiene una estructura única que le permite unirse a un antígeno específico y además todos los anticuerpos tienen la misma estructura general por lo que son conocidos como inmunoglobulinas.

Antígeno Moléculas que reaccionan con los anticuerpos. Generalmente tienen la capacidad de generar anticuerpos, pero algunos no tienen esta capacidad. Solo los antígenos que pueden inducir la producción de anticuerpos se llaman inmunógenos.

Antigenicidad Capacidad de inducir la respuesta inmune adquirida.

Carbohidrato Polihidroxialdehído o polihidroxiketona que puede ser hidrolizado en sus unidades básicas. Tienen una composición acorde a la fórmula $(CH_2O)_n$ e incluye muchas sustancias derivadas. Generalmente contienen monosacáridos unidos, formando oligómeros o polímeros, éstos también son conocidos como oligosacáridos, polisacáridos o más generalmente como sacáridos, cadenas de azúcares o glicanos (Varki *et al.*, 1999).

Cychrome Compuesto que después de ser excitado, emite radiación a 650 nm; su fluorescencia es detectada en el canal FL3 del citómetro.

Marcadores de superficie:

CD3+ Linfocitos T

CD3+CD4+ Linfocitos T cooperadores

CD3+CD8+ Linfocitos T citotóxicos

CD11b+ "Células asesinas naturales" y células mieloides

CD14+ Macrófagos

CD16+ Macrófagos, "células asesinas naturales" y neutrófilos

CD19+ Linfocitos B

CD36+ Plaquetas, monocitos y células endoteliales

CD45RA+ Linfocitos T vírgenes (maduros, no activados)

CD45RO+ Linfocitos T de memoria

Glicano Es la parte carbohidrato de un glicoconjugado

Glicoconjugado Proteína o lípido que contiene uno o más monosacáridos u oligosacáridos unidos covalentemente.

Hapteno Molécula que se une a un anticuerpo, pero que no puede generar por sí misma una respuesta inmune adaptativa.

Inmunógeno Cualquier molécula que pueda originar una respuesta inmune adaptativa. Antígeno que puede inducir la producción de anticuerpos.

Isotipo Cada una de las clases de inmunoglobulinas: IgA, IgG (1, 2_a y 2_b), IgD, IgE e IgM.

Ki-67 Antígeno de proliferación. Es parte de la subunidad alfa de la topoisomerasa II. Este antígeno se detecta únicamente cuando la célula se está dividiendo.

Linfocitos vírgenes son linfocitos maduros que nunca se han encontrado con su antígeno específico y así, nunca han respondido a él. Todos los linfocitos que dejan los órganos linfoides centrales son vírgenes. Los del timos, son linfocitos T vírgenes, los de la médula ósea son linfocitos B vírgenes (Janeway y Travers 1997).

Linfocitos de memoria son linfocitos que ya se han encontrado con su antígeno específico y tienen la capacidad de responder más rápido y más efectivamente ante siguientes encuentros con su antígeno. Tienen la característica de ser específicos y de vivir más (Janeway y Travers 1997).

Monosacárido es un carbohidrato que no se puede hidrolizar en una unidad más simple. Tienen un grupo carbonilo potencial en un extremo de la cadena (aldehído) o en el interior de la cadena (cetona).

TCR $\alpha\beta$ + Células que expresan el receptor de célula T $\alpha\beta$.

TCR $\gamma\delta$ + Células que expresan el receptor de célula T $\gamma\delta$.

APÉNDICE A: citometría de flujo

El análisis por citometría de flujo permite la medición de características físicas de una célula como: el tamaño relativo, la granularidad relativa y la intensidad de fluorescencia relativa. La medición se realiza mientras las células pasan en fila simple a través de un rayo láser del aparato de medición (citómetro de flujo) y se basa en el grado de dispersión de luz o en la fluorescencia emitida. Así, el análisis de **dispersión de luz** de las CMN genera un gráfico de puntos como el indicado en la **figura 15A**. En este gráfico, cada punto representa una célula y en él se detectan linfocitos, monocitos y granulocitos los cuales se pueden diferenciar entre sí, por su tamaño y por su granularidad. Así mismo, el **análisis de la fluorescencia** emitida por fluorocromos unidos específicamente a una célula, puede permitir conocer: su identidad; si expresa moléculas en su superficie; en su interior; o si tiene cambios en su ADN. Para los análisis de fluorescencia, se utilizan lectinas o anticuerpos conjugados a fluorocromos (FITC, PE, "Cychrome" o IP) que se unen a moléculas de la célula. Estos fluorocromos cuando son excitados por el rayo láser emiten diferentes fluorescencias que son detectadas por tres canales diferentes del citómetro. El canal FL1 detecta la fluorescencia de 530 nm, emitida por la fluoresceína; el canal FL2 detecta la fluorescencia de 585 nm, emitida por PE e IP; y el canal FL3 detecta la fluorescencia de 650 nm, emitida por Cychrome. Así, cuando la célula pasa a través del rayo láser, sus características se determinan por el tipo de fluorescencia que emite.

Un ejemplo de análisis con fluorescencia: El análisis por citometría de flujo de las CMN de humano incubadas con anti-CD3-FITC (anticuerpo conjugado a fluoresceína que reconoce linfocitos T) y anti-CD4-PE (anticuerpo conjugado a ficoeritrina que reconoce células cooperadoras), genera un gráfico del tipo mostrado en la **figura 15B**. Para la generación de los cuadrantes en este tipo de gráficos, se utilizaron las células testigo de autofluorescencia (células que no se incubaron con los anticuerpos); el registro de éstas células se ubicó, con controles manuales, en el extremo inferior izquierdo del gráfico y tomándolas como referencia, generó el cuadrante inferior izquierdo (II); automáticamente se formaron los cuadrantes inferior derecho (ID), superior izquierdo (SI) y el superior derecho (SD). Posteriormente, con

los cuadrantes ya ubicados se analizaron las células experimentales; en este ejemplo, el 70% de CMN son CD3+ (linfocitos T, ubicados en los cuadrantes ID y SD), el 50% son CD4+ (células cooperadoras, ubicadas en los cuadrantes SI y SD), el 45% son CD3+CD4+ (linfocitos T cooperadores, ubicados en el cuadrante SD) y el 25% son CMN que no fueron reconocidas, por lo que no son linfocitos T ni células cooperadoras y se ubicaron en el cuadrante II. En este ejemplo y tal como ocurre en muchos de los análisis presentados en este trabajo, **la suma de los porcentajes no es el 100%**, sino que es mayor; esto es porque muchas de las células expresan dos o más las moléculas analizadas en su superficie, es decir son dobles o triples positivas, y por lo tanto, la suma de sus porcentajes es mayor al 100%.

Análisis por citometría de las fases del ciclo celular. Los linfocitos en estado de reposo están en fase G₀ del ciclo celular. Su ADN se encuentra contenido en la cromatina y su cantidad se conoce como 1X. Cuando los linfocitos se activan, inician su proliferación y pasan por cuatro fases distintas, G₁, S, G₂ y M (**figura 15C**). En la fase G₁ se sintetiza ARN y proteínas, mientras que el contenido de ADN permanece constante (1X). La fase de síntesis (S) comienza con la duplicación del ADN. Con el ADN duplicado (2X) la célula se encuentra en la fase G₂ y se prepara para la mitosis (M). En M, el contenido de ADN es 2X hasta que la célula se divide en dos células hijas, y en cada una de ellas queda un juego de cromosomas (1X) (Lodish *et al.*, 2000; Training manual, 1995). Para el análisis por citometría de flujo, los linfocitos T activados con Con-A y fijados en solución de etanol y glicina, se lavaron dos veces con PBA. Posteriormente se incubaron con ALL-FITC a 4°C durante 15 minutos en oscuridad y se lavaron dos veces con PBA. Las células se incubaron con IP a 4°C durante 30 minutos en oscuridad y enseguida se analizó en el citómetro de flujo en los canales FL1 para ALL-FITC y FL2 para el ADN-IP. En este análisis fue importante la **discriminación de las células aglutinadas en pares (1X+1X)**, que pudieran confundirse con células en las fases G₂ y M (2X) (**figura 15D**), ambas con dos juegos de cromosomas. Para esto, se generó una ventana de análisis de cantidad de ADN contra ancho del pulso detectado. En esta ventana se eligió la región (R1) de los linfocitos T que están incrementando su ADN y se discriminaron las células pareadas

con el doble de ADN, pero también con el doble de diámetro (**figura 15E**). Con esta región, se generó una segunda ventana para analizar los linfocitos que se unieron a la lectina ALL, y su ADN (**figura 15F**). En esta segunda ventana, las células en las fases G_0+G_1 se colocaron en el valor 200 del eje correspondiente al ADN (este eje debe ser lineal). Los linfocitos en las fases G_2+M con doble juego de cromosomas, se distribuyeron por sí mismos, en el valor 400. Las células que se distribuyeron entre 200 y 400 se encontraron en fase S (con más de un juego de cromosomas y menos de 2). Los **cuadrantes en los gráficos** de este tipo, se hicieron tomando como referencia linfocitos T que no se incubaron con la lectina ALL. Se generó así, un cuadrante superior en el que se ubicaron las células que se unieron a la lectina y un cuadrante inferior, en el que se ubicaron las células que no se unieron.

APÉNDICE B: respuesta inmune

La respuesta inmune adaptativa es una respuesta específica de los linfocitos a un antígeno extraño, incluye el desarrollo de memoria inmunológica y es generada por la selección clonal de linfocitos. También se llama respuesta inmune adquirida. Al ingresar un inmunógeno al cuerpo y ser capturado por alguna célula presentadora de antígeno (APC), se inicia la respuesta inmune (**figura 16**). La APC lo procesa (1) y presenta a los linfocitos T cooperadores (CD4+) especializados. Estos se activan (2) y se diferencian en los tipos Th1 o Th2. Los linfocitos Th1 activan a los linfocitos citotóxicos (CD8+) que al contactar a su célula blanco determinan su muerte (respuesta inmune celular, 3). En la respuesta inmune humoral (4), los linfocitos Th2 activan a los linfocitos B (CD19+) que proliferan y algunos se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos contra el antígeno. Las células activadas, además de realizar sus funciones efectoras, algunas se diferencian en células de memoria (5), las cuales en futuras infecciones tienen la capacidad de desencadenar la respuesta inmune más rápidamente (Goodman, 1996).

Respuesta inmune innata Incluye las primeras etapas de la respuesta del huésped a la infección, con una variedad de mecanismos de resistencia que reconocen y responden a la presencia de un patógeno. No se incrementa con la exposición repetida de un patógeno dado y no discrimina entre patógenos. Es seguida de la respuesta inmune adaptativa (Janeway *et al.*, 1997).

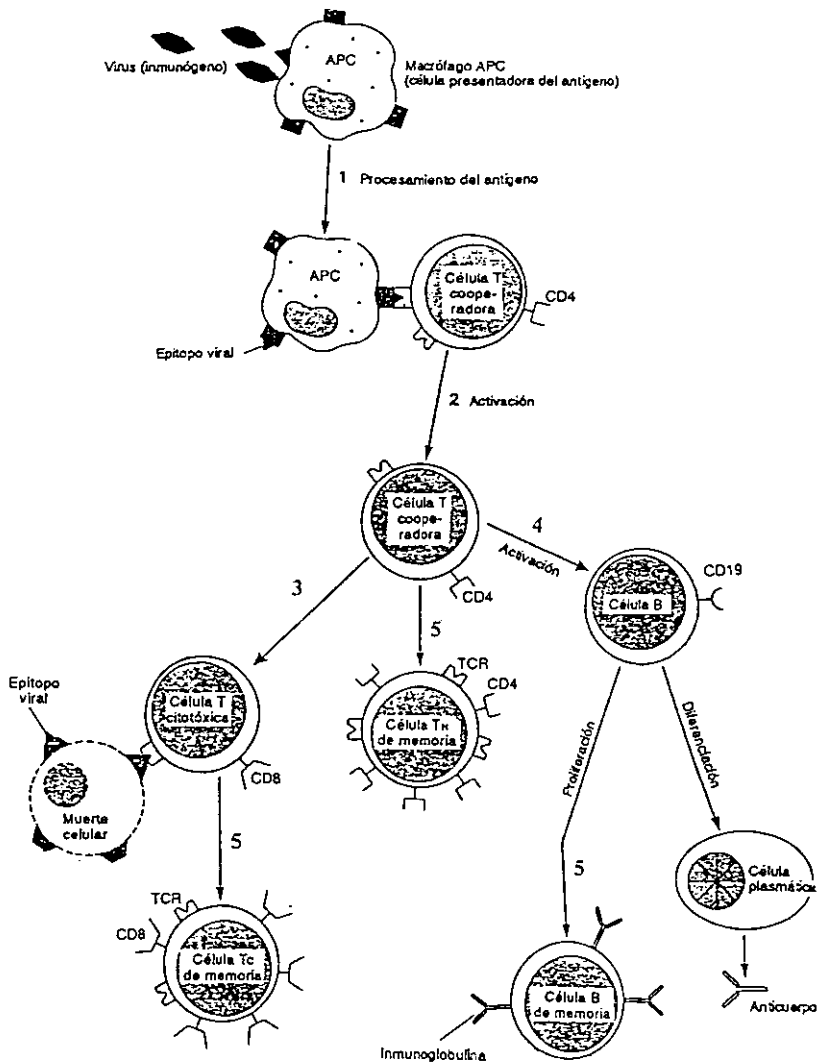


Figura 16- La respuesta inmune adaptativa. La APC captura un inmunógeno y lo procesa (1). Presentación de algunos péptidos unidos al MHC a los linfocitos T cooperadores (CD4+) especializados. Estos se activan (2) y se diferencian en los tipos Th1 o Th2. Los linfocitos Th1, activan a los linfocitos citotóxicos (CD8+) que al contactar a su célula blanco, determinan su muerte (respuesta inmune celular, 3). En la respuesta inmune humoral (4), los linfocitos Th2 activan a los linfocitos B (CD19+) que proliferan y algunos se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos contra el antígeno. Las células activadas, además de realizar sus funciones efectoras, algunas, se diferencian en células de memoria (5), las cuales en futuras infecciones, tienen la capacidad de desencadenar la respuesta inmune más eficaz y más rápidamente (Modificado de Goodman, 1996).

REFERENCIAS

- Almici C, Carlo-Stella C, Wagner J, Mangoni L, Garau D, Rizzoli V 1997 Biologic and phenotypic analysis of early hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood *Leukemia* 11:2143-2149.
- Alvarez G, Lascurain R, Pérez A, Degand P, Montaña L, Martínez-Cairo S, Zenteno E 1999 Relevance of sialoglycoconjugates in murine thymocytes during maturation and selection in the thymus *Immunol Invest* 28:9-18.
- Becton Dickinson. Training manual de FACSCalibur. San José, California: Becton Dickinson Immunocytometry Systems, 1995:8,1-8,45.
- Bidlingmeyer B, Cohen S, Tarvin T 1984 Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization *J Chromatogr* 33: 93-104.
- Bjorkman P, Saper M, Samraoui B, Benner W, Strominger J, Wiley D 1987 The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens *Nature* 329:512-518.
- Bradford M 1976 A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye-binding *Anal Biochem* 37:157-223.
- Buckie W, Cook G 1986 Specific isolation of surface glycoproteins from intact cells by biotinylated concanavalin A and immobilized streptavidin *Anal Biochem* 156:463-472.
- Chilson O, Boylston A, Crumpton M 1984 *Phaseolus vulgaris* phytohaemagglutinin (PHA) binds to the human T lymphocyte antigen receptor *EMBO J* 3:3239.3245.
- Chilson O, Kelly-Chilson A 1989 Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes *Eur J Immun* 19:389-396.

Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C 1988 The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble *Annual Rev Immunol* 6:629-662.

De Maio A, Lis H, Gershoni J, Sharon N 1986 Identification of glycoproteins that are receptors for peanut agglutinin on immature (cortical) mouse thymocytes *FEBS Lett* 194:28-32.

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

Gardner J, Rosenzweig M, Marks D, Harper D, Gaynor K, Fallon R, Wall D, Johnson R, Scadden D 1998 T-lymphopoietic capacity of cord blood-derived CD34+ progenitor cells *Exp Hematol* 26:991-999.

Goodman J. La respuesta inmunitaria. En: Stites D, Terr A, Parslow T, ed. Inmunología básica y clínica. 8° edición. México: Manual Moderno, 1996:51-63.

Harris D, Schumacher M, Locascio J, Besencon F, Olson G, Dominick D, Shenker L, Bard J, Boyse E 1992 Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes *Proc Natl Acad Sci, USA* 89:10006-10010.

Hernández P, Bacilio M, Porras F, Juárez S, DeBray H, Zenteno E, Ortiz B 1999 A comparative study on the purification of the *Amaranthus leucocarpus* syn. *Hypocondriacus* lectin *Prep Biochem Biotechnol* 29:219-234.

Janeway C, Travers P, Hunt S, Walport M. Immunobiology. New York: Garland Publishing Inc, 1997:G1-G21.

Kaku H, Morini Y, Goldstein I, Shibuya N 1993 Monomeric, monovalent derivative of *Maackia amurensis* leucoagglutinin. Preparation and application to the study of cell surface glycoconjugates by cytometry *J Biol Chem* 268:13237-13241.

Kanellopoulos J, De Petris S, Leca G, Crumpton M 1985 The mitogenic lectin from *Phaseolus vulgaris* does not recognize the antigen of human T lymphocytes *Eur J Immunol* 15:479-486.

Krishna M, Varki A 1997 9-O-Acetylation of sialomucins: A novel marker of murine CD4 T cells that is regulated during maturation and activation *J Exp Med* 185:1997-2013.

Laemmli U 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 *Nature* 227:680-685.

Lascurain R, Chávez R, Gorocica P, Pérez A, Montaña L, Zenteno E 1994 Recognition of a CD4+ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin *Immunol* 83:410-413.

Lascurain R, Porras F, Baez R, Chávez R, Martínez Cairo S, Alvarez G, Zenteno E 1997 *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes human naive T cell subpopulations *Immunol Invest* 26:579-587.

Licastro F, Lizabeth J, Morini M 1993 Lectins and superantigens: Membrane interactions of these compounds with T lymphocytes affect immune responses *Int J Biochem* 25:845-852.

Lis H, Sharon N 1998 Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition *Chem Rev* 98:637-674.

Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Molecular cell biology. New York: W H Freeman and Company, 2000:495-500.

Lucivero G, Dalla M, Bresciano E, Loria M, Pezone L, Mancino D 1996 Functional characteristics of cord blood T lymphocytes after lectin and anti-CD3 stimulation. Differences in the way T cells express activation molecules and proliferate *Int J Clin Lab Res* 26:255-261.

Montreuil J. Glycoprotein structure and conformation: An Overview. En: Vebert A, ed. Methods on glycoconjugates. Lille, Francia: Harwood Academic Publishers, 1995:1-23.

Motley D, Meyer M, King R, Naus G 1995 Determination of lymphocyte immunophenotypic values for normal full-term cord blood *Hematopathol* 105:38-43.

Mrkoci K, Kelm S, Crocker P, Schauer R, Berger E 1996 Constitutively hyposialylated human T-lymphocytes clones in Tn-syndrome: binding characteristics of plant and animal lectins *Glycoconj J* 13:567-573.

Muraoka S, Shulman M 1989 Structural requirements for IgM assembly and cytolytic activity. Effects of mutations in the oligosaccharide acceptor site at Asn402 *J Immunol* 142:695-701.

Nowell P 1960 Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes *Cancer Res* 20:462-466.

Piller F, Piller V, Fox IR, Fukuda M 1988 Human T-lymphocyte activation is associated with changes in glycans biosynthesis *J Biol Chem* 263:15146-15150.

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

Reisner Y, Ravid A, Sharon N 1976b Use of soybean agglutinin for the separation of mouse B and T lymphocytes *Biochem Biophys Res Commun* 72:1585-1591.

Roth J 1987 Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells *Biochem Biophys Acta* 906:405-430.

Savage D, Mattson G, Desai S, Nielander G, Morgensen S, Conklin E. Avidin-biotin chemistry. A handbook. Rockford, IL: Pierce Chemical Company, 1992:25-42.

Taylor M, Conary J, Lennatz M, Stahl P, Drickamer K 1990 Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate recognition domains *J Biol Chem* 265:12156-12162.

The T, Feltkamp E 1970 Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies I. Experiments on the conditions of conjugation *Immunol* 18:865-873.

Tift C, Proia R, Camerini-Otero R 1992 The folding and cell surface expression of CD4 requires glycosylation *J Biol Chem* 267:3268-3273.

Varki A 1997 Sialic acids as ligands in recognition phenomena *FASEB J* 11:248-255.

Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. Essentials of glycobiology. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999:1-15, 429-440.

Voet D, Voet J 1990 Biochemistry. John Wiley & Sons. New York 1223p.

Zenteno E, Lascurain R, Montaña L, Debray H, Montreuil J 1992 Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin *Glycoconjugate J* 9:204-208.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA