



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

LA EXPRESIÓN DE O-GLICANOS EN LINFOCITOS T CD4+ DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO SE ASOCIA INVERSAMENTE CON LA ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

EDGAR GUSTAVO RAMOS MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. FRANCISCO BLANCO FAVELA

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

FACULTAD DE MEDICINA

CD. MX. AGOSTO DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, de la Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social y en el Laboratorio de Inmunología del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Francisco Blanco Favela.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el proyecto 113815 y por el proyecto PAPIIT (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica) IN 204315.

El sustentante fue becario del CONACYT con registro de becario número 263070, durante sus estudios de doctorado.

Agradecimientos.

Agradezco al CONACyT y a la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Al Dr. Francisco Blanco Favela por sus enseñanzas.

Al comité tutor:

- Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo
- Dr. Edgar Zenteno Galindo

A los miembros de jurado:

- Dr. Enrique Ortega Soto
- Dr. Roberto A. Arreguin Espinosa de los Monteros
- Dr. Armando Pérez Torres
- Dr. José Moreno Rodríguez

A mis padres **Amalia Martínez** y **Juan Ramos**, porque en todo momento estuvieron conmigo comprendiéndome y apoyándome.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
Alteraciones en la activación de los linfocitos T de pacientes con LES.	9
Alteraciones en moléculas coestimuladoras y de adhesión.	11
Alteraciones en las balsas lipídicas.....	15
Alteraciones en la Apoptosis de LT.....	17
Alteraciones en LT doble negativos de pacientes con LES.	17
Alteraciones en linfocitos T reguladores.	18
Glicosilación.....	19
Papel de la glicosilación en la regulación del sistema inmune.	23
Lectinas.....	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	28
Objetivos específicos	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
RESULTADOS.....	32
Reconocimiento de las lectinas en células mononucleares de sangre periférica.	32
Reconocimiento de ALL y jacalina en linfocitos T de pacientes con LES.	36
ALL y Jacalina no compiten por sus receptores.....	38
Los linfocitos T de pacientes con LES no presentan diferencias en la expresión de ácido siálico.	39
La expresión de ligandos para ALL en LT CD4+ y el porcentaje de células ALL+ correlaciona inversamente con el SLEDAI.....	41

Los cambios en O-glicosilación detectados por ALL se presentan tanto en LT activos como en LT reguladores.	42
La MIF de ALL en LT CD4 correlaciona inversamente con el porcentaje de células dobles negativas (DN) en pacientes con LES.....	44
El reconocimiento de ALL no correlaciona con la apoptosis de LT de pacientes con LES.	46
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES.....	52
PERSPECTIVAS.....	52
BIBLIOGRAFIA	53

ABREVIATURAS

ALL	Lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i>
ANOVA	Análisis de varianza
AP1	Proteína de activación 1
BAFF	Factor activador de células B
C1GalT-1	Core 1 β 1-3 galactosiltransferasa
C2GnT	Core 2 β 1-6 N-acetilglucosaminiltransferasa
CD	Grupo de diferenciación
CMNs	Células mononucleares
CMP	Citidina monofosfato
Cosmc	Chaperona molecular específica de β 3-gal core 1
CREM	Elemento modulador de respuesta a adenosina monofosfato cíclico
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico
DN	Células dobles negativas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Elf-1	Factor tipo E-74
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular
FcR γ	Cadena gama del receptor Fc
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GlcNAc	N-acetilglucosamina
HLA-DR	Antígeno leucocitario humano-DR
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
ICOS	Coestimulador inducible
IFN- γ	Interferón γ
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
ITAMs	Motivo de activación de inmunoreceptor basado en tirosina
jacalina	Lectina de <i>Artocarpus integrifolia</i>

LAG-3	Gen de activación de linfocitos 3
LAT	Proteína adaptadora del linfocito T
LCK	Proteína tirosina cinasa específica de linfocitos
LES	Lupus eritematoso sistémico
LFA-1	Antígeno asociado a la función linfocítica 1
LT	Linfocitos T
LTreg	Linfocito T regulador
MAA	Lectina de <i>Maackia amurensis</i>
MGL	lectina del macrófago de unión a galactosa
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MIF	Mediana de la intensidad de fluorescencia
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
OAS2	2'-5'-oligoadenilato sintetasa
PNA	Aglutinina de <i>Arachis hypogaea</i>
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
ppGalNAcT	N-acetil-galactosaminiltransferasa
RNA	Ácido ribonucleico
Ser	Serina
SLEDAI	Índice de actividad de la enfermedad del lupus eritematoso sistémico
SLP-76	Proteína ligadora que contiene el Dominio sh2 de 76 kDa
SNA	Lectina de <i>Sambucus nigra</i>
ST3Gal	α 2-3 sialiltransferasa
ST6GalNAc	α 2-6 sialiltransferasa
SYK	Tirosina cinasa del bazo
TCR	Receptor de linfocitos T
TGF- β	Factor de crecimiento transformador β
Thr	Treonina
TNF	Factor de necrosis tumoral
UDP-GalNAc	difosfato de uridina-GalNAc

VVL	Lectina de <i>Vicia Villosa</i>
β 3GnT-3	β 1-3 N-acetilglucosaminiltransferasa
β 4GalT	β 1-4 galactosiltransferasa

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Biosíntesis del core 1 y core 2 de los O-glicanos.....	22
Figura 2. Reconocimiento de las lectinas en LT CD4+.....	34
Figura 3. Reconocimiento de las lectinas de ALL y jacalina en LT CD4+ de pacientes con LES e individuos sanos.....	37
Figura 4. ALL y jacalina no compiten por los mismos receptores.....	39
Figura 5. Linfocitos CD4+ de pacientes con LES no presentan alteraciones en la expresión de ácido siálico.	40
Figura 6. El reconocimiento de ALL en LT CD4+ de pacientes con LES correlaciona inversamente con el índice de actividad SLEDAI.....	42
Figura 7. Linfocitos T CD4+ activos y reguladores muestran una disminución en la expresión de O-glicanos y un bajo porcentaje de células reconocidas por la lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i> (ALL).....	43
Figura 8. La MIF de ALL en LT CD4 correlaciona inversamente con el porcentaje de células dobles negativas (DN) en pacientes con LES.....	45
Figura 9. Reconocimiento de ALL no correlaciona con apoptosis.....	47
Tabla 1. Características clínicas de la población de estudio.....	33

RESUMEN

Objetivo: Los linfocitos T (LT) de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) presentan una disminución en el umbral de activación e incremento en la apoptosis. Estos procesos son regulados en parte por la O-glicosilación de receptores de membrana. Por lo que en este estudio evaluamos por citometría de flujo el patrón de O-glicosilación de LT de pacientes con LES y su relación con actividad de la enfermedad.

Métodos: Por medio de citometría de flujo se determinó el patrón de O-glicosilación en LT CD4+ de pacientes con LES y de individuos sanos usando las lectinas de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) y *Artocarpus integrifolia* (jacalina).

Resultados: Con ALL, pero no con jacalina, se observaron alteraciones en el patrón de O-glicosilación en LT de pacientes con LES. Se encontró disminución en el porcentaje y en la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) de los LT CD4+ALL+ de pacientes con LES activo. Además, se encontró una correlación negativa significativa entre el porcentaje y la MIF de LT CD4+ ALL+ y el índice de actividad de la enfermedad del lupus eritematoso sistémico (SLEDAI). No hubo diferencias en el reconocimiento de ALL entre los LT activos y los LT reguladores. No se encontró correlación entre el reconocimiento de ALL y el porcentaje de LT CD4+ en apoptosis.

Conclusión: Estos hallazgos sugieren que hay alteraciones en la glicosilación de LT de pacientes con LES y se correlacionan con la actividad de la enfermedad.

ABSTRACT

Objective: T lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) present a decreased activation threshold and increase in apoptosis. These processes are regulated partially by O-glycosylation of membrane receptors. Therefore, in this study we assessed through flow cytometry the O-glycosylation pattern of T lymphocytes in SLE patients and its relation with disease activity.

Methods: Through flow cytometry, the O-glycosylation pattern of T lymphocytes was determined in SLE patients and healthy individuals, using *Amaranthus leucocarpus* (ALL) and *Artocarpus integrifolia* (jacalin) lectins.

Results: With ALL, but not with jacalin, alterations in the O-glycosylation pattern were observed in SLE patients. A diminution in the percentage and median of the fluorescence intensity (MFI) of CD4+ALL+ T lymphocytes was found in active SLE patients. Significant negative correlation was found between the percentage and the MFI of CD4+ ALL+ T lymphocytes and the Systemic lupus erythematosus disease activity index (SLEDAI). There was no difference in the recognition by ALL on activated T helper cells and T regulatory (Treg) cells. No correlation was found between ALL recognition and the percentage of CD4+ T lymphocytes undergoing apoptosis.

Conclusion: These findings suggest alterations in T lymphocytes O-glycosylation in SLE patients that correlate with disease activity.

INTRODUCCIÓN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune, la cual puede afectar múltiples órganos y puede presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas. Se desarrolla principalmente en mujeres en edad reproductiva en una proporción de 9 mujeres por cada hombre (Sánchez-Rodríguez et al., 2004). Las tasas de incidencia y prevalencia difieren dependiendo del área de estudio. En los Estados Unidos la tasa de incidencia es de 5,1 casos por cada 100,000 habitantes por año y la de prevalencia es de 52 por cada 100,000 habitantes. En poblaciones asiáticas se ha determinado una incidencia anual de 3 a 5 casos cada por 100,000 habitantes y una prevalencia que oscila entre 30 a 60 casos por cada 100,000 habitantes (Cervera y Pallares et al., 2008).

En la etiopatogenia del LES se encuentran involucrados factores inmunológicos, genéticos, hormonales y ambientales que desempeñan un papel importante en la regulación de la tolerancia inmunológica (Liu y Davidson, 2012).

LES puede estar activo o inactivo, cuando está activo hay incremento en moléculas relacionadas con la activación de los LT como CD98, CD25, HLA-DR y CD38 (Alcocer-Valera et al., 1991). Además, hay aumento de los LT de memoria y producción de citocinas proinflamatorias (Ardoin y Pisetsky, 2008). En la clínica se utilizan varios índices para determinar la gravedad de los pacientes, uno de los más utilizados es el SLEDAI (Bombardier et al., 1992).

El suero de los pacientes con LES se caracteriza por presentar autoanticuerpos contra antígenos como el ácido desoxirribonucleico (DNA) de doble cadena, DNA de cadena sencilla, el ácido ribonucleico (RNA), ribonucleoproteínas (Ro, La, Sm) y antígenos del citoesqueleto (Cozzani et al., 2014). Los autoanticuerpos en los pacientes con LES son de alta afinidad y de clase inmunoglobulina (Ig) G, lo que indica que ocurre el cambio de isotipo para lo que se requiere la participación de los LT. Estudios han mostrado que los LT de pacientes con LES sobreexpresan la

molécula CD40L (Koshy et al., 1996; Desai-Mehta et al., 1996) lo que les permitirá una mayor interacción con los linfocitos B y así ayudar a su diferenciación, proliferación y cambio de isotipo.

La asociación de LES particularmente con alelos de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II y la maduración de la afinidad en la producción de autoanticuerpos de clase IgG, sugiere que los LT juegan un papel importante en la patogénesis (Gatto et al., 2013). Además, el papel fundamental de los LT en el desarrollo del LES se ve respaldado por estudios realizados en modelos murinos, como en los ratones NZB/NZW F1 (B/W), los cuales desarrollan una enfermedad tipo lupus, si en estos animales los LT son depletados por medio de anticuerpos monoclonales se logra evitar el desarrollo de la enfermedad (Wofsy y Seaman, 1987). Adicionalmente, la cruce de ratones NZB/NZW F1 (B/W) y ratones nu/nu, los cuales no tienen timo, produce ratones que no desarrollan lupus (Mihara et al., 1988).

Los pacientes con LES presentan alteraciones en los procesos de activación y apoptosis de LT (La Cava, 2008) o alteraciones en el número de subpoblaciones específicas de LT como los LT doble negativos y los LT reguladores (LT reg) (Mak y Kow, 2014; Ohl y Tenbrock, 2014).

En la siguiente sección revisaremos algunos aspectos sobre las alteraciones descritas en la activación de los LT de pacientes con LES y después en el proceso de apoptosis.

Alteraciones en la activación de los linfocitos T de pacientes con LES.

Los LT de pacientes con LES y de modelos murinos presentan un incremento anormal en el flujo de calcio citoplasmático e incremento en la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas señalizadoras al ser estimulados vía el complejo receptor de linfocitos T (TCR) comparado con LT de individuos sanos (La Cava, 2008; Moulton y Tsokos, 2011). Estas alteraciones en la señalización intracelular conllevan a un perfil alterado de citocinas, como una baja producción de interleucina 2 (IL-2) (Katsiari *et al.*, 2005).

Estos defectos se han relacionado con alteraciones en las proteínas señalizadoras del complejo TCR como la proteína CD3 ζ (Moulton y Tsokos, 2011). Normalmente esta proteína es fosforilada en los residuos tirosina de los motivos de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAMs) por acción de la proteína tirosina cinasa específica de linfocitos (LCK), al estimular los LT por vía TCR. Los ITAMs fosforilados de la cadena ζ de CD3 sirven para reclutar a la proteína de 70 kDa asociada a ζ (ZAP70), la cual es también fosforilada por LCK. ZAP70 fosforila a la proteína adaptadora del linfocito T (LAT) y a la proteína ligadora que contiene el dominio SH2 de 76 kDa (SLP-76) lo que desencadena tres vías de señalización río abajo y la posterior translocación de factores nucleares como el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), el factor nuclear de células T activadas (NFAT) y la proteína de activación 1 (AP1) (Abbas *et al.*, 2015).

En la mayoría de los LT de pacientes con LES se han descrito alteraciones tanto a nivel de la transcripción, el splicing y la traducción que contribuyen a la deficiente expresión de CD3 ζ , como del factor transcripcional Elf-1 (factor tipo E-74) el cual se une al promotor de CD3 ζ e induce su expresión en LT normales. En LT de pacientes con LES la forma funcional del Elf-1 se encuentra disminuida por alteraciones en los mecanismos postraduccionales (Juang *et al.*, 2002). Además, se ha descrito un incremento en la unión del represor transcripcional CREM (elemento modulador de respuesta a adenosina monofosfato cíclico) al promotor de CD3 ζ en

LT en LES comparado con LT normales y LT de pacientes con artritis reumatoide (Tenbrock et al., 2005).

Las alteraciones en el mecanismo de corte y empalme en LT de pacientes con LES dan lugar a la formación de varias formas alternativas del RNA mensajero (RNAm) de CD3 ζ , las cuales tienen baja estabilidad y llega a estar afectada su traducción (Nambiar et al., 2001; Chowdhury et al., 2005). Se ha observado un aumento en la ubiquitinación de CD3 ζ lo que media su proteólisis por el proteosoma (Nambiar et al., 2002), además de un incremento en la expresión de caspasa 3, que escinde a CD3 ζ , (Krishnan et al., 2005) y en la degradación lisosomal dependiente de HRES-1/Rab4 (Fernandez et al., 2009). Todos estos mecanismos conllevan a la disminución de CD3 ζ asociado al TCR.

En los linfocitos de estos pacientes se ha encontrado que la cadena FcR γ (cadena gamma del receptor Fc), molécula estructuralmente homologa a CD3, se asocia al complejo TCR en lugar de CD3 ζ . Por inmunoprecipitación se mostró que FcR γ se asocia a CD3 ϵ y SYK (Tirosina cinasa del bazo) en LT de pacientes con LES pero no en LT de individuos sanos (Enyedy et al., 2001). Puesto que SYK puede fosforilar otras SYK o ITAMS sin ayuda de Lck, al contrario de ZAP-70 que requiere la participación de esta cinasa, SYK podría acelerar la cinética de la fosforilación y producir las alteraciones encontradas en los LT de pacientes con LES. Esto se ve respaldado por estudios que muestran que al inducir la expresión de FcR γ en linfocitos de individuos sanos se observó que parte de esta proteína interaccionaba con el TCR en lugar de CD3 ζ . Al ser activadas estas células ocurre un incremento en la fosforilación de residuos de tirosina y en la concentración de calcio citosólico de manera similar a lo reportado en LT de pacientes con LES. Cuando los LT de pacientes con LES fueron transfectados con un vector que codificaba el CD3 ζ para forzar su expresión, se encontró que el incremento en la fosforilación de residuos tirosina y en la concentración de calcio citosólico inducido por estímulos TCR/CD3 se normalizó. La producción baja de IL-2 por LT en LES se atribuye principalmente a la expresión disminuida de la cadena p65 de NF-kB, lo cual queda confirmado por

el hecho de que el restablecimiento de la expresión de p65 en los LT transfectados con CD3 ζ produce niveles normales de IL-2 al ser estimulados. Además, la sobreexpresión de SYK en LT de individuos sanos reproduce los defectos encontrados en los LT de pacientes con LES, como son la sobreexpresión de CD44, IL-21, PP2A (proteína fosfatasa 2) y OAS2 (2'-5'-oligoadenilato sintetasa) (Grammatikos et al., 2013).

La inhibición de SYK con el fármaco R406 provoca una disminución en el flujo de calcio inducido por señales del TCR y disminuye la polimerización acelerada de actina observada en LT de pacientes con LES, en los cuales se ha observado una rápida polimerización de actina (Krishnan et al., 2008). Además, la inhibición de SYK con el fármaco R788 evita la manifestación de la enfermedad en ratones MLR/lpr y suprime el daño en hígado y piel en ratones con enfermedad establecida (Deng et al., 2010). El bloqueo de señales de SYK es un blanco terapéutico en LES (Grammatikos et al., 2013).

Alteraciones en moléculas coestimuladoras y de adhesión.

La expresión de varias moléculas que participan en las vías de coestimulación de los LT se encuentra alterada en los LT de pacientes con LES y éste es uno de los factores que participa en la disminución de la barrera de activación y en el fenotipo diferente que presentan los LT de pacientes con LES tras su activación (Moulton y Tsokos, 2011).

El ligando de CD40 (CD40L) es una proteína que pertenece a la superfamilia de receptores de TNF (factor de necrosis tumoral) y es expresado en LT activos para interactuar con CD40 expresado en linfocitos B, células dendríticas y macrófagos. CD40L desencadena señales para el cebado de LT, la proliferación dependiente de antígeno y la regulación de algunas funciones de LT CD8⁺ (Karimi y Pourfathollah, 2012).

Se ha observado que CD40L está sobreexpresado en LT de ratones propensos a lupus (Mohan et al., 1995; Blossom et al., 1997; Lettesjö et al., 2000). Además en algunos pacientes con LES se ha encontrado incremento en la expresión basal de CD40L en LT CD4+ y en el porcentaje de células CD4+CD40L+ comparado con individuos sanos, estos linfocitos después de ser activados sobreexpresan aún más esta molécula y mantienen su expresión por más tiempo que los linfocitos de individuos sanos (Koshy et al., 1996; Desai-Mehta et al., 1996).

En mujeres con LES se ha observado desmetilación en la secuencia regulatoria del gen de CD40L lo que ocasiona en parte la sobreexpresión de esta molécula (Lu et al., 2007). El tratamiento con inhibidores de la metilación han mostrado causar sobreexpresión de RNAm de CD40L lo que a su vez promueve una fuerte interacción de linfocitos B con LT y un incremento en la producción de autoanticuerpos (Zhou et al., 2009). La expresión de CD40L en pacientes con LES también puede ser incrementada por los estrógenos, ya que se ha reportado que al cultivar LT de pacientes con LES en presencia de estradiol hay un incremento en la expresión de CD40L y este es significativamente mayor al observado en LT de individuos sanos cultivados en las mismas condiciones (Rider et al., 2001)

Se ha reportado que al estimular LT con anticuerpos anti-CD3 y anti- CD40L estos se activan y secretan citocinas como interferón γ (IFN- γ), TNF α e IL10, sin la necesidad de estímulos vía CD28 (Blair et al., 2000). Puesto que los LT de pacientes con LES expresan mayores niveles basales de CD40L éste podría mediar la activación de linfocitos en LES. Lo anterior sugiere que el bloqueo de la interacción de CD40L y CD40 podría disminuir la producción de autoanticuerpos en LES y las manifestaciones clínicas. Sin embargo, los resultados de estudios en los cuales se ha bloqueado esta interacción por anticuerpos monoclonales (Sidiropoulos y Boumpas 2004; Kow y Mak 2013) no son muy alentadores. En ratones propensos a lupus el tratamiento con anti-CD40L puede retrasar el inicio de la enfermedad si el tratamiento es dado meses antes del inicio de los síntomas (Mohan et al., 1995) y se previene la producción de autoanticuerpos y el depósito de complejos inmunes

en el riñón; sin embargo, esto no evita que la enfermedad se desarrolle (Quezada et al., 2003). Más aún, en un ensayo doble ciego fase II de pacientes con LES moderado tratados con IDEC-131 (anti-CD40L) no se encontraron diferencias significativas en reducción de la actividad de la enfermedad (Kalunian et al., 2002). Otros estudios han mostrado complicaciones tromboembólicas del tratamiento con anti-CD40L. (Kawai et al., 2000; Boumpas et al., 2003).

El suero de pacientes con LES contiene títulos altos de CD40L soluble que correlacionan positivamente con los títulos de anticuerpos anti-DNA doble cadena y el SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) (Kato et al., 1999). Sin embargo, en otro estudio se encontró que los pacientes en remisión tienen mayores títulos de CD40L que los pacientes con enfermedad activa (Urquiza-Padilla et al., 2009).

Otra molécula de coestimulación que se ha encontrado alterada en LES es ICOS (coestimulador inducible) la cual es miembro de la superfamilia de receptores con dominios de inmunoglobulina, a la que también pertenece CD28. ICOS puede incrementar la proliferación y secreción de citocinas en células T al interactuar con su ligando CD275, el cual se expresa constitutivamente en linfocitos B y es inducible en células dendríticas y monocitos (Simpson et al., 2010). ICOS se sobreexpresa en LT CD4+ y CD8+ mientras que su ligando CD275 se encuentra disminuido en linfocitos B de memoria CD27+ en pacientes con LES, probablemente debido a su reciente interacción con LT ICOS+ (Hutloff et al., 2004; Yang et al., 2005). Los pacientes con nefritis lúpica sobreexpresan ICOS en los linfocitos CD4+CD45RO+ comparados con linfocitos de pacientes sin nefritis e individuos sanos. En biopsias de riñones de pacientes con nefritis lúpica se ha encontrado formación de estructuras parecidas a centros germinales en los cuales los linfocitos B y LT ICOS+ están en estrecho contacto (Hutloff et al., 2004; Li et al., 2012). En modelos murinos se ha observado que la expresión de ICOS en LT es requerida para la producción de citocinas inflamatorias y para la formación de lesiones

perivasculares en riñón, lo que sugiere que las vías de ICOS participan en la patogenia de la nefritis lúpica (Odegard et al., 2009).

La estimulación de los LT CD4+ y CD8+ de pacientes con LES por la vía de ICOS muestran defectos en la fosforilación de proteínas señalizadoras como la cinasa regulada por señal extracelular (ERK), hiperproliferación y baja producción de IL-2 (Yang et al., 2005; Gang et al., 2009). Se ha realizado un ensayo clínico fase Ib con anticuerpos anti-ICOS sin embargo todavía se esperan los resultados del ensayo ([78] NCT00774943, <http://www.clinicaltrials.gov/>).

El receptor CD28 pertenece a la superfamilia las inmunoglobulinas y es expresado en LT CD4+ y CD8+. Se une a CD80 y CD86 expresado en las células presentadoras de antígeno y promueve la proliferación y activación de los LT (Kow y Mak 2013). Se ha encontrado una disminución en el porcentaje de LT CD4+CD28+ de pacientes con LES comparado con individuos sanos, además de un incremento en el porcentaje de linfocitos B CD19+CD80+ (Alvarado et al., 1994; Kaneko et al., 1996; Hu et al., 2004). Los LT de pacientes con LES presentan mayor proliferación al ser estimulados con anti-CD28 y anti-CD3, que los linfocitos de individuos sanos (Alvarado et al., 1994).

En modelos murinos de lupus se ha mostrado que la terapia con Abatecept, una proteína formada por la unión del Fc de IgG1 al dominio extracelular del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4), produce una marcada disminución de LT CD69+, además de retrasar en el inicio de la enfermedad y la expresión de títulos altos de anticuerpos anti-DNA (Mihara et al., 2000). Terapia combinada de Atacicept, el cual inhibe la unión de BAFF (factor activador de células B) a sus receptores, y Abatecept, que inhibe la unión de CD28 a CD80 y CD86, produce retraso en el inicio de la enfermedad, disminución de la producción de autoanticuerpos, reversión de nefritis e incremento de la supervivencia (Ramanujam et al., 2004). En un estudio realizado en pacientes con nefritis lúpica clase III ó IV tratados con abatecept y terapia de fondo con micofenolato y glucocorticoides se encontró una mejora en los

niveles de anticuerpos anti-dsDNA, complemento y proteínas en orina (Furie et al., 2014)

Alteraciones en las balsas lipídicas

Las balsas lipídicas son regiones dinámicas de la membrana ricas en esfingolípidos y colesterol, su tamaño es de algunos nanómetros y fueron identificados por su insolubilidad en detergentes no iónicos, para su estudio se ha usado la subunidad β de la toxina de cólera, la cual reconoce al esfingolípidio GM1 constituyente de las balsas lipídicas (Tuosto et al., 2001; Simons y Sampaio, 2011). Muchas moléculas que participan en la señalización del LT se agrupan en estos microdominios como por ejemplo las cinasas LCK y FYN, proteínas asociadas a trifosfato de guanosina, CD4, CD8, LAT y receptores ligados a glicosilfosfatidilinositol (Dykstra et al., 2003; Kabouridis y Jury, 2008).

Los LT de pacientes con LES expresan altos niveles del glicoesfingolípidio GM1 comparado con LT de individuos sanos, lo que indica que una mayor fracción de la membrana de los linfocitos de pacientes con LES se encuentra formando balsas lipídicas (Jury et al., 2003; Krishnan et al., 2004).

La LCK en LT de pacientes con LES tiene colocalización reducida dentro de las balsas lipídicas, lo cual se relaciona con un incremento en la ubiquitinización de varias proteínas señalizadoras del TCR, entre ellas la misma LCK, lo que marcaría a estas proteínas para su degradación en el proteasoma. Sin embargo, experimentos de activación *in vitro* mostraron que la disminución de LCK fue independiente del proceso de activación de los linfocitos (Jury et al., 2003).

Por otra parte, CD45 se encuentra disminuido en la fracción de membrana que no contiene balsas lipídicas de LT de pacientes con LES pero está aumentado en la fracción de balsas lipídicas comparado con linfocitos de individuos sanos.

Experimentos de inmunoprecipitación han mostrado un incremento en la asociación de CD45 y LCK en pacientes con LES y dado que CD45 desfosforila la tirosina inhibitoria (Y505) de LCK cambiando así a su forma activa, este podría ser un mecanismo que explica el incremento en la forma activa de LCK dentro de las balsas lipídicas (Jury et al., 2004). Otros reportes han mostrado disminución de la actividad basal de CD45 en LT de pacientes con LES, que es revertida e incrementada si dichos linfocitos son activados con anti-CD3, lo cual no se aprecia en linfocitos de individuos sanos (Blasini et al., 1998).

Por microscopia de fluorescencia se ha observado la inclusión de FcR γ dentro de las balsas lipídicas de LT de pacientes con LES pero no en linfocitos de individuos sanos. Además, la cinasa de tirosina SYK se encuentra enriquecida en balsas lipídicas de pacientes (Krishnan et al., 2004) lo que concuerda con lo comentado anteriormente en el sentido de que FcR γ señala por medio de SYK y no de LCK.

En LT de pacientes con LES se ha observado un incremento en la movilidad lateral de las proteínas de membrana y una rápida agregación de las balsas lipídicas después de ser estimulados con anti-CD3 (Krishnan et al., 2004), lo que favorece la polarización de las proteínas y facilita la formación de la sinapsis inmunológica. En ratones MLR/lpr se ha demostrado que el tratamiento con la subunidad β de la toxina de cólera, la cual ocasiona el agrupamiento de las balsas lipídicas, favorece el desarrollo de proteinuria, hematuria e incremento en los niveles de IgG y anticuerpos anti-DNA. Cuando las balsas lipídicas son desintegradas por tratamiento con metil- β -ciclodextrina se observa retraso en el desarrollo de la enfermedad (Deng y Tsokos, 2008).

El tratamiento de LT de pacientes con enfermedad activa con atorvastatina restaura los niveles de LCK y disminuye su asociación dentro de las balsas lipídicas con CD45. Si los LT de paciente con LES son activados con anti-CD3 y anti-CD28, y tratados con atorvastatina, normalizan el reclutamiento de LCK a los microdominios, incremento de la fosforilación de ERK1/2, la cual se encuentra disminuida en LES

(Oelke y Richardson, 2004), y reducen de la secreción de IL-6 e IL-10 (Jury et al., 2006).

Alteraciones en la Apoptosis de LT

Estudios han mostrado que hay incremento en la apoptosis en LT de pacientes con LES, la apoptosis en linfocitos de pacientes con LES activo fue mayor a la apoptosis de linfocitos de pacientes con LES inactivo (Jin et al., 2005). Otros investigadores han encontrado correlación entre los niveles de apoptosis en linfocitos y el SLEDAI (Dhir et al., 2009). Además, se ha encontrado correlación inversa entre el número de LT y los títulos de autoanticuerpos, sugiriendo que algunos autoanticuerpos podrían estimular la apoptosis de LT (Robak et al., 2006; Su et al., 2013)

Se ha observado correlación negativa entre los niveles de glutatión intracelular y el porcentaje de apoptosis de LT de pacientes con LES, lo que sugiere que el control deficiente de las especies reactivas de oxígeno, incrementadas en los pacientes con LES, estaría involucrado en el incremento de la apoptosis (Shah et al., 2011). Se ha reportado correlación inversa entre la frecuencia y la apoptosis de LT de pacientes con LES lo que indica que existe una relación causa-efecto entre la linfopenia observada en algunos pacientes con LES y el incremento en la susceptibilidad de los LT a la apoptosis (Shah et al., 2011).

Alteraciones en LT doble negativos de pacientes con LES.

La población de LT dobles negativas (DN) en sangre periférica es escasa en individuos sanos pero en pacientes con LES estas células constituyen una importante proporción de las células T (Anand et al., 2002). Las células DN expresan niveles incrementados de marcadores de activación como el HLA-DR (antígeno leucocitario humano-DR), CD69, CD28 y CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico), además de IL-4 comparados con individuos sanos y con pacientes con artritis reumatoide (Anand et al., 2002; Dean et al., 2002).

Las células DN de pacientes con LES producen cantidades significativas de IL-17 e IFN- γ . Adicionalmente, han sido encontradas en biopsias de riñón provenientes de pacientes con nefritis lúpica (Crispin et al., 2008). Se ha descrito que células DN de pacientes con LES restringidas por CD1c pueden proveer ayuda a células B CD1c+ para estimular la producción de inmunoglobulina IgG (Sieling et al., 2000).

Se ha propuesto que una población de las células DN se produce a partir de las células CD4+ que son estimuladas crónicamente perdiendo la expresión de CD4 y mostrando el fenotipo CD3+CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ +. Este hecho se basa en la observación que células CD4+ puestas en condiciones de cultivo con perlas cubiertas de anti-CD3 y anti-CD28 pierden su capacidad de expresar CD4 en su membrana (Grishkan et al., 2013). Un incremento en el porcentaje de células DN puede deberse a un incremento en la supervivencia de estas células. Cualquiera que sea el caso los estudios han mostrado que estas células pueden tener efectos inmunomoduladores que pueden participar en algunas de las manifestaciones clínicas observadas en LES, tanto directa como indirectamente.

Alteraciones en linfocitos T reguladores.

Los linfocitos T reguladores CD4+ (LTreg) son una subpoblación de células que sobreexpresan moléculas como CD25 y el factor transcripcional FoxP3. Se ha probado que estas células tienen la capacidad de disminuir la proliferación de LT efectoras de manera específica y que la deficiencia del factor FoxP3 da susceptibilidad a enfermedades autoinmunes (Sakaguchi, 2000; Brusko et al., 2009).

Los LTreg tienen varios mecanismos por los cuales realizan su función reguladora como son la secreción de citocinas inmunosupresoras/antiinflamatorias (IL-10, IL-35 y factor transformador de crecimiento β , TGF- β), o secreción de moléculas como perforina, granzima A y B, las cuales median la apoptosis en las células blanco (Vignali et al., 2008). Otros mecanismos requieren contacto con moléculas de

membrana como CTLA-4, LAG-3 (gen de activación de linfocitos 3) y CD223 las cuales interfieren con la maduración de las células presentadoras de antígenos (Misra et al., 2004; Liang et al., 2008). La expresión de ectoenzimas como CD39 y CD73 las cuales generan adenosina a partir del trifosfato de adenosina, que inhibe a los LT activados o a las células dendríticas a través del receptor de adenosina 2^a, es otro mecanismo de acción de los LTreg (Deaglio et al., 2007).

Los estudios que evalúan la población de LTreg en pacientes con LES han mostrado resultados controversiales. Muchos de estos han encontrado una reducción en la frecuencia de LTreg, aunque otros han mostrado frecuencias normales (La Cava 2008). Los estudios muestran que no hay diferencias en la capacidad supresora de los LTreg entre pacientes con LES activo e inactivo, pero en general se ha observado que el número de LTreg en pacientes con LES activo es menor comparado con el número de LTreg en pacientes con LES inactivo (Mellor-Pita et al., 2006; Lyssuk et al., 2007).

Glicosilación.

La glicosilación es el proceso celular mediante el cual se añaden azúcares a proteínas y lípidos en compartimentos especializados como el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico rugoso. En mamíferos tenemos dos tipos principales de glicosilación la *N*-glicosilación y la *O*-glicosilación. La *N*-glicosilación comienza en el retículo endoplásmico rugoso y se caracteriza por la unión de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) a residuos de asparagina en secuencias consenso asparagina-X-treonina. La *O*-glicosilación se realiza principalmente en el aparato de Golgi y se caracteriza por la unión de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) a residuos de serina o treonina en regiones consenso que contiene prolina (Brockhausen et al., 2009).

En la *O*-glicosilación los residuos GalNAc son añadidos por acción de la *N*-acetilgalactosaminiltransferasa (ppGalNAcT) a partir del difosfato de uridina-GalNAc (UDP-GalNAc). Se han descrito al menos 21 isoformas de esta enzima las cuales

tiene afinidades diferentes dependiendo la secuencia de aminoácidos y la disposición tridimensional de los residuos de carbohidratos (Hassan et al., 2000; Wandall et al., 2007).

La unión de GalNAc a la serina o treonina forma la estructura conocida como antígeno Tn. En un segundo paso se añade Galactosa (Gal) al residuo de GalNAc en enlace β 1-3, por acción de la Core 1 β 1-3 galactosiltransferasa (C1GalT-1), para formar la estructura conocida como antígeno T o core1 (Gal β 1-3GalNAc-). La C1GalT-1 es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso y transportada al aparato de Golgi por acción de la chaperona molecular específica de β 3-GalT core 1 (Cosmc), la cual se requiere para el correcto funcionamiento de la C1GalT-1. La deficiencia en la actividad de la C1GalT-1 o la carencia de la chaperona Cosmc evita la formación del core 1 y por tanto hay incremento en la expresión del antígeno Tn y antígeno siali-Tn (ácido siálico unido al antígeno Tn en el C-6) (Wang et al., 2010). En humanos, las mutaciones en Cosmc dan lugar a una condición llamada síndrome Tn en la cual hay incremento de la expresión del antígeno Tn y puede causar nefropatía acompañado de moderada trombocitopenia y leucopenia (Berger 1999; Ju and Cummings 2005).

Adicionalmente, el antígeno T puede ser sustrato de las sialiltransferasas las cuales pueden unir ácido siálico al C-3 de la Gal y al C-6 de la GalNAc. Dado que el ácido siálico está cargado negativamente su unión a los receptores regula la interacción ligando-receptor al cambiar la carga de la molécula (Pilatte et al., 1993). La adición de ácido siálico previene otras modificaciones del core 1. Se ha reportado que las proteínas de membrana de muchas células tumorales y de leucemias contiene grandes cantidades de sialilcore 1 (Dall'Olio y Chiricolo, 2001). En patologías como cáncer y enfermedad intestinal inflamatoria se ha encontrado el core 1 sin sustituciones, lo que indica anomalías en la sialilación y en la extensión y ramificación del core 1 (Brockhausen, 1999).

El core 1 puede ser sustrato de la enzima core 2 β 1-6 *N*-acetilglucosaminiltransferasa (C2GnT) la cual cataliza la adición de GlcNAc en enlace β 1-6 con la Gal (Figura 1). Se han descrito dos isoformas de esta enzima, la tipo L que sintetiza el core 2 y la tipo M que también participa en la síntesis de otros core (Kuhns et al., 1993). Entre la core 2 sintetasa y las sialiltransferasas hay competencia por el core 1. Un incremento en la actividad de las α 3-sialiltransferasa previene la glicosilación adicional del core 1 como en el caso de las células de la leucemia mieloide crónica donde la actividad de la α 3-sialiltransferasa está incrementada lo que causa un incremento de la sialilación de las proteínas (Baker et al., 1985). El core 2 se produce en muchos sitios como la mucosa intestinal, en LT activados y durante el desarrollo embrionario (Piller et al., 1988; Brockhausen et al., 1999). Se ha reportado que las células cancerígenas y de leucemias tienen cantidades anormales de core 2. Además la síntesis de core 2 ha sido correlacionada con la progresión tumoral (Dennis et al., 1999). La síntesis de otros core como el 3,4 está restringida principalmente a sitios como el epitelio de las mucosas del tracto gastrointestinal, del tracto respiratorio y las glándulas salivales (Brockhausen et al., 1999).

Las alteraciones en la glicosilación están relacionadas a varias enfermedades, por ejemplo, varios tipos de cáncer presentan incrementos significativos en la fucosilación y ramificación de glicoproteínas, como en el cáncer de ovario y el cáncer de mama (Goodarzi y Turner, 1995). Asimismo, se han reportado alteraciones en el patrón de sialilación, ya que se observa un incremento del ácido siálico en enlace α (1-6), lo que se ha demostrado con la lectina de *Sambucus nigra* (SNA). También, se han reportado alteraciones en la actividad de las sialidasas y en la expresión de diferentes subtipos de estas enzimas (Goodarzi y Turner, 1995; Vajaria et al., 2016). Además, cambios en el patrón de O-glicosilación es un marcador de varios cánceres, como el colorectal, el cáncer de próstata y cáncer de ovario (Meany y Chan, 2011; Kailemia et al., 2016). Se ha descrito que alteraciones en O-glicanos favorecen la progresión y metástasis (Stowell y Cummings, 2015).

Algunos de los mecanismos que causan alteraciones en la glicosilación incluyen cambios en los niveles de expresión de las glicosiltransferasas, alterada localización de las enzimas dentro de los compartimentos subcelulares o cambios en la actividad enzimática de las glicosiltransferasas (Varki, 2016; Venkitachalam y Guda, 2016).

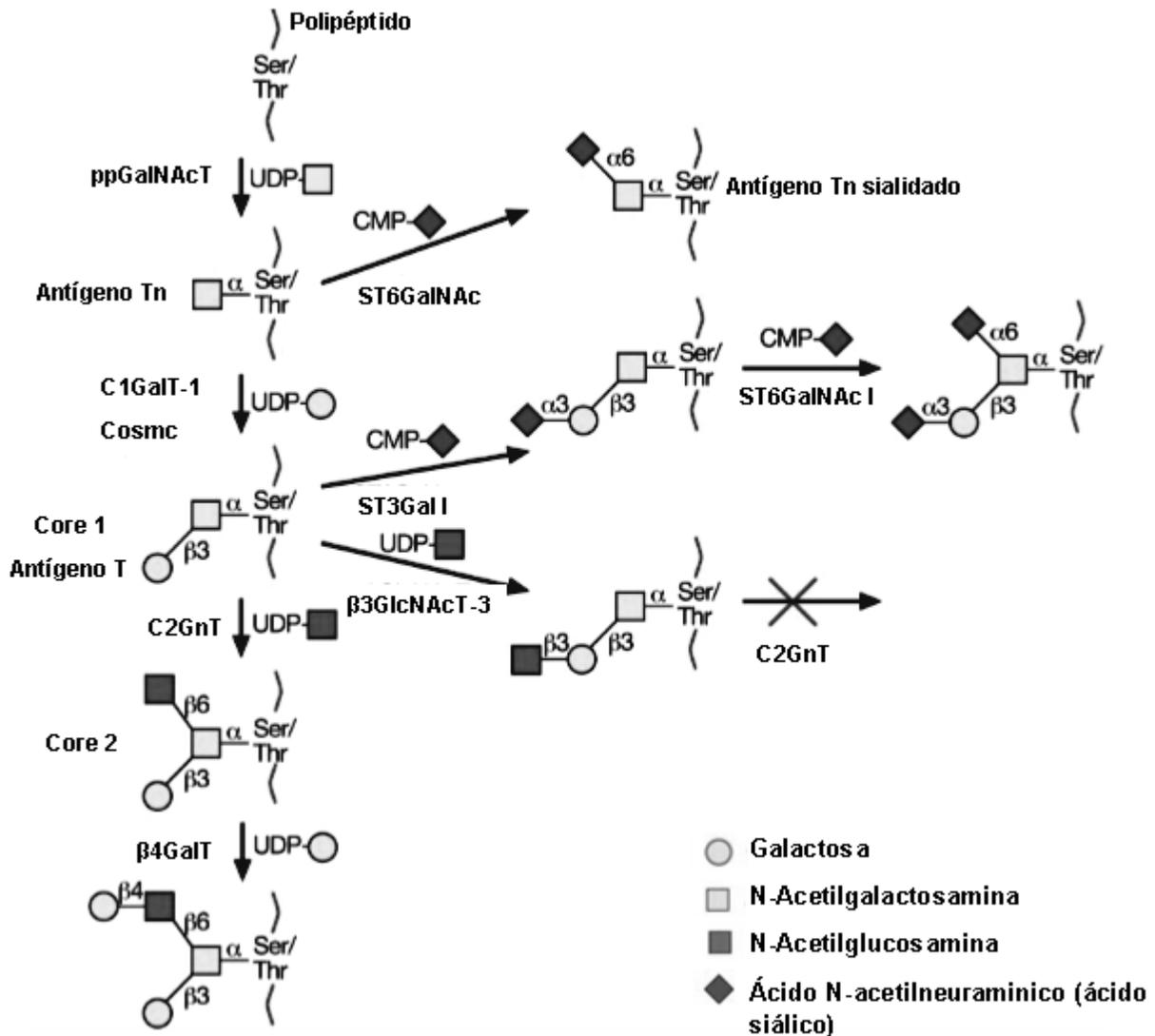


Figura 1. Biosíntesis del core 1 y core 2 de los O-glicanos. El antígeno Tn formado por la unión de la N-acetilgalactosamina (GalNAc) a la serina (Ser) o Treonina (Thr) es la base para la síntesis de todos los O-glicanos tipo mucina. Esta reacción es catalizada por las N-acetilgalactosaminiltransferasas (ppGalNAcT) a partir de la uridina difosfato-GalNAc (UDP-GalNAc). El core 1 $\beta 1$ -3 galactosiltransferasa (C1GalT-1) cataliza la unión de Gal a la GalNAc del antígeno

Tn para formar el core 1, para esto se requiere la chaperona Cosmc. El antígeno Tn y el core 1 puede ser sialilados por la α 2-6 sialiltransferasa (ST6GalNAc), la cual une ácido siálico en enlace α 2-6 a la GalNAc. El core 1 es sustrato de 3 enzimas, las cuales compiten por él. La α 2-3 sialiltransferasa (ST3Gal) une ácido siálico en enlace α 2-3 a la Gal y la β 1-3 N-acetilglucosaminiltransferasa (β 3GlcNAcT-3) une N-acetilglucosamina (GlcNAc) en enlace β 1-3 igualmente a la Gal. La adición de estos azúcares al core 1 bloquea la acción de la β 1-6 N-acetilglucosaminiltransferasa (C2GnT). La C2GnT cataliza la unión de GlcNAc en enlace β 1-6 a la GalNAc del core 1 para formar el core 2. Este último puede ser sustrato de la β 1-4 galactosiltransferasa (β 4GalT) la cual une GalNAc en enlace β 1-4 a la GlcNAc del core 2 para formar las cadenas de lactosamina que son ligandos para muchas galectinas y selectinas. CMP: citidina monofosfato.

Papel de la glicosilación en la regulación del sistema inmune.

La glicosilación es un factor importante en el reconocimiento de proteínas que participan en la adhesión celular. Durante el proceso de inflamación las proteínas receptores que participan en la migración, adhesión y diapédesis son glicosiladas de manera diferencial para que así sean reconocidas por sus ligandos y las células puedan llegar a los sitios correspondientes donde realizar sus funciones. Tal es el caso de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), para la cual se ha demostrado que las glicosilaciones en su tercer dominio Ig regulan su interacción con otros receptores. Las mutaciones en las secuencias consenso de glicosilación o el tratamiento de las células con agentes que interfieren con la glicosilación incrementan la unión de ICAM-1 a la integrina CD11b/CD18. Por el contrario, la forma glicosilada de ICAM-1 tiene mayor afinidad por el antígeno asociado a la función linfocítica 1 (LFA-1) (Diamond et al., 1991).

La glicosilación participa en el control de la diferenciación de los LT. Así, la disminución de la glicosilación de CD25 impide la diferenciación de LT a los fenotipos Th1, Th2 y LTreg inducidos, pero promueve la diferenciación de linfocitos

Th17. Además, el tratamiento de ratones modelos con glucosamina, la cual disminuye la glicosilación de CD25, impide la diferenciación a células Th1 y aumenta la supervivencia de injertos de islotes pancreáticos en ratones diabéticos y exacerba la severidad de encefalitis autoinmune experimental (Chien et al., 2015). La sialilación de las glicoproteínas también es un factor importante que regula la interacción entre los receptores y sus ligandos, como es el caso de CD69 y el complejo S100A8/S100A9. Se ha demostrado que la interacción entre CD69 y este complejo es importante en la diferenciación de LTreg. Sin embargo, la eliminación del ácido siálico, por tratamiento con sialidasa, en LT CD4+ activados evita la unión entre estas proteínas y disminuye la diferenciación a LTreg (Lin et al., 2015).

La glicosilación también participa en la maduración y selección de los LT. Durante el desarrollo de los LT estos sufren el proceso de selección positiva, en el cual, se eliminan los timocitos que no puedan reconocer autopéptidos presentados por las moléculas del MHC. Se ha demostrado que la glicosilación de receptores de membrana como CD4, CD8 y el TCR altera la afinidad de las interacciones MHC-TCR, lo que resulta en un factor que regula la selección positiva (Zhou et al., 2014). La selección negativa también es regulada en parte por la glicosilación, por ejemplo, la presencia de ácido siálico en posición α 2-3 en el core 1 de O-glicanos del coreceptor CD8 disminuye la avidéz por moléculas del MHC clase I lo cual tiene un papel importante en la selección negativa de estas células (Daniels et al., 2001).

Dentro de los factores que regulan la activación y los procesos efectoros de los LT tenemos a la glicosilación. La glicosilación de las proteínas en los LT es un proceso dinámico y cambia según los estímulos que estos reciben, por ejemplo, el patrón de glicosilación entre LT vírgenes y los LT activos es diferente (Hernández et al., 2007). Cuando el LT es activado por estímulos a través de su TCR se observa un incremento del antígeno Tn en las glicoproteínas, esto fue mostrado inicialmente por estudios con lectinas como la aglutinina de *Arachis hypogaea* (PNA) y la aglutinina de *Helix pomatia* (Chervenak y Cohen, 1982; De Petris y Takacs 1983; Jung et al., 1988; van Vliet et al., 2013). Este incremento en la expresión del

antígeno Tn se explica por la disminución del RNA mensajero y de la actividad de la enzima C1GalT-1 y la chaperona Cosmc. El incremento en la expresión del antígeno Tn tiene implicaciones funcionales y de regulación en los LT, ya que estudios ha demostrado que la lectina del macrófago de unión a galactosa (MGL) puede reconocer el antígeno Tn expresado en la glicoproteína CD45 (van Vliet et al., 2013). La unión de MGL a CD45 reduce su actividad de fosfatasa e inhibe varias vías de señalización, lo que resulta en la disminución de la secreción de citocinas proinflamatorias, disminución de la proliferación e inducción de apoptosis (van Vliet et al., 2006)

Las galectinas son lectinas que reconocen lactosamina en los glicanos expresados en las proteínas de membrana, estas lectinas son secretadas por diferentes células como las endoteliales, monocitos y células dendríticas. La unión de las galectinas a sus ligandos desencadena señales relacionadas con la inflamación, la activación y muerte de las células blanco (Clark y Baum, 2012; Blidner et al., 2015). Se ha reportado que la galectina 1 estimula la apoptosis de LT al reconocer al core 1 o al core 2 de la mucina CD43 (Hernández et al., 2006). Otro ligando de galectina 1 es la glicoproteína CD45, la cual debe expresar el core 2 para desencadenar señales apoptóticas (Nguyen et al., 2001)

Lectinas

Las lectinas son proteínas que reconocen secuencias de oligosacáridos de manera específica y han sido usadas como herramientas para estudiar cambios en la glicosilación, así como para caracterizar y purificar poblaciones celulares (Sharon et al., 2004).

Las lectinas con especificidad por O-glicanos que conteniendo el antígeno T han sido usadas en el aislamiento de subpoblaciones de linfocitos, y para identificar el estado de maduración o activación de éstos. Por ejemplo, la lectina de PNA que reconoce el -OH en el C4 de la Gal en estructuras O-glicosídicas (Pereira et al.,

1976) puede diferenciar entre LT CD4 efectores y de memoria (Galván et al., 1998) e identificar timocitos corticales inmaduros via interacciones con el antígeno Tn (Reisner et al., 1976). Por otro lado la lectina de *Vicia Villosa* (VVL) reconoce también Gal pero identifica principalmente a LT CD8+ (Fortune y Lehner, 1988) mientras que la lectina de *Salvia sclarea* reconoce a CD43 en inmunodeficiencias como el síndrome de Wiskott-Aldrich ya que se encuentra glicosilada sólo con el core 1 (Khan et al., 2008).

Las lectinas con afinidad por O-glicanos también pueden ser usadas como comitógenos en la activación de los linfocitos, ya que interaccionan con receptores que participan en este proceso. Tal es el caso de jacalina, la lectina de *Artocarpus integrifolia*, la cual reconoce varias glicoproteínas en los LT como la proteína tirosina fosfatasa CD45. Se ha mostrado que los LT estimulados vía TCR en presencia de jacalina secretan más IL-2 y un perfil de citocinas tipo Th2 (Baba et al., 2007).

La lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) presenta afinidad por las secuencias Gal β 1,3GalNAc-1,0Ser/Thr y GalNAc1,0Ser/Thr (core 1 y antígeno Tn, respectivamente). Además, la unión de la lectina a sus ligandos es inhibida por el azúcar GalNAc (Zenteno et al., 1992; Hernández et al., 2004). ALL reconoce LT CD4+ que expresan marcadores asociados con la activación como CD69 y Ki-67, y es un comitógeno para LT CD4+ (Urrea et al., 2010). Se ha reportado que ALL disminuye el porcentaje de apoptosis en cultivos de células totales de ganglios linfáticos, lo cual se evaluó por la unión de Anexina V a fosfatidilserina. Las células de ganglios linfáticos fueron cultivadas en medio no suplementado con suero y se observó menor número de linfocitos en apoptosis en aquellos cultivos cuyo medio fue suplementado con ALL (Urrea et al., 2011).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La O-glicosilación es un proceso que participa en la regulación del sistema inmunológico mediando procesos como la activación de los LT. Además, se ha observado que proteínas O-glicosiladas reconocidas por lectinas pueden participar como correceptores en el proceso de activación de los LT. Otro aspecto regulado por la O-glicosilación en la fisiología de los LT es la apoptosis, ya que se ha observado que cambios en la expresión del Core 1 y del Core 2 en CD45 y CD43 regulan la susceptibilidad a la apoptosis mediada por galectinas. Además, los LT de pacientes con LES presentan alteraciones en procesos que son regulados, en parte, por la O-glicosilación como son la activación y la apoptosis. Por lo anterior, nuestra pregunta de investigación es: ¿los LT de pacientes con LES presentan alteraciones en la O-glicosilación y si estas alteraciones se relacionan con la actividad de la enfermedad?

JUSTIFICACIÓN

El LES es la enfermedad autoinmune con más alta tasa de incidencia y prevalencia. Se caracteriza por alteraciones en la activación y la regulación de varias células del sistema inmune y por la producción de auto-anticuerpos. Los LT de pacientes con LES presentan alteraciones en la activación y la apoptosis, procesos fundamentales en la regulación del sistema inmune. Dentro de los factores que regulan estos procesos en los LT, se encuentra la O-glicosilación de las proteínas. Sin embargo, actualmente no existen estudios que hayan evaluado si los LT de pacientes con LES presentan cambios en su patrón de O-glicosilación y si estos se relacionan con las manifestaciones clínicas y la actividad de la enfermedad. Por lo tanto, consideramos importante evaluar si hay cambios en la O-glicosilación en los LT CD4+ de pacientes con LES comparado con individuos sanos y si estos cambios se relacionan con la actividad de la enfermedad.

HIPÓTESIS

Los LT de pacientes con LES presentan alteraciones en la O-glicosilación y estos cambios correlacionan con la actividad de la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el patrón de O-glicosilación de linfocitos provenientes de pacientes con LES y su relación con la actividad de la enfermedad.

Objetivos específicos

- Comparar el patrón de O-glicosilación de linfocitos T de pacientes con LES con el patrón de linfocitos T de individuos sanos.
- Relacionar los patrones de O-glicosilación con la actividad de la enfermedad o con las manifestaciones clínicas.
- Identificar las poblaciones de linfocitos T en las cuales se encuentran los cambios en O-glicosilación.
- Determinar si hay relación entre los patrones de O-glicosilación de linfocitos T de pacientes con LES y el porcentaje de apoptosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes y controles

Se estudiaron 23 pacientes femeninos con LES atendidos en el Centro Médico Nacional la Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (Ciudad de México). Se estableció el diagnóstico con al menos 4 de los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) y se estratificaron de acuerdo a la actividad de la enfermedad determinada con SLEDAI. Se consideraron activos los pacientes con una puntuación mayor a uno e inactivos cuando el valor fue cero. El grupo control incluyó 11 donadoras sanas de la misma edad que las pacientes con LES que acudieron al Banco de Sangre y cumplieron con los criterios establecidos y aceptaron participar en el estudio. Las características de los pacientes aparecen en la tabla 1. El Comité de Ética Humana e Investigación Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social aprobó el protocolo de estudio, y se obtuvo el consentimiento informado escrito de todos los sujetos que participaron en este estudio.

Reactivos y anticuerpos.

La albúmina sérica bovina (BSA) fracción V, los carbohidratos de referencia y los reactivos químicos fueron de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). El Lymphoprep fue obtenido de Axis-Shield (Dundee, Scotland). Se utilizaron los siguientes reactivos y anticuerpos conjugados a diferentes fluorocromos: Anexina V, anti-CD4 (VIT4), anti-CD25 (3G10) y anti-CD127 (TM) de Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany); DAPI y los anti-CD3 (HIT3a) de BD Biosciences (New York, NY, USA); anti- HLA-DR (L243) de BioLegend (San Diego, CA, USA) y estreptavidina-aloficocianina (S-APC) de Vector laboratories (California, USA).

Lectinas

Las lectinas de *Arachis hypogaea* (PNA), jacalina, *Maackia amurensis* (MAA) y *Sambucus nigra* (SNA) acopladas a biotina fueron de Vector laboratories (California, USA). La lectina de ALL fue purificada de *A. leucocarpus* colectadas en Tulyehualco (México). La purificación se realizó por cromatografía de afinidad como se describió

anteriormente (Zenteno et al. 1988). ALL fue acoplado a FITC a una proporción FITC/ALL de 2:1.

Células Mononucleares

Las células mononucleares de sangre periférica (CMNs) fueron separadas por gradiente de densidad con Lymphoprep centrifugando a 800xg durante 30 min a 18°C. Las células fueron colectadas, lavadas dos veces y resuspendidas en PBS. La viabilidad celular (>90 %) fue determinada por tinción con azul tripano.

Citometría de flujo

Las CMNs fueron lavadas con PBA (PBS con 1% BSA y 0.1% de azida de sodio) e incubadas por 30 minutos a 4°C con la lectina correspondiente (1.4 µg/ml de PNA, 0.05 µg/ml de jacalina, 0.6 µg/ml de MAA, 1.2 µg/ml de SNA o 0.04 µg/ml de ALL). Se determinó que el reconocimiento de las lectina fuera específico con pruebas de inhibición usando 0.2 mM de GalNAc para ALL, 0.2 mM de Gal para PNA, 0.2 mM de *N*-metilgalactosa para jacalina y con 0.01 mM de fetuina para SNA y MAA. Posteriormente, las CMNs se lavaron con PBA y se incubaron durante 20 min a 4°C con la combinación de anticuerpos correspondiente a cada experimento. A las células marcadas con PNA, jacalina, MAA y SNA se les añadió S-APC. Las células fueron lavadas con PBA y resuspendidas en 100 µl de la misma solución para su análisis en un citómetro MACSQuant analyzer (Miltenyi Biotec). Para la captura de los datos se realizó una región de las células simples usando los parámetros FSC-A y FSC-H, después se hizo una región en los linfocitos basado en tamaño y granularidad y se capturaron 30,000 eventos de la región de los LT CD3+CD4+ por muestra. El análisis de los datos se realizó con el programa FlowJo v. 10 (FLOWJO, LLC). El porcentaje de células ALL+ se calculó usando el algoritmo "super-enhanced Dmax (SED) normalised subtraction" el cual permite calcular el porcentaje de células positivas donde los histogramas de distribución se superponen (Bagwell 1996; Panoskaltis et al. 2003).

Determinación de apoptosis

Las CMNs se lavaron dos veces con buffer de unión a anexina (ABB, 10 mM de HEPES, 140 mM NaCl y 2.5 mM de CaCl₂, pH7.4) e incubadas durante 30 min a 4°C con Anexina V. Posteriormente se lavaron con ABB y se incubaron por 30 minutos a 4°C con anticuerpos contra CD3, CD4 y con lectina ALL. Las células fueron lavadas y resuspendidas en 100 µl de ABB y se añadió 1 µg/ml de DAPI 15 minutos antes de la lectura en el citómetro de flujo. La captura de los datos se realizó de manera similar a lo descrito anteriormente, capturando 30,000 eventos de la región de los LT CD3+CD4+.

Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como media \pm desviación estándar. La normalidad de los datos se verificó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones de dos medias se realizaron con la prueba de Mann Whitney. Las comparaciones de tres grupos fueron hechas usando el análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido por la prueba de comparación múltiple de Bonferroni o con la prueba de Kruskal-Wallis. Los análisis de correlación se realizaron con el índice de correlación de Spearman. La significancia estadística fue considerada como $\alpha < 0.05$. El análisis fue realizado con el programa Graphpad Prism 6.0.

RESULTADOS

Reconocimiento de las lectinas en células mononucleares de sangre periférica.

Para estandarizar la concentración de lectina se marcaron CMNs de individuos sanos con anti-CD3 y anti-CD4, y con diferentes concentraciones de ALL, SNA, MAA y jacalina; con PNA se marcaron LT CD4+ activados. Se determinó, por citometría de flujo, la concentración a la cual se reconocía el mayor porcentaje de células sin que se produjera agregación celular, lo cual se evaluó por microscopía. En la Figura 1A se muestra el porcentaje de reconocimiento para las diferentes concentraciones de las lectinas. Para la lectina de jacalina se observó que con una concentración de 0.05 µg/ml se reconocía el 100 % de los linfocitos CD4+ y no se observó agregación celular con esta concentración de lectina (Figura 1B). En el caso de las lectinas que reconocen ácido siálico se eligió 0.6 µg/ml para MAA y 1.2 µg/ml para SNA y se observó que reconocían un 96% y 80 % de los LT CD4+, respectivamente. A concentraciones mayores se observó agregación celular (Figura 1B). Para la lectina de ALL se observó que con 0.04 µg/ml se reconoció el 85 % de los LT CD4+ y para PNA se eligió una concentración de 1.4 µg/ml que reconocía el 85% de los LT CD4+ activados (Figura 1B).

Para verificar la especificidad de la unión de las lectinas fuera específica se realizó un ensayo de inhibición usando 0.2 mM de GalNAc para ALL, 0.2 mM de Gal para PNA, 0.2 mM de N-metilgalactosa para jacalina y 0.01 mM de fetuina para SNA y MAA. Se observó inhibición del reconocimiento de las lectinas cuando estuvo presente el azúcar específico pero no con otros azúcares (datos no mostrados).

Tabla 1. Características clínicas de la población de estudio.

Características	LES	Sanos
Número de individuos	23	11
Edad (Años, media)	30±10.6	29±7.7
Género (porcentaje de pacientes femeninos)	100	100
Diagnostico (porcentaje de pacientes)		
Erupción Malar	57	
Erupción Discoide	13	
Fotosensibilidad	22	
Ulceras orales	22	
Artritis	61	
Serositis	22	
Desorden renal	70	
Desorden neurológico	9	
Desorden hematológico	35	
Desorden inmunológico	26	
Anticuerpos antinucleares	31	
Duración de la enfermedad (años, media)*	4.7±4.9	
Tratamiento (porcentaje de pacientes)*		
Prednisona	65	
Cloroquina	53	
Azatioprina	13	
Micofenolato de mofetilo	13	
Pulso de ciclofosfamida	9	
SLEDAI (número de pacientes inactivos-activos)	13-10	

* Datos correspondientes al momento de la toma de muestra

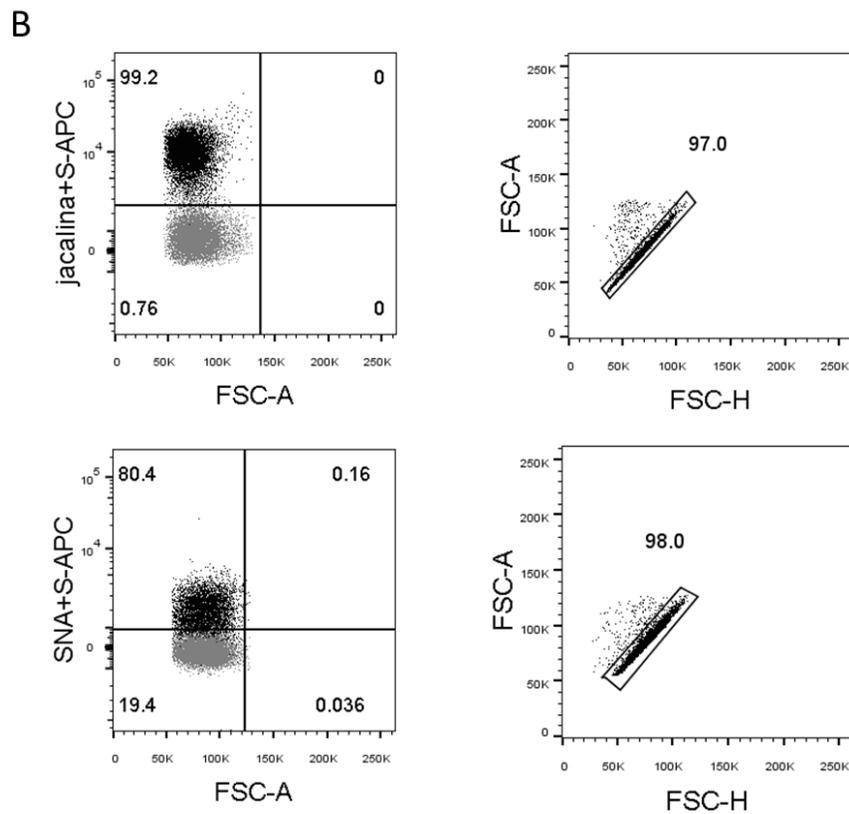
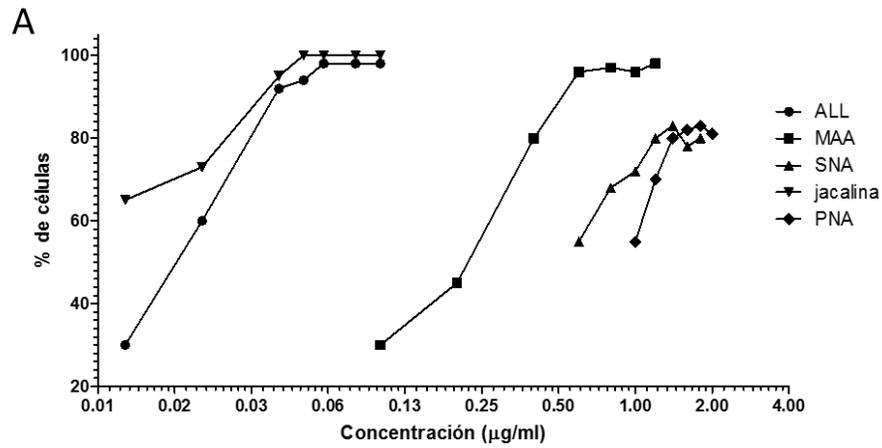


Figura 2. Reconocimiento de las lectinas en LT CD4+. CMN de individuos sanos fueron marcadas con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD3, y con diferentes concentraciones de lectinas. A) Gráfica poligonal del porcentaje de células reconocidas por las lectinas dentro de las células CD3+CD4+. B) Dot plot representativos del reconocimiento de las lectinas a las concentraciones elegidas. En los dot plot de la izquierda se muestra las células marcadas con lectinas en negro

y los controles de tinción en gris. En los dot plot de la derecha se muestra el porcentaje de células individuales.

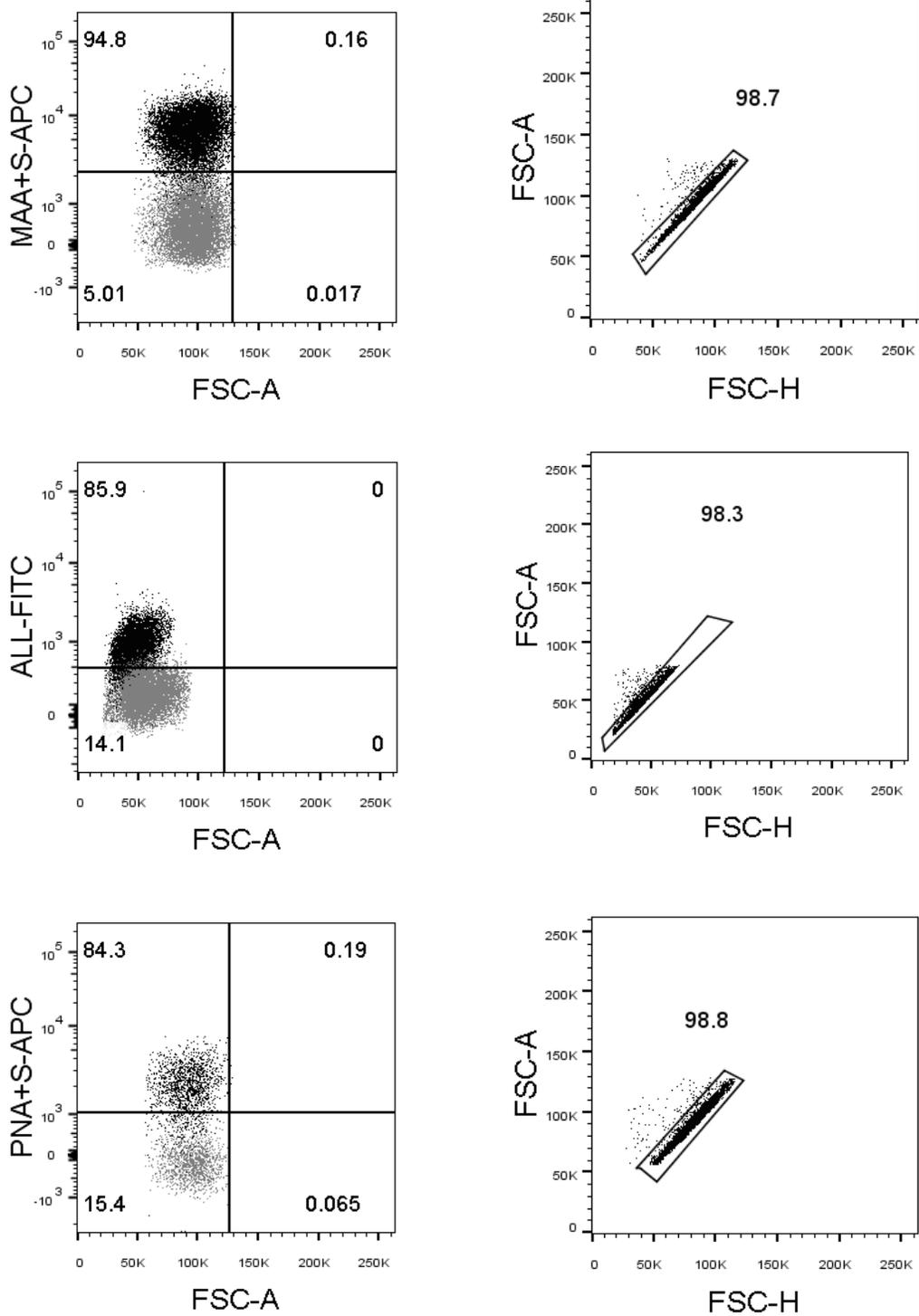


Figura 2. (Continuación)

Reconocimiento de ALL y jacalina en linfocitos T de pacientes con LES.

Las células provenientes de pacientes con LES e individuos sanos fueron teñidas con anticuerpos dirigidos contra CD3 y CD4, y con las lectinas ALL y jacalina para ser analizadas por citometría de flujo. Se encontraron diferencias en el reconociendo de la lectina de ALL en LT de pacientes con LES activo comparados con los de otros grupos, ya que se observó un menor porcentaje de células ALL+ en los LT (80 ± 3.4 %) comparados con los LT de individuos sanos (91 ± 1.1 %) y los LT de pacientes con LES inactivo (91 ± 0.81 %). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P < 0.001$). También se observó una disminución en la MIF de ALL en los LT CD3+CD4+ de pacientes con LES activo comparado con los LT de individuos sanos (514 ± 57.5 y 674 ± 33.9), respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células positivas ni en la MIF para ALL entre pacientes con LES inactivo e individuos sanos (Figura 2A, C).

Jacalina reconoció el 97 ± 1.7 % de los LT CD4+ en individuos sanos y no se encontró diferencia con el porcentaje reconocido en LT de pacientes con LES inactivo (96 ± 2.3 %) o activo (94 ± 3.2 %). El análisis de la MIF para jacalina mostró que no habían diferencias significativas en la expresión de glicanos reconocidos por jacalina en LT de pacientes con LES activo, inactivo e individuos sanos (Figura 2B, C).

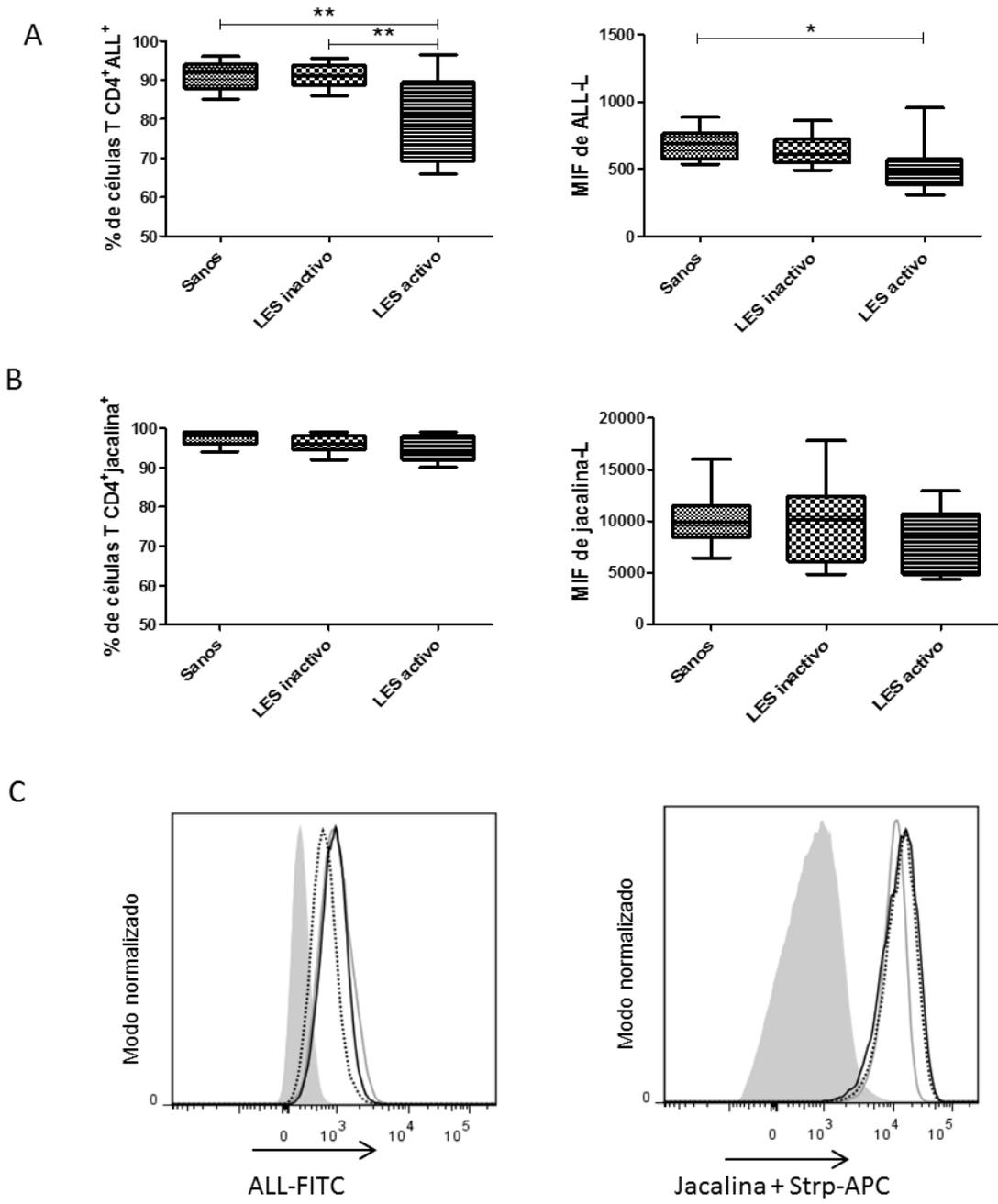


Figura 3. Reconocimiento de las lectinas de ALL y jacalina en LT CD4+ de pacientes con LES e individuos sanos. CMNs de pacientes con LES e individuos sanos fueron marcadas con ALL o jacalina, además de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4 para ser analizadas por citometría de flujo. A) Gráficas de cajas con bigotes mostrando el porcentaje de células ALL+ y la MIF de los LT CD3+CD4+, B) Gráficas mostrando el porcentaje de células jacalina+ y la MIF de los LT CD3+CD4+ (los

datos para ALL corresponde a 10 pacientes con LES activo, 13 con LES inactivo y 11 individuos sanos, para jacalina corresponden a 7 pacientes con LES activo, 13 con LES inactivo y 11 Individuos sanos). C) Histogramas representativos del reconocimiento de ALL y jacalina en LT CD3+CD4+ de pacientes con LES e individuos sanos. El área sombreada indica células no teñidas, la línea gris LT de individuos sanos, la línea negra LT de pacientes inactivos y la línea punteada LT de pacientes activos. El porcentaje de células positivas se obtuvo usando el algoritmo SED. Los resultados fueron comparados con ANOVA de una vía seguido con la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

ALL y Jacalina no compiten por sus receptores.

Puesto que ALL y jacalina reconocen el core 1 se realizó un ensayo de competencia para analizar si ALL y jacalina reconocen las mismas glicoproteínas, en el cual se marcaron CMNs de individuos sanos y pacientes con LES con ALL y después con jacalina o de manera inversa y comparadas con las células marcadas con una sola lectina. No se encontraron diferencias en el reconocimiento de ALL y jacalina cuando estuvieron juntas o separadas, lo que demuestra que no compiten por los mismos epítomos (Figura 4).

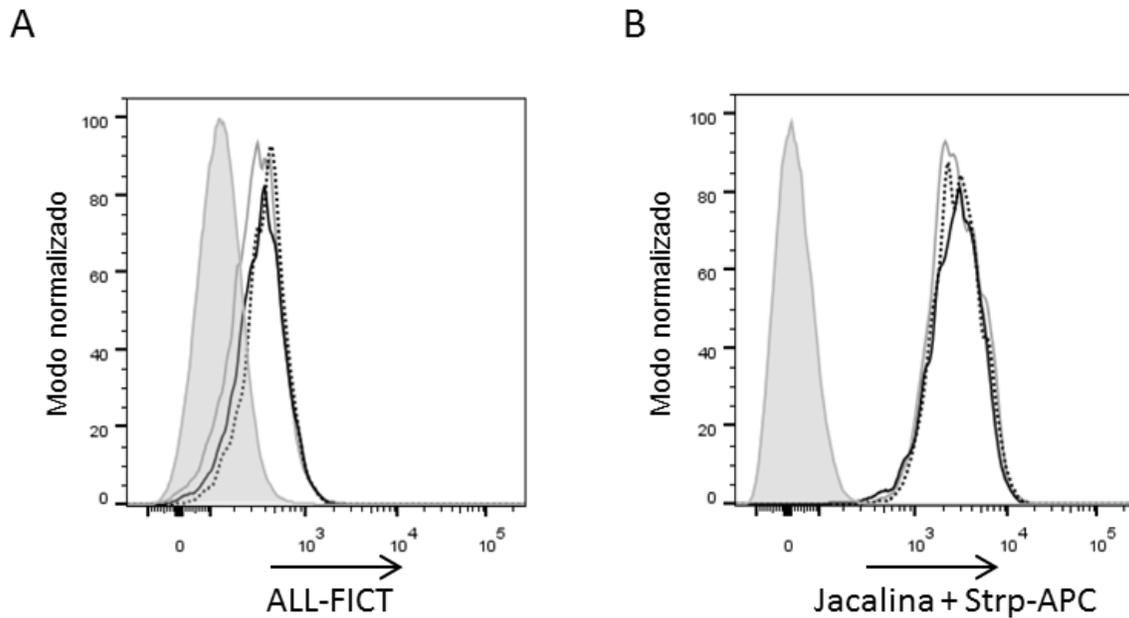


Figura 4. ALL y jacalina no compiten por los mismos receptores. CMNs de individuos sanos fueron marcadas con ALL o jacalina como se detalla en el texto y con anticuerpos anti-CD4. A) Histograma del reconocimiento de ALL en LT CD4+, B) Histograma del reconocimiento de jacalina en LT CD4+. El área sombreada indica células no teñidas, la línea gris células marcados sólo con ALL o jacalina, la línea negra células marcadas con ALL y después con jacalina y la línea punteada células marcadas con jacalina y después con ALL (imágenes representativas de 3 experimentos).

Los linfocitos T de pacientes con LES no presentan diferencias en la expresión de ácido siálico.

Para probar si las alteraciones en el reconocimiento de ALL en LT de pacientes con LES se deben a cambios en la expresión de ácido siálico, se evaluó la expresión de ácido siálico en enlace α 1-3 con la lectina MAA y en enlace α 1-6 con la lectina SNA en los LT CD4+ de pacientes con LES e individuos sanos. Además se determinó si

había disminución en la expresión de ácido siálico con la lectina PNA la cual reconoce el core 1 que no se encuentra sialilado.

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células positivas, ni en la MIF, para MAA, SNA o PNA (Figura 4), lo que sugiere que la disminución en el reconocimiento de los LT CD4+ de pacientes con LES activo por ALL no se debe a un incremento en la expresión de ácido siálico.

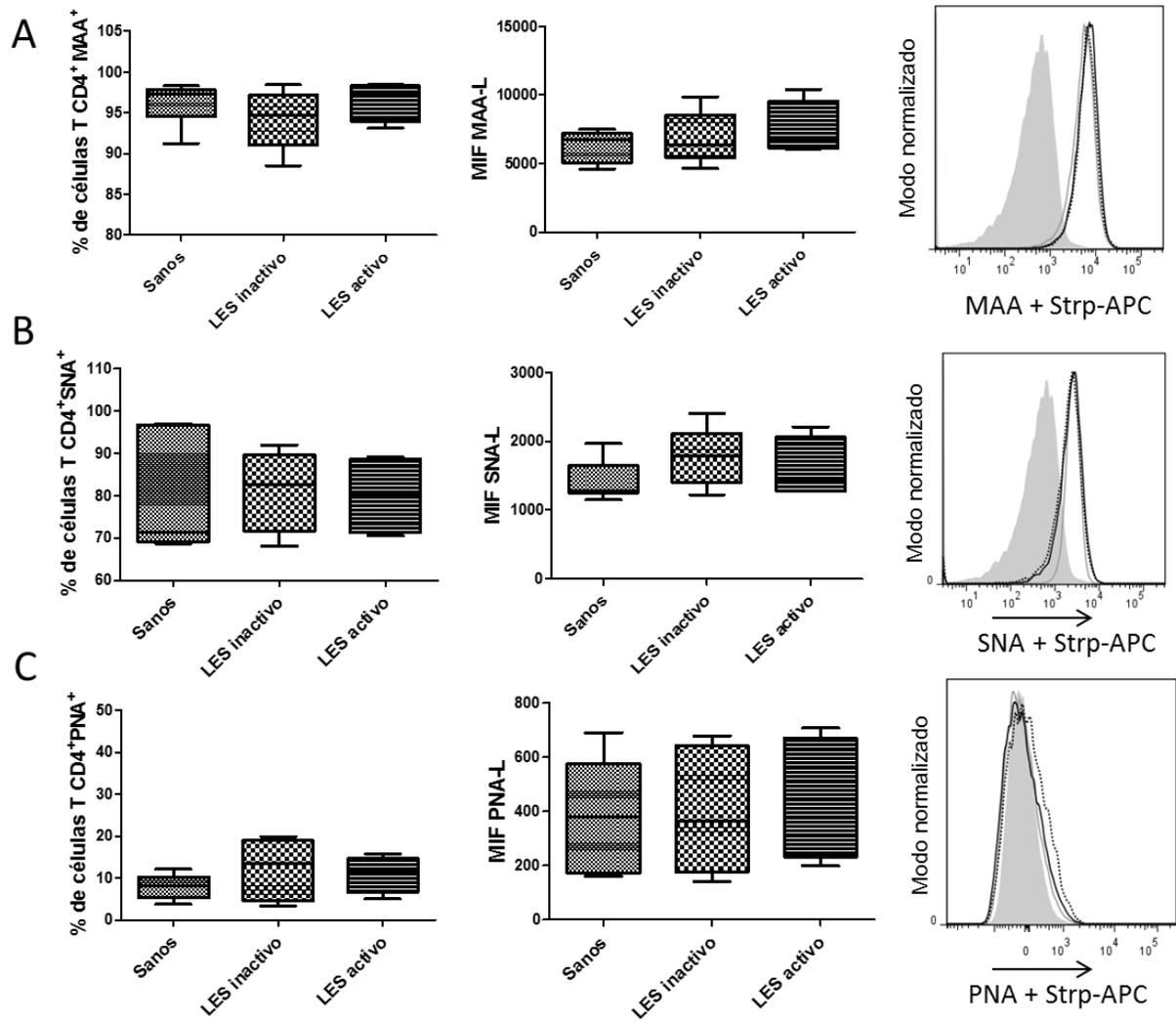


Figura 5. Linfocitos CD4+ de pacientes con LES no presentan alteraciones en la expresión de ácido siálico. CMNs de pacientes con LES fueron marcadas con

las lectinas de MAA, SNA o PNA, además de anticuerpos anti-CD4. Se comparó el porcentaje de células positivas y la MIF dentro de los LT CD4+ para MAA (A), SNA (B) y PNA (C). Los datos para MAA y SNA corresponden a 10 pacientes con LES inactivo, 4 pacientes con LES activo y 8 individuos sanos y para PNA corresponden a 5 pacientes con LES inactivo, 4 pacientes con LES activo y 8 individuos sanos. Se muestran los histogramas representativos del reconocimiento de MAA, SNA y PNA en LT CD4+ de pacientes con LES e Individuos sanos. El área sombreada indica células no teñidas, la línea gris LT de individuos sanos, la línea negra LT de pacientes inactivos y la línea punteada LT de pacientes activos. El porcentaje de células positivas se obtuvo usando el algoritmo SED. Los datos son comparados con la prueba de Kruskal-Wallis.

La expresión de ligandos para ALL en LT CD4+ y el porcentaje de células ALL+ correlaciona inversamente con el SLEDAI.

Se realizó un análisis de correlación entre el reconocimiento de ALL y el SLEDAI. Se observó una correlación inversamente proporcional y estadísticamente significativa entre el porcentaje de LT CD3+CD4+ALL+ en pacientes con LES y el SLEDAI ($r = -0.474$, $P = 0.0223$). En el análisis de la MIF también se observó correlación estadísticamente significativa entre la MIF y el SLEDAI ($r = -0.428$, $P = 0.0415$) (Figura 6). Lo cual sugiere que las O-glicosilaciones detectadas por ALL pueden estar participando en la activación de la enfermedad.

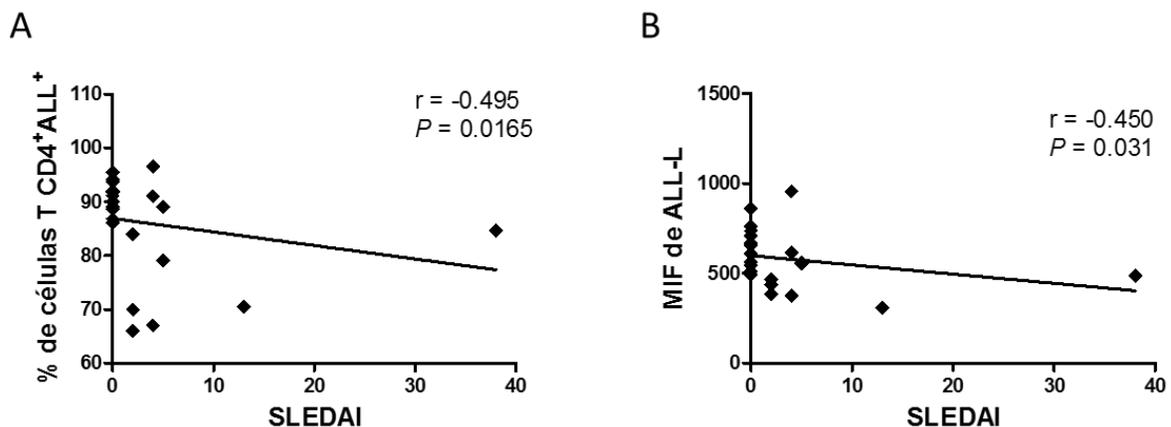


Figura 6. El reconocimiento de ALL en LT CD4+ de pacientes con LES correlaciona inversamente con el SLEDAI. Análisis de correlación entre A) el porcentaje de células ALL+ y el SLEDAI y B) entre la MIF de ALL y el SLEDAI (Los datos corresponden a 23 pacientes con LES). Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

Los cambios en O-glicosilación detectados por ALL se presentan tanto en LT activos como en LT reguladores.

Se realizó una tinción con anticuerpos específicos para LT activos y LTreg para observar alteraciones en el reconocimiento de ALL en estas poblaciones. Cuando se analizó la población de LT activos CD4+CD25+ se observó que los pacientes con LES activo presentaban menor porcentaje de células ALL+ (77 ± 10.2 %) comparado con los pacientes con LES inactivo (92 ± 6.3 %). Además el porcentaje de células ALL+ en los pacientes con LES inactivo fue significativamente mayor que en los individuos sanos (88 ± 4.1 %). El análisis de la MIF de ALL en LT CD4+CD25+ mostró que los pacientes con LES inactivo expresan mayor cantidad de glicanos reconocidos por ALL que los pacientes con LES activo y los individuos sanos (792 ± 126.0 , 549 ± 126.7 y 525 ± 65.3 , respectivamente) (Figura 7A). El reconocimiento con ALL de LT activos usando como marcador la expresión de HLADR+, mostró una disminución en el porcentaje de células ALL+ en los LT CD4+HLADR+ de pacientes con LES activo (85 ± 9.8 %) comparado con LT de pacientes con LES inactivo (93 ± 3.4 %) e individuos sanos (93 ± 3.2 %). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la MIF de ALL en los LT CD4+HLADR+ (Figura 7B). En la población de LTreg CD4+CD25^{hi}CD127^{low} se encontró una disminución en el porcentaje de células ALL+ en los pacientes con LES activo comparado con los pacientes con LES inactivo (67 ± 10.8 % y 82 ± 9.0 %, respectivamente). Se observó un incremento en la MIF de ALL en LT reguladores de pacientes con LES inactivo comparado con pacientes con LES activo e individuos sanos (599 ± 92.0 , 476 ± 101.2 y 443 ± 61.2 , respectivamente) (Figura 7C).

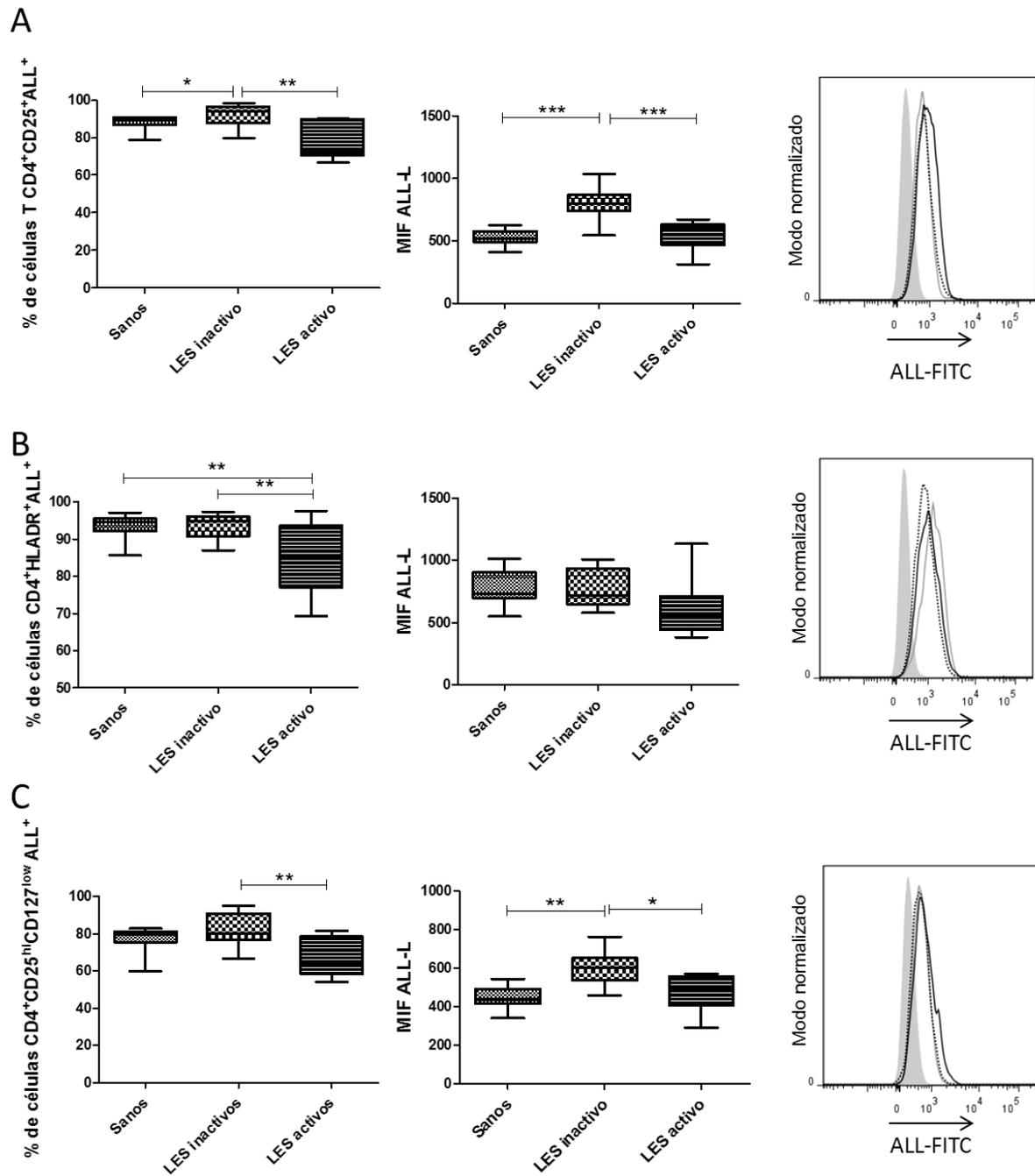


Figura 7. Linfocitos T CD4⁺ activos y reguladores muestran una disminución en la expresión de O-glicanos y un bajo porcentaje de células reconocidas por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL). CMNs de pacientes con LES e individuos sanos fueron marcadas con ALL-FITC y anticuerpos contra CD3, CD4,

CD25, HLADR y CD127. Gráficas donde se compara el porcentaje de células ALL+ y la MIF de ALL en: A) LT CD4+CD25+CD127+, B) LT CD4+HLADR+ y C) LT CD4+CD25hiCD127low. Los datos para los LT CD4+CD25+CD127+ y los LT CD4+CD25hiCD127low corresponden a 10 pacientes con LES inactivo, 6 pacientes con LES activo y 8 individuos sanos y para los LT CD4+HLADR+ corresponden a 13 pacientes con LES inactivo, 10 pacientes con LES activo y 11 individuos sanos. En los histogramas el área sombreada indica células no teñidas, la línea gris LT de individuos sanos, la línea negra LT de pacientes inactivos y la línea punteada LT de pacientes activos. El porcentaje de células positivas se obtuvo usando el algoritmo SED. Los resultados fueron comparados con ANOVA de una vía y con la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

La MIF de ALL en LT CD4 correlaciona inversamente con el porcentaje de células dobles negativas (DN) en pacientes con LES.

Se determinó el porcentaje de células DN (CD3+CD4-CD8-) en muestras de pacientes con LES e individuos sanos, se encontró un incremento en el porcentaje de células DN en los pacientes con LES comparado con individuos sanos (Figura 8A, B). Se realizó un análisis de correlación entre el porcentaje de células DN en pacientes con LES y el reconocimiento de ALL en LT CD4. Se encontró correlación inversamente proporcional y estadísticamente significativa entre el porcentaje de células DN y la MIF de ALL en LT CD4 ($r = -0.594$, $P = 0.0415$). También se observó correlación inversa entre el porcentaje de células DN y el porcentaje de LT CD4 ALL+ aunque no fue estadísticamente significativa ($r = -0.559$, $P = 0.0586$) (Figura 8C, D).

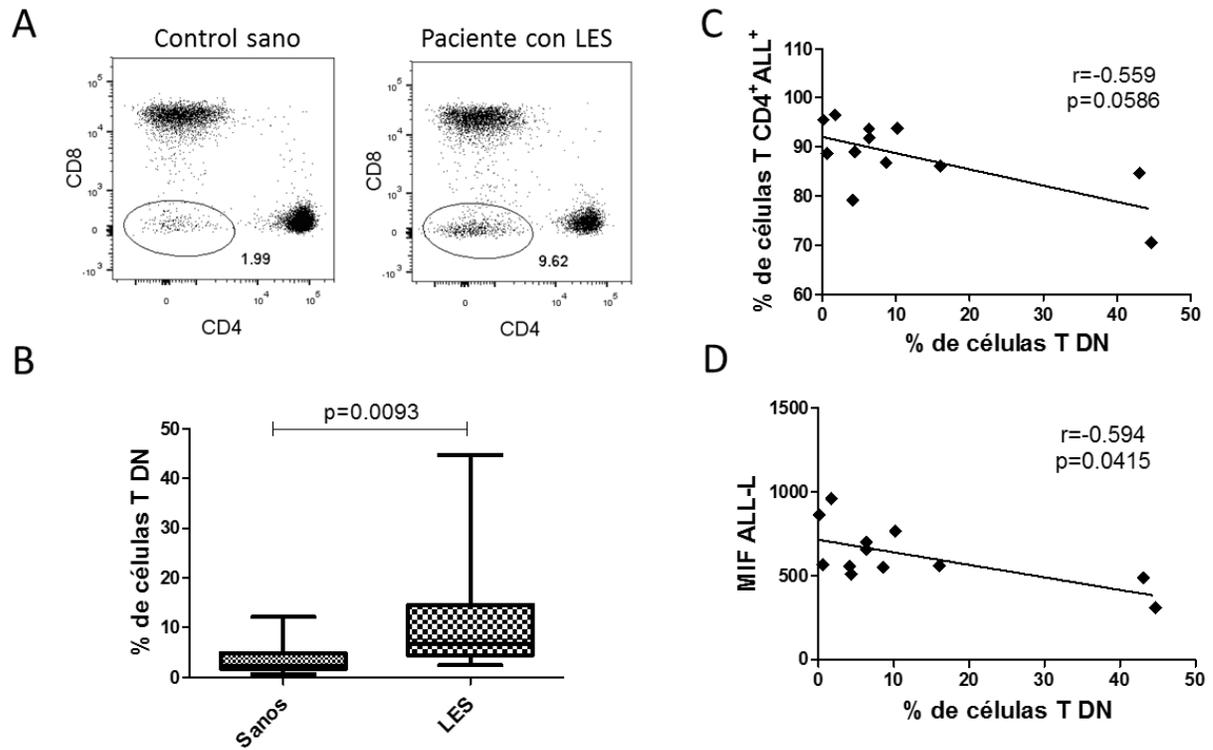


Figura 8. La MIF de ALL en LT CD4 correlaciona inversamente con el porcentaje de células dobles negativas (DN) en pacientes con LES. CMNs de pacientes con LES fueron marcadas con ALL y anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8, el análisis del porcentaje de las células DN se realizó en la región de las células CD3+. A) Dot plot representativos del porcentaje de células DN en pacientes con LES e individuos sanos. B) Gráficas de cajas con bigotes mostrando el porcentaje de células DN en 12 pacientes con LES y 9 individuos sanos. C) Gráfica de correlación entre el porcentaje de LT CD4+ALL+ contra el porcentaje de células DN y D) Gráfica de correlación entre la MIF de ALL contra el porcentaje de células DN. Los datos fueron comparados con la prueba de Mann Whitney y el análisis de correlación se realizó con la prueba de Spearman.

El reconocimiento de ALL no correlaciona con la apoptosis de LT de pacientes con LES.

Se evaluó si había relación entre el porcentaje de células en apoptosis y el reconocimiento de ALL. Para esto se determinó el porcentaje de células en apoptosis temprana (Anexina+DAPI-) en los LT CD4+ y se observó que los LT de pacientes con LES activo e inactivo presentan un incremento significativo en la apoptosis comparado con los LT de individuos sanos (Figura 9A, B). Sin embargo, no se encontró correlación entre el porcentaje de LT CD4+ en apoptosis y el SLEDAI. Tampoco se encontró correlación entre el porcentaje de células ALL+ y el porcentaje de LT en apoptosis o entre la MIF de ALL y el porcentaje de LT en apoptosis (Figura 9C).

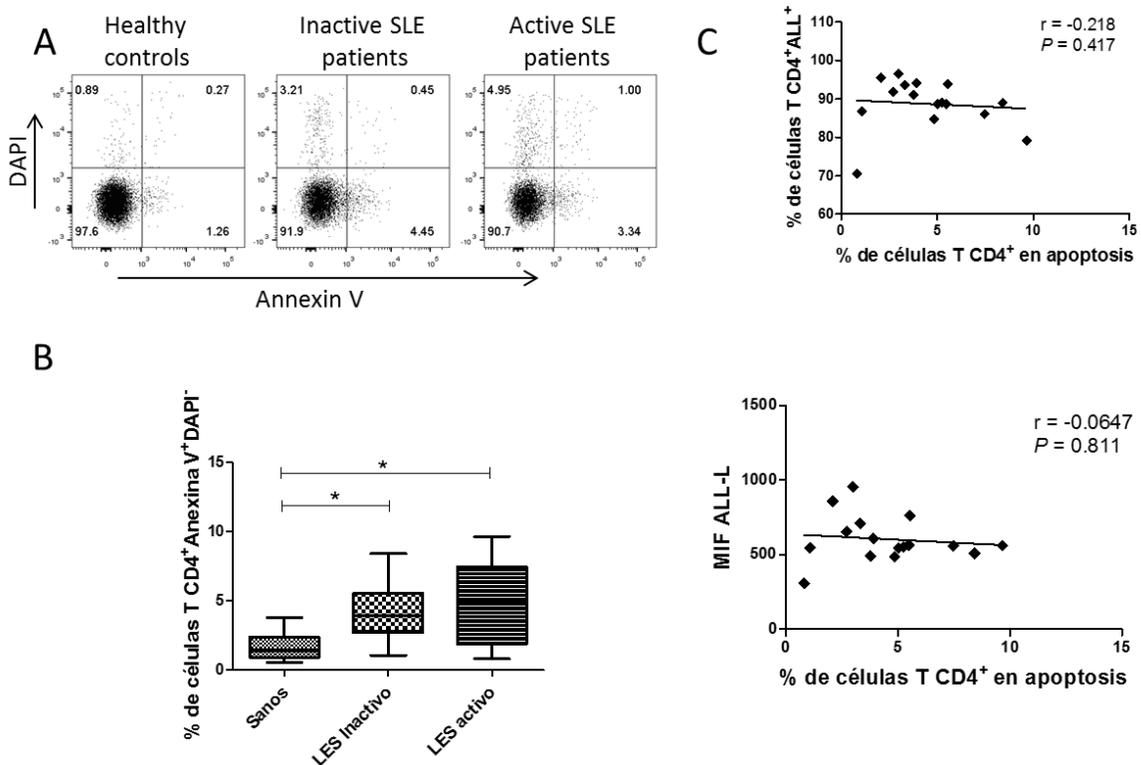


Figura 9. Reconocimiento de ALL no correlaciona con apoptosis. CMNs de pacientes con LES fueron marcadas con ALL y anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4, y se determinó el porcentaje de células apoptóticas usando anexina V y DAPI. El análisis de las células se realizó en los LT CD3+CD4+. A) Dot plot representativos de LT CD3+CD4+ marcados para la determinación de apoptosis. B) Gráficas de cajas con bigotes del porcentaje de células anexina+ DAPI+ dentro de los LT CD3+CD4+ en 11 pacientes con LES inactivo, 5 pacientes con LES activo y 9 controles sanos. C) Análisis de correlación entre el porcentaje de LT ALL+ contra el porcentaje de LT en apoptosis y entre la MIF de ALL+ contra el porcentaje de LT en apoptosis de 16 pacientes con LES. Los resultados fueron analizados con la prueba de ANOVA de una vía, y comparados contra el control (individuos sanos) con la prueba de Bonferroni. * $P < 0.05$. El análisis de correlación se realizó con la prueba de correlación de Spearman.

DISCUSIÓN

Se determinó la expresión de core 1 en LT CD4+ de pacientes con LES usando las lectinas ALL, PNA y jacalina. Encontramos un menor número de LT reconocidos por ALL, pero no en los reconocidos por jacalina o PNA, en los LT de pacientes con LES.

Aunque estas tres lectinas tienen afinidad por el core 1 (Lotan et al. 1975; Mahanta et al. 1990; Zenteno et al. 1992; Hernández et al. 2004) el porcentaje de células reconocido fue muy diferente entre las tres. Jacalina reconoció el 100% de los LT y la MIF fue muy alta, lo que indica que los ligandos para esta lectina se expresan en todos los linfocitos CD4 y en altas cantidades. Esto concuerda con lo reportado previamente, ya que jacalina reconoce a las proteínas CD45 y CD4, las cuales son expresadas de manera ubicua en los LT CD4+ (Baba et al., 20071; Lafont et al., 1996). En contraste, PNA reconoció un porcentaje bajo de LT y con una MIF relativamente baja. Aunque los LT vírgenes expresan el core 1 estos no son reconocidos por la lectina de PNA por que la ST3Gal sialila al core 1, lo que inhibe la unión de PNA (Lotan et al. 1975; Pereira et al. 1976; Swamy et al. 1991). La lectina de PNA reconoce glicoproteínas principalmente en LT activos, ya que estos dejan de expresar la enzima ST3Gal y el core 1 no es sialilado (Piller et al., 1988; Clark y Baum, 2012).

La lectina de ALL reconoció aproximadamente el 80% de los LT pero la MIF fue relativamente baja comparado con jacalina, lo cual concuerdan con lo mostrado por Urrea y cols., en 2010. Esta MIF relativamente baja ocasiona que los histogramas de distribución se superpongan en los análisis de citometría de flujo. Por lo que se utilizó el algoritmo "super-enhanced Dmax (SED) normalised subtraction" para calcular el porcentaje de células positivas de manera más exacta (Bagwell 1996; Panoskaltsis et al. 2003).

A través de ensayos de competencia demostramos que ALL y jacalina no compiten por los mismos sitios de reconocimiento, sugiriendo que ambas lectinas reconocen diferentes glicoproteínas. Esto concuerda con lo reportado, ya que el principal receptor de ALL es una glicoproteína de 70 kDa (Porrás et al., 2005). Esta diferencia entre el reconocimiento de las tres lectinas se puede explicar porque la lectina de jacalina reconoce en el core 1 los grupos OH de los carbonos 2, 3, 4 y 6 de la D-Gal y el grupo acetamido de la GalNAc (Sastry et al. 1986), mientras que la especificidad de ALL es dirigida hacia el grupo acetamido en el carbono 2 de la GalNAc en el core 1 y el antígeno T. La sustitución en el carbono 3 ó 6 de Gal/GalNAc por ácido siálico no disminuye la afinidad de esta lectina hacia el core 1 (Zenteno et al. 1992). Además, ALL reconoce residuos GalNAc cuando ellos están espaciados en estructuras glicosídicas (Hernández et al. 2004), mientras que PNA muestra especificidad por el -OH del carbono 4 de la Gal en el core 1.

Como se ha comentado el core 1 puede ser sustrato de la ST3Gal y la ST6GalNAc, las cuales unen ácido siálico y modulan la afinidad de los receptores y con ello participan en la regulación del sistema inmune. Por ello evaluamos la expresión de ácidos siálico usando las lectinas de MAA y SNA. En este estudio no se encontraron diferencias en la sialilación de las proteínas de membrana usando las lectinas de MAA y SNA.

Además, como se mostró, estos cambios en glicosilación no se presentan en alguna población específica de LT CD4+ si no que se pueden observar tanto en LT activos como en LTreg. El porcentaje de células reconocidas por ALL en los LT activos y los LTreg de individuos sanos fue similar, esto no concuerda con lo reportado previamente por Jiménez-Martínez y cols. (2013) quienes encontraron que ALL reconocía un mayor porcentaje de LTreg que LT activos.

Se han reportado cambios en O-glicosilación se han reportado en LT de ratones MLR-*lpr* ya que hay menor reconocimiento de los linfocitos por la lectina de *Maclura pomifera*, la cual tiene afinidad por el core 1 (Sarkar et al., 1981), comparado con

ratones MLR ++ (Dumont y Habbersett et al., 1982). Los ratones MRL-*lpr* desarrollan una enfermedad más agresiva y presentan una disminución en la expresión del core1 de manera similar a los LT de pacientes activos, lo cual se relaciona a nuestros hallazgos.

Otros estudios han reportado un incremento en la expresión del antígeno Tn en LT de pacientes con LES usando la lectina de *Vicia villosa* y anticuerpos monoclonales (CT1 y CT2) (Fortune y Lehner, 1988; Fortune et al., 1994). Puesto que el antígeno Tn es el sustrato para la formación del core 1, un incremento en el antígeno Tn sugiere una disminución en la síntesis de core 1. Esta disminución en la formación del core 1 puede deberse a una disminución en la expresión de la enzima C1GalT1 o de Cosmc las cuales pudieran estar alteradas por las concentraciones de algunas citocinas. Por ejemplo: en células B provenientes de pacientes con nefropatía IgA, la IL-6 y en menor grado la IL-4 disminuyen la expresión del core 1 en las IgA al disminuir la expresión de la C1GalT1 (Suzuki et al., 2014) o como en la línea celular de linfoma B (DAKIKI) donde se observó que la IL-4 disminuye la expresión de RNAm de C1GalT1 y Cosmc (Yamada et al., 2010). Dado que en los pacientes con LES activo presentan niveles elevados de IL-6 (Linker-Israeli et al., 1991; Ripley et al., 2005; Umare et al., 2014) e IL-4 (Funauchi et al., 1998; Mi y Zeng, 2005) se sugiere que esto podría ser la causa de las alteraciones de la expresión del core 1.

Adicionalmente se encontró correlación entre el porcentaje de células ALL+ y la MIF con el SLEDAI, lo que sugiere que cambios en la O-glicosilación se relacionan con la actividad del sistema inmune en pacientes con LES. De igual manera, otros estudios han encontrado correlación entre la actividad de la enfermedad y alteraciones en los LT. Por ejemplo, Wenzel y cols. (2005) observaron correlación entre el porcentaje de LT CD4+HLADR+ y la actividad de la enfermedad en lupus eritematoso cutáneo. Song y cols. (2015) encontraron que el porcentaje de LT CD3+CD4+Tim-3+ correlaciona inversamente con la actividad de enfermedad y con los niveles de los componentes del complemento C3 y C4 en LES. También se ha observado correlación entre la actividad de la enfermedad y el porcentaje de

poblaciones de LT, como el porcentaje de LT CD4+NKG2D+, una población de linfocitos inmunosupresores, que correlaciona inversamente con la actividad de la enfermedad en LES de inicio juvenil (Dai et al., 2009) y el porcentaje de LT CD8+ activos que correlaciona con el SLEDAI. (Blanco et al., 2005). Nuestros resultados sugieren que la expresión de O-glicanos reconocidos por ALL en los LT puede ser un blanco adecuado para ser usado como un marcador de la actividad de la enfermedad.

El porcentaje de células DN negativas se encuentra incrementado en pacientes con LES (Anand et al., 2002; Crispín et al., 2008) y se han relacionado a la patogenia de esta enfermedad por las citocinas inflamatorias que producen y su capacidad para ayudar a las células B en la producción de autoanticuerpos contra el DNA (Shivakumar et al., 1989; Rajagopalan et al., 1990; Crispín et al., 2009). Las células DN se pueden originar de LT CD4 al estimularlos repetidas veces con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (Grishkan et al., 2013). Dado que ALL reconoce receptores relacionados con la activación (Urrea et al., 2010) y estos pudieran estar participando en la estimulación crónica de los LT CD4, nosotros esperábamos encontrar una correlación positiva entre el porcentaje de células DN y la expresión de los receptores de ALL, sin embargo, se encontró una correlación negativa entre el porcentaje de células DN y la MIF de ALL en LT CD4.

Se ha reportado que los pacientes con LES activo presentan un incremento en el porcentaje de LT CD4+ en apoptosis (Dhir et al., 2009; Shah et al., 2011). También se ha descrito que estímulos por ALL pueden promover la supervivencia celular en LT CD4+ (Urrea et al., 2011). Dado que nosotros observamos una disminución tanto en el porcentaje de células ALL+ como en la MIF de ALL en pacientes con LES activo se evaluó si había correlación entre el reconocimiento de ALL y el porcentaje de LT CD4+ en apoptosis en pacientes con LES. De manera similar a lo previamente reportado (Dhir et al., 2009; Shah et al., 2011) se encontró un incremento en el porcentaje de LT en apoptosis en los pacientes con LES. Sin embargo, no se

encontró correlación entre el reconocimiento de ALL y el porcentaje de LT CD4+ en apoptosis en los pacientes con LES.

CONCLUSIONES

En resumen, esta investigación mostró que hay cambios en la O-glicosilación de LT de pacientes con LES y que estos se correlacionan con la actividad de la enfermedad, lo que sugiere que alteraciones en el proceso de glicosilación están relacionadas con las manifestaciones clínicas del LES, aunque consideramos que aún falta esclarecer mejor el papel que tienen las O-glicosilación en el control de la homeostasis de los LT de pacientes con lupus.

PERSPECTIVAS

Determinar, por medio de electroforesis desnaturalizante, si las proteínas reconocidas por ALL en LT de pacientes con LES son las mismas que las reconocidas en individuos sanos.

Realizar ensayos *in vitro* para evaluar la respuesta de los LT de pacientes con LES al ser estimulados con ALL.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai Shiv. Inmunología celular y molecular. 8a ed. España: Elsevier; c2015. Capítulo 9, Activación de linfocitos T; p. 199-213.
2. AH, Richardson B, Lu Q. T cell CD40LG gene expression and the production of IgG by autologous B cells in systemic lupus erythematosus. Clin Immunol. 2009 Sep;132(3):362-70.
3. Alcocer-Varela J, Alarcón-Riquelme M, Laffón A, Sánchez-Madrid F, Alarcón-Segovia D. Activation markers on peripheral blood T cells from patients with active or inactive systemic lupus erythematosus. Correlation with proliferative responses and production of IL-2. J Autoimmun. 1991 Dec;4(6):935-45.
4. Alvarado C, Alcocer-Varela J, Llorente L, Richaud-Patin Y, Cerbon M, Alarcon-Segovia D. Effect of CD28 antibody on T cells from patients with systemic lupus erythematosus. J Autoimmun. 1994 Dec;7(6):763-73.
5. Anand A, Dean GS, Quereshi K, Isenberg DA, Lydyard PM. Characterization of CD3+ CD4- CD8- (double negative) T cells in patients with systemic lupus erythematosus: activation markers. Lupus. 2002;11(8):493-500.
6. Antonopoulos A, Demotte N, Stroobant V, Haslam SM, van der Bruggen P, Dell A. Loss of effector function of human cytolytic T lymphocytes is accompanied by major alterations in N- and O-glycosylation. J Biol Chem. 2012;287(14): 11240-51.
7. Ardoin SP, Pisetsky DS. The role of cell death in the pathogenesis of autoimmune disease: HMGB1 and microparticles as intercellular mediators of inflammation. Mod Rheumatol. 2008;18(4):319-26.
8. Baba M, Yong Ma B, Nonaka M, Matsuishi Y, Hirano M, Nakamura N, Kawasaki N, Kawasaki N, Kawasaki T. Glycosylation-dependent interaction of Jacalin with CD45 induces T lymphocyte activation and Th1/Th2 cytokine secretion. J Leukoc Biol. 2007 Apr;81(4):1002-11.
9. Bagwell, C.B. A journey through flow cytometric immunofluorescence analyses: Finding accurate and robust algorithms that estimate positive fraction distributions. Clin. Immunol. Newsletter. 1996;16:33-7.

10. Baker MA, Taub RN, Kanani A, Brockhausen I, Hindenburg A. Increased activity of a specific sialyltransferase in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1985 Nov;66(5):1068-71.
11. Berger EG. Tn-syndrome. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Oct 8;1455(2-3):255-68.
12. Blair PJ, Riley JL, Harlan DM, Abe R, Tadaki DK, Hoffmann SC, White L, Francomano T, Perfetto SJ, Kirk AD, June CH. CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4(+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis. *J Exp Med*. 2000 Feb 21;191(4):651-60.
13. Blanco P, Pitard V, Viallard JF, Taupin JL, Pellegrin JL, Moreau JF. Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2005 Jan;52(1):201-11.
14. Blasini AM, Alonzo E, Chacón R, Riera R, Stekman IL, Rodriguez MA. Abnormal pattern of tyrosine phosphorylation in unstimulated peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 1998;7(8):515-23.
15. Blidner AG, Méndez-Huergo SP, Cagnoni AJ, Rabinovich GA. Re-wiring regulatory cell networks in immunity by galectin-glycan interactions. *FEBS Lett*. 2015 Nov 14;589(22):3407-18.
16. Blossom S, Chu EB, Weigle WO, Gilbert KM. CD40 ligand expressed on B cells in the BXSB mouse model of systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 1997 Nov 1;159(9):4580-6.
17. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum*. 1992 Jun;35(6):630-40.
18. Boumpas DT, Furie R, Manzi S, Illei GG, Wallace DJ, Balow JE, Vaishnav A; BG9588 Lupus Nephritis Trial Group. A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis Rheum*. 2003 Mar;48(3):719-27.

19. Brockhausen I, Schachter H, Stanley P. O-GalNAc Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. p.115-26.
20. Brockhausen I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Dec 6;1473(1):67-95.
21. Brusko TM, Putnam AL, Bluestone JA. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol Rev*. 2008 Jun;223:371-90. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00637.x. Review. Erratum in: *Immunol Rev*. 2009 May;229(1):388.
22. Cervera R, Pallares L. Epidemiología y clasificación del lupus eritematoso sistémico. In *Avances en lupus eritematoso sistémico*. Cervera R, Jiménez Alonso J. Marge Medica Books; Barcelona. 2008; 9-22.
23. Chervenak R, Cohen JJ. Peanut lectin binding as a marker for activated T-lineage lymphocytes. *Thymus*. 1982 Feb;4(2):61-7.
24. Chien MW, Lin MH, Huang SH, Fu SH, Hsu CY, Yen BL, Chen JT, Chang DM, Sytwu HK. Glucosamine Modulates T Cell Differentiation through Down-regulating N-Linked Glycosylation of CD25. *J Biol Chem*. 2015 Dec 4;290(49):29329-44.
25. Chowdhury B, Tsokos CG, Krishnan S, Robertson J, Fisher CU, Warke RG, Warke VG, Nambiar MP, Tsokos GC. Decreased stability and translation of T cell receptor zeta mRNA with an alternatively spliced 3'-untranslated region contribute to zeta chain down-regulation in patients with systemic lupus erythematosus. *J Biol Chem*. 2005 May 13;280(19):18959-66.
26. Clark MC, Baum LG. T cells modulate glycans on CD43 and CD45 during development and activation, signal regulation, and survival. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Apr;1253:58-67.
27. Cozzani E, Drosera M, Gasparini G, Parodi A. Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects. *Autoimmune Dis*. 2014;2014:321359.
28. Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC. Expanded double negative T cells in patients with

- systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol.* 2008 Dec 15;181(12):8761-6.
29. Crispín JC, Tsokos GC. Human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J Immunol.* 2009;183:4675-81.
30. Dai Z, Turtle CJ, Booth GC, Riddell SR, Gooley TA, Stevens AM, Spies T, Groh V. Normally occurring NKG2D+CD4+ T cells are immunosuppressive and inversely correlated with disease activity in juvenile-onset lupus. *J Exp Med.* 2009 Apr 13;206(4):793-805.
31. Dall'Olio F, Chiricolo M. Sialyltransferases in cancer. *Glycoconj J.* 2001 Nov-Dec;18(11-12):841-50.
32. Daniels MA, Devine L, Miller JD, Moser JM, Lukacher AE, Altman JD, Kavathas P, Hogquist KA, Jameson SC. CD8 binding to MHC class I molecules is influenced by T cell maturation and glycosylation. *Immunity.* 2001 Dec;15(6):1051-61.
33. De Petris S, Takacs B. Relationship between mouse lymphocyte receptors for peanut agglutinin (PNA) and *Helix pomatia* agglutinin (HPA). *Eur J Immunol.* 1983 Oct;13(10):831-40.
34. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al: Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007 204:1257–65.
35. Dean GS, Anand A, Blofeld A, Isenberg DA, Lydyard PM. Characterization of CD3+ CD4- CD8- (double negative) T cells in patients with systemic lupus erythematosus: production of IL-4. *Lupus.* 2002;11(8):501-7.
36. Deng GM, Liu L, Bahjat FR, Pine PR, Tsokos GC. Suppression of skin and kidney disease by inhibition of spleen tyrosine kinase in lupus-prone mice. *Arthritis Rheum.* 2010 Jul;62(7):2086-92.
37. Deng GM, Tsokos GC. Cholera toxin B accelerates disease progression in lupus-prone mice by promoting lipid raft aggregation. *J Immunol.* 2008 Sep 15;181(6):4019-26.

38. Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Dec 6;1473(1):21-34.
39. Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest*. 1996 May 1;97(9):2063-73.
40. Dhir V, Singh AP, Aggarwal A, Naik S, Misra R. Increased T-lymphocyte apoptosis in lupus correlates with disease activity and may be responsible for reduced T-cell frequency: a cross-sectional and longitudinal study. *Lupus*. 2009 Aug;18(9):785-91.
41. Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, Springer TA. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and regulation by glycosylation. *Cell*. 1991 Jun 14;65(6):961-71.
42. Dumont F, Habbersett RG. Unusual cell surface properties of the T lymphocyte population expanding in MRL/Mp-lpr/lpr mice. *Immunol*. 1982;47:271-81.
43. Dykstra M, Cherukuri A, Sohn HW, Tzeng SJ, Pierce SK. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:457-81.
44. Enyedy EJ, Nambiar MP, Liossis SN, Dennis G, Kammer GM, Tsokos GC. Fc epsilon receptor type I gamma chain replaces the deficient T cell receptor zeta chain in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2001 May;44(5):1114-21.
45. Fernandez DR, Telarico T, Bonilla E, Li Q, Banerjee S, Middleton FA, Phillips PE, Crow MK, Oess S, Muller-Esterl W, Perl A. Activation of mammalian target of rapamycin controls the loss of TCRzeta in lupus T cells through HRES-1/Rab4-regulated lysosomal degradation. *J Immunol*. 2009 Feb 15;182(4):2063-73.
46. Fortune F, Lehner T. Phenotypic expression of *Vicia villosa* binding T cell subsets, as markers of contrasuppressor cells in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol*. 1988;74: 100-4.
47. Fortune F, Walker J, Lefrancois M, Lehner T. The expression of carbohydrate antigens in activated T cells and in autoimmune diseases. *Scand J Immunol*. 1994;40:636-42.

48. Funauchi M, Ikoma S, Enomoto H, Horiuchi A. Decreased Th1-like and increased Th2-like cells in systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol.* 1998;27:219-24.
49. Furie R, Nicholls K, Cheng TT, Houssiau F, Burgos-Vargas R, Chen SL, Hillson JL, Meadows-Shropshire S, Kinaszczuk M, Merrill JT. Efficacy and safety of abatacept in lupus nephritis: a twelve-month, randomized, double-blind study. *Arthritis Rheumatol.* 2014 Feb;66(2):379-89.
50. Galvan M, Murali-Krishna K., Ming LL, Baum L, Ahmed R. Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from virally infected mice can distinguish effector/memory CD8+ T cells from naive cells. *J. Immunol.* 1998;161: 641-8.
51. Gang C, Jiahui Y, Huaizhou W, Qing C, Dongbao Z, Qian S. Defects of mitogen-activated protein kinase in ICOS signaling pathway lead to CD4(+) and CD8(+) T-cell dysfunction in patients with active SLE. *Cell Immunol.* 2009;258(1):83-9.
52. Gatto M, Zen M, Ghirardello A, Bettio S, Bassi N, Iaccarino L, Punzi L, Doria A. Emerging and critical issues in the pathogenesis of lupus. *Autoimmun Rev.* 2013 Feb;12(4):523-36.
53. Goodarzi MT, Turner GA. Decreased branching, increased fucosylation and changed sialylation of alpha-1-proteinase inhibitor in breast and ovarian cancer. *Clin Chim Acta.* 1995 May 15;236(2):161-71.
54. Grammatikos AP, Ghosh D, Devlin A, Kyttaris VC, Tsokos GC. Spleen tyrosine kinase (Syk) regulates systemic lupus erythematosus (SLE) T cell signaling. *PLoS One.* 2013 Aug 27;8(8):e74550.
55. Grigorian A, Torossian S, Demetriou M. T-cell growth, cell surface organization, and the galectin-glycoprotein lattice. *Immunol Rev.* 2009;230:232-46.
56. Grishkan IV, Ntranos A, Calabresi PA, Gocke AR. Helper T cells down-regulate CD4 expression upon chronic stimulation giving rise to double-negative T cells. *Cell Immunol.* 2013 Jul-Aug;284(1-2):68-74.
57. Hassan H, Reis CA, Bennett EP, Mirgorodskaya E, Roepstorff P, Hollingsworth MA, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Clausen H. The lectin domain of UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T4

- directs its glycopeptide specificities. *J Biol Chem*. 2000 Dec 8;275(49):38197-205.
58. Hernandez JD, Klein J, Van Dyken SJ, Marth JD, Baum LG. T-cell activation results in microheterogeneous changes in glycosylation of CD45. *Int Immunol*. 2007 Jul;19(7):847-56.
59. Hernandez JD, Nguyen JT, He J, Wang W, Ardman B, Green JM, Fukuda M, Baum LG. Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death. *J Immunol*. 2006 Oct 15;177(8):5328-36.
60. Hernández P, Tetaert D, Vergoten G, Debray H, del Carmen Jimenez M, Fernández G, Agundis C, Degand P, Zenteno E. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* lectin for O-glycopeptides. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Nov1;1674(3):282-90.
61. Hu S, Tao D, He P. Expression of costimulatory molecules B7/CD28 in systemic lupus erythematosus. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2004;24(3):245-65.
62. Hutloff A, Büchner K, Reiter K, Baelde HJ, Odendahl M, Jacobi A, Dörner T, Kroczeck RA. Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004 Oct;50(10):3211-20.
63. Jiménez-Martínez MC, Lascurain R, Méndez-Reguera A, Estrada-Parra S, Estrada-García I, Gorocica P, Martínez-Cairo S, Zenteno E, Chávez R. O-glycosylation of NnTreg lymphocytes recognized by the *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:506807.
64. Jin O, Sun LY, Zhou KX, Zhang XS, Feng XB, Mok MY, Lau CS. Lymphocyte apoptosis and macrophage function: correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2005 Apr;24(2):107-10.
65. Ju T, Cummings RD. Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome. *Nature*. 2005 Oct 27;437(7063):1252.
66. Juang YT, Tenbrock K, Nambiar MP, Gourley MF, Tsokos GC. Defective production of functional 98-kDa form of Elf-1 is responsible for the decreased

- expression of TCR zeta-chain in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2002 Nov 15;169(10):6048-55.
67. Jung TM, Gallatin WM, Weissman IL, Dailey MO. Down-regulation of homing receptors after T cell activation. *J Immunol.* 1988 Dec 15;141(12):4110-7.
68. Jury EC, Isenberg DA, Mauri C, Ehrenstein MR. Atorvastatin restores Lck expression and lipid raft-associated signaling in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2006 Nov 15;177(10):7416-22.
69. Jury EC, Kabouridis PS, Abba A, Mageed RA, Isenberg DA. Increased ubiquitination and reduced expression of LCK in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2003 May;48(5):1343-54.
70. Jury EC, Kabouridis PS, Flores-Borja F, Mageed RA, Isenberg DA. Altered lipid raft-associated signaling and ganglioside expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 2004 Apr;113(8):1176-87.
71. Kabouridis PS, Jury EC. Lipid rafts and T-lymphocyte function: implications for autoimmunity. *FEBS Lett.* 2008 Nov 12;582(27):3711-8.
72. Kailemia MJ, Park D, Lebrilla CB. Glycans and glycoproteins as specific biomarkers for cancer. *Anal Bioanal Chem.* 2017 Jan;409(2):395-410.
73. Kalunian KC, Davis JC Jr, Merrill JT, Totoritis MC, Wofsy D; IDEC-131 Lupus Study Group. Treatment of systemic lupus erythematosus by inhibition of T cell costimulation with anti-CD154: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2002 Dec;46(12):3251-8.
74. Kaneko H, Saito K, Hashimoto H, Yagita H, Okumura K, Azuma M. Preferential elimination of CD28+ T cells in systemic lupus erythematosus (SLE) and the relation with activation-induced apoptosis. *Clin Exp Immunol.* 1996 Nov;106(2):218-29.
75. Karimi MH, Pourfathollah AA. CD40 and tolerance induction. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2012 Mar;11(1):1-13.
76. Kato K, Santana-Sahagún E, Rassenti LZ, Weisman MH, Tamura N, Kobayashi S, Hashimoto H, Kipps TJ. The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1999 Oct;104(7):947-55.

77. Katsiari CG, Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC. Protein phosphatase 2A is a negative regulator of IL-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 2005 Nov;115(11):3193-204.
78. Kawai T, Andrews D, Colvin RB, Sachs DH, Cosimi AB. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med.* 2000 Feb;6(2):114.
79. Khan S, Holding S, Doré PC, Sewell WA. Abnormal O-glycosylation of CD43 may account for some features of Wiskott-Aldrich syndrome. *Med Hypotheses.* 2008;70(2):269-72.
80. Koshy M, Berger D, Crow MK. Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes. *J Clin Invest.* 1996 Aug 1;98(3):826-37.
81. Kow NY, Mak A. Costimulatory pathways: physiology and potential therapeutic manipulation in systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:245928. doi: 10.1155/2013/245928. Epub 2013 Jul 29.
82. Krishnan S, Juang YT, Chowdhury B, Magilavy A, Fisher CU, Nguyen H, Nambiar MP, Kyttaris V, Weinstein A, Bahjat R, Pine P, Rus V, Tsokos GC. Differential expression and molecular associations of Syk in systemic lupus erythematosus T cells. *J Immunol.* 2008 Dec 1;181(11):8145-52.
83. Krishnan S, Kiang JG, Fisher CU, Nambiar MP, Nguyen HT, Kyttaris VC, Chowdhury B, Rus V, Tsokos GC. Increased caspase-3 expression and activity contribute to reduced CD3zeta expression in systemic lupus erythematosus T cells. *J Immunol.* 2005 Sep 1;175(5):3417-23.
84. Krishnan S, Nambiar MP, Warke VG, Fisher CU, Mitchell J, Delaney N, Tsokos GC. Alterations in lipid raft composition and dynamics contribute to abnormal T cell responses in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2004 Jun 15;172(12):7821-31.
85. Kuhns W, Rutz V, Paulsen H, Matta KL, Baker MA, Barner M, Granovsky M, Brockhausen I. Processing O-glycan core 1, Gal beta 1-3GalNAc alpha-R. Specificities of core 2, UDP-GlcNAc: Gal beta 1-3 GalNAc-R(GlcNAc to GalNAc) beta 6-N-acetylglucosaminyltransferase and CMP-sialic acid: Gal beta 1-3GalNAc-alpha 3-sialyltransferase. *Glycoconj J.* 1993 Oct;10(5):381-94.

86. La Cava A: T-regulatory cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2008;17:421–25.
87. Lafont V, Dornand J, Covassin L, Liautard JP, Favero J. The lectin jacalin triggers CD4-mediated lymphocyte signaling by binding CD4 through a protein-protein interaction. *J Leukoc Biol*. 1996 May;59(5):691-6.
88. Lettesjö H, Burd GP, Mageed RA. CD4+ T lymphocytes with constitutive CD40 ligand in preautoimmune (NZB x NZW)F1 lupus-prone mice: phenotype and possible role in autoreactivity. *J Immunol*. 2000 Oct 1;165(7):4095-104.
89. Liang B, Workman C, Lee J, et al: Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J Immunol*. 2008;180:5916–26.
90. Lin CR, Wei TY, Tsai HY, Wu YT, Wu PY, Chen ST. Glycosylation-dependent interaction between CD69 and S100A8/S100A9 complex is required for regulatory T-cell differentiation. *FASEB J*. 2015 Dec;29(12):5006-17.
91. Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *J Immunol*. 1991;147:117-23.
92. Liossis SN, Ding XZ, Dennis GJ, Tsokos GC. Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *J Clin Invest*. 1998;101:1448-57.
93. Liu Z, Davidson A. Taming lupus-a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nat Med*. 2012 Jun 6;18(6):871-82.
94. Lotan R, Skutelsky E, Danon D, Sharon N. The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). *J Biol Chem*. 1975;250:8518-23.
95. Lu Q, Wu A, Tesmer L, Ray D, Yousif N, Richardson B. Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus. *J Immunol*. 2007 Nov 1;179(9):6352-8.

96. Lyssuk EY, Torgashina AV, Soloviev SK, et al: Reduced number and function of CD4 + CD25 high FoxP3 + regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol.* 2007;601:113–9.
97. Ma BY, Yoshida K, Baba M, Nonaka M, Matsumoto S, Kawasaki N, Asano S, Kawasaki T. The lectin Jacalin induces human B-lymphocyte apoptosis through glycosylation-dependent interaction with CD45. *Immunology.* 2009 Aug;127(4):477-88.
98. Mahanta SK, Sastry MV, Surolia A. Topography of the combining region of a Thomsen-Friedenreich-antigen-specific lectin jacalin (*Artocarpus integrifolia* agglutinin). A thermodynamic and circular-dichroism spectroscopic study. *Biochem J.* 1990;265:831-40.
99. Mak A, Kow NY. The pathology of T cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol Res.* 2014;2014:419029.
100. Meany DL, Chan DW. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. *Clin Proteomics.* 2011 Jun 3;8(1):7.
101. Mellor-Pita S, Citores MJ, Castejon R, et al: Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:553-54.
102. Mi XB, Zeng FQ. Hypomethylation of interleukin-4 and -6 promoters in T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Acta Pharmacol Sin.* 2008;29:105-12.
103. Mihara M, Ohsugi Y, Saito K, et al. Immunologic abnormality in NZB/NZW F1 mice. Thymus-independent occurrence of B cell abnormality and requirement for T cells in the development of autoimmune disease, as evidenced by an analysis of the athymic nude individuals. *J Immunol.* 1988; 141: 85–90.
104. Mihara M, Tan I, Chuzhin Y, Reddy B, Budhai L, Holzer A, Gu Y, Davidson A. CTLA4Ig inhibits T cell-dependent B-cell maturation in murine systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 2000 Jul;106(1):91-101.
105. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, et al: Cutting edge: human CD4 + CD25 + T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol.* 2004;172:4676–80.

106. Mohan C, Shi Y, Laman JD, Datta SK. Interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis. *J Immunol.* 1995 Feb 1;154(3):1470-80.
107. Moulton VR, Tsokos GC. Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2011 Mar 17;13(2):207.
108. Nambiar MP, Enyedy EJ, Fisher CU, Krishnan S, Warke VG, Gilliland WR, Oglesby RJ, Tsokos GC. Abnormal expression of various molecular forms and distribution of T cell receptor zeta chain in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2002 Jan;46(1):163-74.
109. Nambiar MP, Enyedy EJ, Warke VG, Krishnan S, Dennis G, Kammer GM, Tsokos GC. Polymorphisms/mutations of TCR-zeta-chain promoter and 3' untranslated region and selective expression of TCR zeta-chain with an alternatively spliced 3' untranslated region in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2001 Mar;16(2):133-42.
110. Nguyen JT, Evans DP, Galvan M, Pace KE, Leitenberg D, Bui TN, Baum LG. CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. *J Immunol.* 2001 Nov 15;167(10):5697-707.
111. Nucamendi GC, Guillén-Domínguez G, Sánchez Garay EM. ¿Qué es el Lupus eritematoso?. *Boletín epidemiológico.* 2013 Jul;30(30): 1-4
112. Odegard JM, DiPlacido LD, Greenwald L, Kashgarian M, Kono DH, Dong C, Flavell RA, Craft J. ICOS controls effector function but not trafficking receptor expression of kidney-infiltrating effector T cells in murine lupus. *J Immunol.* 2009 Apr 1;182(7):4076-84
113. Oelke K, Richardson B. Decreased T cell ERK pathway signaling may contribute to the development of lupus through effects on DNA methylation and gene expression. *Int Rev Immunol.* 2004 May-Aug;23(3-4):315-31.
114. Ohl K, Tenbrock K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol.* 2015 Feb;45(2):344-55.
115. Panoskaltsis N, Reid CD, Knight SC. Quantification and cytokine production of circulating lymphoid and myeloid cells in acute myelogenous leukaemia. *Leukemia.* 2003;17:716–30.

116. Pereira ME, Kabat EA, Lotan R, Sharon N. Immunochemical studies on the specificity of the peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin. *Carbohydr. Res.* 1976;51:107-18.
117. Pilatte Y, Bignon J, Lambré CR. Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. *Glycobiology.* 1993 Jun;3(3):201-18.
118. Piller F, Piller V, Fox RI, Fukuda M. Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J Biol Chem.* 1988 Oct 15;263(29):15146-50.
119. Porras F, Urrea F, Ortiz B, Martínez-Cairo S, Bouquelet S, Martínez G, Lascurain R, Zenteno E. Isolation of the receptor for the *Amaranthus leucocarpus* lectin from human T lymphocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jun 20;1724(1-2):155-62.
120. Quezada SA, Eckert M, Adeyi OA, Schned AR, Noelle RJ, Burns CM. Distinct mechanisms of action of anti-CD154 in early versus late treatment of murine lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2003 Sep;48(9):2541-54.
121. Rajagopalan S, Zordan T, Tsokos GC, Datta SK. Pathogenic anti-DNA autoantibody-inducing T helper cell lines from patients with active lupus nephritis: isolation of CD4-8- T helper cell lines that express the gamma delta T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:7020-4.
122. Ramanujam M, Wang X, Huang W, Schiffer L, Grimaldi C, Akkerman A, Diamond B, Madaio MP, Davidson A. Mechanism of action of transmembrane activator and calcium modulator ligand interactor-Ig in murine systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2004 Sep 1;173(5):3524-34.
123. Reisner Y, Linker-Israeli M, Sharon N. Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cell Immunol.* 1976 Jul;25(1):129-34.
124. Rider V, Jones S, Evans M, Bassiri H, Afsar Z, Abdou NI. Estrogen increases CD40 ligand expression in T cells from women with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2001 Dec;28(12):2644-9.

125. Ripley BJ, Goncalves B, Isenberg DA, Latchman DS, Rahman A. Raised levels of interleukin 6 in systemic lupus erythematosus correlate with anaemia. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:849-53.
126. Robak E, Sysa-Jedrzejowska A, Robak T, Smolewski P. Peripheral blood lymphocyte apoptosis and circulating dendritic cells in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with immunological status and disease-related symptoms. *Clin Rheumatol*. 2006 Mar;25(2):225-33.
127. Sakaguchi S: Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 2000;101:455–58.
128. Sánchez-Rodríguez SH , Barajas-Vásquez GE, Ramírez-Alvarado DA, Moreno-García A, Barbosa-Cisneros OY. Lupus eritematoso: enfermedad autoinmune sistémica y órgano específica. *Rev Biomed*. 2004;15:173-80.
129. Sarkar M, Wu AM, Kabat EA. Immunochemical studies on the carbohydrate specificity of *Maclura pomifera* lectin. *Arch Biochem Biophys*. 1981;209:204-18.
130. Shah D, Aggarwal A, Bhatnagar A, Kiran R, Wanchu A. Association between T lymphocyte sub-sets apoptosis and peripheral blood mononuclear cells oxidative stress in systemic lupus erythematosus. *Free Radic Res*. 2011 May;45(5):559-67.
131. Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 2004;14: 53R-62R.
132. Shivakumar S, Tsokos GC, Datta SK. T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J Immunol*. 1989;143:103-12.
133. Sidiropoulos PI, Boumpas DT. Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2004;13(5):391-7.
134. Sieling PA, Porcelli SA, Duong BT, Spada F, Bloom BR, Diamond B, Hahn BH. Human double-negative T cells in systemic lupus erythematosus provide help for IgG and are restricted by CD1c. *J Immunol*. 2000 Nov 1;165(9):5338-44.
135. Simons K, Sampaio JL. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Oct 1;3(10):a004697.

136. Simpson TR, Quezada SA, Allison JP. Regulation of CD4 T cell activation and effector function by inducible costimulator (ICOS). *Curr Opin Immunol*. 2010 Jun;22(3):326-32.
137. Song LJ, Wang X, Wang XP, Li D, Ding F, Liu HX, Yu X, Li XF, Shu Q. Increased Tim-3 expression on peripheral T lymphocyte subsets and association with higher disease activity in systemic lupus erythematosus. *Diagn Pathol*. 2015 Jun 16;10:71.
138. Stowell SR, Ju T, Cummings RD. Protein glycosylation in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:473-510.
139. Su YJ, Cheng TT, Chen CJ, Chiu WC, Hsu CY, Chang WN, Tsai NW, Kung CT, Wang HC, Lin WC, Huang CC, Chang YT, Su CM, Chiang YF, Cheng BC, Lin YJ, Lu CH. The association among leukocyte apoptosis, autoantibodies and disease severity in systemic lupus erythematosus. *J Transl Med*. 2013 Oct 19;11:261.
140. Suzuki H, Raska M, Yamada K, Moldoveanu Z, Julian BA, Wyatt RJ, Tomino Y, Gharavi AG, Novak J. Cytokines alter IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzymes. *J Biol Chem*. 2014;289:5330-9.
141. Tenbrock K, Kyttaris VC, Ahlmann M, Ehrchen JM, Tolnay M, Melkonyan H, Mawrin C, Roth J, Sorg C, Juang YT, Tsokos GC. The cyclic AMP response element modulator regulates transcription of the TCR zeta-chain. *J Immunol*. 2005 Nov 1;175(9):5975-80.
142. Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, Zwirner NW, Poirier F, Riley EM, Baum LG, Rabinovich GA. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol*. 2007;8:825-34.
143. Tsokos GC, Liossis SN. Immune cell signaling defects in lupus: activation, anergy and death. *Immunol Today*. 1999 Mar;20(3):119-24.
144. Tuosto L, Parolini I, Schröder S, Sargiacomo M, Lanzavecchia A, Viola A. Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation. *Eur J Immunol*. 2001 Feb;31(2):345-9.

145. Umare V, Pradhan V, Nadkar M, Rajadhyaksha A, Patwardhan M, Ghosh KK, Nadkarni AH. Effect of Proinflammatory Cytokines (IL-6, TNF- α , and IL-1 β) on Clinical Manifestations in Indian SLE Patients. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:385297.
146. Urquizu-Padilla M, Balada E, Cortés F, Pérez EH, Vilardell-Tarrés M, Ordi-Ros J. Serum levels of soluble CD40 ligand at flare and at remission in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2009 May;36(5):953-60.
147. Urrea F, Ortiz-Quintero B, Sanchez-Garcia FJ, Blanco-Favela F, Garfias Y, Lascurain R, Zenteno E. The *Amaranthus leucocarpus* lectin enhances the anti-CD3 antibody-mediated activation of human peripheral blood CD4⁺ T cells. *Tohoku J Exp Med.* 2010 Aug;221(4):271-9.
148. Urrea F, Zenteno E, Avila-Moreno F, Sanchez-Garcia FJ, Zuñiga J, Lascurain R, Ortiz-Quintero B. *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) enhances anti-CD3-dependent activation of murine T cells and promotes cell survival. *Immunol Invest.* 2011;40(2):113-29.
149. Vajaria BN, Patel KR, Begum R, Patel PS. Sialylation: an Avenue to Target Cancer Cells. *Pathol Oncol Res.* 2016 Jul;22(3):443-7.
150. van Vliet SJ, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Regulation of effector T cells by antigen-presenting cells via interaction of the C-type lectin MGL with CD45. *Nat Immunol.* 2006 Nov;7(11):1200-8.
151. van Vliet SJ, Vuist IM, Lenos K, Tefsen B, Kalay H, García-Vallejo JJ, van Kooyk Y. Human T cell activation results in extracellular signal-regulated kinase (ERK)- calcineurin-dependent exposure of Tn antigen on the cell surface and binding of the macrophage galactose-type lectin (MGL). *J Biol Chem.* 2013 Sep 20;288(38):27519-32.
152. Varki A. Biological Roles of Glycans. *Glycobiology.* 2017 Jan;27(1):3-49.
153. Vassilopoulos D, Kovacs B, Tsokos GC. TCR/CD3 complex-mediated signal transduction pathway in T cells and T cell lines from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1995;155:2269-81.
154. Venkitachalam S, Guda K. Altered glycosyltransferases in colorectal cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016 Nov;4:1-3.

155. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jul;8(7):523-32. doi: 10.1038/nri2343.
156. Wandall HH, Irazoqui F, Tarp MA, Bennett EP, Mandel U, Takeuchi H, Kato K, Irimura T, Suryanarayanan G, Hollingsworth MA, Clausen H. The lectin domains of polypeptide GalNAc-transferases exhibit carbohydrate-binding specificity for GalNAc: lectin binding to GalNAc-glycopeptide substrates is required for high density GalNAc-O-glycosylation. *Glycobiology*. 2007 Apr;17(4):374-87.
157. Wang Y, Ju T, Ding X, Xia B, Wang W, Xia L, He M, Cummings RD. Cosmc is an essential chaperone for correct protein O-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 18;107(20):9228-33.
158. Wenzel J, Henze S, Brähler S, Bieber T, Tüting T. The expression of human leukocyte antigen-DR and CD25 on circulating T cells in cutaneous lupus erythematosus and correlation with disease activity. *Exp Dermatol*. 2005 Jun;14(6):454-9.
159. Wofsy D, Seaman WE. Reversal of advanced murine lupus in NZB/NZW F1 mice by treatment with monoclonal antibody to L3T4. *J Immunol*. 1987; 138: 3247-53.
160. Yamada K, Kobayashi N, Ikeda T, Suzuki Y, Tsuge T, Horikoshi S, Emancipator SN, Tomino Y. Down-regulation of core 1 beta1,3-galactosyltransferase and Cosmc by Th2 cytokine alters O-glycosylation of IgA1. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:3890-7.
161. Yang JH, Zhang J, Cai Q, Zhao DB, Wang J, Guo PE, Liu L, Han XH, Shen Q. Expression and function of inducible costimulator on peripheral blood T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2005 Oct;44(10):1245-54.
162. Zenteno E, Lascurain R, Montaña LF, Vazquez L, Debray H, Montreuil J. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj J*. 1992 Aug;9(4):204-8.
163. Zhou RW, Mkhikian H, Grigorian A, Hong A, Chen D, Arakelyan A, Demetriou M. N-glycosylation bidirectionally extends the boundaries of thymocyte positive selection by decoupling Lck from Ca²⁺ signaling. *Nat Immunol*. 2014 Nov;15(11):1038-45.

164. Zhou Y, Yuan J, Pan Y, Fei Y, Qiu X, Hu N, Luo Y, Lei W, Li Y, Long H, Sawalha Li WX, Pan HF, Chen GP, Tao JH, Li XP, Ye DQ. Expression of inducible costimulator on peripheral blood T lymphocytes in patients with lupus nephritis. *Rheumatol Int.* 2012 Jul;32(7):2051-5.