



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ANÁLISIS DE LA SIALILACIÓN $\alpha 2,6$ EN SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS
HUMANOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
GONZÁLEZ AGUILAR GLORIA ADALERI

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. EDA PATRICIA TENORIO ZUMÁRRAGA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DR RAFAEL SAAVEDRA DURÁN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2025



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.

**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo a lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

Análisis de la sialilación $\alpha 2,6$ en subpoblaciones de linfocitos humanos

Que presenté para obtener el grado de MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, es original, de mí autoría y lo realicé con rigor metodológico exigido por el Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referenciadas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de obtención de mi grado académico.

Atentamente



GONZÁLEZ AGUILAR GLORIA ADALERI
No de cuenta UNAM: 313179116

(Nombre, firma y número de cuenta del estudiante)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ANÁLISIS DE LA SIALILACIÓN α 2,6 EN SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS
HUMANOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
GONZÁLEZ AGUILAR GLORIA ADALERI

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. EDA PATRICIA TENORIO ZUMÁRRAGA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DR RAFAEL SAAVEDRA DURÁN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM
DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2025

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD (FACULTAD DE MEDICINA)
OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/0047/2025
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de noviembre de 2024** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** de la estudiante **GONZÁLEZ AGUILAR GLORIA ADALERI** con número de cuenta **313179116** con la tesis titulada **“ANÁLISIS DE LA SIALILACIÓN α 2,6 EN SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS HUMANOS”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. EDA PATRICIA TENORIO ZUMÁRRAGA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. GOHAR GEVORGYAN
Vocal: DR. JOSÉ FRANCISCO TORRES QUIROZ
Vocal: DR. JOSÉ LUIS SÁNCHEZ SALGADO
Vocal: DR. JOSÉ LUIS REYES HERNÁNDEZ
Secretario: DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 15 de enero de 2025

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO



c. c. p. Expediente del alumno

ACBB/RCHT/EARR/rcht

Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM que me brindo esta gran oportunidad

Agradezco el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de Maestría, a través de la beca otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), que ha pasado a ser la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI).

Al Proyecto de Investigación PAPIIT IN221124 por el apoyo a esta investigación.

A mi tutor y al comité tutor, por su apoyo, paciencia y enseñanzas que me ayudaron a realizar este trabajo

Dra. Eda Patricia Tenorio Zumárraga

Dr. Rafael Saavedra Durán

Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo

Agradecimientos a título personal

A mi madre, María del Carmen Margarita Aguilar Bonilla, mi fuente de vida, fuerza, motivación e inspiración para continuar este camino, gracias por darme la vida y enseñarme a vivirla no solo una, sino dos veces.

A mi hermano Jorge y su esposa Mariana, son el soporte y la seguridad que hacen que pueda seguir construyendo cada objetivo que me propongo. Gracias por tanto esfuerzo y por no rendirse conmigo a pesar de las circunstancias.

A mi hermana Mireya y su esposo Gustavo, son mi apoyo, mis confidentes, mis cómplices en esta aventura llamada vida; gracias por escucharme siempre, tomarme en cuenta y valorar mi voz; son mi cordura y mi valentía.

A mis sobrinos Alondra, Mabel, Uziel y Jorge Uriel, sé que la esperanza y el amor verdadero existen porque lo veo en sus ojos; mientras ustedes crean en mí yo no me detendré, porque mientras yo viva ustedes tendrán un corazón que les pertenece; recuerden que siempre se pueden sentar en mis piernas.

A los miembros de mi laboratorio, Dra. Eda, Dr. Lenin, Vanessa, Mari, Miguel y Alan, son la prueba de que hay personas que llegan a tu vida para hacerte crecer, sanar y mejorar, no solo en el trabajo, también en lo personal. Gracias por tantas risas y horas de trabajo tan bellas, por esperarme para irnos juntas todos los días; particularmente, Dra. Eda, gracias por el apoyo incondicional, me enseñó más que citometría; ahora tengo un lugar seguro. Vamos juntos, como la familia que somos.

A mis amigas y amigos: Ingrid, gracias por esta conexión tan hermosa, sé que si hay alguien incondicional en esta vida y en las que vengan eres tú; Jessica, no hay nada que sea tan malo que juntas no lo podamos resolver, gracias por permanecer; Abril, gracias por estos 16 años de amistad, todo cambia, pero nosotras permanecemos; María Fernanda, eres una constante en mi vida, ahora es poco el tiempo que pasamos juntas, pero es maravilloso, y Fernando, gracias por ser quién resuelve todas mis dudas existenciales, académicas y burocráticas.

A mi equipo del gimnasio, Alfredo, Yolotzin y Salvador, gracias por tanta paciencia que me tienen, por las risas y el dolor muscular. Ustedes hacen que me olvide de todos mis problemas y pueda cerrar el día de la mejor manera.

A mi legado, Miguelito, Juanita, papá Quique y Javier, cada paso que doy es con ustedes a mi lado, fe hasta el último momento...

A la Facultad de Medicina

Al jurado de grado, por sus consejos y observaciones

Dra. Gohar Gevorgyan

Dr. José Francisco Torres Quiroz

Dr. José Luis Sánchez Salgado

Dr. José Luis Reyes Hernández

Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo

Dedicatoria

“No hay dolor que sea eterno,
no es eterno un hasta luego,
hasta luego es un regreso,
no hay regreso sin encuentro,
y un encuentro es lo más bello
cuando estemos frente a frente”

Jorge Luis Piloto & Yoel Henríquez

A mi padre, Jorge Enrique González Mirraji.

Índice

Lista de figuras

Lista de tablas

Índice de abreviaturas

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
1. El sistema inmunológico	5
1.1. Respuesta inmune innata	6
1.2. Respuesta inmune adaptativa	7
2. Células linfoides	8
2.1 Linfocitos T	8
2.2 Linfocitos B	14
2.3 Células NK	17
3. Modificaciones postraduccionales	22
3.1 Glicosilación	23
Antecedentes	31
Hipótesis	32
Objetivos	33
General	33
Particulares	33
Metodología	34
1. Donadores	34
2. Obtención de células mononucleadas	35
3. Citometría de flujo	35
3.1 Citometría de flujo	35
3.2 Anticuerpos y colorantes	36
3.3 Diseño de panales experimentales	37
3.4 inmunofluorescencia directa	38
3.5 inmunofluorescencia indirecta	39
3.6 Determinación de la viabilidad	39
4. software de Análisis y Estadística	39
Resultados	40
1. Linfocitos T CD4 ⁺	41

2. Linfocitos CD8 ⁺	45
3. Linfocitos TCR $\gamma\delta$ ⁺	48
4. Linfocitos B CD20 ⁺	50
5. Células NK CD16 ^{Lw} CD56 ^{Hi}	54
6. Células NK CD16 ^{Hi} CD56 ^{Md}	58
7. Análisis de la sialilación en células de linaje linfoide	61
7.1 Sialilación α 2,6	61
7.2 Sialilación α 2,3	63
Discusión	65
Conclusiones	73
Referencias bibliográficas	74
Anexo	82

Lista de figuras

Figura 1. Respuesta inmune innata y adaptativa

Figura 2. Estructura del TCR-CD3 $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$

Figura 3. Complejo TCR-CD3 en linfocitos CD4⁺

Figura 4. Complejo TCR-CD3 en linfocitos CD8⁺

Figura 5. Estructura del BCR

Figura 6. Estructura de una inmunoglobulina

Figura 7. Subpoblaciones de células NK

Figura 8. Modificaciones postraduccionales

Figura 9. Glicosilaciones

Figura 10. Estructura de los ácidos siálicos

Figura 11. Ejemplos de sialilación y sistema inmune

Figura 12. Estrategia de análisis de linfocitos T

Figura 13. Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ en linfocitos T CD4⁺

Figura 14. Análisis comparativo de la Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ en linfocitos CD4⁺

Figura 15. Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ en linfocitos T CD8⁺

Figura 16. Análisis comparativo de la Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ en linfocitos CD8⁺

Figura 17. Estrategia de análisis de linfocitos TCR $\gamma\delta$

Figura 18. Sialilación $\alpha 2,6$ en linfocitos TCR $\gamma\delta$

Figura 19. Estrategia de análisis de linfocitos B

Figura 20. Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ en linfocitos B

Figura 21. Análisis comparativo de la Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ en linfocitos B CD20⁺

Figura 22. Estrategia de análisis de células NK

Figura 23. Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ en células NK CD16^{Lw} CD56^{Hi}

Figura 24 Análisis comparativo de la Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ en células NK CD16^{Lw} CD56^{Hi}

Figura 25. Sialilación $\alpha 2,6$ $\alpha 2,3$ en células NK CD16^{Hi} CD56^{Md}

Figura 26. Análisis comparativo de la Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ en células NK CD16^{Hi} CD56^{Md}

Figura 27. Sialilación $\alpha 2,6$ en células linfoides

Figura 28. Sialilación en $\alpha 2,3$ células linfoides

Lista de tablas

Tabla 1. Marcadores de membrana en Linfocitos T

Tabla 2. Subtipos de células T CD4

Tabla 3. Marcadores de membrana en Linfocitos B

Tabla 4. Receptores activadores e inhibidores de células NK

Tabla 5. Marcadores de membrana en células NK

Tabla 6. Familias de Sialiltransferasas

Tabla 7. Características del citómetro

Tabla 8. Características del citómetro

Tabla 9. Características de los anticuerpos

Tabla 10. Características de los fluorocromos

Tabla 11. Panel para citometría de flujo de linfocitos T

Tabla 12. Panel para citometría de flujo de linfocitos TCR $\gamma\delta$

Tabla 13. Panel para citometría de flujo de linfocitos B

Tabla 14. Panel para citometría de flujo de células NK

Índice de abreviaturas

Ab: anticuerpos (del inglés, *Antibodies*)

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (del inglés, *antibody-dependent cellular-cytotoxicity*)

Ag: antígeno

APC: célula presentadora de antígeno (del inglés, *antigen presenting cell*)

Asn: asparagina

BCR: receptor de células B (del inglés, *B cell receptor*)

Bregs: células B reguladoras

CLP: célula progenitora linfóide (del inglés, *lymphoid progenitor cell*)

cNK: células NK convencionales

DC: células dendríticas (del inglés, *dendritic cells*)

DPBS: buffer de fosfatos

Gal: galactosa

GalNAc: N-acetilgalactosamina

Glc: glucosa

ILC: célula linfóide innata (del inglés, *innate lymphoid cell*)

MAL II: lectina dos de *Makia amurensis*

Man: manosa

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, *major histocompatibility complex*)

NK: células asesinas naturales (del inglés, *Natural Killers*)

PBMC: células mononucleadas de sangre periférica (del inglés, *peripheral blood mononuclear cells*)

PRR: receptores de reconocimiento de patrones (del inglés *pattern recognition receptors*)

PTM: modificaciones postraduccionales (del inglés, *post translational modifications*)

RER: retículo endoplásmico rugoso

ROS: especies reactivas de oxígeno (del inglés, *reactive oxygen species*)

Ser: serina

Sial α 2,6: Sialilación α 2,6

SN: lectina de *Sambucus nigra*

STs: Sialiltransferasas

T. gondii: *Toxoplasma gondii*

TCR: receptor de Células T (del inglés, *T cell receptor*)

Th: linfocitos T cooperadores (del inglés, *T helper lymphocytes*)

Thr: treonina

Treg: linfocitos T reguladores (del inglés, *regulatory T lymphocytes*)

trNK: células NK residentes en tejido

Resumen

La sialilación es un tipo de glicosilación en la que se lleva a cabo la adición terminal de unidades de ácido siálico (Sial) a oligosacáridos y glicoproteínas. Los Sial se unen ya sea en galactosa (Gal) o *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) a través de enlaces $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$, o a otros restos de ácido siálico a través de enlaces $\alpha 2,8$ o $\alpha 2,9$. Las estructuras sialiladas se expresan de manera específica en cada tejido y se regulan durante diferentes estados celulares como la activación y diferenciación celular, además, los glicanos sialilados tanto intracelulares como de superficie, participan en la transducción de señales.

Recientemente, utilizando la lectina de *Sambucus nigra* (SN), que reconoce sialilaciones en la posición $\alpha 2,6$ (Sial $\alpha 2,6$), identificamos dos nuevos estados celulares de activación, en linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, a partir de la expresión de la Sial $\alpha 2,6$ durante la infección aguda con *Toxoplasma gondii* en un modelo murino. La subpoblación SN^{-Dim} produce IFN γ e IL-10, por otro lado, la subpoblación SN⁺ produce IL-2, esto nos sugiere que cada glicofenotipo se relaciona con funciones particulares; la población SNA^{-Dim} podría migrar a los tejidos correspondientes a ejecutar sus funciones y SN⁺ podría permanecer en el bazo a generar otras células efectoras. Estos datos muestran que la expresión de la Sial $\alpha 2,6$ nos permite identificar estadios funcionales altamente especializados que serían imposibles de detectar utilizando únicamente perfiles de expresión de proteínas de membrana; por lo tanto, podría utilizarse como un marcador con potencial diagnóstico y de seguimiento en patologías inflamatorias.

Para llegar a este punto es fundamental determinar el comportamiento de la Sial $\alpha 2,6$ en linfocitos humanos; en este trabajo se analizó la expresión de la Sial $\alpha 2,6$ por citometría de flujo en células de linaje linfóide de sangre periférica humana de hombres y mujeres sanos. Los resultados muestran que la expresión de Sial $\alpha 2,6$ en linfocitos CD4⁺ y en células NK CD16^{Hi}CD56^{Med} es diferencial entre ambos sexos, tanto el porcentaje de células sialiladas como en el nivel de expresión, es mayor en mujeres; por otro lado observamos que todos los linfocitos CD8⁺, linfocitos B y células NK CD16^{Lw}CD56^{Hi} expresan Sial $\alpha 2,6$, sin embargo, el nivel de expresión es al menos dos veces mayor en las células de mujeres en comparación con las de los hombres; finalmente, no se identificó diferencias en la expresión o el porcentaje de células TCR $\gamma\delta$ sialiladas entre ambos sexos. Por lo tanto, se concluye

que la Sial α 2,6 se expresa diferencialmente en células linfoides en condiciones basales, manteniendo un comportamiento uniforme entre cada linaje celular analizado; dado que no existen descripciones publicadas de los glicofenotipos distinguibles a partir de la Sial α 2,6 en humanos, este estudio es fundamental para comenzar a comprender la biología linfocitaria desde una nueva perspectiva y contribuye a la caracterización de nuevas poblaciones, como blanco terapéutico y/o como biomarcador de seguimiento clínico.

Abstract

Sialylation is a type of glycosylation involving the terminal addition of sialic acid (Sial) units to oligosaccharides and glycoproteins. Sialic acids are attached either to galactose (Gal) or *N-acetylgalactosamine* (GalNAc) via $\alpha 2,3$ or $\alpha 2,6$ linkages, or to other sialic acid residues through $\alpha 2,8$ or $\alpha 2,9$ linkages. These sialylated structures are expressed in a tissue-specific manner and are regulated during different cellular states, such as activation and differentiation. Additionally, both intracellular and surface sialylated glycans play a role in signal transduction.

Recently, using the *Sambucus nigra* lectin (SNA), which recognizes $\alpha 2,6$ -linked sialic acids (Sial $\alpha 2,6$), we identified two novel cellular states in CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes based on Sial $\alpha 2,6$ expression during acute infection with *Toxoplasma gondii* in a murine model. The SN^{-Dim} subpopulation produces IFN γ and IL-10, while the SN⁺ subpopulation produces IL-2. This suggests that each glycophenotype is associated with specific functions; for instance, the former may migrate to tissues to carry out their functions, whereas the latter remains in the spleen to generate new effector cells. These findings demonstrate that Sial $\alpha 2,6$ expression allows us to identify highly specialized functional stages that would be undetectable using membrane protein expression profiles alone. Therefore, it could serve as a potential diagnostic and monitoring marker in inflammatory conditions.

To advance in this area, it is essential to understand the behavior of Sial $\alpha 2,6$ in human lymphocytes. In this study, we analyzed Sial $\alpha 2,6$ expression by flow cytometry in lymphoid lineage cells from the peripheral blood of healthy individuals. The results show that Sial $\alpha 2,6$ expression in CD4⁺ lymphocytes and CD16^{Hi}CD56^{Mid} NK cells differs between sexes. Both the percentage of sialylated cells and the level of expression are higher in women. On the other hand, all CD8⁺ lymphocytes, B lymphocytes, and CD16^{Lw}CD56^{Hi} NK cells express Sial $\alpha 2,6$, but the expression level is at least twice as high in women compared to men. Finally, no differences were found in either the level of expression or the percentage of sialylated TCR $\gamma\delta$ cells between men and women.

In conclusion, Sial $\alpha 2,6$ is differentially expressed in lymphoid cells under basal conditions, maintaining uniform behavior within each analyzed lineage. Given the lack of published descriptions of distinguishable glycophenotypes based on Sial $\alpha 2,6$ in humans, this study is a crucial step toward understanding lymphocyte biology from a new perspective. It contributes to the characterization of novel populations as potential therapeutic targets

and/or clinical biomarkers. Further research is needed to confirm whether the behavior reported here changes in lymphocytes from patients with infectious or autoimmune diseases.

Introducción

1. El sistema inmunológico

El término inmunidad deriva de la palabra latina *immunitas* (protección), históricamente el término inmunidad ha hecho referencia a la protección frente a la enfermedad y, de forma más específica, frente a las enfermedades infecciosas. Las células y las moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmunitario, y a su respuesta conjunta y coordinada a la introducción de sustancias extrañas se le llama respuesta inmunitaria (1, 2). La protección conferida por el sistema inmunitario puede dividirse en dos actividades vinculadas: reconocimiento y reacción (o respuesta) (1, 2).

El reconocimiento inmunitario es notable por su capacidad de distinguir entre invasores extraños y componentes propios; puede reconocer patrones moleculares que caracterizan a grupos de patógenos comunes y atacarlos de manera rápida y decisiva; incluso es capaz de detectar diferencias químicas sutiles que distinguen a un patógeno de otro (2).

El sistema inmune se clasifica como: Innato y adaptativo (figura 1), sin embargo, esta clasificación es sólo didáctica, ya que ambos sistemas funcionan de manera integrada, ya que el sistema inmune innato activa el sistema inmune adaptativo en respuesta a las infecciones y el sistema inmune adaptativo utiliza los mecanismos efectores de la inmunidad innata para eliminar los microorganismos (3).

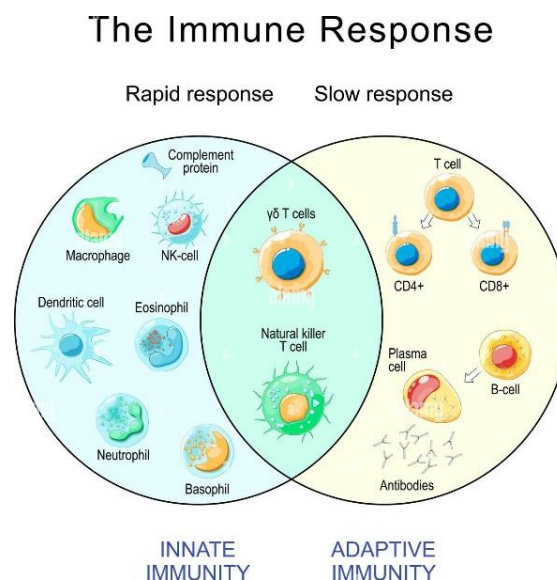


Figura 1. Respuesta inmune: inmunidad innata y adaptativa (4).

1.1. Respuesta inmune innata

Se denomina inmunidad innata al conjunto de mecanismos moleculares y celulares, que son evolutivamente conservados y está dirigida a prevenir infecciones o eliminar rápidamente el agente infeccioso. Estos incluyen barreras físicas y químicas, así como los receptores que están directamente codificadas en su genoma y que son capaces de reconocer las estructuras químicas comunes de ciertos patógenos y eliminar ciertos microorganismos o células neoplásicas. Además de ser la primera línea de defensa inmunológica frente a la infección, la inmunidad innata participa activamente en la promoción y dirección de la respuesta inmunitaria adaptativa (5).

Algunas de las características principales de la respuesta inmune innata son: es inmediata, no requiere una exposición previa y no se genera memoria inmune. El repertorio de reconocimiento de la inmunidad innata es limitado y no es clonal. La detección del patógeno se lleva a cabo mediante los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que están codificados en la línea germinal, vigilan tanto el espacio extra como el intracelular y, cuando se activan, inician la transducción de señales que promueve las funciones antimicrobiana y proinflamatoria de las células que los expresan. Se calcula que los PRR reconocen aproximadamente 1,000 productos de microorganismos y células dañadas (6).

En la inmunidad innata participan las barreras físicas y químicas en epitelios queratinizados y mucosos (7) así como componentes celulares: células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas (DC), células asesinas naturales (NK) y células linfoides innatas (ILC); receptores de patrones moleculares asociados a patógenos o a daño y sustancias químicas antimicrobianas, proteínas solubles y mediadores de la inflamación (6).

La inmunidad innata tiene tres funciones principales:

1. Impedir, controlar y/o eliminar la infección por patógenos. Esto se pone de manifiesto en modelos experimentales que muestran cómo las deficiencias, la inhibición o la eliminación de varios mecanismos de la inmunidad innata incrementan la propensión a las infecciones. Muchos patógenos han desarrollado estrategias para resistir la inmunidad innata y estas estrategias son cruciales para la virulencia de estos (1, 2, 6).
2. Eliminar las células dañadas e iniciar el proceso de reparación tisular. Distintos mecanismos reconocen y responden a proteínas que las células estresadas, dañadas y muertas producen, liberan o acumulan. La respuesta innata puede darse

en el contexto de daño estéril (daño que sucede en células y tejidos en ausencia de infección); alteraciones en la respuesta inmune innata puede tener muchas implicaciones patológicas (1, 2, 6).

3. Iniciar, dirigir y regular la respuesta inmune adaptativa, haciéndola eficaz frente a diferentes tipos de patógenos. La inmunidad innata proporciona las señales de peligro que alertan y polarizan al sistema inmune adaptativo para que responda de la manera más adecuada en función del patógeno particular, esto permite adecuar la respuesta a cada tipo de patógeno (o célula tumoral) y generar una memoria inmune adecuada a cada situación (1, 2, 6).

1.2. Respuesta inmune adaptativa

La respuesta inmune adaptativa está mediada por linfocitos, se caracteriza por ser altamente específica y generar memoria antigénica (1).

Se compone de dos mecanismos:

1. Respuestas celulares: mediada por linfocitos T y B; los linfocitos T llevan a cabo funciones citotóxicas (CD8) y de polarización de respuesta (CD4); y los linfocitos B, que cooperan con la activación de los linfocitos T, y que además se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos específicos contra el antígeno. Los mecanismos de inmunidad celular a su vez incluyen la cooperación de células fagocíticas para aumentar su capacidad (5, 7).
2. Respuestas humores: mediada por anticuerpos (Ab), que se unen a antígenos (Ag) del patógeno, los neutralizan y dirigen contra ellos otros mecanismos efectores, como la activación del complemento, la fagocitosis o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (5, 7).

2. Células linfoides

Los linfocitos constituyen del 20 a 40% de los glóbulos blancos en sangre y 99% de las células de la linfa, además, son capaces de migrar hacia espacios tisulares y órganos linfoides, por lo que constituyen un puente entre distintas partes del sistema inmunitario (2). Las células linfoides engloban un conjunto de linajes celulares que se diferencian a partir de una célula progenitora común, denominada célula progenitora linfóide (CLP), la cual tiene el potencial para convertirse en Pro-B, Pre-T, ILC o célula NK (8, 9).

Con base en sus funciones los linfocitos pueden dividirse en cuatro poblaciones: linfocitos T, linfocitos B, células linfoides innatas (ILC) y células NK (1, 2).

2.1 Linfocitos T

Los linfocitos T constituyen entre el 75% y el 80% de los linfocitos (10). Poseen un receptor antígeno específico, denominado TCR; el cual media el reconocimiento de péptidos antigénicos unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (11). En humanos se expresan cuatro cadenas de TCR, conocidos como $\text{TCR}\alpha$, $\text{TCR}\beta$, $\text{TCR}\gamma$ y $\text{TCR}\delta$, que forman dos heterodímeros distintos: $\text{TCR}\alpha/\text{TCR}\beta$ o $\text{TCR}\gamma/\text{TCR}\delta$ (12).

El TCR se asocia con dímeros del grupo de diferenciación 3 (CD3): $\text{CD3}\epsilon\gamma$, $\text{CD3}\epsilon\delta$ y $\text{CD3}\zeta\zeta$, los cuales transducen las señales de activación a la célula T (2, 11, 13), esta unión da como resultado el complejo TCR-CD3 (figura 2).

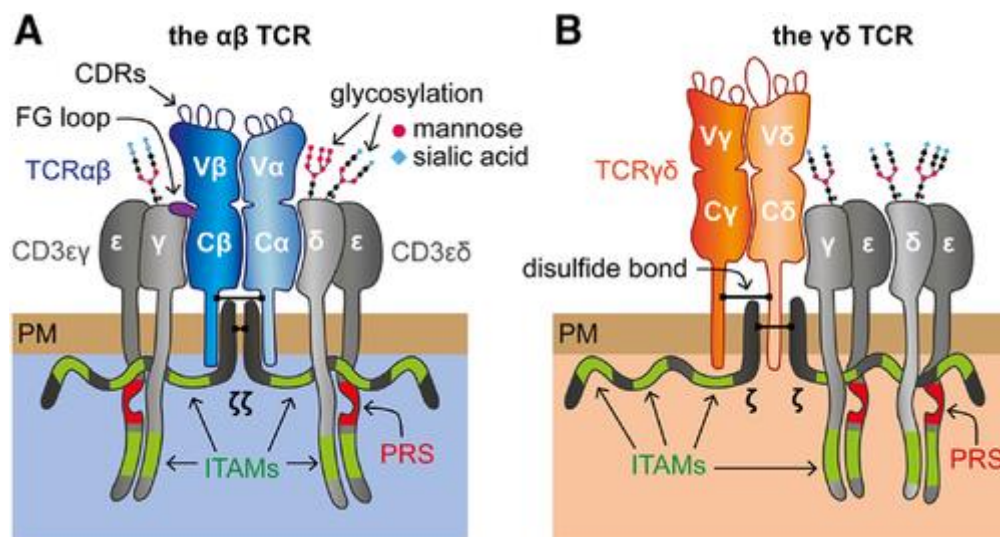


Figura 2. TCR $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$. A: estructura del $\text{TCR}\alpha\beta$ -CD3. B: estructura del $\text{TCR}\gamma\delta$ -CD3 (13).

Una característica importante que distingue a los linfocitos T, es que el reconocimiento de estas células está restringido por el MHC, es decir únicamente reconocen péptidos asociados a una molécula de MHC, en las células presentadoras de antígenos (11).

Para que la célula T se active requiere de tres señales, la primera es la unión del complejo TCR-CD3 a un péptido antigénico, seguida de la interacción de moléculas coestimuladoras, principalmente CD28 y CTLA-4 y finalmente un perfil de citocinas en el microambiente, principalmente IL-2, la integración de estos tres estímulos da como resultado una cascada de señalización que culmina en la activación de la célula, la proliferación y la diferenciación hacia un perfil efector (14, 15). La mayoría de las células T maduras expresan las isoformas de TCR $\alpha\beta$, mientras que una pequeña porción (0.5-5 %) de los linfocitos T expresan las isoformas TCR $\gamma\delta$, entre otras proteínas de superficie (tabla1) (16).

Marcadores de membrana para linfocitos T					
	Todos los LT	LT NAIVE	CD4	CD8	TCR $\gamma\delta$
CD45	+	-	+	+	+
CD3	+	+	+	+	+
CD2	+	-	+	+	+
CD5	+	-	+	+	+
CD6	+	-	+	+	+
TCR $\alpha\beta$	-	+/-	+	+	+/-
CD4	-	+/-	+	-	-
CD8	-	+/-	-	+	-
TCR $\gamma\delta$	-	-	-	-	+
CD28	-	+	+	+/-	+
CD44	-	-	+	+	-
CD107a	-	-	-	+	-
CD178	-	-	-	+	-
CD27	-	+	-	-	+
CD57	-	-	-	-	-
CD62L	-	+	-	-	-
CD69	-	-	+ (activadas)	+ (activadas)	+
CD127	-	+	-	-	-
CD197	-	+	-	-	-
CD25	-	-	+ (activadas)	+ (activadas)	-
CD95	-	-	+ (activadas)	+ (activadas)	-
CD134	-	-	+ (activadas)	+ (activadas)	-
CD137	-	-	+ (activadas)	+ (activadas)	-

Tabla 1. Marcadores de membrana de linfocitos T. Adaptado de (17-19).

2.1.1 TCR $\alpha\beta$

Constituyen aproximadamente el 95% de los linfocitos T, reconocen péptidos derivados de proteínas extrañas o propias, unidas al MHC y expresan un correceptor fundamental para su funcionamiento, la glicoproteína CD4 o CD8. De acuerdo con la expresión de estos correceptores los linfocitos T TCR $\alpha\beta$ comúnmente se dividen en dos subconjuntos, linfocitos CD4 o colaboradores y linfocitos CD8 o citotóxicos (20-23).

2.1.1.1 Linfocitos T CD4

El CD4, es una glicoproteína de 55 kDa que contiene cuatro dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (D1-D4), una región transmembranal hidrófoba y una cola citoplásmica larga que alberga tres residuos de serina que pueden fosforilarse. El CD4 es miembro de la familia IgR, se expresa en la superficie celular de este tipo de linfocitos T, como un monómero transmembrana, que interactúa con el dominio $\beta 2$ de las moléculas MHC de clase II en las células presentadoras de antígeno (figura 3) (2, 23).

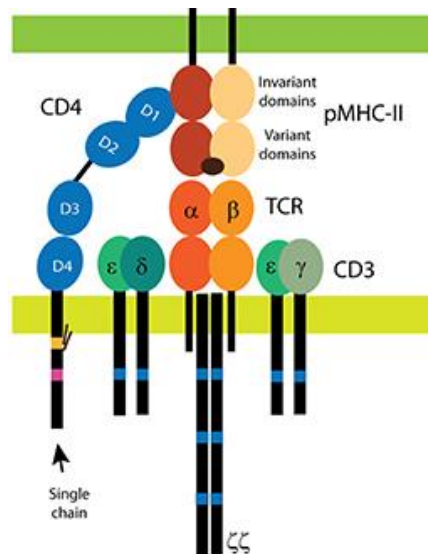


Figura 3: Complejo TCR-CD3 de linfocitos CD4⁺ (24)

Los linfocitos T CD4⁺, se encargan de coordinar la respuesta inmunitaria estimulando otras células del sistema inmune, como los macrófagos, los linfocitos B y los linfocitos T CD8, dirigen la expansión, la función efectora y la polarización de la respuesta contra patógenos, sin embargo, también pueden desencadenar alergias y/o autoinmunidades (25, 26).

Dependiendo de los diferentes fenotipos y funciones, las células T CD4⁺ se clasifican en linfocitos T convencionales (Th) y linfocitos T reguladores (Treg), se han descrito principalmente tres linajes efectores, Th1 Th2 y Th17; la expresión de factores de transcripción específicos inducen a las células T CD4⁺ a polarizarse en células efectoras o reguladoras (tabla 2); cada subtipo Th se caracteriza por la producción de un perfil de citocinas (27, 28), que ayudan a crear condiciones óptimas para que otras células lleven a

cabo su función durante diferentes tipos de respuesta inmune (29). Por otro lado, los linfocitos Treg suprimen la proliferación y la producción de citocinas efectoras, ayudan a la contracción de respuesta produciendo citocinas antiinflamatorias (2, 25, 26).

Subtipos de linfocitos CD4 ⁺				
Linfocitos T efectores	Factor de transcripción	Citocina	Defensa del huésped	Célula diana principal
Th1	T-bet, mediado por IL-2 e IFN- γ	IFN- γ TNF- α	Patógeno intracelular	Macrófago
Th2	GATA 3 mediado por IL-4	IL-4 IL-5 IL-13	Parásitos helmínticos	Eosinófilo
Th17	ROR γ t, mediado por TGF- β e IL-6	IL-17A IL-17F IL-22	Patógenos extracelulares y hongos	Neutrófilo
Th22	ARH, mediado por IL-6	IL-22	Patógenos extracelulares	Linfocitos
Thf	STAT 3, mediado por IL-6 e IL-21	IL-21 IFN- γ IL-4	Patógenos extracelulares	Linfocito B
Treg	FOXP3 mediado por TGF- β	IL-10 TGF- β	Tras un proceso inflamatorio	Evita la activación de células T

Tabla 2. Clasificación de los linfocitos CD4⁺ efectores (28, 30-35)

2.1.1.2 Linfocitos T CD8

La molécula CD8, consta de dos cadenas α y β , las cuales son glicoproteínas pequeñas de alrededor de 30 a 38 kDa (2). El CD8 se puede encontrar como un heterodímero $\alpha\beta$ unido por enlaces disulfuro o un homodímero $\alpha\alpha$, cada una de estas cadenas contienen un dominio extracelular único, de tipo inmunoglobulina, una región transmembranal hidrófoba y una cola citoplásmica con 25 a 27 residuos, varios de los cuales pueden fosforilarse (figura 4). El CD8 se expresa en la superficie celular de este tipo de linfocitos T, se une a los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del MHC-I en las células presentadoras de antígeno, sin embargo, cabe resaltar que la molécula de clase I del MHC se expresa en toda célula nucleada (2, 23, 36).

Los linfocitos T CD8⁺ se encargan de la citotoxicidad celular, una vez activados, experimentan un proceso de diferenciación y expansión para generar una gran cantidad de células efectoras que migran hacia la periferia, estos linfocitos tienen la capacidad de reconocer al antígeno que las activó presentado por diferentes células del organismo (37, 38).

Tras el reencuentro con el antígeno en la periferia, las células T CD8⁺ efectoras ejercen su función citotóxica, inducen apoptosis en las células que presentan el antígeno, mediante la liberación de granzimas y perforinas, o por la vía de los receptores FAS/FAS-L, además producen IFN- γ y TNF- α , citocinas que aceleran la respuesta contra patógenos intracelulares. Una vez controlado el proceso inflamatorio la mayoría de los linfocitos CD4 y CD8 mueren por apoptosis, sin embargo, una pequeña fracción sobrevive y se conservan como células T de memoria; estas células tienen la capacidad de proliferar rápidamente y diferenciarse a células efectoras tras la reexposición al antígeno (37, 38).

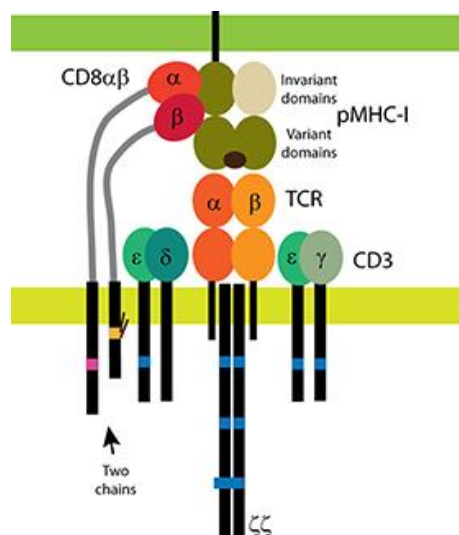


Figura 4: Complejo TCR-CD3 en linfocitos CD8⁺ (24)

2.1.2 TCR $\gamma\delta$

Las células T $\gamma\delta$ constituyen del 0.5 al 5 % de los linfocitos T, se encuentran presentes en sangre y principalmente en tejidos, siendo particularmente abundantes en el intestino (39-41). Exhiben un complejo TCR-CD3 que no está asociado a CD4 ni CD8. (1, 39). EL TCR $\gamma\delta$ interacciona con varios miembros de la superfamilia de moléculas de MHC no clásicas,

como la familia CD1, que presentan lípidos endógenos o inducidos por estrés, por moléculas como MICA y MICB, y no parecen presentar ligandos variables (39, 42). No están totalmente restringidos por el MHC ya que pueden responder a patrones moleculares asociados a patógenos y a perfiles de citocinas (1, 13, 42).

En condiciones homeostáticas, las células T $\gamma\delta$ muestran un fenotipo “preactivado” y de memoria, esto les permite responder rápidamente (sin la activación vía TCR), sirven como defensa temprana contra un número limitado de patógenos que se encuentran con frecuencia en las barreras epiteliales y en los tejidos periféricos (41), además producen diferentes quimiocinas y una amplia gama de citocinas, incluidas IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-21 e IL-22 (42-45).

Las características, tanto fenotípicas como funcionales, de los linfocitos T $\gamma\delta$ son poco conocidas (46). De los hallazgos que se han sucedido en los últimos años, se ha reportado que los linfocitos T $\gamma\delta$ poseen la capacidad de producir efectos citotóxicos, a través de la producción de granzimas y perforinas; además median la apoptosis vía CD95/CD95L (Fas/FasL), por último, los linfocitos T $\gamma\delta$ producen factores de crecimiento para mantener la integridad de los epitelios (47, 48). Todos estos mecanismos, permiten a los linfocitos T $\gamma\delta$ una respuesta rápida y amplia, lo que se asocia su función en la inmunidad innata (46).

2.2 Linfocitos B

Los linfocitos B constituyen del 15% al 20% de los linfocitos, poseen un receptor antígeno específico denominado BCR, este receptor está conformado por una inmunoglobulina (IgM) unida a la membrana (figura 5). Cada célula B posee alrededor de 1.5×10^5 moléculas de anticuerpo en la membrana con un sitio de unión para antígeno idéntico, que es capaz de reconocer antígenos solubles y en la superficie celular; además de moléculas estimuladoras como CD19 y CD21 (tabla 3) (1, 2).

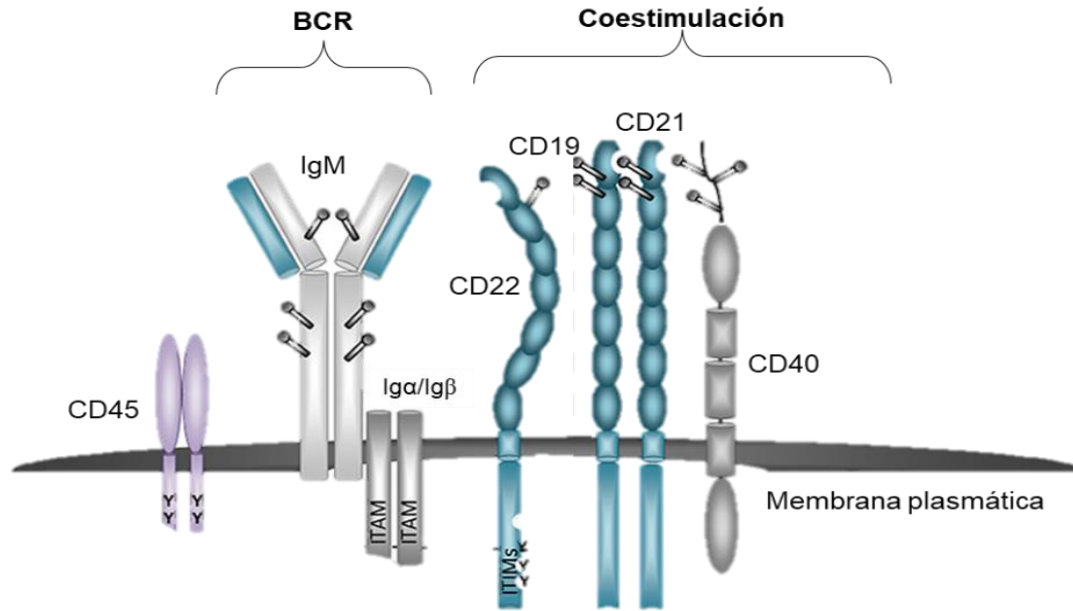


Figura 5. Estructura del BCR. Tomado y modificado de (49)

Se han identificado varias subpoblaciones de células B, de nominadas B-1, B-2 y células B reguladoras. Las células B-1 se originan principalmente en el hígado fetal y se subdividen en B-1a y B-1b, estas células son importantes para la defensa del huésped contra los patógenos que ingresan al peritoneo a través del epitelio intestinal. Las células B-2 se derivan de la médula ósea y se diferencian en células B foliculares y de la zona B marginal. Las células B reguladoras (Breg) suprimen respuestas inmunitarias, principalmente mediante la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 (50)

Marcadores de membrana en células B					
	Todos los LB	LB vírgenes	LB en reposo	Células plasmáticas	LB de memoria
CD19	+	+	+	Low/-	+
CD20	+	+	+	-	+
CD22	+	+	-	-	-
CD27	-	+	-	+	+/-
CD43	-	-	+	-	-
CD80	-	-	+	-	-
CD86	-	-	+	-	-
CD38	-	-	-	++	-
CD138	-	-	-	-	-
CD23	-	-	-	-	Low/-
CD40	-	-	-	-	+
MHC-II	-	-	-	+/-	-
IgM	-	+	+/-	-	+
IgD	-	+	-	-	+/-
IgA	-	-	-	-	+
IgE	-	-	-	-	+
IgG	-	-	-	-	+

Tabla 3. Marcadores de membrana para linfocitos B. Adaptado de (17, 51)

La inmunoglobulina es una proteína que consiste en cuatro cadenas polipeptídicas, que consta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas, visualizada en tres dimensiones la molécula de anticuerpo tiene una forma de “Y” (Figura 6), cada cadena ligera está conectada a su cadena pesada asociada mediante un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína correspondientes; las dos cadenas pesadas también están conectadas entre sí a través de enlaces disulfuro. Los dos sitios de unión al antígeno están formados por componentes de las cadenas pesada y ligera (50, 52).

La secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos reveló que el dominio aminoterminal de cada cadena es extremadamente variable, mientras que la secuencia de las secciones carboxiloterminales se pueden clasificar en cinco tipos: mu (μ), delta (δ), gamma (γ), alfa (α) y épsilon (ϵ), dando lugar a los diferentes 5 isotipos o clases de anticuerpos (1, 52-55).

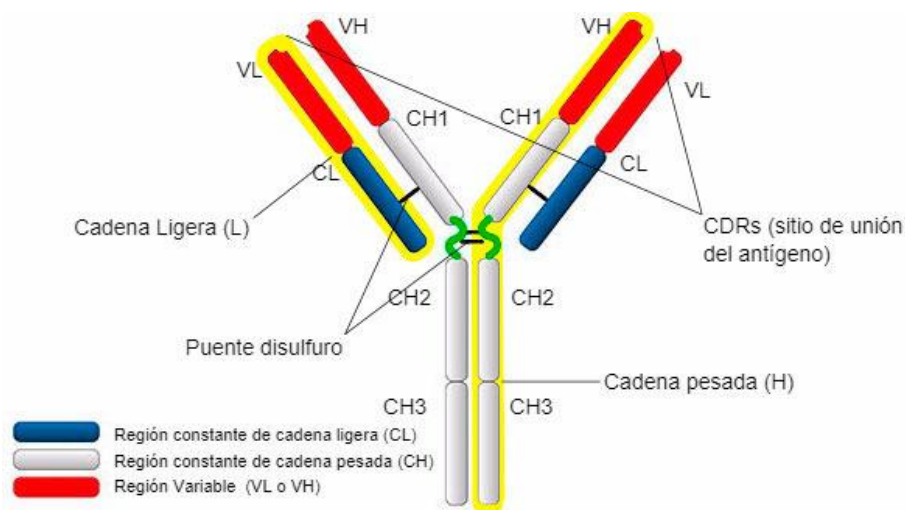


Figura 6. Estructura de una inmunoglobulina

La activación de los linfocitos B, se da por dos vías: la vía T independiente, donde los Ag se encuentran solubles y la vía T dependientes, donde los Ag están unidos a un MHC (56). Ambas vías inducen que las células B se diferencien en células productoras de anticuerpos, dependiendo de las señales proporcionadas por el microambiente se producirá un isotipo de inmunoglobulina particular que podría cumplir funciones como neutralización e inactivación de patógenos, activación del sistema de complemento y en la opsonización, entre otros (53, 57-59).

Las células Breg apoyan a la contracción de respuesta produciendo IL-10. Una vez controlado el proceso inflamatorio la mayoría de los linfocitos B mueren por apoptosis, mientras que otra pequeña población permanecerá como células B de memoria, las cuales inducen respuestas inmunitarias más rápidas y eficientes al reencontrarse con el mismo antígeno (52, 56, 60, 61).

2.3 Células NK

Las células NK representan entre el 5 y el 20% de todos los linfocitos circulantes en humanos (62, 63). Denominadas células NK o células “asesinas naturales”, se distinguen de otros linfocitos por no presentar receptores antígeno específico, ejercen su función citotóxica a través de señales de activación e inhibición (64-67).

Las células NK son una población heterogénea que comprende varias poblaciones (68, 69). Aunque no existe una clasificación, se han descrito principalmente 3 tipos de células NK: las células NK convencionales (cNK), las células NK residentes de tejido (trNK) y las células NKT. Las células cNK y las trNK, se distinguen principalmente por su ubicación, las primeras se encuentran en sangre periférica y las segundas en órganos como los pulmones, el hígado, los riñones y los ganglios linfáticos, el timo y el útero (70, 71); por otro lado, las células NKT se diferencian porque tiene algunas características de las células T, por ejemplo, la expresión de un TCR, sin embargo el TCR de células NKT no interactúa con moléculas MHC clase I o II (clásicas), sino con moléculas parecidas a MHC (no clásicas) como CD1 (2)

Las células NK están provistas con un repertorio de receptores de superficie inhibidores y activadores, codificados en la línea germinal (tabla 4). Las células NK reconocen la densidad de moléculas MHC-I en células sanas que inducen señales inhibitoras que evita su activación, por el contrario, en una célula infectada la expresión de MHC-I, por lo tanto, la señal inhibitora se debilita, aumentan las señales activadoras aunado a la expresión de moléculas de estrés como MICA/MICB, moléculas reconocidas por los receptores activadores en células NK, desencadenando su activación que lleva a la eliminación de célula blanco (72-75).

Activación e inhibición de células NK	
Receptor	Ligandos
NKG2D	Proteína A (MICA) y B (MICB) relacionada con la cadena de clase I del MHC, proteínas de unión a UL16 (ULBP1-6)
ADNM1	PVR(CD155), nectina-2 (CD112)
NKp30 (NCR3)	pp65, B7-H6, galectina-3, BAG6, hemaglutinina viral (HA), glucosaminoglicanos (GAG) de heparán sulfato (HS), dominio (DBL) -1 ^a de la proteína-1 de la membrana de los eritrocitos <i>de Plasmodium falciparum</i>
NKp44 (NCR2)	PDGF-DD, 21spe-MLL5, PCNA, Syndecan-4, Nidogen-1, HA viral, HS GAG
NKp46 (NCR1)	Factor de complemento P, HA viral, GAG HS, dominio (DBL)-1 ^a de la proteína-1 de la membrana de los eritrocitos <i>de Plasmodium falciparum</i> , <i>vimentina</i>
CD16 (FcγRIII)	Porción Fc de anticuerpos IgG
Inhibición de NK	
CD94/NKG2A	HLA-E
KIR2DL1	HLA-C, grupo 2
KIR2DL2/3	HLA-C, grupo 1
KIR3DL1	HLA-Bw4
KIR3DL2	HLA-A3, A11

Tabla 4. Activación e inhibición de células NK. Modificado de (72)

Recientemente se han clasificado a las células NK de acuerdo con el nivel de expresión de las proteínas de superficie CD56, (molécula de adhesión de células neuronales, N-CAM) y CD16 (receptor FcγRIII), en 2 subpoblaciones: las células NK CD16^{Low} CD56^{bright} y las células CD16^{brigh} CD56^{Low} (figura 7) (76).

Células NK CD16^{Low} CD56^{bright}

Conocidas también como células NK CD56 brillantes (CD56^{bright}), representan el 10% de las células NK de sangre periférica; están presentes principalmente en tejidos linfoides secundarios. Principalmente se consideran productoras de citocinas, como: IFN-γ, TNF-α, GM-CSF, IL-10 e IL-13 (77, 78). Por otro lado, hay ausencia y/o baja expresión de gránulos líticos, participan en el mantenimiento de la homeostasis inmune y aunque tienen baja citotoxicidad, este efecto aumenta en condiciones inflamatorias (77, 79, 80). Dentro de las CD16^{Low} aisladas de sangre periférica o de órganos linfoides, existen ligeras diferencias

tanto en las características fenotípicas como en la respuesta a la estimulación de citocinas (80-82).

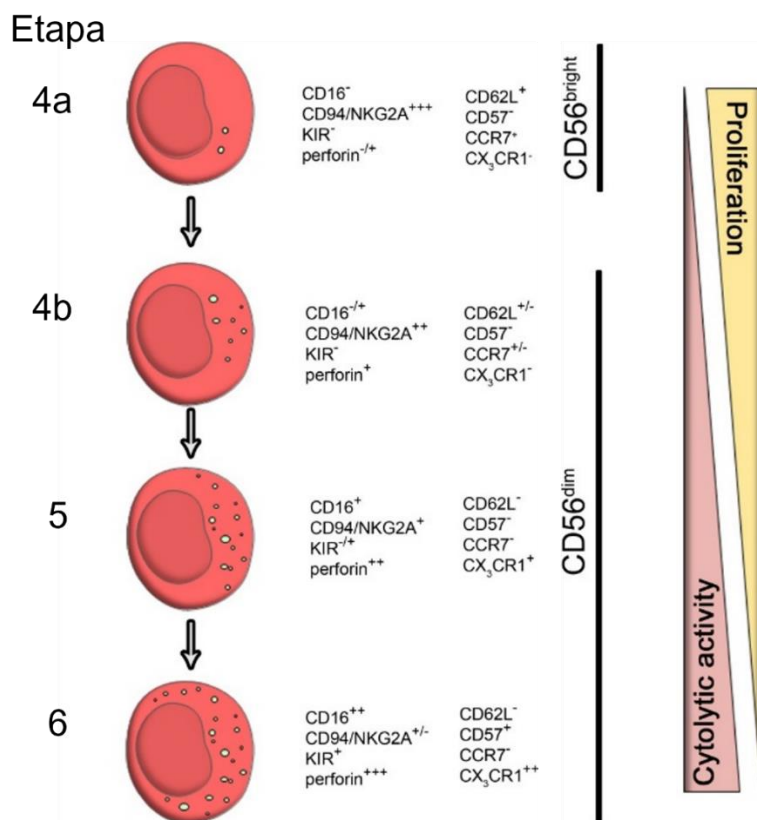


Figura 7. Subpoblaciones de células NK. Tomado y modificado de: (80)

Células NK CD56^{Low} CD16^{brigh}

Conocidas también como células CD56 tenues (CD56^{Low}), representan el 90% de las células NK en sangre periférica, expresan niveles elevados de CD16 a medida que maduran, por lo cual se cree que las células NK CD16^{Low} circulantes en la sangre periférica son sus precursoras (80, 83, 84). Se consideran principalmente células efectoras citotóxicas, expresan el marcador de diferenciación terminal CD57 (85, 86). Aunque se sabe poco de estas dos subpoblaciones, se tiene bien caracterizado el perfil de marcadores de membrana que expresa cada una (tabla 5) (76).

Marcadores de membrana de células NK				
	NK CD16 ^{Low}	NK CD16 ^{Low}	NK CD16 ^{Brigh}	NK CD16 ^{Brigh}
	Etapas 4a	Etapas 4b	Etapas 5	Etapas 6
CD34	—	—	—	—
c-Kit	+ / Low	Low / -	Low / -	—
CD244	+	+	+	+
CD45RA	+ / -	+ / -	—	—
CD127	—	—	—	—
CD7	+	+	+	+
CD10	—	—	—	—
ILR1	+ / Low	Low / -	Low / -	Low / -
CD122	+	+	+	+
HLA-DR	—	—	—	—
NKp46	+	+	+	+
NKp30	+	+	+	+
CD161	+	+	+	+
NKG2D	+	+	+	+
NKG2A	+	+	Low / -	Low / -
NKp80	—	+	+	+
CD56	++	++	Low	Low
CD16	—	—	+	+
KIR	—	—	+ / -	+
NKG2C	—	—	+	+
CD57	—	—	—	+

Tabla 5. Marcadores de membrana para células NK. Adaptado de (2, 72)

3. Modificaciones postraduccionales

Las modificaciones postraduccionales (PTM) son cambios que le suceden a ciertos aminoácidos de una proteína durante o después de su traducción, generalmente se unen fracciones químicas, lípidos o carbohidratos, por enlaces covalentes al aminoácido objetivo, pueden ser una o varias modificaciones, que ocurren en la cadena lateral o terminal de los aminoácidos, pueden tener un impacto en el sitio funcional (PTM ortostéricos), como la sumoilación, o a distancia (PTM alostéricos) como la ubiquitinación y fosforilación (figura 8) (87, 88).

Las PTM amplían enormemente la diversidad molecular de una proteína generando múltiples isoformas con funciones biológicas distintas (89, 90); sin embargo, las alteraciones en las PTM pueden causar fallas estructurales y funcionales de las proteínas, por ejemplo, se ha reportado PTM aberrantes en la patogénesis de proteinopatías como cáncer, enfermedades cardíacas, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y síndromes metabólicos (88).

Las modificaciones postraduccionales se dividen en cuatro grupos según el tipo de modificaciones:

1. La adición de grupos químicos: metilación, acetilación, o carboxilación
2. La adición de polipéptidos: ubiquitinación y sumoilación
3. La adición de aminoácidos y cambios estructurales: racemización, citrulinación e isoaspartación
4. La adición de moléculas complejas: la palmitilolación, glipiación y carbonilación (90)

Las PTM de proteínas suelen ser catalizadas por enzimas, aunque también pueden ocurrir espontáneamente (91-94).

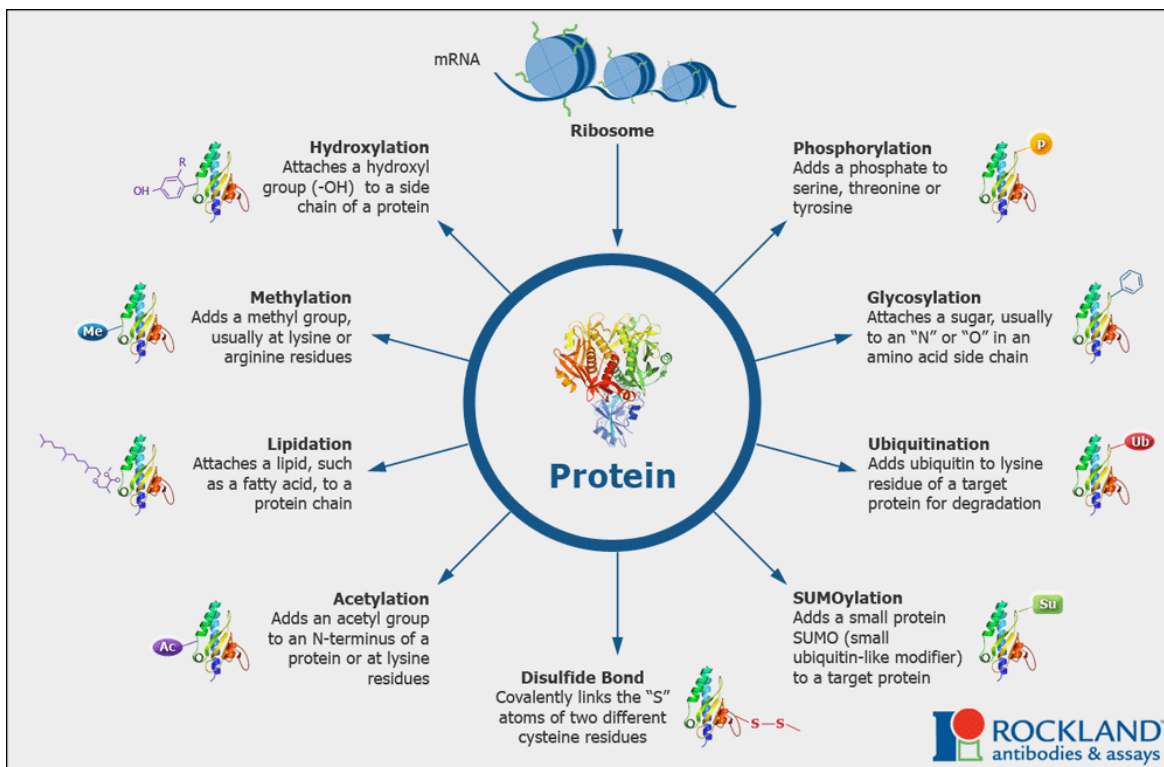


Figura 8. Modificaciones postraduccionales (95).

3.1 Glicosilación

La glicosilación es una modificación postraducciona de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que influye en sus propiedades fisicoquímicas y funcionales. Es importante para diversas funciones biológicas como interacciones proteína-proteína, comunicación celular, plegamiento de proteínas e inmunogenicidad, las cuales están involucrados en numerosas procesos fisiológicos y patológicos clave de la célula (96, 97). Los glicanos unidos covalentemente a la proteína intervienen en el plegamiento correcto de la misma, les provee resistencia a las proteasas, permitiendo que la proteína interactúe con sus ligandos y se dirija a su ubicación (94, 96, 98).

Existen dos tipos de glicosilaciones:

La *N*-glicosilación: es la modificación postraducciona más conservada en eucariotas, los *N*-glicanos son complejos macromoleculares formados a partir de un precursor sintetizado en el retículo endoplásmico rugoso (RER); consta de un oligosacárido preformado compuesto por *N*-acetil glucosamina (GlcNAc), manosa (Man) y glucosa (Glc), el cual se une al grupo amino (NH₂) de la cadena lateral de la asparagina (Asn) de una proteína (99).

Comienza con la transferencia de 14 precursores de azúcar Glc3Man9 a una secuencia consenso Asn-X-Thr/Ser, (X: Cualquier aminoácido, excepto la prolina) (figura 9A) (100)

Los *N*-glicanos presentes en las proteínas se clasifican en tres grandes grupos:

1. los *N*-glicanos con un alto contenido de manosa en su estructura se encuentran en proteínas plasmáticas, hormonas, enzimas, receptores de superficie celular, inmunoglobulinas y lectinas, además, son intermediarios para otro tipo de estructuras *N*-glicánicas más complejas
2. Los *N*-glicanos complejos o de estructuras del tipo lactosaminico se presentan en estructuras de la superficie celular y actúan como señales de reconocimiento.
3. Los *N*-glicanos híbridos. Las proteínas que presentan este tipo de arreglo contienen una mezcla de estructuras lactosaminicas y de las manosas (100).

La *O*-glicosilación: consiste en glicanos unidos vía *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) ligada al grupo hidroxilo de residuos serina (Ser) y treonina (Thr), sintetizadas en el aparato de Golgi. Es una de las formas más abundantes de glicosilación de proteínas en animales; un ejemplo de este tipo de glicoproteínas son las mucinas, por su gran complejidad y diversidad los *O*-glicanos participan en la conformación de la estructura secundaria y terciaria e inclusive de la cuaternaria de algunas proteínas (figura 9B) (101).

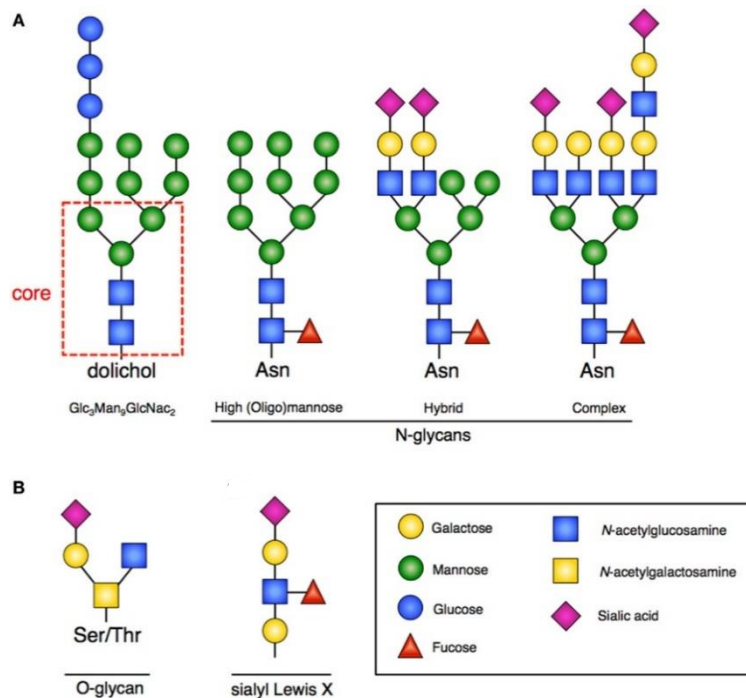


Figura 9. Glicosilaciones: (A) N-glicosilación, de alta manosa, híbrida y compleja (de izquierda a derecha) a partir del precursor conservado $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, (B) O-glicosilación, donde no existe un precursor conservado (102)

La síntesis de glicanos no tiene una “plantilla” predeterminada, lo que significa que las secuencias de glicanos no están codificadas directamente por el genoma (103). Los glicanos se producen a nivel tisular y pueden modificarse dinámicamente como respuesta a estímulos ambientales a través de la actividad coordinada de enzimas biosintéticas, el tráfico de estas enzimas al RE y al aparato de Golgi, y la disponibilidad de donantes de azúcar (104). En las células humanas, los glicanos se construyen principalmente a partir de diez monosacáridos: glucosa (Glc), galactosa (Gal), N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc), ácido siálico (Neu5Ac), manosa (Man), xilosa (Xyl), ácido glucurónico (GlcA) y ácido idurónico (IdoA); además puede surgir una complejidad adicional a partir de modificaciones adicionales mediante sulfatación, fosforilación, metilación y acetilación. Además de que la glicosilación es un evento intracelular, se han demostrado que los glicanos pueden sufrir modificaciones adicionales por parte de enzimas extracelulares, lo que revela aún más la complejidad dinámica de la glicosilación (105).

3.1.1 Sialilación

La sialilación es un tipo de glicosilación en la que se lleva a cabo la adición terminal de unidades de ácido siálico a oligosacáridos y glicoproteínas (105).

Los ácidos siálicos son una familia de α cetoácidos, están formados por una cadena principal de nueve carbonos, de naturaleza ácida, derivados del ácido neuramínico; pueden presentar diferentes sustituyentes en el grupo amino o hidroxilo. La presencia del grupo carboxilo en el carbono 1 y del grupo amino en el carbono 5, le confieren una carga neta negativa a la célula a pH fisiológico, dando como resultado la repulsión por carga eléctrica entre células y la unión de cationes (97, 106-108).

Los ácidos siálicos se pueden encontrar en tres formas, que comparten una estructura similar, pero poseen diferentes grupos en la posición C5:

1. El ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac); el más común en mamíferos.
2. El ácido *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc); una forma importante de ácido siálico en los mamíferos, sin embargo, no se puede producir biosintéticamente en humanos, pero puede estar presente debido a la incorporación de Neu5Gc derivado de la dieta.
3. El ácido deaminoneuramínico (Kdn) y sus derivados; que provienen de con modificaciones como la metilación, acetilación y sulfatación en las posiciones 4, 7, 8 y 9, generando más de 50 especies de ácido siálico (105, 109)

Los glicanos sialilados se pueden unir a proteínas o péptidos a través de un átomo de oxígeno en la serina/treonina (*O*-glicosilación) o de un átomo de nitrógeno en la asparagina (*N*-glicosilación) de forma lineales o ramificados (figura 10), normalmente se encuentran unidos a los extremos terminales, lo que los convierte en las moléculas "puente" entre las células, así como entre las células y la matriz extracelular, además involucrados en muchos fenómenos biológicos y patológicos presentes en la mayoría de las células, secreciones, fluidos y tejidos de mamíferos (97, 106).

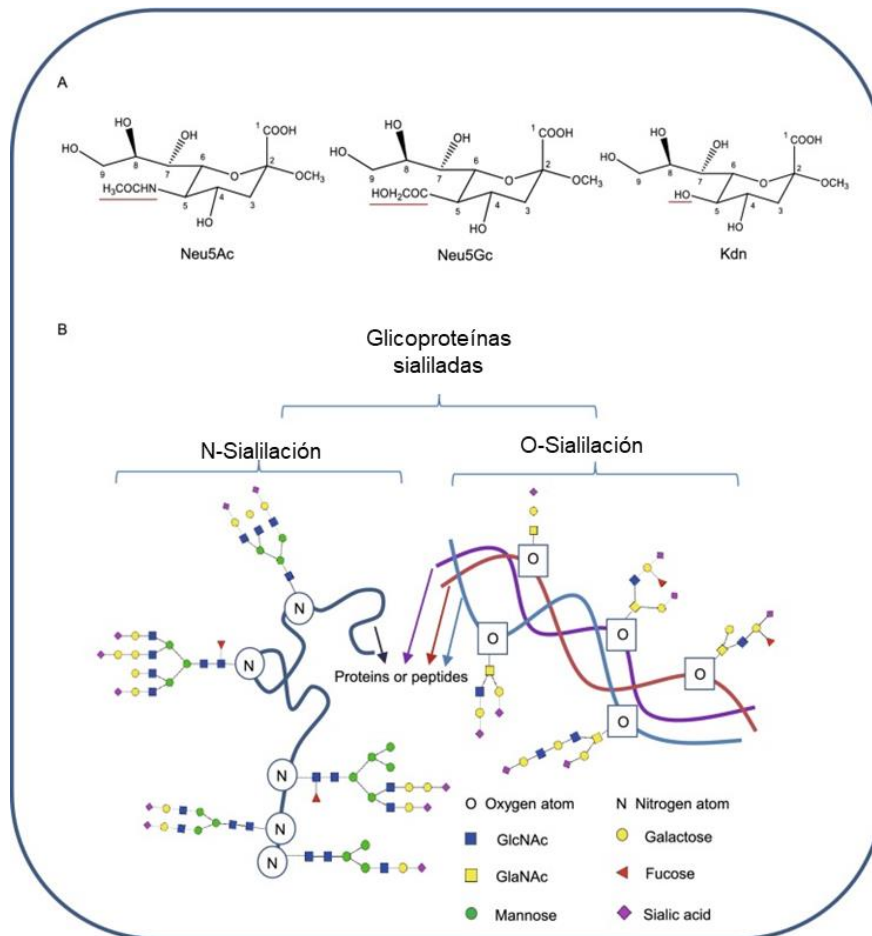


Figura 10. Estructuras de los ácidos siálicos. (A) Neu5Ac, Neu5Gc y Kdn, posición del C5 subrayado en rojo. (B) Diversidad de glicoproteínas sialiladas, los glicanos sialilados se pueden unir a través de un átomo de oxígeno en la serina/treonina o un átomo de nitrógeno en la asparagina (106).

La transferencia de ácido siálico a los oligosacáridos se da a partir de un azúcar donador activado (CMP-NeuAc), y es catalizada por una familia de enzimas llamadas Sialiltransferasas (STs), estas se encuentran ancladas a la membrana de la red trans del aparato de Golgi y unen ácidos siálicos a Gal o GalNAc, mediante enlaces $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$, o a otros restos de ácido siálico a través de enlaces $\alpha 2,8$ o $\alpha 2,9$ (107). A la fecha, se han identificado veinte STs que se clasifican en cuatro grupos: ST3GAL, ST6GAL, ST6GALNAC y ST8SIA, y cada una presenta diferencias en el sustrato que reconocen en función del enlace que forman (tabla 6) (107, 110, 111).

Familias de Sialiltransferasas		
Familia	Enlace formado	Enzima
α 2,6 Sialiltransferasas	α 2,6-Gal/GalNAc	ST6Gal NAc I-VI
α 2,3 Sialiltransferasas	α 2,3-Gal	ST3Gal I-VI
α 2,9 α 2,8 Sialiltransferasas	α 2,9 o α 2,8-Neu5Ac,	ST8Sia I-VIII

Tabla 6. Familias de sialiltransferasa (112)

La sialilación es un proceso dinámico regulado en espacio y tiempo y que cambia durante el desarrollo y la diferenciación celular. La presencia de una cierta estructura sialilada en un momento particular es el resultado del balance total entre las actividades de sialiltransferasas y de sialidasas; así como de la competencia con otras glicosiltransferasas en el aparato de Golgi, en donde se lleva a cabo el proceso. Las sialidasas, también llamadas neuraminidasas, son enzimas que eliminan el ácido siálico de los glicoconjugados. En mamíferos se han identificado cuatro sialidasas (NEU1-4) que hidrolizan residuos de ácido α 2,3 α 2,6 y α 2,8, transfiriendo preferentemente ácido siálico de sialoglicoconjugados a moléculas aceptoras en ausencia de sustratos sialilo (107, 112, 113).

3.1.1.1 Sialilación y sistema inmune

El ácido siálico contribuye significativamente a las propiedades biofísicas de las células sialiladas (figura 11). Los eritrocitos se encuentran altamente sialilados, por lo tanto, tienen carga negativa, al igual que la superficie luminal del endotelio vascular, que también está sialilado; esto da como resultado una repulsión mutua de carga entre los dos, impidiendo que los eritrocitos se adhieran al endotelio vascular y les permite circular libremente (114, 115). La extravasación de leucocitos activados a sitios de inflamación, o el reclutamiento de estos a órganos linfoides secundarios, esta mediada por la regulación positiva de ácido siálico donde su reconocimiento se da a través de moléculas de adhesión de la familia de las selectinas (116).

La sialilación también se identifica en moléculas séricas como las inmunoglobulinas, las diferentes alternativas de la glicosilación en la región Fc de la IgG modifican las características estructurales de los anticuerpos, lo que influye en su función en la respuesta inmune. Ciertos tipos de glicosilación en la región del Fc de las IgG se asocian a enfermedades autoinmunes, se ha observado que el incremento en la sialilación permite establecer una nueva terapéutica antiinflamatoria (97).

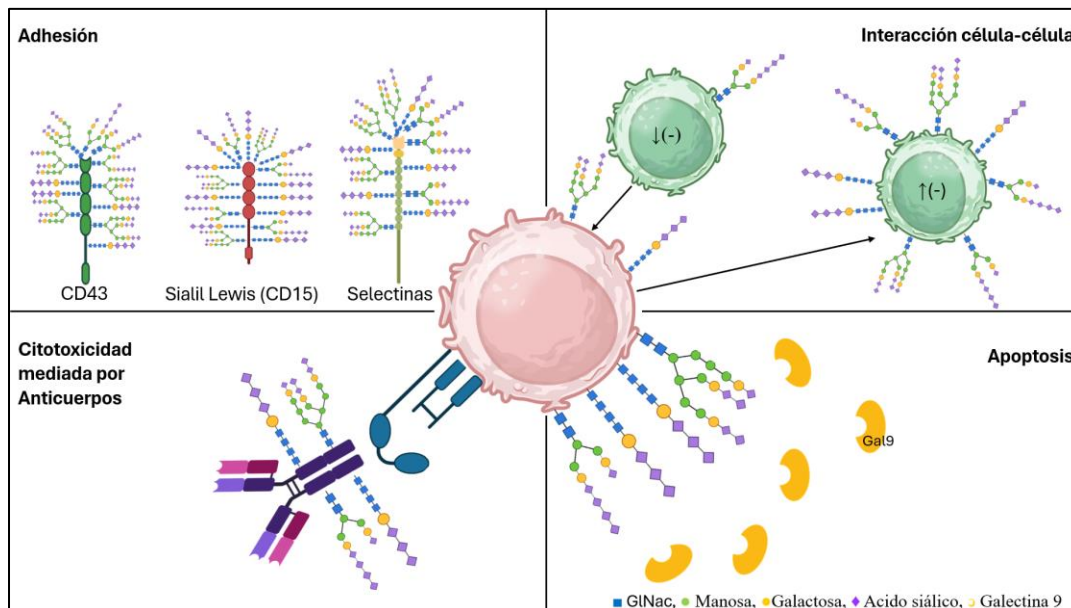


Figura 11. Ejemplos de sialilación y sistema inmune. Creada y editada en Biorender y PowerPoint.

El ácido siálico también modula interacciones moleculares a través del enmascaramiento de la galactosa, cuando se pierde el ácido siálico en enlace α -2,6 sobre la Gal (Neu5Ac α 2,6- Gal β), las galectinas se unen a las galactosas terminales y comienzan una variedad de procesos que incluyen interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (MEC). Se sabe que la galectina-1 y la galectina-9 inducen apoptosis en células T activadas y se ha propuesto a la galectina-1 como inmunosupresor en padecimientos autoinmunes (117, 118).

La actividad de la sialidasa *Neu1* aumenta significativamente durante la activación en la mayoría de las células inmunitarias, incluidas las células T, las células B, las células NK y los monocitos, mientras que la sialilación de algunas de sus moléculas de superficie como el MHC-I y el MHC- II disminuye, esto es necesario para que las células respondan a las células presentadoras de antígenos (119-122)

En células murinas, la activación de las células B maduras a células plasmáticas se acompaña con la presencia de al menos cuatro isoformas distintas de ARNm de ST6Gal I, que codifica para una sialiltransferasa que une ácido siálico en posición α 2,6 (123). El ácido siálico α 2,6 sirve como ligando extracelular para CD22 y Siglec-G que inhibe la señal del BCR. La capacidad de estos dos receptores para unirse al Sial α 2,6 y la expresión de este,

es crucial para regular la inhibición e inducir tolerancia a los Ag propios; la deficiencia combinada de Siglec-G y CD22 conduce a autoinmunidad espontánea en ratones. En humano, las mutaciones en las sialiltransferasas están directamente relacionadas con diferentes enfermedades autoinmunes (123-125).

La glicosilación diferencial de las glicoproteínas de la superficie celular puede regular selectivamente la supervivencia de células Th1, Th2 y Th-17 (126). Las células T CD4⁺ humanas activadas *in vitro* expresan una menor cantidad de Sial α 2,6; las células Th1 humanas generadas *in vitro* expresan menos Sial α 2,6, por lo tanto, la galectina-1 puede regular negativamente las respuestas inflamatorias de tipo Th1, proporcionando un vínculo molecular entre la glicosilación diferencial de las células T colaboradoras, la susceptibilidad a la muerte celular y la contracción de la respuesta inflamatoria (126).

Antecedentes

Recientemente en nuestro grupo de trabajo, utilizando un modelo *in vivo* de infección aguda con *Toxoplasma gondii*, se identificaron dos nuevos estados celulares en linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ a partir de la expresión de la Sial α 2,6 durante la infección aguda con *T. gondii*. Nuestros resultados muestran que todos los linfocitos T de ratones no infectados presentan un glicofenotipo Sial α 2,6⁺, tras 7 días de infección, aproximadamente el 50% de los linfocitos dejan de expresar esta sialilación y exhiben un glicofenotipo Sial α 2,6^{-Dim}. Un análisis más profundo de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ SN^{-Dim} mostró que se trata de células altamente activadas, con un fenotipo TEf/EM o TCM que producen altos niveles de IFN- γ , un estado celular activo no descrito previamente (127).

Este trabajo demuestra la importancia del estudio del glicoma en los linfocitos T, ya que proporciona nueva información que no se obtiene al evaluar únicamente la expresión de proteínas. Las diferencias funcionales entre las células SN^{Bright} y SN^{-Dim} sugiere que la expresión de Sial α 2,6 podría ser un marcador útil para distinguir estas poblaciones, agregando un solo marcador glicofenotípico, lo que permitiría eficientizar el monitoreo de un paciente en contextos infecciosos, autoinmunes o cancerosos.

Hipótesis

La Sial α 2,6 se expresa diferencialmente en Linfocitos T, Linfocitos B y células NK humanas obtenidas de sujetos sanos

Objetivos

General

Analizar la expresión de la Sial α 2,6 en linfocitos T, linfocitos B y NK humanos obtenidos de sangre periférica de sujetos sanos

Particulares

- Diseñar paneles de citometría de flujo que nos permitan analizarla Sial α 2,6 en linfocitos T, linfocitos B y células NK humanos de donadores sanos
- Diseñar la estrategia de análisis de datos
- Validar los paneles en PBMC de sujetos sanos
- Obtención de muestras y análisis de datos

Metodología

1. Donadores

Se obtuvo sangre periférica por punción venosa de voluntarios sanos mayores de edad, se excluyeron sujetos con alguna infección y personas en condiciones de embarazo o puerperio.

Todos los donadores firmaron un consentimiento informado y se recolectó la siguiente información: sexo, género, edad y día del periodo menstrual (tabla 7). El protocolo fue aprobado por las Comisiones de Investigación y ética de la Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM (proyecto FM/DI/076/2022).

Letra	Sexo	Edad (años)	Día de periodo menstrual
A	Hombre	26	N/A
B	Hombre	30	N/A
C	Hombre	64	N/A
D	Hombre	27	N/A
E	Mujer	24	22
F	Mujer	52	N/A
G	Mujer	42	5
H	Mujer	24	Después de ovular
I	Mujer	26	5
J	Mujer	33	5
K	Hombre	24	N/A
L	Hombre	24	N/A
M	Hombre	24	N/A
Criterios de inclusión			
Sujetos sanos, mayores de edad			
Criterios de exclusión			
Sujetos con alguna infección y personas en embarazo o puerperio			
Edad promedio de los donadores			
33 años			
Mínima: 24 años		Max: 62 años	
Edad promedio de donadores hombres			
30 años			
Mínima: 24 años		máxima: 62 años	
Edad promedio de las donadoras mujeres			
33 años			
Mínima: 24 años		máxima: 52 años	
Tabla 7. Características de los donadores. N/A: No Aplica			

2. Obtención de células mononucleadas

Se colectaron 7 ml de sangre periférica de cada donador, utilizando un sistema de colecta de muestra S-Monovette 7.5 ml Na Heparin NH (SARSTEDT, Alemania)

La muestra se diluye con DPBS (NaCl 138mM, KCl 2.7mM, NaHPO₄ 8.1mM, KH₂PO₄ 1.2mM) en proporción 1:1. Las células mononucleares se separan por centrifugación de gradiente de densidad; el cual se prepara colocando 3 ml de Histopaque-1077 (Sigama-Aldrich, Alemania) a temperatura ambiente en un tubo de fondo cónico de 15 ml (Axigen-Corning, USA) vertiendo cuidadosamente la mitad de la muestra, de modo tal que no se mezcle el reactivo y la sangre. Los tubos se centrifugan a 800 g por 30 min y se recuperan del gradiente las células mononucleares localizadas en el anillo blanco que se encuentra en la interfase del Histopaque y el plasma. Las células se lavan primero con 30 ml de DPBS centrifugando a 800 g por 10 min y dos veces más con 15 ml de DPBS. Las células se resuspenden en la misma solución, se cuentan y se utilizan inmediatamente.

3. Citometría de flujo

3.1 Citometría de flujo

Se utiliza el citómetro de flujo del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina con las siguientes características:

Citómetro	Características	Canales de detección	Filtro	Programa para captura de muestras
MACSQUANT	Laser violeta 405nm	V1	450/50	MACSQuantify
	Laser azul 488nm	B1	252/50	
		B2	585/40	
		B3	655-730	
		B4	750 LP	
	Laser rojo 635nm	R1	655-730	
		R2	750 LP	

Tabla 8. Características del citómetro

3.2 Anticuerpos y colorantes

Los reactivos fueron titulados previamente a su uso para lograr su optima detección y mejor compensación.

Anticuerpos			
Especificidad	Clona	Fluorocromos	Fabricante
CD3	REA 613	PerCP-Vio700	Miltenyi
CD4	REA623	PE-Vio770	Miltenyi
CD8	REA734	PE	Miltenyi
CD16	REA423	FITC	Miltenyi
CD20	2H7	PE	Tonbo
CD56	MY31	PE	Tonbo
NKp46	9E2	PE-CY7	Biolegend
TCR $\gamma\delta$	11F2	Biotinilado	Miltenyi
Lectinas			
Especificidad	Nombre	Fluorocromo	Fabricante
Sial α 2,3	<i>Makia A Murensis</i> (MAI II)	Biotinilado	Vector
Sial α 2.6	<i>Sambucus Nigra</i> (SN)	CY5	Vector
Fluorocromos acoplados a estreptavidina			
Especificidad	Nombre	Fluorocromo	Fabricante
Biotina	Brillan Violet 421	BV421	Bio Legend
Colorantes para evaluar viabilidad			
Ghost Dye Red 780			Tonbo

Tabla 9. Características de los anticuerpos

Los fluorocromos utilizados tienen las siguientes características:

Fluorocromo o colorante	Laser de excitación	Canal de detección	Excitación máxima	Emisión máxima
Brillant Violet 421	405nm	V1	407	423
CY5	635nm	R1	648	665
FITC	488nm	B1	499	518
Ghost Dye Red	635nm	R2	640	780
PE	488nm	B2	566	576
PE-CY7	488nm	B4	569	781
PerCP-Vio700	488nm	B3	488	678
PE-Vio770	488nm	B4	567	782

Tabla 10. Características de los fluorocromos

3.3 Diseño de paneles experimentales

Con el fin de evaluar la Sial $\alpha 2,6$ en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, TCR $\gamma\delta$ ⁺, Linfocitos B y células NK CD16^{Low} CD56^{Hi} y CD16^{Hi} CD56^{Md}, de acuerdo con las características del citómetro, se diseñaron cuatro paneles para citometría de flujo con anticuerpos que distinguen cada una de las poblaciones mencionadas y la lectina de *Sambucus nigra* (SN) para evaluar la sialilación.

LINFOCITOS T			
Laser	Canal o detector	Filtro (nm)	Anticuerpo/fluorocromo colorante
405 nm	V1	450/50	Makia Biot/Strp
488 nm	B1	252/50	
	B2	585/40	CD8 PE
	B3	655-730	CD3 PerCP-Vio700
	B4	750 LP	CD4 PE-vio 770
635 nm	R1	655-730	SN CY5
	R2	750 LP	Ghost dye red

Tabla 11. Panel de tinción para citometría de flujo de linfocitos T. Adaptado (18, 128)

TCR $\gamma\delta$			
Laser	Canal o detector	Filtro (nm)	Anticuerpo/fluorocromo colorante
405 nm	V1	450/50	TCR $\gamma\delta$ Biot/Strp
488 nm	B1	252/50	
	B2	585/40	
	B3	655-730	CD3 PerCP-Vio700
	B4	750 LP	
635 nm	R1	655-730	SN CY5
	R2	750 LP	Ghost dye red

Tabla 12. Panel de tinción para citometría de flujo de linfocitos TCR $\gamma\delta$. Adaptado de (18, 128).

LINFOCITOS B			
Laser	Canal o detector	Filtro (nm)	Anticuerpo/fluorocromo colorante
405 nm	V1	450/50	Makia Biot/Strp
488 nm	B1	252/50	
	B2	585/40	CD20 PE
	B3	655-730	
	B4	750 LP	
635 nm	R1	655-730	SN CY5
	R2	750 LP	Ghost dye red

Tabla 13. Panel de tinción para citometría de flujo de linfocitos B. Adaptado de (129)

Células NK			
Laser	Canal o detector	Filtro (nm)	Anticuerpo/fluorocromo colorante
405 nm	V1	450/50	Makia Biot/Strp
488 nm	B1	252/50	CD16 FitC
	B2	585/40	CD56 PE
	B3	655-730	CD3 PerCP-Vio700
	B4	750 LP	NKp46 PE-Cy7
635 nm	R1	655-730	SN CY5
	R2	750 LP	Ghost dye red

Tabla 14. Panel de tinción para citometría de flujo de células NK. Adaptado de OMIP 058 (130)

Como parte de la estandarización, cada una de las lectinas, los anticuerpos y colorantes se titularon para su optima detección y compensación, además de determinar el número de células de captura adecuado para poder observar suficientes células de cada población.

3.4 inmunofluorescencia directa

Un millón de células se resuspenden en 100 µl de solución de lavado con la combinación de anticuerpos y/o lectinas requeridas para la fenotipificación y análisis de la sialilación de cada subpoblación de linfocitos de interés. Las muestras se incuban 30 min a 4°C en oscuridad, se lavan 2 veces con 1 ml de solución de lavado centrifugando 5 min a 500 g y se resuspenden en solución de lavado. Las células se analizan inmediatamente en el citómetro de flujo o se tiñen para evaluar viabilidad.

3.5 inmunofluorescencia indirecta

Un millón de células se resuspenden en 100 μ l de solución de lavado [DPBS+ 1% de SFB (Byproducts, México)] con anti-TCR $\gamma\delta$ o Mal II biotinilada, se incuban 30 min a 4°C en oscuridad, se lavan 2 veces con 1 ml de solución de lavado, centrifugando 5 min a 500 *g* y se resuspenden en solución de lavado. Posteriormente se incuban con estreptavidina acoplada a Brilliant Violet 421 por 30 min a 4°C en oscuridad, se lavan 2 veces con 1 ml de solución de lavado, centrifugando 5 min a 500 *g* y se resuspenden en solución de lavado. Las células se analizan inmediatamente en el citómetro de flujo, se tiñen con anticuerpos y/o lectinas, o para evaluar viabilidad.

3.6 Determinación de la viabilidad

Las muestras se lavan con 1 ml de DPBS y posteriormente se incuban con 1 μ g/ml del colorante Ghost Dye Red 780 en 100 μ l de DPBS durante 20 min a 4°C en oscuridad. Se centrifugan a 500 *g* por 5 min y se resuspenden en 200 μ l de DPBS. Las células se analizan inmediatamente en el citómetro de flujo.

4. software de Análisis y Estadística

El análisis de las muestras de citometría se realiza con el programa FlowJo versión 10.8.1 (BD).

EL análisis estadístico de los datos se realiza con el programa Prism 10.1.0 de GraphPad Software (San Diego CA). Se realiza una prueba de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk y se analiza si había diferencia entre las varianzas con el *F* test to compare variances of Welch. Para determinar diferencias significativas entre dos grupos se utiliza la prueba *t* de Student con un intervalo de confianza del 98%; cuando los grupos tenían distribución normal con varianzas diferentes se aplica la correlación de Welch's, cuando los grupos tenían distribución normal con varianzas iguales se aplica la prueba de *t* no pareada y cuando los grupos no tenían distribución normal se aplicó la prueba de Mann-Whitney. Para comparar tres o más grupos se utiliza una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95%; se realizó una prueba de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilky; si la distribución era normal se usaba la prueba ordinaria ANOVA de una vía y una prueba posterior de comparación de Bonferroni; si la distribución no era normal se usaba una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y una prueba posterior de comparación de Dunns. En todos los casos se consideraron estadísticamente significativos los valores (**p*<0.05, ***p*<0.001, ****p*<0,0005. *****p*<0.0001).

Resultados

Este trabajo tiene como objetivo analizar la Sial $\alpha 2,6$ en células T con el fenotipo $CD4^+$, $CD8^+$ y $TCR \gamma\delta^+$, Linfocitos B $CD20^+$ y células NK $CD16^{Low} CD56^{Hi}$ y $CD16^{Hi} CD56^{Md}$. Cabe resaltar que las sialilaciones más abundantes en mamíferos son la Sial $\alpha 2,6$ y la $\alpha 2,3$ (107, 131), por lo que, en los paneles en los que el diseño nos lo permitió, incluimos como control la tinción con la lectina de *Maackia amurensis* (MAL II), que reconoce la sialilación $\alpha 2,3$. Los resultados obtenidos se muestran a continuación divididos en función de cada población analizada.

1. Linfocitos T CD4⁺

Para evaluar la expresión de la Sial α 2,6 y α 2,3 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de sujetos sanos, teñimos PBMC con el panel que se muestra en la tabla 11 y utilizamos la estrategia de análisis que se observa en la figura 12.

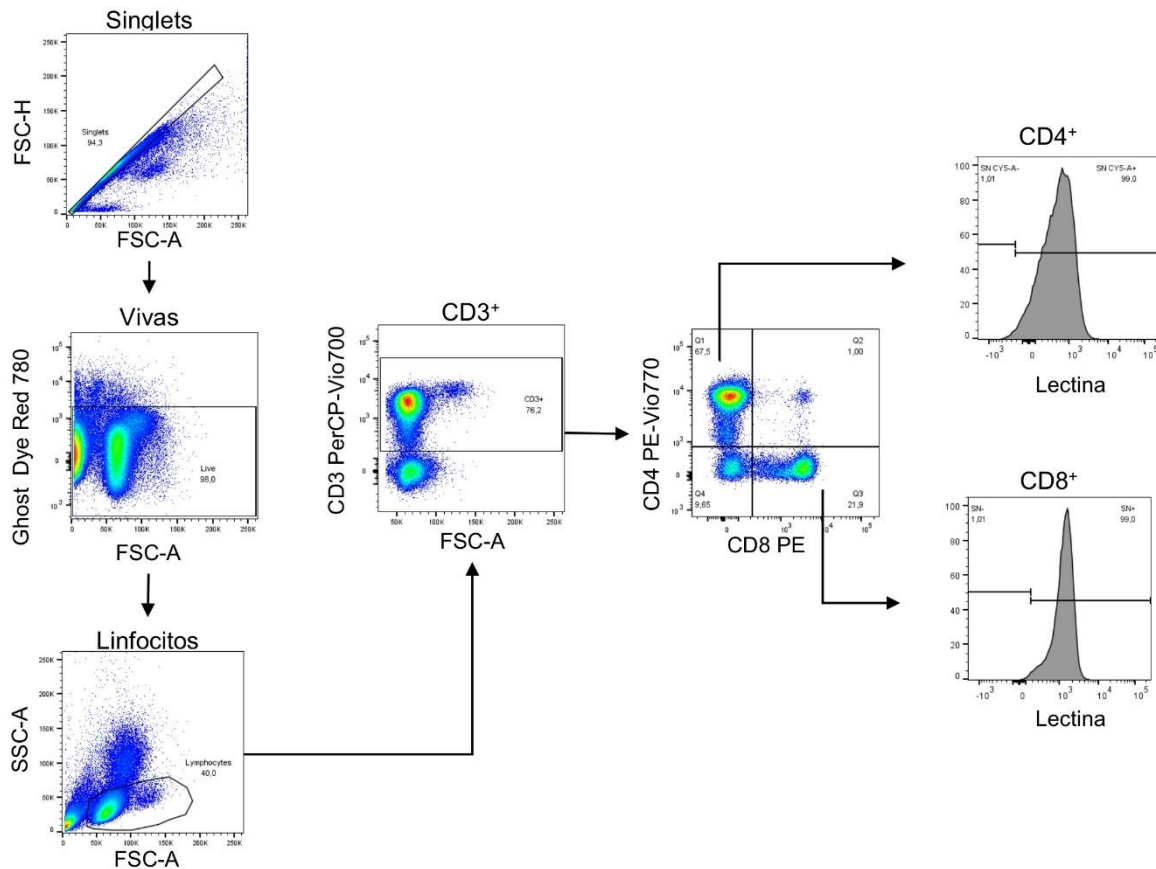


Figura 12 Estrategia de análisis de la sialilación α 2,6 y α 2,3 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

PBMC fueron teñidas para observar la Sial α 2,6 y α 2,3 en linfocitos T (tabla 11) y analizadas en el citómetro de flujo. Primero se seleccionaron las células individuales o singlets, después se excluyeron las células muertas; se seleccionó la región de linfocitos a partir de sus características de tamaño y granularidad. Dentro de la población de linfocitos se seleccionaron las células CD3⁺ y usando un dotplot de CD4 contra CD8 se identificaron las células CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺ CD8⁺. Finalmente se analizó la unión de SN y MAL II en cada una de estas subpoblaciones.

En la figura 13 se muestra el análisis de la unión de la lectina de SN (A) y MAL II (D) en linfocitos CD4⁺ de donadores sanos. Podemos observar que las células CD4⁺ de hombres,

el 70% de la población es SN⁺, es decir, expresan la Sial α 2,6, mientras que en mujeres el 94% de la población CD4⁺ es SN⁺ (figura 13B); además las células CD4⁺SN⁺ de las mujeres expresan 17 veces más la Sial α 2,6 que las de los hombres (figura 13C).

llama la atención que la expresión de la Sial α 2,6 en los linfocitos de hombres muestra un patrón claro, mismo que también se puede observar en las mujeres, sin embargo, hay un dato que se encuentra en el extremo inferior (F) y otro en el extremo superior (H); al revisar su información personal encontramos que la donadora H se encuentra en periodo post ovulatorio y la donadora F, además de ser la persona de mayor edad, atraviesa por la menopausia; el patrón de expresión de la Sial α 2,6 en esta donante es semejante al que se observa en hombres, sugiriendo que la reducción de hormonas como los estrógenos y la progesterona (132) se relacionan con la expresión de la Sial α 2,6.

Estos datos muestran que en linfocitos CD4⁺ la Sial α 2,6 se expresa de manera diferencial entre hombres y mujeres, tanto en proporción de células positivas para la lectina, como el nivel de expresión. Siendo las células de mujeres donde la población completa de CD4⁺ es SN⁺ y expresa el mayor nivel de Sial α 2,6.

Al analizar la Sial α 2,3, observamos que la población CD4⁺ MAL II⁺ en hombres corresponde al 64% y al 40% en mujeres (figura 13E); mientras que el nivel de expresión de la Sial α 2,3 es similar entre hombres (2013) y mujeres (1920) (figura 13F); es importante destacar que la expresión de la Sial α 2,3 es particular en cada donador, principalmente en mujeres, donde cada una muestra un perfil de expresión de Sial α 2,3 diferente; pareciera ser, que hay un perfil de expresión similar en los donantes masculinos (A, B y C), pero al revisar los datos personales, no encontramos alguna característica que compartieran, además del sexo.

A diferencia de lo que observamos anteriormente, la población de células CD4⁺ que expresan la Sial α 2,3, es mayor en hombres que en mujeres, cabe resaltar que no hay un patrón distinguible en el porcentaje de células MAL II⁺; la expresión de la Sial α 2,3 es diferencial en cada persona.

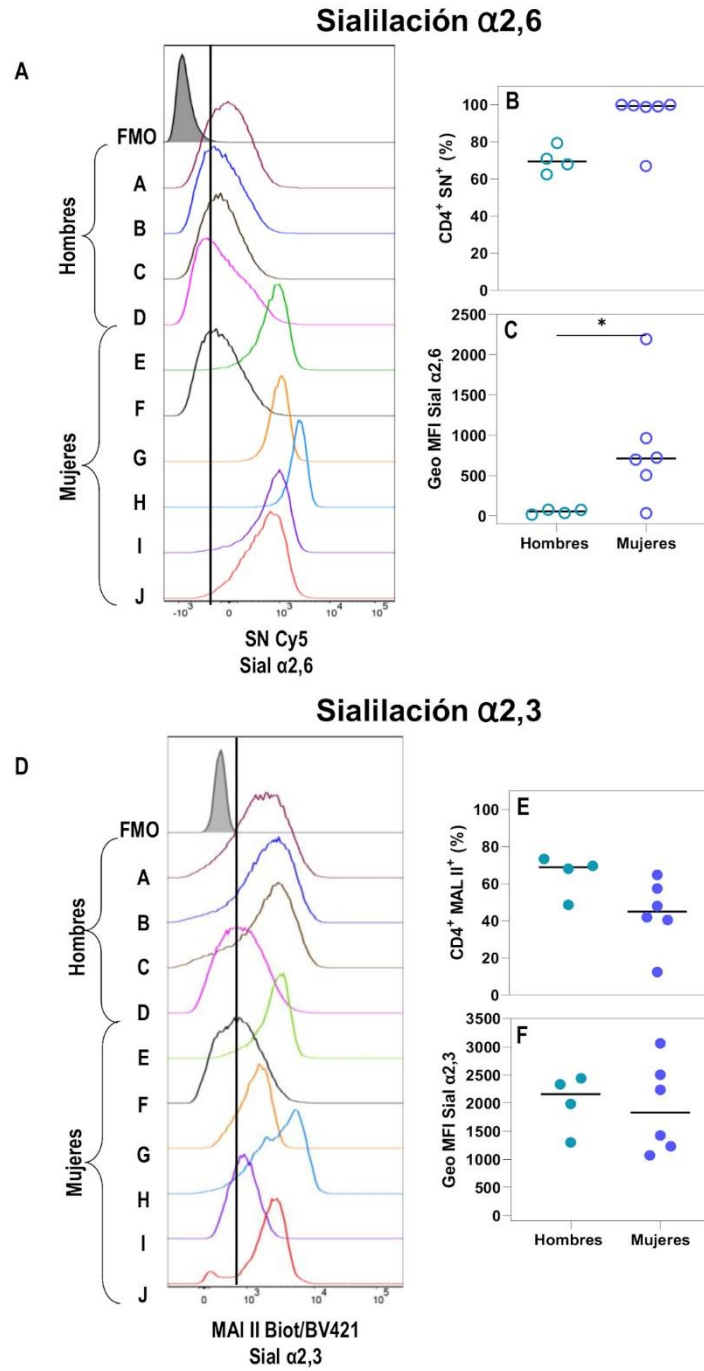


Figura 13. Análisis de la Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ de linfocitos T CD4. PBMC teñidas con el panel para linfocitos T (tabla 10) y analizadas en el citómetro de flujo. Los histogramas muestran la unión de la lectina SN (A) o de la MAL II (B) en linfocitos T CD4⁺ de donadores independientes, (A-D hombres y E-J mujeres). Análisis estadístico del porcentaje de células SN⁺ (B, ● hombres y ● mujeres) y MAL II (E, ● hombres y ● mujeres); dentro de la población CD4⁺ y de la Geo MFI de la Sial $\alpha 2,6$ (C, ○ hombres y ○ mujeres) y la Sial $\alpha 2,3$ (F, ● hombres y ● mujeres); cada círculo representa un donador. Los datos se analizaron utilizando la prueba de Mann-Whitney o con la prueba de Welch's (*p<0.05).

Al comparar los datos obtenidos del análisis de la Sial $\alpha 2,6$ y la Sial $\alpha 2,3$, encontramos que, en hombres, la misma proporción de linfocitos CD4⁺ expresan la Sial $\alpha 2,6$ y la Sial $\alpha 2,3$ (70% y 64% respectivamente) (figura 14A); mientras que en mujeres todos los linfocitos CD4⁺ expresan la Sial $\alpha 2,6$ y de ellos el 44% también expresa la Sial $\alpha 2,3$ (Figura 14B).

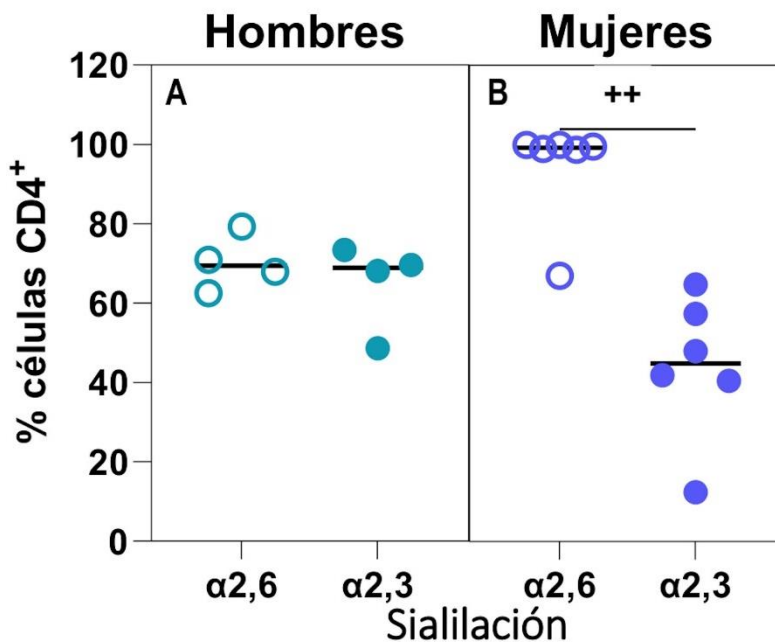


Figura 14. Análisis comparativo de la Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ en linfocitos CD4⁺. Análisis estadístico del porcentaje de células que expresan la Sial $\alpha 2,6$ (círculo abierto) y la $\alpha 2,3$ (círculo cerrado) en hombres (A) y en mujeres (B) dentro de la población CD4⁺. Cada círculo representa un donador (mujeres en morado y hombres en verde) y se analizaron con la prueba de Mann-Whitney (**p<0.001).

2. Linfocitos CD8⁺

En la figura 15 observamos el análisis de la unión de la lectina de SN (A) y MAL II (D) en linfocitos CD8⁺ de donadores sanos. Los resultados muestran que el porcentaje de células que expresan la Sial α 2,6 es similar en hombres (95%) y mujeres (98%) (figura 15B), no obstante, el nivel de expresión de la sialilación es 2.3 veces mayor en linfocitos de mujeres respecto a los de hombres (figura 15C).

La Sial α 2,6 exhibe un patrón de expresión claro tanto en hombres como en mujeres, sin embargo, en los perfiles de sialilación de las donadoras, nuevamente apreciamos que dos datos se encuentran situados a los extremos inferior (F) y superior (H); coincidentemente este mismo comportamiento con estas donantes, lo observamos previamente en los linfocitos CD4⁺, además, reiteradamente el perfil de expresión de la Sial α 2,6 en la donadora F es semejante a los perfiles de expresión de donadores masculinos, lo que refuerza la idea de una posible relación entre la expresión de la Sial α 2,6 y el ciclo hormonal. Por lo tanto, todos los linfocitos CD8⁺ expresan la Sial α 2,6, independientemente del sexo del individuo, no obstante, el nivel de expresión es diferencial entre hombres y mujeres, siendo las células de mujeres las que expresan un mayor nivel de Sial α 2,6.

El análisis de la Sial α 2,3 en linfocitos CD8⁺ muestra que en hombres el 77% de la población es MAL II⁺ en mujeres, el 76% (figura 15E); no hay diferencias significativas entre los promedios de expresión de la Sial α 2,3 en las células de hombres (1666) y de mujeres (1610) (figura 15F).

Es importante destacar que no se observa un patrón uniforme en la expresión de Sial α 2,3. Parece haber una mayor homogeneidad en el perfil de expresión entre los linfocitos de hombres en los donantes A, B y C. En contraste, en los linfocitos de mujeres, cada donante presenta un perfil de sialilación particular. Por ejemplo, en las donantes F, G y H, la mitad de las células CD8⁺ son MAL II⁺ y muestran una menor expresión de Sial α 2,3 en comparación con las donantes E, I y J, donde toda la población CD8⁺ es MAL II⁺ y muestra una mayor expresión de Sial α 2,3. Estos resultados indican que la expresión de Sial α 2,3 en los linfocitos CD8⁺ varía entre cada donador, tanto en la proporción de células positivas para la lectina como en el nivel de expresión.

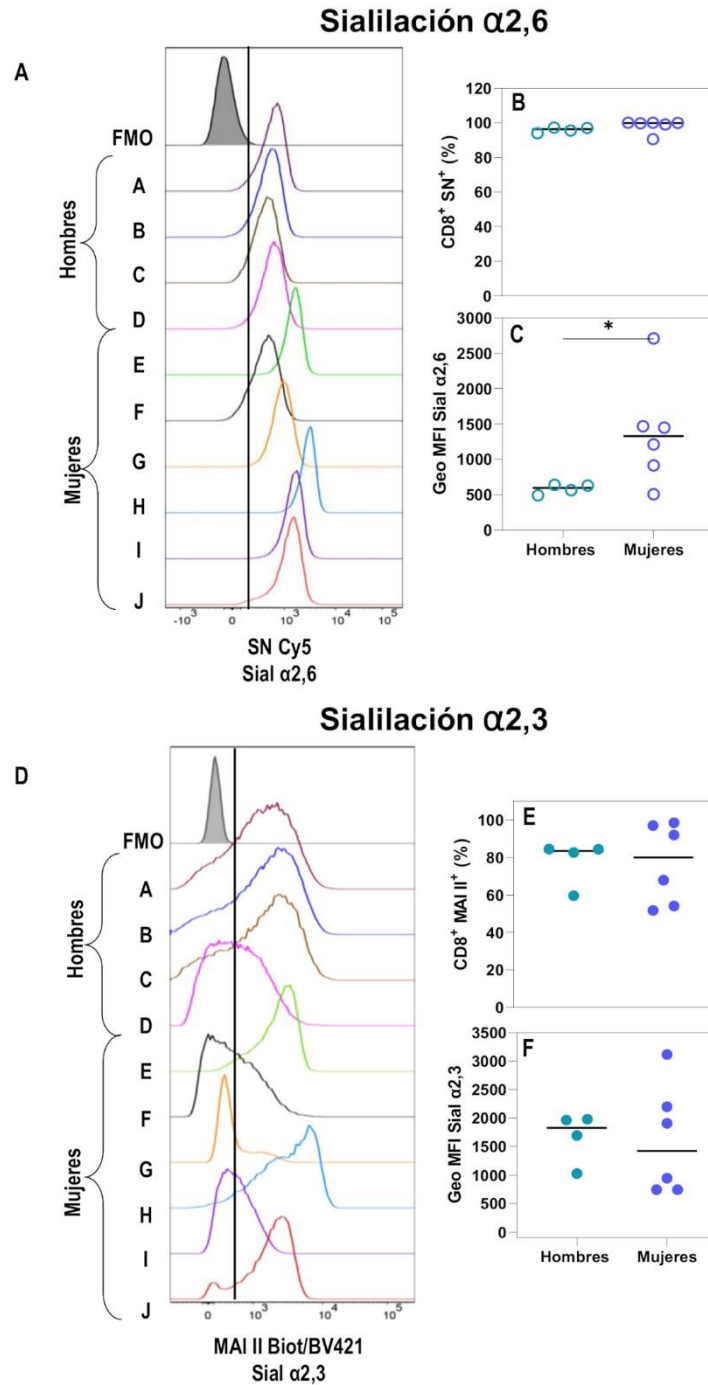


Figura 15. Análisis de la Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ de linfocitos T CD8. PBMC teñidas con el panel para linfocitos T (tabla 10) y analizadas en el citómetro de flujo. Los histogramas muestran la unión de la lectina SN (A) o de la MAL II (B) en linfocitos T CD8⁺ de donadores independientes, (A-D hombres y E-J mujeres). Análisis estadístico del porcentaje de células SN⁺ (B, ○ hombres y ○ mujeres) y MAL II (E, ● hombres y ● mujeres) dentro de la población CD8⁺ y de la Geo MFI de la Sial $\alpha 2,6$ (C, ○ hombres y ○ mujeres) y la Sial $\alpha 2,3$ (F, ● hombres y ● mujeres); cada circulo representa un donador. Los datos se analizaron utilizando la prueba de Mann-Whitney o con la prueba de Welch's (*p<0.05).

El análisis comparativo entre la Sial $\alpha 2,6$ y la Sial $\alpha 2,3$ en linfocitos CD8⁺ muestra que, todos los linfocitos CD8⁺ expresan la Sial $\alpha 2,6$, tanto en hombres como en mujeres, y de ellos la misma proporción expresa también la Sial $\alpha 2,3$ (77% y 76% respectivamente) (figura 16).

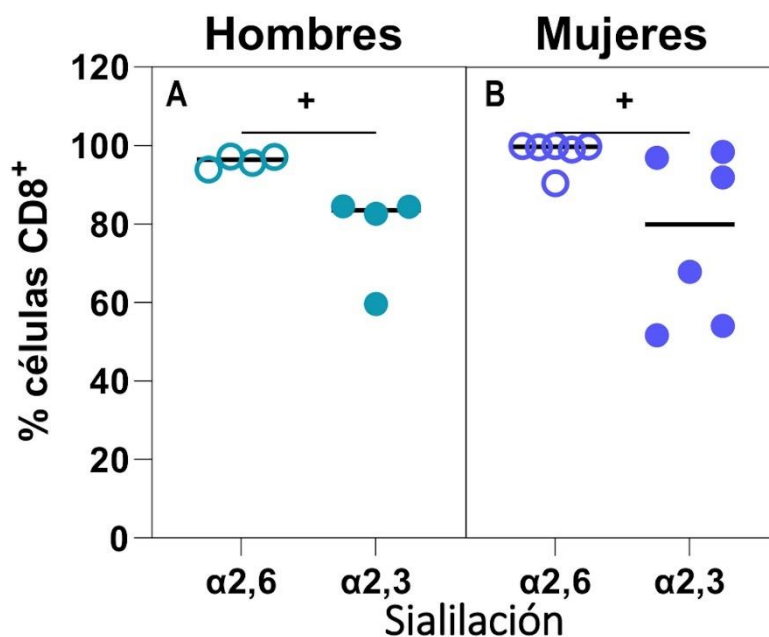


Figura 16. Análisis comparativo de la Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ en linfocitos CD8⁺. Análisis estadístico del porcentaje de células que expresan la Sial $\alpha 2,6$ (círculo abierto) y la $\alpha 2,3$ (círculo cerrado) en hombres (A) y en mujeres (B) dentro de la población CD8⁺. Cada círculo representa un donador (mujeres en morado y hombres en verde) y se analizaron con la prueba de Mann-Whitney (* $p < 0.05$).

3. Linfocitos TCR $\gamma\delta^+$

Dado que el diseño del panel de tinción para linfocitos TCR $\gamma\delta$ (tabla 12) no nos permitió incluir la lectina de MAL II, en esta población únicamente analizamos la expresión de la Sial $\alpha 2,6$ en linfocitos TCR $\gamma\delta^+$ de sujetos sanos, para ello teñimos PBMC con panel previamente mencionado y realizamos el análisis con la estrategia que se observa en la figura 17.

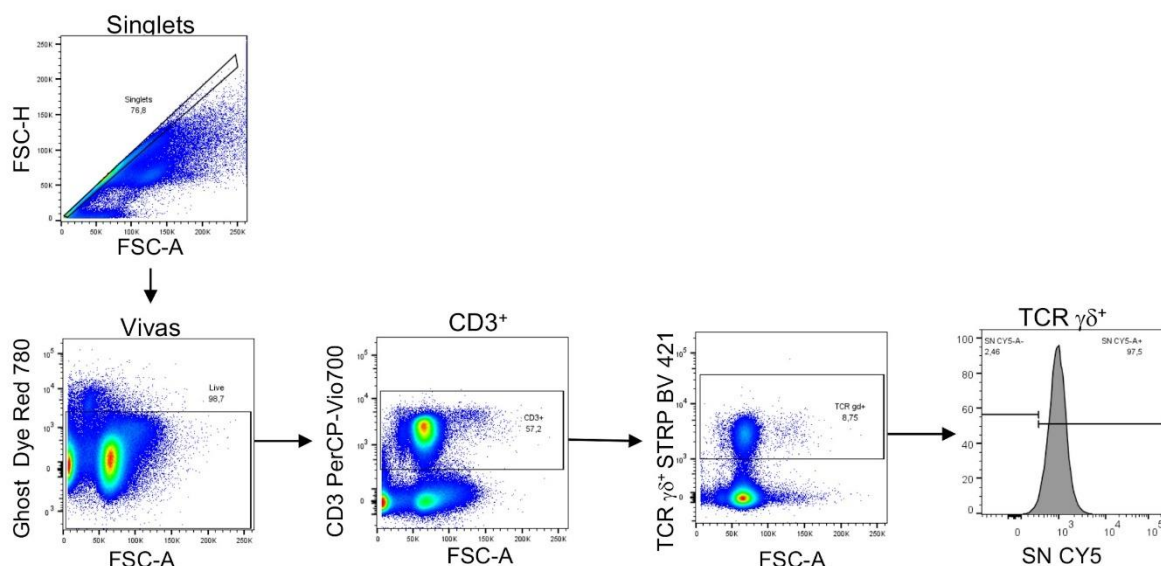


Figura 17. Estrategia de análisis de la sialilación $\alpha 2,6$ en linfocitos TCR $\gamma\delta$ humanos. PBMC fueron teñidas para observar la Sial $\alpha 2,6$ en linfocitos TCR $\gamma\delta$ (tabla 12) y analizadas en el citómetro de flujo. Primero se seleccionaron las células individuales o singlets, después se excluyeron las células muertas, se seleccionaron las células CD3 $^+$ y se identificaron las células TCR $\gamma\delta^+$. Finalmente se analizó la unión de SN en esta población.

En la figura 18 se presenta el análisis de la unión de la lectina de SN (A). Observamos que la proporción de linfocitos TCR $\gamma\delta^+$ SN $^+$ es similar en ambos sexos (99% en hombres y 97% en mujeres) (figura 18B), lo que indica que todos los linfocitos TCR $\gamma\delta^+$ expresan Sial $\alpha 2,6$. Además, el nivel de expresión de Sial $\alpha 2,6$ es semejante entre hombres (1339) y mujeres (1275) (figura 18C). Los linfocitos TCR $\gamma\delta^+$ de hombres muestran un patrón claro de expresión de Sial $\alpha 2,6$, el cual también se observa en mujeres; sin embargo, hay un dato atípico con un sujeto en particular (H), quien como ya se mencionó anteriormente se encuentra en el periodo post-ovulatorio, a diferencia del resto de las donadoras, que están

en el día 5 de su ciclo. Los resultados muestran que todos los linfocitos TCR $\gamma\delta^+$ expresan la Sial $\alpha 2,6$ independientemente del sexo y en el mismo nivel.

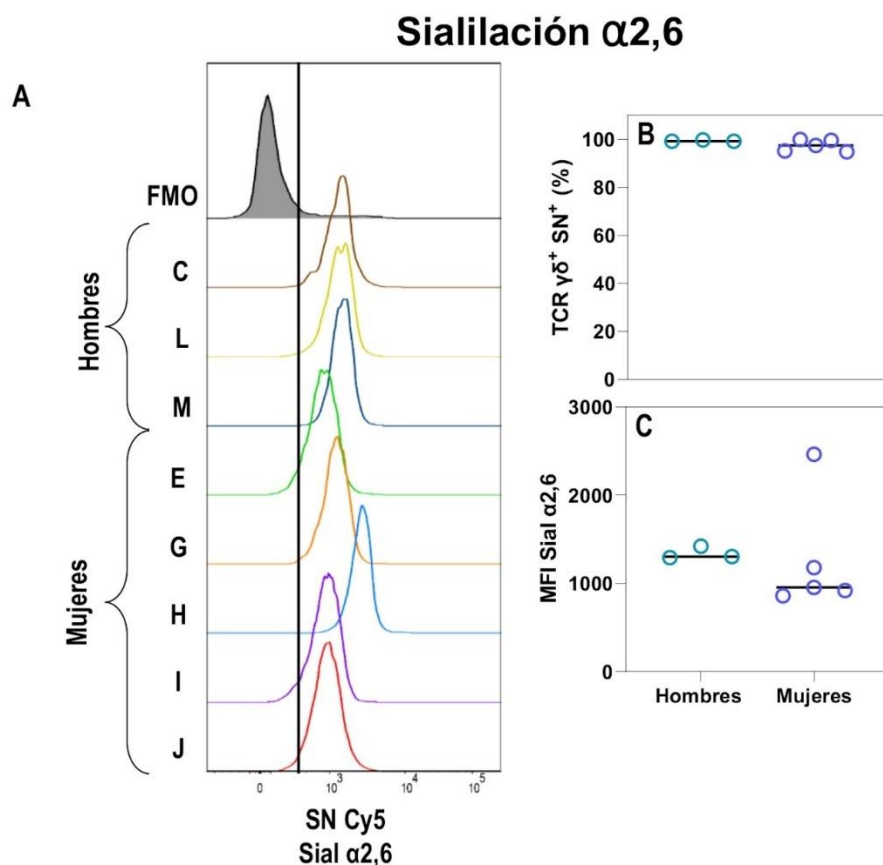


Figura 18. Análisis de la Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ de linfocitos TCR $\gamma\delta$. PBMC teñidas con el panel para linfocitos T (tabla 12) y analizadas en el citómetro de flujo. El histograma muestra la unión de la lectina SN (A), en linfocitos TCR $\gamma\delta^+$ de donadores independientes, (C, L-M hombres, y E, G-J mujeres). Análisis estadístico del porcentaje de células SN $^+$ dentro de la población TCR $\gamma\delta^+$ (B) y de la Geo MFI de la Sial $\alpha 2,6$ (C), ($\circ$ hombres y $\circ$ mujeres); cada círculo representa un donador. Los datos se analizaron utilizando la prueba de Mann-Whitney o con la prueba de Welch's.

4. Linfocitos B CD20⁺

Con el objetivo de evaluar la expresión de la Sial α 2,6 y α 2,3 en linfocitos B CD20⁺ de sujetos sanos, teñimos PBMC con el panel que se muestra en la tabla 13 y analizamos los datos de acuerdo con la estrategia que se observa en la figura 19.

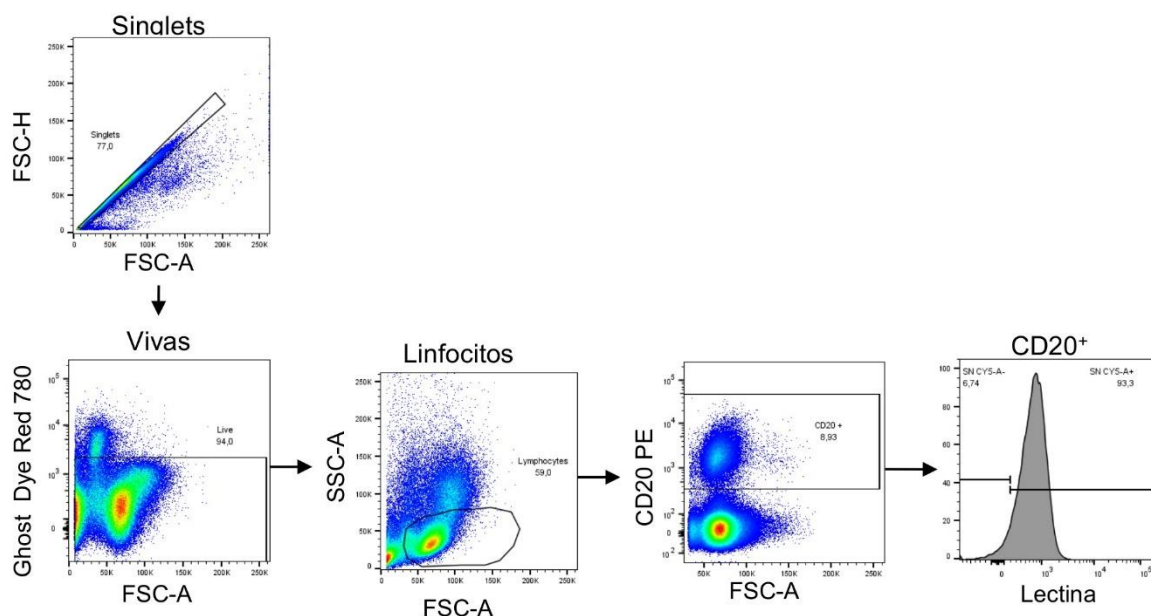


Figura 19. Estrategia de análisis de la sialilación α 2,6 y α 2,3 en linfocitos B CD20⁺ humanos. PBMC fueron teñidas para observar la Sial α 2,6 y α 2,3, en linfocitos B (tabla 13) y analizadas en el citómetro de flujo. Primero se seleccionaron las células individuales o singlets, después se excluyeron las células muertas, se seleccionó la región de linfocitos a partir de sus características de tamaño y granularidad. Dentro de la población de linfocitos identificaron las células CD20⁺. Finalmente se analizó la unión de SN y MAL II en cada una de estas subpoblaciones.

La figura 20 muestra el análisis de la unión de la lectina de SN (figura 20A) y MAL II (figura 20D) en linfocitos B CD20⁺ de donadores sanos. Observamos que la proporción de células CD20⁺SN⁺ es semejante en ambos sexos, (hombres 95% y mujeres 92%) (figura 20B); sin embargo, los linfocitos de las mujeres expresan 0.6 veces más la Sial α 2,6 en comparación con los linfocitos de hombres (figura 20C).

Los resultados indican que los perfiles de sialilación en los linfocitos B de hombres muestran una notable uniformidad. En el caso de las células de mujeres, también se observa un patrón general de comportamiento, con excepción de dos datos que destacan en los

extremos inferior y superior; estos corresponden a las donadoras F y H, respectivamente. El perfil de sialilación de la donadora F en esta ocasión no coincide con los perfiles observados en los linfocitos T masculinos, como previamente habíamos observado. Los datos obtenidos indican que todos los linfocitos B, tanto de hombres como de mujeres, expresan Sial α 2,6, aunque con niveles de expresión diferentes. Específicamente, las mujeres muestran un mayor nivel de expresión de Sial α 2,6 en comparación con los hombres.

Por otro lado, los resultados de la unión de la lectina MAL II en linfocitos B indican que, en hombres, el 69% de los linfocitos CD20⁺ expresan Sial α 2,3, mientras que en mujeres solo el 41% muestra esta expresión (figura 20E). Además, se observó que el nivel de expresión es 0.66 veces mayor en los linfocitos de hombres comparados con los de mujeres (figura 20F). Sin embargo, es importante señalar que esta diferencia no es estadísticamente significativa debido a la gran dispersión de los datos; ya que cada donante presenta un perfil particular de expresión de Sial α 2,3. Solo se pueden observar similitudes entre los perfiles de expresión de los donadores A y B. Por lo tanto, la expresión de Sial α 2,3 en los linfocitos CD20⁺ varía considerablemente entre individuos.

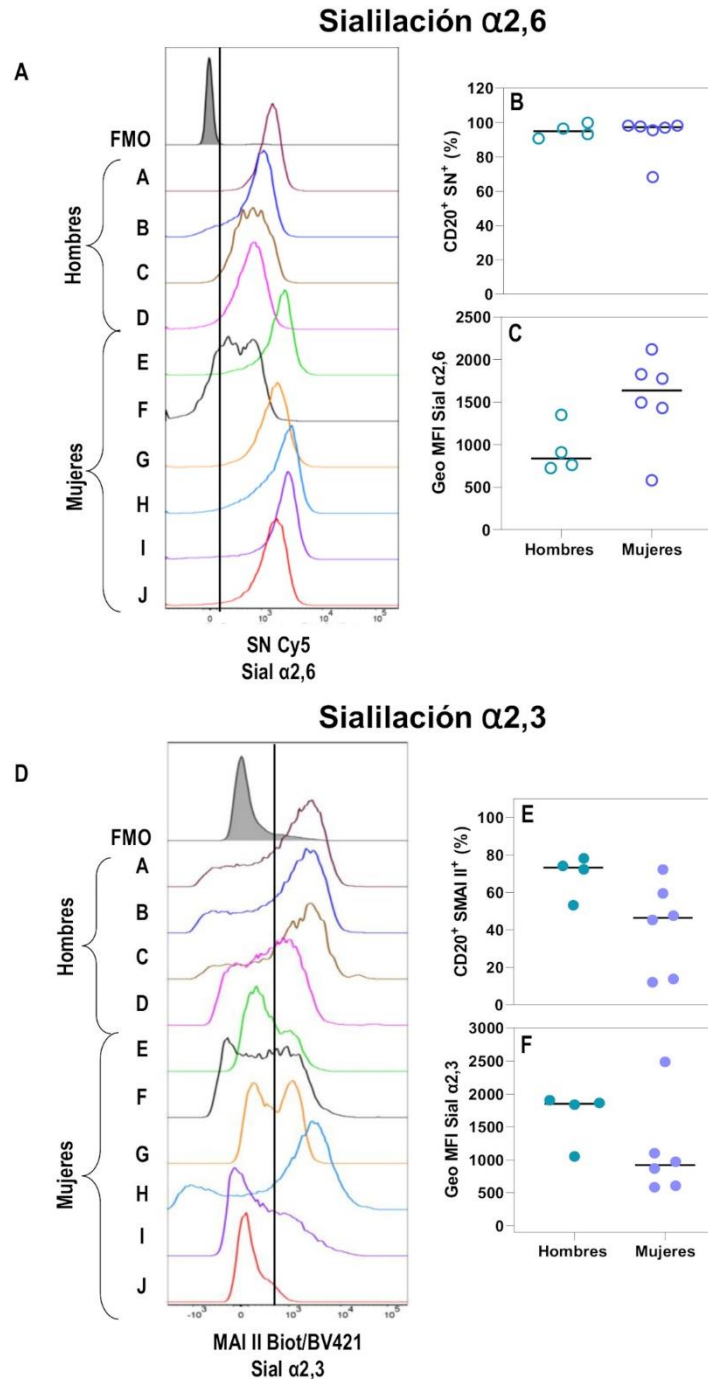


Figura 20. Análisis de la Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ de linfocitos B CD20. PBMC teñidas con el panel para linfocitos T (tabla 13) y analizadas en el citómetro de flujo. Los histogramas muestran la unión de la lectina SN (A) o de la MAL II (B) en linfocitos B CD20⁺ de donadores independientes, (A-D hombres y E-J mujeres). Análisis estadístico del porcentaje de células SN⁺ (B, ○ hombres y ○ mujeres) y MAL II (E, ● hombres y ● mujeres) dentro de la población CD20⁺ y de la Geo MFI de la Sial $\alpha 2,6$ (C, ○ hombres y ○ mujeres) y la Sial $\alpha 2,3$ (F, ● hombres y ● mujeres); cada círculo representa un donador. Los datos se analizaron utilizando la prueba de Mann-Whitney, prueba de *t* no pareada o con la prueba de Welch's.

El análisis comparativo de la expresión de la Sial $\alpha 2,6$ y Sial $\alpha 2,3$, en linfocitos B CD20⁺, mostro que todos los linfocitos B de hombres expresan la Sial $\alpha 2,6$ y de ellos el 69%, expresa también el sial $\alpha 2,3$, de igual forma, en mujeres, todos los linfocitos B expresan la Sial $\alpha 2,6$ y de estos únicamente el 41% también la $\alpha 2,3$ (figura 21).

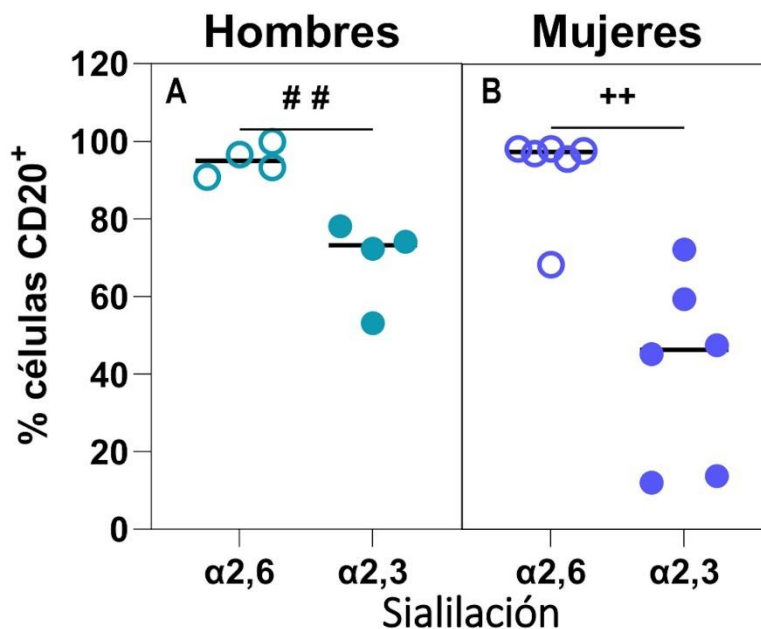


Figura 21. Análisis comparativo de la Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ en linfocitos B CD20⁺. Análisis estadístico del porcentaje de células que expresan la Sial $\alpha 2,6$ (círculo abierto) y la $\alpha 2,3$ (círculo cerrado) en hombres (A) y en mujeres (B) dentro de la población CD20⁺. Cada círculo representa un donador (mujeres en morado y hombres en verde) y se analizaron con la prueba de Mann-Whitney (**p<0.001), o prueba de t no pareada (##p<0.001).

5. Células NK CD16^{Lw}CD56^{Hi}

Con el objetivo de analizar la expresión de la Sial α 2,6 y α 2,3 Células NK CD16^{Lw}CD56^{Hi} y CD16^{Hi}CD56^{Md} de sujetos sanos, marcamos PBMC de acuerdo con el panel que se observa en la tabla14 y utilizamos la siguiente estrategia de análisis figura 22.

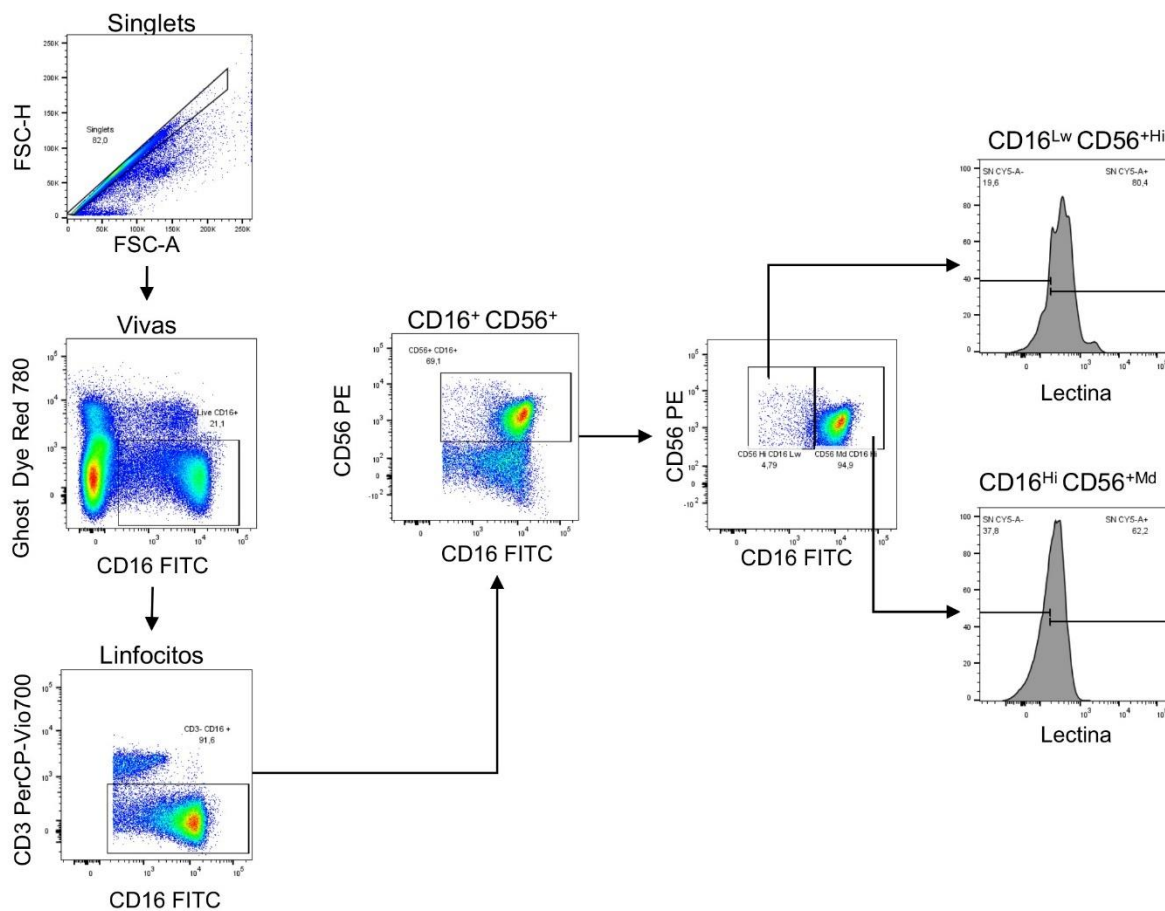


Figura 22. Estrategia de análisis de la sialilación α 2,6 y α 2,3 en Células NK CD16^{Lw}CD56^{Hi} y CD16^{Hi}CD56^{Md} humanos. PBMC fueron teñidas para observar la Sial α 2,6 y α 2,3 en células NK (tabla 14) y analizadas en el citómetro de flujo. Primero se seleccionaron las células individuales o singlets, después se excluyeron las células muertas y CD16⁻, se seleccionó la región de células CD3⁻ dentro de la población CD16⁺ y usando un dotplot de CD16 contra CD56 se identificaron las células CD16^{Lw}CD56^{Hi} y CD16^{Hi}CD56^{Md}. Finalmente se analizó la unión de SN y MAL II en cada una de estas subpoblaciones.

En la figura 23 se observa el análisis de la unión de la lectina de SN (A) y MAL II (D) en células NK CD16^{Lw}CD56^{Hi} de donadores sanos. Los resultados muestran que la misma

proporción de células CD16^{Lw}CD56^{Hi} de hombres y mujeres expresan la Sial α 2,6 (86%) (figura 23B), pero el nivel de expresión es 0.6 veces mayor en las células CD16^{Lw}CD56^{Hi} de mujeres en comparación con las células de los hombres (figura 23C).

La expresión de la Sial α 2,6 en células CD16^{Lw}CD56^{Hi} exhibe un patrón de comportamiento para ambos sexos; llama la atención que, en la mayoría de los hombres, encontramos una pequeña población CD16^{Lw}CD56^{Hi} SN^{Hi} (A, C y D), mientras que en mujeres solo una donadora la presenta (E). Estos resultados indican que la Sial α 2,6 se expresa en las células NK CD16^{Lw}CD56^{Hi} independientemente del sexo y en la misma proporción, no obstante, el nivel de expresión es mayor en células de mujeres.

Por otro lado, al analizar la expresión de la Sial α 2,3 en células las CD16^{Lw}CD56^{Hi} encontramos diferencias la proporción de células CD16^{Lw}CD56^{Hi} MAL II⁺, siendo mayor en hombres que en mujeres (70% y 53% respectivamente) (figura 23E), con respecto al nivel de expresión también hay diferencias dependiendo del sexo, las células CD16^{Lw}CD56^{Hi} de hombres expresan 0.7 veces más la Sial α 2,3 con respecto a las células de mujeres (figura 23F).

A diferencia de lo que hemos observado en otras poblaciones celulares, en las células CD16^{Lw}CD56^{Hi} se puede apreciar un patrón de expresión de la Sial α 2,3, que inclusive es diferente entre ambos sexos; los histogramas de los perfiles de sialilación en células de hombres presentan un sesgo negativo, por el contrario, en mujeres el sesgo es positivo. Así bien las células CD16^{Lw}CD56^{Hi} expresan la Sial α 2,3 de manera diferencial entre hombres y mujeres, tanto en la proporción de células MAL II⁺, como en el nivel de expresión; siendo los hombres donde encontramos el mayor porcentaje de células CD16^{Lw}CD56^{Hi} MAL II⁺ con un nivel de expresión superior al de células de mujeres.

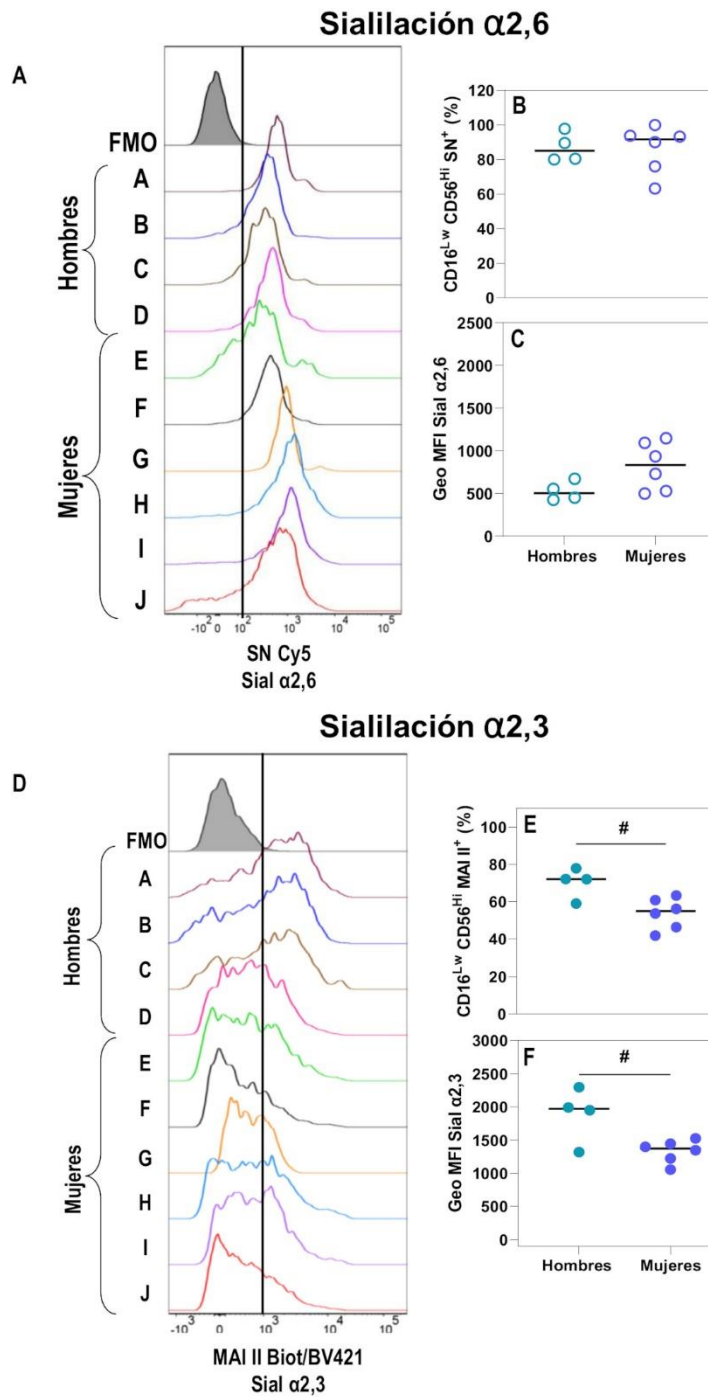


Figura 23. Análisis de la Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ de células NK $CD16^{Lw}CD56^{Hi}$. PBMC teñidas con el panel para células NK (tabla 14) y analizadas en el citómetro de flujo. Los histogramas muestran la unión de la lectina SN (A) o de la MAL II (B) en células NK $CD16^{Lw}CD56^{Hi}$ de donadores independientes, (A-D hombres y E-J mujeres). Análisis estadístico del porcentaje de células SN^+ (B, $\circ$ hombres y $\circ$ mujeres) y MAL II (E, $\bullet$ hombres y $\bullet$ mujeres) dentro de la población $CD16^{Lw}CD56^{Hi}$ y de la Geo MFI de la Sial $\alpha 2,6$ (C, $\circ$ hombres y $\circ$ mujeres) y la Sial $\alpha 2,3$ (F, $\bullet$ hombres y $\bullet$ mujeres); cada círculo representa un donador. Los datos se analizaron utilizando la prueba de Mann-Whitney o la prueba de t no pareada ($\#p<0.05$).

Los resultados del análisis comparativo entre la Sial α 2,6 y la Sial α 2,3, en células CD16^{Lw}CD56^{Hi}, mostraron que tanto en hombres como en mujeres la proporción de células que expresan la Sial α 2,6 (86%) es mayor que la que expresa la Sial α 2,3 (70% y 53% respectivamente) (figura 24).

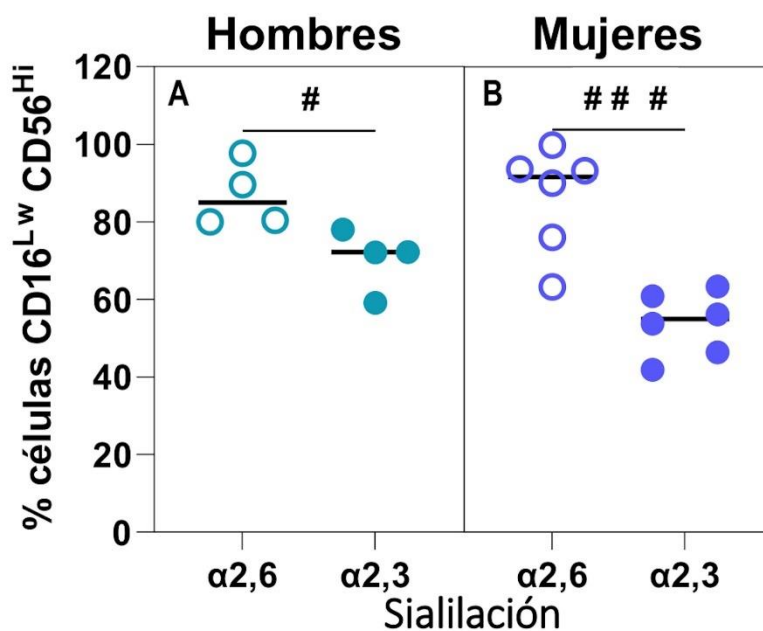


Figura 24. Análisis comparativo de la Sialilación α 2,6 y α 2,3 en células NK CD16^{Lw}CD56^{Hi}.
Análisis estadístico del porcentaje de células que expresan la Sial α 2,6 (círculo abierto) y la α 2,3 (círculo cerrado) en hombres (A) y en mujeres (B) dentro de la población CD20⁺. Cada círculo representa un donador (mujeres en morado y hombres en verde) y se analizaron con la prueba de t no pareada (# p <0.05, ## p <0.001, ### p <0.0005).

6. Células NK CD16^{Hi}CD56^{Md}

En la figura 25 se observa el análisis de la unión de la lectina de SN (A) y MAL II (D) en células CD16^{Hi}CD56^{Md} de donadores sanos. Los resultados muestran que en hombres el 78% de las células CD16^{Hi}CD56^{Md} son SN⁺, mientras que en mujeres el 90% de la población es SN⁺ (figura 25B) además las células de mujeres expresan el doble de la Sial α 2,6 en comparación con las células de hombres (figura 25C).

Resalta la uniformidad que hay entre los perfiles de sialilación en ambos sexos, sin embargo, en mujeres hay un par de datos (E y F) que son similares a los perfiles de expresión que presentan los hombres, al revisar los datos personales de ambas donadoras, encontramos que son las de menor y mayor edad, respectivamente; en las células T y B, ya habíamos encontrado esta similitud de la donadora F con los donadores masculinos, sin embargo la donadora E se había mantenido dentro de la media en las poblaciones analizadas previamente. Los resultados indican que en células NK CD16^{Hi}CD56^{Md} la expresión de la Sial α 2,6 es diferencial, siendo las mujeres las que presentan un mayor porcentaje de células CD16^{Hi}CD56^{Md} SN⁺ y con un nivel de expresión mayor respecto a los hombres.

Por otra parte, los resultados del análisis de la Sial α 2,3 mostraron que en hombres el 64% de las células CD16^{Hi}CD56^{Md} presenta el fenotipo MAL II⁺ y en mujeres únicamente el 44% de las células son positivas para la lectina (figura 25E); en cuanto al nivel de expresión de la Sial α 2,3 es 0.6 veces mayor en células de hombres en comparación con las células de mujeres (figura 25F).

Curiosamente también en esta subpoblación los histogramas de los perfiles de sialilación en células de hombres exhiben un sesgo negativo, en cambio en mujeres el sesgo es negativo, sin embargo no se aprecia un patrón de expresión distintivo, entre ambos sexos. Los resultados indican que la expresión de la Sial α 2,3 es particular en cada individuo.

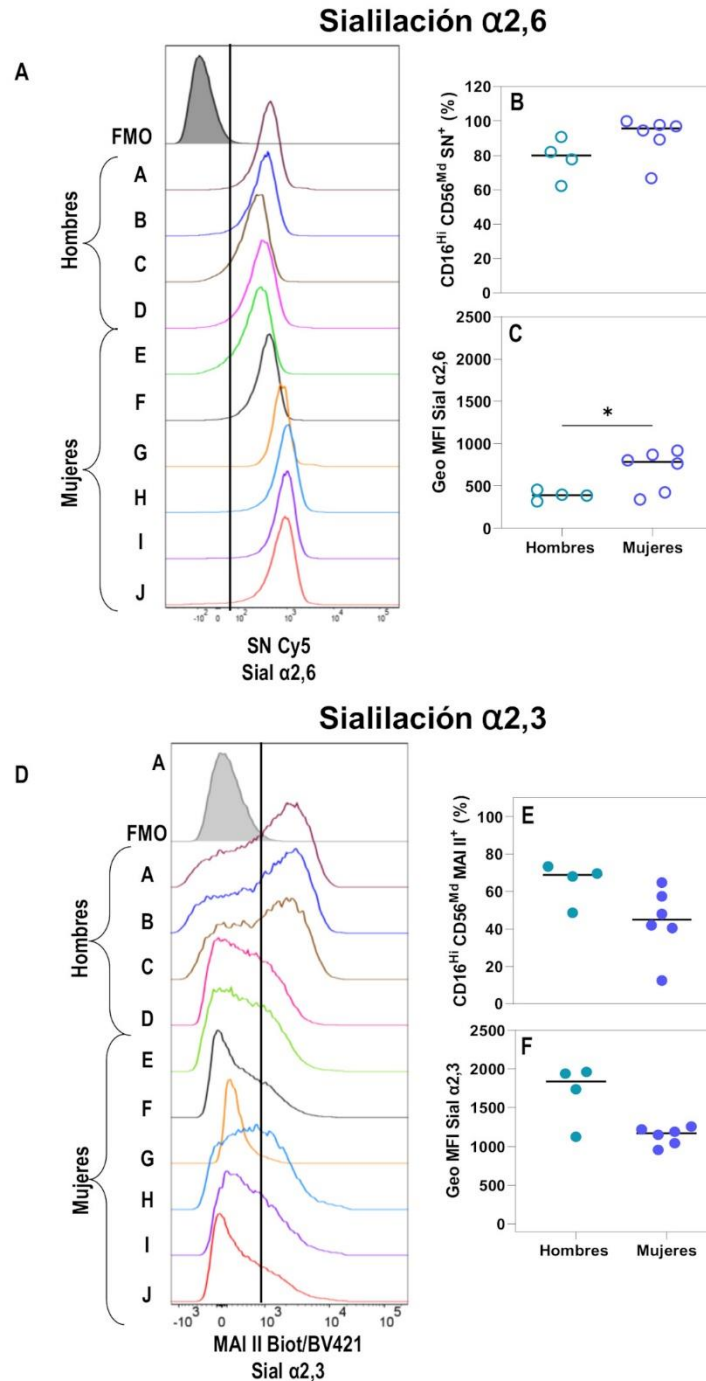


Figura 25. Análisis de la Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ de células NK $CD16^{Hi}CD56^{Md}$. PBMC teñidas con el panel para células NK (tabla 14) y analizadas en el citómetro de flujo. Los histogramas muestran la unión de la lectina SN (A) o de la MAL II (B) en células NK $CD16^{Hi}CD56^{Md}$ de donadores independientes, (A-D hombres y E-J mujeres). Análisis estadístico del porcentaje de células SN^+ (B, $\circ$ hombres y $\circ$ mujeres) y MAL II (E, $\bullet$ hombres y $\bullet$ mujeres) dentro de la población $CD16^{Hi}CD56^{Md}$ y de la Geo MFI de la Sial $\alpha 2,6$ (C, $\circ$ hombres y $\circ$ mujeres) y la Sial $\alpha 2,3$ (F, $\bullet$ hombres y $\bullet$ mujeres); cada círculo representa un donador. Los datos se analizaron utilizando la prueba de Welch's (* $p < 0.05$).

Los resultados de la comparación de la Sial $\alpha 2,6$ con la Sial $\alpha 2,3$ en células $CD16^{Hi}CD56^{Md}$ muestran que en hombres el porcentaje de células que expresan la Sial $\alpha 2,6$ (78%) es mayor que el que expresa la $\alpha 2,6$ (64%); de igual forma en mujeres, la proporción de células que expresa la Sial $\alpha 2,6$ (90%) es mayor que la que expresa la Sial $\alpha 2,3$ (44%) (figura 26).

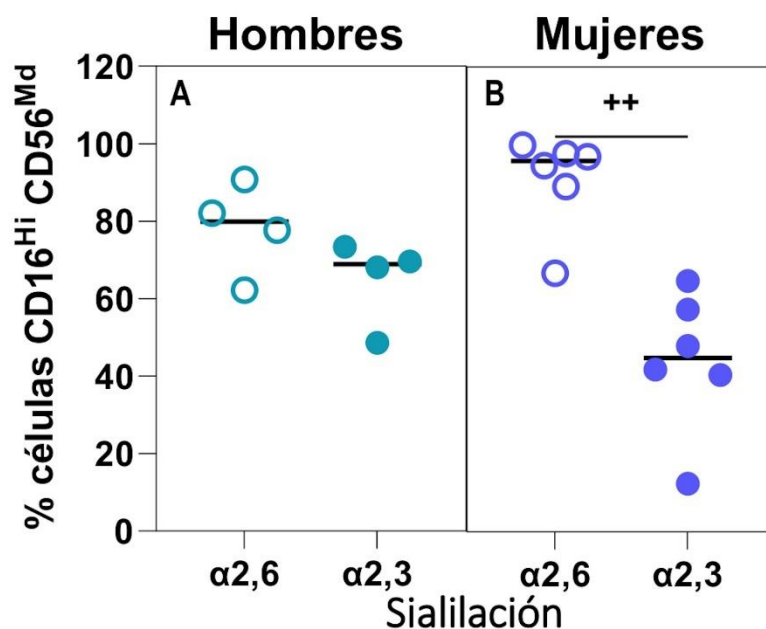


Figura 26. Análisis comparativo de la Sialilación $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ en células NK $CD16^{Hi}CD56^{Md}$. Análisis estadístico del porcentaje de células que expresan la Sial $\alpha 2,6$ (círculo abierto) y la $\alpha 2,3$ (círculo cerrado) en hombres (A) y en mujeres (B) dentro de la población NK $CD16^{Hi}CD56^{Md}$. Cada círculo representa un donador (mujeres en morado y hombres en verde) y se analizaron con la prueba de Mann-Whitney (** $p < 0.001$).

7. Análisis de la sialilación en células de linaje linfoide

Por último, se realizó un análisis evaluando la expresión de la Sial $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ comparando las poblaciones linfocitarias de interés, linfocitos T, linfocitos B y células NK en cada sexo.

7.1 Sialilación $\alpha 2,6$

El resultado del análisis de la Sial $\alpha 2,6$ en células de linaje linfoide de mujeres, mostro que todas las células de las poblaciones analizadas expresan la Sial $\alpha 2,6$ (figura 27A), sin embargo, hay diferencias en el nivel de expresión, siendo la población de linfocitos B, la que presenta el nivel más alto de expresión de la Sial $\alpha 2,6$, al contrario de las células NK CD16^{Hi}CD56^{Med} donde la expresión es baja (figura 27B).

Es importante considerar que en las poblaciones de linfocitos CD4⁺, CD8⁺ y B, había dos donadoras que se alejaban de la media hacia el extremo inferior y superior, F y H respectivamente, lo que aumenta la dispersión en los datos y por lo tanto no se aprecian diferencias estadísticamente significativas, aunque el diferendo en el nivel de expresión entre los linfocitos B y las células NK sea del doble. Los resultados indican que la Sial $\alpha 2,6$ se expresa en todos los linfocitos T, B y células NK de mujeres sanas, sin embargo, el nivel de expresión es diferencial en cada población celular.

El análisis de la Sial $\alpha 2,6$ en células del linaje linfoide en hombres, se observan variaciones significativas en el porcentaje de células que expresan esta sialilación. Los linfocitos TCR $\gamma\delta$ ⁺ destacan por tener la mayor proporción de células SN⁺ (99%), mientras que los linfocitos T CD4⁺ muestran la menor proporción (70%) (figura 27C). Estas mismas poblaciones también exhiben el nivel más alto y bajo de expresión de la Sial $\alpha 2,6$, respectivamente, siendo 26 veces mayor en los linfocitos TCR $\gamma\delta$ ⁺ que en los linfocitos T CD4⁺ (figura 27D).

Es relevante destacar que en cada población celular analizada se observan similitudes en los perfiles de expresión de la sialilación, lo cual indica un patrón de expresión. Estos resultados señalan que la expresión de la Sial $\alpha 2,6$ en células del linaje linfoide de hombres varía, tanto en términos de la proporción de células que la expresan como en el nivel de expresión, siendo los linfocitos TCR $\gamma\delta$ los que muestran un nivel de expresión más elevado.

Sialilación $\alpha 2,6$

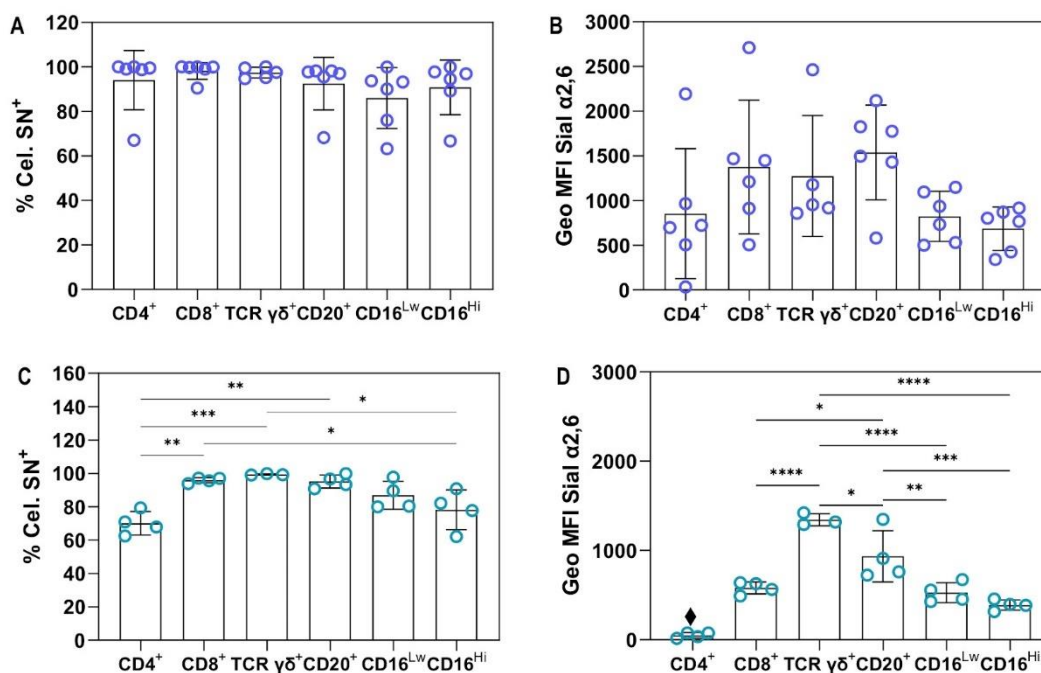


Figura 27. Análisis de la sialilación $\alpha 2,6$ en células de linaje linfoide. Análisis estadístico del porcentaje de células en hombres y mujeres (A y C) que expresan la Sial $\alpha 2,6$ así como su nivel de expresión (B y D). Los datos se segmentaron por sexo (● hombres y ● mujeres). Cada círculo representa un donador y se analizaron con la prueba ANOVA y una subprueba de Bonferroni, (♦, diferencia estadística con todos los grupos) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$).

7.2 Sialilación $\alpha 2,3$

Los resultados del análisis de la Sial $\alpha 2,3$ en linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, B y células NK de mujeres mostraron que, la mayor proporción de células SN⁺ se encuentra en los linfocitos CD4⁺ (84%), además son la población que más expresa esta sialilación, por el contrario, los linfocitos B constituyen la población menos sialilada (41%) con menor expresión de la Sial $\alpha 2,3$ (figura 28A).

Llama la atención que la expresión de la Sial $\alpha 2,3$ en linfocitos T y B presentaba un perfil de sialilación particular en cada donadora, no se podía apreciar un patrón de comportamiento, salvo en las células NK donde los datos eran más homogéneos, pero tampoco se observaba un patrón de expresión (figura 28B). Por lo tanto, la expresión de la Sial $\alpha 2,3$ en células linfoides es diferencial en cada donadora.

Por otro lado, el análisis de la Sial $\alpha 2,3$ en linfocitos CD4⁺, CD8⁺, linfocitos B y células NK de hombres mostró que la población con el mayor porcentaje de células que expresan esta sialilación son los linfocitos CD4⁺ y la población con el menor porcentaje son las células CD16^{Hi}CD56^{Md} (figura 28C). Curiosamente también los linfocitos CD4⁺ expresan mayor nivel de la Sial $\alpha 2,3$, contrariamente a los linfocitos B donde encontramos 0.8 veces menos Sial $\alpha 2,3$ respecto a las células CD4⁺ (figura 28D).

Sialilación $\alpha 2,3$

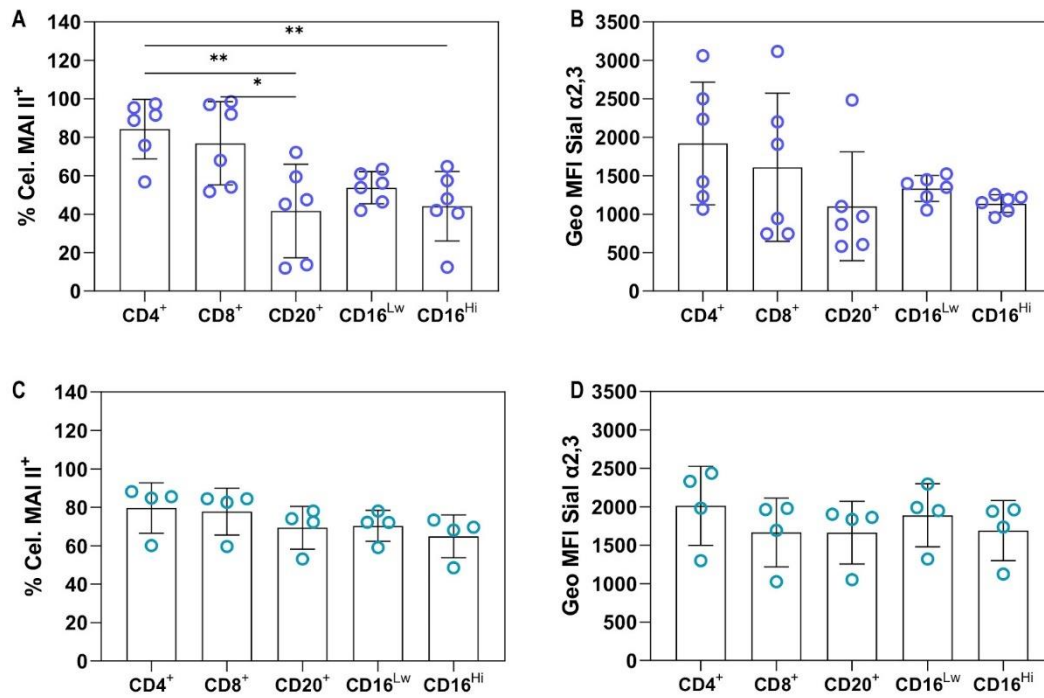


Figura 28. Análisis de la sialilación $\alpha 2,3$ en células de linaje linfoide. Análisis estadístico del porcentaje de células (A y C) que expresan la Sial $\alpha 2,3$ así como su nivel de expresión (B y D). Los datos se segmentaron por sexo (● hombres y ● mujeres). Cada círculo representa un donador y se analizaron con la prueba ANOVA y una subprueba de Bonferroni, (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$).

Discusión

El objetivo de este trabajo fue analizar la sialilación $\alpha 2,6$ en linfocitos T, B y células NK humanas de sujetos sanos. Una cualidad muy importante de este trabajo es que además de analizar la Sial $\alpha 2,6$ decidimos incluir, el análisis de la Sial $\alpha 2,3$, ya que estas sialilaciones son las más comunes en mamíferos (107, 131), sin embargo, a diferencia de muchas de las investigaciones sobre sialilación, los resultados abordaron de manera independiente la Sial $\alpha 2,6$ de la $\alpha 2,3$.

Nuestros resultados muestran que de manera basal las células de linaje linfoide expresan la Sial $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$, trabajos previos han destacado la importancia de la sialilación, que proporciona un gran componente de repulsión de carga negativa entre células, lo que modifica las interacciones celulares en diferentes sistemas (133-135). La carga negativa que otorga el ácido siálico a las células es muy importante dentro del contexto de la respuesta inmune. Cuando las células poseen altas concentraciones de ácido siálico propician la repulsión con otras células sialiladas, permitiéndoles circular libremente a través del torrente sanguíneo (114, 115).

Cuando la concentración de ácido siálico disminuye, la repulsión por carga también decrementa, esto ayuda a las interacciones célula-célula; se ha reportado que, durante la activación en la mayoría de las células inmunitarias, incluidas las células T, las células B, las células NK y los monocitos, la actividad endógena de la sialidasa *Neu1* aumenta significativamente, esta enzima hidroliza residuos de ácido $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$, por lo tanto, la expresión de estos ácidos siálicos se reduce. Además, la sialilación de algunas de sus moléculas de superficie como el MHC-I y el MHC-II también disminuye, se ha demostrado que esto es necesario para que las células interactúen con las células presentadoras de antígenos (113, 119-122).

Otra propiedad importante que otorga el ácido siálico en las células, es la regulación de la apoptosis mediada por las galectinas 1 y 9, a través del enmascaramiento de la galactosa (118). Así bien, las células sialiladas viven por más tiempo en el organismo.

La Sial $\alpha 2,3$ se expresa en las poblaciones celulares analizadas, sin embargo, no fue posible distinguir algún patrón que nos permitiera relacionar el porcentaje de células sialiladas o el nivel de expresión con el sexo del donante; recientemente se identificó que todos los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ de ratones sanos expresan la Sial $\alpha 2,3$, estos patrones no se

modifican durante la infección aguda con *T. gondii*. Por lo tanto, la ausencia de un perfil definido de sialilación en individuos sanos dificultaría la identificación de modificaciones en esta sialilación durante procesos inflamatorios. Aunque los reportes actuales no sugieren cambios en la expresión de la sialilación $\alpha 2,3$, durante un proceso inflamatorio es necesario confirmar esta teoría de manera definitiva.

La Sial $\alpha 2,6$ se expresa de manera diferencial en linfocitos CD4⁺ de mujeres y de hombres; mientras en las primeras toda la población es SN⁺, en hombres solo el 70% de la población expresa esta sialilación. Además, las células CD4⁺ de mujeres expresan 17 veces más la Sial $\alpha 2,6$ en comparación con las células de los hombres.

Esta es la primera vez que se describe esta diferencia de sialilación entre sexos, sin embargo, trabajos previos reportan que las células CD4⁺ activadas *in vitro* expresan menos la Sial $\alpha 2,6$ en comparación de células CD4⁺ no activadas, además se demostró que células polarizadas *in vitro* a un perfil Th1 expresan menos la $\alpha 2,6$ (126). Otro trabajo analizó el papel de la sialilación en la función de los linfocitos CD4⁺, en ratones sanos, todas las células CD4⁺ vírgenes son SN⁺, tras ser infectados con *T. gondii* la mitad de la población deja de expresar la sialilación (127); lo cual coincide con la observación previa, ya que la infección con *T. gondii* da como resultado respuestas de tipo Th1, en ambos casos, todas las células CD4⁺ de los grupos control tenía el glicofenotipo SN⁺, lo que coincide con nuestros resultados y nos hace pensar que posiblemente tras un proceso inflamatorio podría disminuir la sialilación (127).

En la literatura no hay investigaciones previas que establezcan una relación entre el nivel de expresión de la sialilación en una población celular y el sexo de los individuos. Nuestro estudio aporta los primeros datos que evidencian que la expresión de la Sial $\alpha 2,6$ es diferencial en los linfocitos CD4⁺ de hombres y mujeres.

Llama la atención que hay un patrón de expresión de la Sial $\alpha 2,6$ constante en los histogramas de hombres, aunque también se puede observar un patrón de expresión en mujeres, hay un par de donadoras que se encuentran a los extremos, las donadoras que se encontraban en el mismo día de su ciclo menstrual (día 5), mientras que, en los extremos, la donante con mayor nivel de expresión de la Sial $\alpha 2,6$ estaba en fase post ovulatoria (después del día 20) y la donante que menos expresa la Sial $\alpha 2,6$ se encuentra en menopausia, particularmente el perfil de sialilación de esta donante, mostraba similitudes

con el perfil de sialilación de linfocitos de hombres; lo que sugiere una relación entre la expresión de la Sial $\alpha 2,6$ con los cambios hormonales, dado que se reconoce que el ciclo menstrual influye en el funcionamiento del sistema inmunitario (136).

No sería raro que existiera una posible relación entre la expresión de la sialilación y el ciclo menstrual, y, por ende, también podría relacionarse con cierta susceptibilidad a enfermedades autoinmunes, que son más incidentes en la población femenina (137-140). Sin embargo, es importante señalar que este experimento no fue diseñado con el objetivo de monitorear la sialilación durante el ciclo menstrual, así que no podemos demostrar de manera concluyente que tal relación exista.

Finalmente, al comparar las dos formas de sialilación, se observó que la proporción de linfocitos CD4⁺ en hombres que expresan $\alpha 2,6$ era similar a los que expresan $\alpha 2,3$. Por otro lado, todos los linfocitos CD4⁺ en mujeres expresan Sial $\alpha 2,6$, aunque solo el 40% de estos también expresa la $\alpha 2,3$.

La población CD8⁺ presenta el fenotipo Sial $\alpha 2,6$ ⁺ indistintamente del sexo; sin embargo, las células CD8⁺ de mujeres expresan más del doble de la sialilación que los hombres. Se ha reportado que linfocitos CD8⁺ vírgenes de ratones saludables expresan la Sial $\alpha 2,6$, en cambio durante la infección con *T. gondii* disminuye el porcentaje de células sialiladas (127). Otro estudio informó que la pérdida de la sialilación en células dendríticas activadas por TLR, promueve interacciones de alta afinidad con linfocitos CD8⁺, así bien concluyen con que el ácido siálico puede regularse de forma negativa para mejorar la activación y proliferación de las células T; dado que una alta sialilación puede limitar estas interacciones (141).

Estudios adicionales documentaron que tanto el MHC-I como el MHC-II se encuentran hiposialilados tras la activación en células T (119, 120). En ambos estudios, las células en estado basal se encontraban sialiladas, lo cual podría estar relacionado que, en un proceso infeccioso, la Sial $\alpha 2,6$, se regula de forma negativa. Resulta interesante que se mantiene la existencia de un patrón de expresión de la Sial $\alpha 2,6$ muy claro en hombres y también en mujeres, sin embargo, al igual que en los linfocitos CD4⁺, observamos que la donadora F Y H se situaban en los extremos, inferior y superior, respectivamente; además de la semejanza del perfil de sialilación en la donadora F con los perfiles de sialilación de linfocitos masculinos, lo cual refuerza la idea de que los cambios en el nivel de expresión

de la Sial $\alpha 2,6$ se ven influenciados por cambios hormonales. Por último, al comparar ambas formas de sialilación, se observa que todos los linfocitos CD8⁺ de hombres y mujeres expresan la sialilación $\alpha 2,6$. Curiosamente, la proporción de células que también expresan la sialilación $\alpha 2,3$ es similar en ambos sexos.

La Sial $\alpha 2,6$ en linfocitos TCR $\gamma\delta$ ⁺ se expresa en todas las células, independientemente del sexo y en el mismo nivel. Es importante tomar en cuenta que esta es la primera vez que se analiza la Sial $\alpha 2,6$ en esta población, por lo cual no hay evidencia que nos dé un indicio de algún glicofenotipo particular.

Sabemos que las células TCR $\gamma\delta$ se encuentran principalmente en tejido y en menor proporción en sangre (39-41); las células que analizamos provienen de circulación, por lo tanto esperábamos que la población se encontrara sialilada, desconocemos si esta condición se vería modificada en células TCR $\gamma\delta$ residentes de tejido, pero teniendo en cuenta que la sialilación evita la inducción de apoptosis por galectinas (118), podríamos suponer que las células residentes de tejido también deberían expresar la Sial $\alpha 2,6$.

Como sabemos, las células TCR $\gamma\delta$ reconocen en contexto de CD1 y llevan a cabo funciones citotóxicas, de forma muy parecida a como lo hace una célula CD8⁺, salvo que esta reconoce en contexto de MHC (1, 2). Si comparamos estas poblaciones, ambas coinciden en que todas las células tienen el glicofenotipo SN⁺, y el nivel de expresión de la Sial $\alpha 2,6$ es similar, tanto en hombres como en mujeres, por el contrario, si las comparamos con linfocitos células CD4⁺, donde su función no es la citotoxicidad, encontramos diferencias en el porcentaje de células sialiladas, y en el nivel de expresión, lo que sugiere que la expresión de la Sial $\alpha 2,6$ se relaciona con la función de estas células.

En las células CD20⁺ encontramos expresión de la Sial $\alpha 2,6$ indistintamente del sexo, pero las células de las mujeres expresan el doble de la Sial $\alpha 2,6$, en comparación con las células de los hombres; además, los linfocitos B exhiben un patrón de expresión de la Sial $\alpha 2,6$ tanto en hombres como en mujeres, sin embargo, en estas últimas tenemos dos datos atípicos situados a los extremos, coincidentemente son las donadoras F y H; recordemos que este comportamiento lo observamos también en linfocitos T, lo que sugiere que la posible influencia del ciclo hormonal en la expresión de la Sial $\alpha 2,6$ también se observa en linfocitos B; sin embargo aún no hay estudios sobre este tema. Sin embargo, se sabe que en células murinas, la activación y diferenciación terminal de células B maduras en células

plasmáticas, se acompaña de la síntesis del ARNm, que codifica para cuatro isoformas distintas ST6Gal I, una sialiltransferasa que une ácido siálico en posición $\alpha 2,6$ (123).

En linfocitos no activados se ha demostrado que el ácido siálico $\alpha 2,6$ sirve como ligando extracelular para CD22 y Siglec-G, estos se unen al ácido siálico e inhiben la señal del BCR (123); La capacidad de CD22 para unirse al Sial $\alpha 2,6$ y la expresión de este, es crucial para regular la inhibición e inducir tolerancia a los antígenos propios; la deficiencia combinada de Siglec-G y CD22 conduce a autoinmunidad espontánea en ratones (124). En humanos se ha reportado que las mutaciones en las enzimas que modifican los ligandos de Siglec están directamente relacionadas con varias enfermedades autoinmunes mediadas por células B (123-125, 142).

Es importante destacar que, entre las poblaciones celulares analizadas en mujeres, los linfocitos B muestran los niveles más elevados de expresión de la Sial $\alpha 2,6$. Como se ha mencionado previamente, esta forma de sialilación es crucial para la tolerancia Ag propios y alteraciones en su expresión se relaciona con enfermedades autoinmunes, las cuales son bastante comunes en la población femenina; curiosamente los trastornos de la tiroides, son las autoinmunidades más frecuentes en este grupo poblacional y no están directamente vinculadas con los linfocitos B; sin embargo, otras enfermedades con alta incidencia en mujeres sí muestran asociaciones con alteraciones en los linfocitos B; como el síndrome de Sjögren, el lupus y la esclerosis sistémica, pero es importante destacar que otras poblaciones celulares también participan en la patogénesis de estas enfermedades (117, 138-140, 143, 144).

La expresión de la Sial $\alpha 2,6$ se presenta en el 80% de las células NK CD16^{Lw} CD56^{Hi} en hombres y en mujeres, aunque con una diferencia en el nivel de expresión a favor de las células de mujeres; además, observamos un patrón en los perfiles de sialilación de las células de hombres y mujeres.

En la literatura no se ha reportado el comportamiento de la sialilación con esta subpoblación, sin embargo, sabemos que las células CD16^{Lw}CD56^{Hi} se encuentran en baja proporción en sangre, pero son abundantes en tejido, y cumplen funciones citotóxicas principalmente (77, 78), como los linfocitos CD8⁺ y los linfocitos TCR $\gamma\delta$ ⁺; si comparamos estas poblaciones, observamos que el porcentaje de células SN⁺ y el nivel de expresión de la Sial $\alpha 2,6$ es similar, lo cual podría sugerir una relación funcional entre la citotoxicidad y

la expresión de esta sialilación; no obstante, se tendrían que hacer estudios específicos que respondieran esta pregunta.

Por otro lado, en las células CD16^{Hi}CD56^{Md} observamos diferencias tanto en el porcentaje de células SN⁺ como en el nivel de expresión de la Sial α 2,6, siendo mayor en las células de mujeres (90%), respecto a los hombres (78%); cabe destacar que las células CD16^{Hi}CD56^{Md} exhiben claramente un patrón en los perfiles de sialilación, en hombres y mujeres.

Como ya mencionamos anteriormente, las células que están en circulación se encuentran sialiladas, para propiciar la repulsión por carga y favorecer el tráfico celular (113, 119, 120, 122); sabemos que las células CD16^{Hi}CD56^{Md} tienen mayor presencia en sangre (71, 77, 79), por lo cual tiene sentido que la mayoría de ellas expresen la Sial α 2,6, además se ha reportado que son consideradas buenas productoras de citocinas (71, 77, 79), como los linfocitos CD4⁺. Al comparar ambas subpoblaciones no encontramos similitudes en el porcentaje de células sialiladas, ni en los niveles de expresión. Cabe resaltar que este trabajo brinda por primera vez datos sobre el glicofenotipo de células NK CD16^{Lw}CD56^{Hi} y CD16^{Hi}CD56^{Md}.

La Sial α 2,6 se expresa en todas las células de linaje linfóide de mujeres (linfocitos T, linfocitos B y las células NK), sin embargo, observamos diferencias en el nivel de expresión, siendo los linfocitos B la población que presenta el mayor nivel y las células NK CD16^{Hi}CD56^{Md} el menor.

Aunque todos los linajes celulares analizados mostraban un patrón de expresión de la Sial α 2,6, en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, y linfocitos B CD20⁺, observamos dos datos que se situaban al extremo inferior (F) y superior (H), con respecto a las demás donadoras, al revisar los datos nos percatamos que las donantes que se agrupaban, se encontraban en el mismo día de su ciclo menstrual (día 5), por otro lado el extremo superior correspondía a una donadora en periodo postovulatorio y el extremo inferior a una donadora en periodo menopaúsico, que además presentaba un perfil de sialilación semejante al que observábamos en células de hombres, lo que nos hace pensar que probablemente hay una relación entre la expresión de la Sial α 2,6 y la progresión de los cambios hormonales propios del ciclo menstrual.

El sistema endocrino y el sistema inmunológico están estrechamente interconectados; las hormonas desempeñan un papel crucial en la regulación de la respuesta inmunitaria; se ha reportado que niveles elevados de estrógeno generalmente incrementan la inflamación; por el contrario, la progesterona tiende a reducir la inflamación, y el cortisol suprime la respuesta inmune (148).

Sabemos que hormonas como el estrógeno y la progesterona ejercen su función mediante la unión a receptores específicos, los cuales están presentes en células inmunitarias (136, 137); y que durante la menopausia los estrógenos y progesterona disminuyen y la FSH aumenta (132). Aunque se siguen haciendo estudios sobre este tema, se ha reportado que los niveles hormonales modifican el número y la función de los linfocitos, el número de linfocitos CD4 se reduce durante la fase lútea en comparación con la fase folicular temprana, pero se presenta un aumento de otras células, como los monocitos, granulocitos y neutrófilos (145, 146); además se informó que en mujeres postmenopáusicas disminuye el recuento de linfocitos T y B (147).

No hay reportes sobre el comportamiento de la sialilación de células linfoides a través del ciclo menstrual; sin embargo, se ha determinado que existen variaciones en el grado de sialilación de las hormonas presentes en sangre durante el ciclo menstrual. Estudios cromatográficos indican que en fase folicular inicial y media existen isoformas de hormonas más ácidas (con mayor expresión de ácido siálico) que a mitad de ciclo, mientras que las formas aún más ácidas se detectan en fase lútea (148). Estos trabajos apoyan la idea de una relación entre los cambios hormonales y la expresión de la Sial $\alpha 2,6$, pero se tendrían que hacer otro tipo de experimentos que lo demuestren.

Las células de linaje linfóide de hombres expresan la $\alpha 2,6$ de forma diferencial, tanto en el porcentaje de células sialiladas como en el nivel de expresión. Los linfocitos T CD8⁺, los linfocitos TCR $\gamma\delta$ ⁺, los linfocitos B CD20⁺ y las células NK CD16^{Lw}CD56^{Hi} presentan una mayor proporción de células sialiladas en comparación con los linfocitos T CD4⁺ y las células NK CD16^{Hi}CD56^{Md}.

Por otro lado, las células TCR $\gamma\delta$ ⁺ presentan el mayor nivel de expresión, de la Sial $\alpha 2,6$, al contrario de los linfocitos CD4⁺ donde se encontró el menor nivel. Cabe destacar que, en todas las poblaciones analizadas, el patrón de expresión de la Sial $\alpha 2,6$ siempre fue muy evidente, ya que había poca dispersión entre los datos de los donadores.

Nuestros datos muestran por primera vez que la sialilación $\alpha 2,6$ se expresa en células linfocitarias independientemente del sexo del individuo, pero los niveles de expresión se modifican dependiendo del sexo, las células de mujeres expresan por lo menos dos veces más la Sial $\alpha 2,6$ que las células de los hombres. Este comportamiento tan uniforme entre cada linaje celular nos sugiere que la Sial $\alpha 2,6$ podría ser un marcador conservado de linfocitos T, B y células NK en condiciones basales. Queda por determinar si lo descrito en sujetos sanos se modifica tras la activación *in vitro* o si se encuentra alterado en pacientes con enfermedades infecciosas o autoinmunes.

Conclusiones

La Sial $\alpha 2,3$ no presenta un patrón de expresión común en linfocitos T, linfocitos B y células NK, es particular en cada sujeto.

La Sial $\alpha 2,6$ en linfocitos T CD4⁺ se expresa de manera diferencial tanto en el porcentaje de células sialiladas como en el nivel de expresión, siendo mayor en mujeres.

La Sial $\alpha 2,6$ se expresa en todos los linfocitos T CD8⁺, tanto de hombres y mujeres; sin embargo, la expresión es mayor en células mujeres.

La Sial $\alpha 2,6$ se expresa en todos los linfocitos TCR $\gamma\delta$ de hombres y mujeres, y en el mismo nivel.

La Sial $\alpha 2,6$ se expresa en todos los linfocitos B de hombres y de mujeres, pero el nivel de expresión es mayor en células de mujeres.

La Sial $\alpha 2,6$ se expresa en la mayoría de las células NK CD16^{Lw}CD56^{Hi} de hombres y mujeres, pero con mayor intensidad en células de mujeres.

La Sial $\alpha 2,6$ en células NK CD16^{Hi}CD56^{Md} se expresa de forma diferencial en hombres y en mujeres, el porcentaje de células sialiladas, así como el nivel de expresión es mayor en mujeres.

La Sial $\alpha 2,6$ se expresa diferencialmente en células linfoides en condiciones basales, se mantiene un comportamiento uniforme entre cada linaje celular, lo que sugiere que la Sial $\alpha 2,6$ podría ser un marcador de linfocitos T, B y células NK de sujetos sanos, queda por confirmar si este comportamiento se modifica en linfocitos de pacientes con enfermedades infecciosas o autoinmunes.

Referencias bibliográficas

1. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. Inmunología celular y molecular + Student Consult. Philadelphia, SPAIN: Elsevier; 2012.
2. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. INMUNOLOGÍA de Kuby: McGraw Hill; 2007.
3. Dra TPP. Visión panorámica del sistema inmune. Revista Médica Clínica Las Condes. 2012;23(4):446-57.
4. Zhabska T. Respuesta inmunitaria. Alamy Vector2022. p. Componentes de la inmunidad innata y adaptativa.
5. Prieto JR. El papel de la inmunidad innata en las infecciones gripales humanas. Vacunas: investigación y práctica. 2010;11(1):25-9.
6. Martín DD, Cantera MÚ, Suárez AL, de Mon Soto MÁ. Respuesta inmune innata y sus implicaciones fisiopatológicas. Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. 2017;12(24):1388-97.
7. Rodríguez HB, Martín AP, Sanz JM, Martín DD, Martín ER, de Mon Soto MÁ. Respuesta inmune adaptativa o antígeno específica. Medicine: Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. 2009;10(28):1868-79.
8. Renoux VM, Zriwil A, Peitzsch C, Michaëlsson J, Friberg D, Soneji S, et al. Identification of a human natural killer cell lineage-restricted progenitor in fetal and adult tissues. Immunity. 2015;43(2):394-407.
9. Scoville SD, Freud AG, Caligiuri MA. Cellular pathways in the development of human and murine innate lymphoid cells. Current opinion in immunology. 2019;56:100-6.
10. Dale DC. Linfocitopenia University of Washington: Manual MSD, version para profesionales; 2023 [Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-cl/professional/hematolog%C3%ADa-y-oncolog%C3%ADa/leucopenias/linfocitopenia>].
11. Mariuzza RA, Agnihotri P, Orban J. The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. Journal of Biological Chemistry. 2020;295(4):914-25.
12. Shah K, Al-Haidari A, Sun J, Kazi JU. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1):412.
13. Morath A, Schamel WW. $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell receptors: Similar but different. J Leukoc Biol. 2020;107(6):1045-55.
14. Cantrell DA. T-cell antigen receptor signal transduction. Immunology. 2002;105(4):369.
15. Samelson LE. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. Annual review of immunology. 2002;20(1):371-94.
16. Zhao Y, Niu C, Cui J. Gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells: friend or foe in cancer development? Journal of translational medicine. 2018;16:1-13.
17. Miltenyi. The broadest portfolio for your T cell research. Miltenyi Biotec GmbH and/or its affiliates2018.
18. Doyle CM, Fewings NL, Ctercteko G, Byrne SN, Harman AN, Bertram KM. OMIP 082: A 25-color phenotyping to define human innate lymphoid cells, natural killer cells, mucosal-associated invariant T cells, and $\gamma\delta$ T cells from freshly isolated human intestinal tissue. Cytometry A. 2022;101(3):196-202.
19. Mousset CM, Hobo W, Woestenenk R, Preijers F, Dolstra H, van der Waart AB. Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. Cytometry A. 2019;95(6):647-54.
20. Singer A, Adoro S, Park JH. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. Nat Rev Immunol. 2008;8(10):788-801.

21. Hogquist KA, Xing Y, Hsu FC, Shapiro VS. T Cell Adolescence: Maturation Events Beyond Positive Selection. *J Immunol.* 2015;195(4):1351-7.
22. Wang L, Xiong Y, Bosselut R. Tenuous paths in unexplored territory: From T cell receptor signaling to effector gene expression during thymocyte selection. *Semin Immunol.* 2010;22(5):294-302.
23. Overgaard NH, Jung JW, Steptoe RJ, Wells JW. CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J Leukoc Biol.* 2015;97(1):31-8.
24. Glatzová D, Cebecauer M. Dual Role of CD4 in Peripheral T Lymphocytes. *Front Immunol.* 2019;10:618.
25. Ruterbusch M, Pruner KB, Shehata L, Pepper M. In Vivo CD4(+) T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm. *Annu Rev Immunol.* 2020;38:705-25.
26. Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, et al. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:523-44.
27. Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4⁺ T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(2):136-48.
28. Xie L, Fang J, Yu J, Zhang W, He Z, Ye L, et al. The role of CD4(+) T cells in tumor and chronic viral immune responses. *MedComm (2020).* 2023;4(5):e390.
29. Takeuchi A, Saito T. CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4(+) T Cells, Their Differentiation and Function. *Front Immunol.* 2017;8:194.
30. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front Immunol.* 2018;9:847.
31. Kammertoens T, Frieze C, Arina A, Idel C, Briesemeister D, Rothe M, et al. Tumour ischaemia by interferon- γ resembles physiological blood vessel regression. *Nature.* 2017;545(7652):98-102.
32. Oyoshi MK, Elkhail A, Kumar L, Scott JE, Koduru S, He R, et al. Vaccinia virus inoculation in sites of allergic skin inflammation elicits a vigorous cutaneous IL-17 response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(35):14954-9.
33. Crowe CR, Chen K, Pociask DA, Alcorn JF, Krivich C, Enelow RI, et al. Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection. *J Immunol.* 2009;183(8):5301-10.
34. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med.* 2001;194(4):519-27.
35. Chen J, Yao J. Th22 cells and the intestinal mucosal barrier. *Frontiers in Immunology.* 2023;14.
36. Chang HC, Tan K, Ouyang J, Parisini E, Liu JH, Le Y, et al. Structural and mutational analyses of a CD8 α beta heterodimer and comparison with the CD8 α alpha homodimer. *Immunity.* 2005;23(6):661-71.
37. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(11):749-61.
38. Mittrücker HW, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2014;62(6):449-58.
39. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):467-78.
40. Dar AA, Patil RS, Chiplunkar SV. Insights into the Relationship between Toll Like Receptors and Gamma Delta T Cell Responses. *Frontiers in Immunology.* 2014;5.
41. Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol.* 2001;2(11):997-1003.

42. Shiromizu CM, Jancic CC. $\gamma\delta$ T Lymphocytes: An Effector Cell in Autoimmunity and Infection. *Front Immunol.* 2018;9:2389.
43. Toulon A, Breton L, Taylor KR, Tenenhaus M, Bhavsar D, Lanigan C, et al. A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J Exp Med.* 2009;206(4):743-50.
44. McGinley AM, Edwards SC, Raverdeau M, Mills KHG. Th17 cells, $\gamma\delta$ T cells and their interplay in EAE and multiple sclerosis. *J Autoimmun.* 2018.
45. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity.* 2009;31(2):331-41.
46. Villarrubia N, León F, Bootello A. Los linfocitos T $\gamma\delta$ y su papel en procesos de hipersensibilidad en la mucosa digestiva y respiratoria. *Allergologia et Immunopathologia.* 2002;30(5):273-82.
47. Troye-Blomberg M, Worku S, Tangteerawatana P, Jamshaid R, Söderström K, Elghazali G, et al. Human gamma delta T cells that inhibit the in vitro growth of the asexual blood stages of the *Plasmodium falciparum* parasite express cytolytic and proinflammatory molecules. *Scand J Immunol.* 1999;50(6):642-50.
48. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon- γ and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by $\gamma\delta$ T cells in vivo. *Nature.* 1995;373(6511):255-7.
49. Clark EA, Giltiay NV. CD22: A Regulator of Innate and Adaptive B Cell Responses and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology.* 2018;9.
50. Wang Y, Liu J, Burrows PD, Wang JY. B Cell Development and Maturation. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1254:1-22.
51. Miltenyi. The complete portfolio for your B cell research. In: affiliates. MBaoi, editor. 2022.
52. Tangye SG, Nguyen T, Deenick EK, Bryant VL, Ma CS. Inborn errors of human B cell development, differentiation, and function. *J Exp Med.* 2023;220(7).
53. Morgan D, Tergaonkar V. Unraveling B cell trajectories at single cell resolution. *Trends Immunol.* 2022;43(3):210-29.
54. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131(4):959-71.
55. Vaeth M, Feske S. Ion channelopathies of the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2018;52:39-50.
56. Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol.* 2009;39(8):2065-75.
57. Hardt U, Carlberg K, af Klint E, Sahlström P, Larsson L, van Vollenhoven A, et al. Integrated single cell and spatial transcriptomics reveal autoreactive differentiated B cells in joints of early rheumatoid arthritis. *Scientific Reports.* 2022;12(1):11876.
58. Zhang F, Wei K, Slowikowski K, Fonseka CY, Rao DA, Kelly S, et al. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nature Immunology.* 2019;20(7):928-42.
59. Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. B Cells, Antibodies, and More. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(1):137-54.
60. Robinson MJ, Webster RH, Tarlinton DM. How intrinsic and extrinsic regulators of plasma cell survival might intersect for durable humoral immunity. *Immunol Rev.* 2020;296(1):87-103.
61. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal Centers. *Annu Rev Immunol.* 2022;40:413-42.

62. Langers I, Renoux VM, Thiry M, Delvenne P, Jacobs N. Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. *Biologics: targets and therapy*. 2012;73-82.
63. Sojka DK, Yang L, Yokoyama WM. Uterine Natural Killer Cells. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.
64. Peng H, Tian Z. Natural Killer Cell Memory: Progress and Implications. *Frontiers in Immunology*. 2017;8.
65. Marischen L, Englert A, Schmitt AL, Einsele H, Loeffler J. Human NK cells adapt their immune response towards increasing multiplicities of infection of *Aspergillus fumigatus*. *BMC Immunol*. 2018;19(1):39.
66. Kale A, Sharma A, Stolzing A, Desprez PY, Campisi J. Role of immune cells in the removal of deleterious senescent cells. *Immun Ageing*. 2020;17:16.
67. Perera Molligoda Arachchige AS. Human NK cells: From development to effector functions. *Innate Immun*. 2021;27(3):212-29.
68. Zhang C, Tian Z. NK cell subsets in autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 2017;83:22-30.
69. Liu M, Zhang C. The Role of Innate Lymphoid Cells in Immune-Mediated Liver Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2017;8.
70. Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, Goodman K, Morandi B, Muller WA, et al. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol*. 2004;172(3):1455-62.
71. Marquardt N, Kekäläinen E, Chen P, Lourda M, Wilson JN, Scharenberg M, et al. Unique transcriptional and protein-expression signature in human lung tissue-resident NK cells. *Nature Communications*. 2019;10(1):3841.
72. Liu S, Galat V, Galat Y, Lee YKA, Wainwright D, Wu J. NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development. *J Hematol Oncol*. 2021;14(1):7.
73. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*. 2005;42(4):501-10.
74. Chen Y, Lu D, Churov A, Fu R. Research Progress on NK Cell Receptors and Their Signaling Pathways. *Mediators Inflamm*. 2020;2020:6437057.
75. Handgretinger R, Lang P, André MC. Exploitation of natural killer cells for the treatment of acute leukemia. *Blood*. 2016;127(26):3341-9.
76. Caligiuri MA, Zmuidzinas A, Manley TJ, Levine H, Smith KA, Ritz J. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med*. 1990;171(5):1509-26.
77. Tian Z, Gershwin ME, Zhang C. Regulatory NK cells in autoimmune disease. *J Autoimmun*. 2012;39(3):206-15.
78. Fu B, Tian Z, Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology*. 2014;141(4):483-9.
79. Pesce S, Moretta L, Moretta A, Marcenaro E. Human NK Cell Subsets Redistribution in Pathological Conditions: A Role for CCR7 Receptor. *Front Immunol*. 2016;7:414.
80. Montaldo E, Del Zotto G, Della Chiesa M, Mingari MC, Moretta A, De Maria A, et al. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A*. 2013;83(8):702-13.
81. André P, Spertini O, Guia S, Rihet P, Dignat-George F, Brailly H, et al. Modification of P-selectin glycoprotein ligand-1 with a natural killer cell-restricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for L-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3400-5.

82. Della Chiesa M, Falco M, Podestà M, Locatelli F, Moretta L, Frassoni F, et al. Phenotypic and functional heterogeneity of human NK cells developing after umbilical cord blood transplantation: a role for human cytomegalovirus? *Blood*. 2012;119(2):399-410.
83. Cichocki F, Grzywacz B, Miller JS. Human NK Cell Development: One Road or Many? *Frontiers in Immunology*. 2019;10.
84. Liu M, Liang S, Zhang C. NK Cells in Autoimmune Diseases: Protective or Pathogenic? *Frontiers in Immunology*. 2021;12.
85. Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity*. 2017;47(5):820-33.
86. Lopez-Vergès S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood*. 2010;116(19):3865-74.
87. Consortium TU. The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010. *Nucleic Acids Research*. 2009;38(suppl_1):D142-D8.
88. Dutta H, Jain N. Post-translational modifications and their implications in cancer. *Frontiers in Oncology*. 2023;13.
89. Salovska B, Liu Y. Post-translational modification and phenotype. *Proteomics*. 2023;23(3-4):e2200535.
90. Gupta R, Sahu M, Srivastava D, Tiwari S, Ambasta RK, Kumar P. Post-translational modifications: Regulators of neurodegenerative proteinopathies. *Ageing Res Rev*. 2021;68:101336.
91. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001;44(2):129-46.
92. Verbrugge FH, Tang WH, Hazen SL. Protein carbamylation and cardiovascular disease. *Kidney Int*. 2015;88(3):474-8.
93. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med*. 2003;9(4):169-76.
94. Kalim S, Karumanchi SA, Thadhani RI, Berg AH. Protein carbamylation in kidney disease: pathogenesis and clinical implications. *Am J Kidney Dis*. 2014;64(5):793-803.
95. Aryal S. Post Translational Modification- Definition, Processing. *Microbe notes* 2022.
96. Bodnar E, Raymond C, Lopez PG, Villacrés C, Butler M, Schoenhofen IC, et al. Mass spectrometric analysis of products of metabolic glycan engineering with azido-modification of sialic acids. *Anal Bioanal Chem*. 2015;407(30):8945-58.
97. Olivera BLS, Rojas BF, Juárez JH, Gallego Velasco IB, García-Cruz LM, Hernández-Cruz PA. El papel del ácido sialico en el desarrollo del cáncer de mama. *Revista de Educación Bioquímica*. 2021;40(3):89-99.
98. Zhong Q, Xiao X, Qiu Y, Xu Z, Chen C, Chong B, et al. Protein posttranslational modifications in health and diseases: Functions, regulatory mechanisms, and therapeutic implications. *MedComm (2020)*. 2023;4(3):e261.
99. Suzuki T, Kitajima K, Inoue S, Inoue Y. N-glycosylation/deglycosylation as a mechanism for the post-translational modification/remodification of proteins. *Glycoconj J*. 1995;12(3):183-93.
100. B SG, Surolia A. Comprehensive analysis of α 2-3-linked sialic acid specific Maackia amurensis leukagglutinin reveals differentially occupied N-glycans and C-terminal processing. *Int J Biol Macromol*. 2017;94(Pt A):114-21.
101. Bennett EP, Mandel U, Clausen H, Gerken TA, Fritz TA, Tabak LA. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology*. 2012;22(6):736-56.

102. Lyons JJ, Milner JD, Rosenzweig SD. Glycans Instructing Immunity: The Emerging Role of Altered Glycosylation in Clinical Immunology. *Front Pediatr.* 2015;3:54.
103. Lazar IM, Lazar AC, Cortes DF, Kabulski JL. Recent advances in the MS analysis of glycoproteins: Theoretical considerations. *Electrophoresis.* 2011;32(1):3-13.
104. Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(9):540-55.
105. Munkley J. Aberrant Sialylation in Cancer: Therapeutic Opportunities. *Cancers (Basel).* 2022;14(17).
106. Li F, Ding J. Sialylation is involved in cell fate decision during development, reprogramming and cancer progression. *Protein Cell.* 2019;10(8):550-65.
107. Morales DL, Vallejo V. Expresión de ácido siálico y de la β -galactósido- α -2, 6-sialiltransferasa en cáncer. *Revista de Educación Bioquímica.* 2007;26(3):93-8.
108. de Lederkremer RM, Giorgi ME, Agusti R. trans-Sialylation: a strategy used to incorporate sialic acid into oligosaccharides. *RSC Chem Biol.* 2022;3(2):121-39.
109. Angata T, Varki A. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev.* 2002;102(2):439-69.
110. Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S, Delannoy P. The human sialyltransferase family. *Biochimie.* 2001;83(8):727-37.
111. Schjoldager KT, Narimatsu Y, Joshi HJ, Clausen H. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(12):729-49.
112. Lipničánová S, Chmelová D, Ondrejovič M, Frečer V, Miertuš S. Diversity of sialidases found in the human body - A review. *Int J Biol Macromol.* 2020;148:857-68.
113. Reglero Á, Bravo IG, Martínez VF, editors. Ácidos siálicos: distribución, metabolismo y función biológica. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia;* 2007.
114. Varki A. Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med.* 2008;14(8):351-60.
115. Born GV, Palinski W. Unusually high concentrations of sialic acids on the surface of vascular endothelia. *Br J Exp Pathol.* 1985;66(5):543-9.
116. Kannagi R. Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes. *Curr Opin Struct Biol.* 2002;12(5):599-608.
117. Aspe Unanue L, González Hermosa MR, Gardeazabal García J. Esclerodermia (esclerosis sistémica). *Piel Formación continuada en dermatología.* 2010;25(5):252-66.
118. Garín MI, Chu C-C, Golshayan D, Cernuda-Morollón E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood.* 2006;109(5):2058-65.
119. Liang F, Seyrantepe V, Landry K, Ahmad R, Ahmad A, Stamatou NM, et al. Monocyte Differentiation Up-regulates the Expression of the Lysosomal Sialidase, Neu1, and Triggers Its Targeting to the Plasma Membrane via Major Histocompatibility Complex Class II-positive Compartments*. *Journal of Biological Chemistry.* 2006;281(37):27526-38.
120. Landolfi NF, Cook RG. Activated T-lymphocytes express class I molecules which are hyposialylated compared to other lymphocyte populations. *Molecular Immunology.* 1986;23(3):297-309.
121. Chen X-P, Ding X, Daynes RA. GANGLIOSIDE CONTROL OVER IL-4 PRIMING AND CYTOKINE PRODUCTION IN ACTIVATED T CELLS. *Cytokine.* 2000;12(7):972-85.
122. de Lederkremer RM, Giorgi ME, Agusti R. trans-Sialylation: a strategy used to incorporate sialic acid into oligosaccharides. *RSC Chemical Biology.* 2022;3(2):121-39.
123. Wuensch SA, Huang RY, Ewing J, Liang X, Lau JTY. Murine B cell differentiation is accompanied by programmed expression of multiple novel β -galactoside α 2,6-sialyltransferase mRNA forms. *Glycobiology.* 2000;10(1):67-75.

124. Müller J, Nitschke L. The role of CD22 and Siglec-G in B-cell tolerance and autoimmune disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2014;10(7):422-8.
125. Crocker PR. Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Current Opinion in Structural Biology*. 2002;12(5):609-15.
126. Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol*. 2007;8(8):825-34.
127. Sierra-Ulloa D, Fernández J, Cacelín M, González-Aguilar GA, Saavedra R, Tenorio EP. α 2,6 sialylation distinguishes a novel active state in CD4+ and CD8+ cells during acute *Toxoplasma gondii* infection. *Frontiers in Immunology*. 2024;15.
128. Hertoghs N, Schwedhelm KV, Stuart KD, McElrath MJ, De Rosa SC. OMIP-064: A 27-Color Flow Cytometry Panel to Detect and Characterize Human NK Cells and Other Innate Lymphoid Cell Subsets, MAIT Cells, and $\gamma\delta$ T Cells. *Cytometry A*. 2020;97(10):1019-23.
129. Liechti T, Roederer M. OMIP-051 - 28-color flow cytometry panel to characterize B cells and myeloid cells. *Cytometry A*. 2019;95(2):150-5.
130. Liechti T, Roederer M. OMIP-058: 30-Parameter Flow Cytometry Panel to Characterize iNKT, NK, Unconventional and Conventional T Cells. *Cytometry A*. 2019;95(9):946-51.
131. Li Y, Chen X. Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012;94(4):887-905.
132. Takahashi TA, Johnson KM. Menopause. *Med Clin North Am*. 2015;99(3):521-34.
133. Varki A, Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012;1253(1):16-36.
134. 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;3(3):201-18.
135. Schauer R. Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem*. 1982;40:131-234.
136. Oertelt-Prigione S. Immunology and the menstrual cycle. *Autoimmunity Reviews*. 2012;11(6):A486-A92.
137. Brundin PMA, Landgren B-M, Fjällström P, Shamekh MM, Gustafsson J-Å, Johansson AF, et al. Expression of Sex Hormone Receptor and Immune Response Genes in Peripheral Blood Mononuclear Cells During the Menstrual Cycle. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12.
138. Conrad N, Misra S, Verbakel JY, Verbeke G, Molenberghs G, Taylor PN, et al. Incidence, prevalence, and co-occurrence of autoimmune disorders over time and by age, sex, and socioeconomic status: a population-based cohort study of 22 million individuals in the UK. *The Lancet*. 2023;401(10391):1878-90.
139. Wu D, Jin Y, Xing Y, Abate MD, Abbasian M, Abbasi-Kangevari M, et al. Global, regional, and national incidence of six major immune-mediated inflammatory diseases: findings from the global burden of disease study 2019. *eClinicalMedicine*. 2023;64.
140. Miller FW. The increasing prevalence of autoimmunity and autoimmune diseases: an urgent call to action for improved understanding, diagnosis, treatment, and prevention. *Curr Opin Immunol*. 2023;80:102266.
141. Balneger N, Cornelissen LAM, Wassink M, Moons SJ, Boltje TJ, Bar-Ephraim YE, et al. Sialic acid blockade in dendritic cells enhances CD8(+) T cell responses by facilitating high-avidity interactions. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(2):98.
142. Nitschke L. CD22 and Siglec-G regulate inhibition of B-cell signaling by sialic acid ligand binding and control B-cell tolerance. *Glycobiology*. 2014;24(9):807-17.

143. Enríquez-Mejía MG. Fisiopatología del lupus eritematoso sistémico. *Revista de Medicina e Investigación*. 2010;25(5):8-16.
144. Díez Morrondo C, Lema Gontad JM, Álvarez Rivas N, Atanes Sandoval A, De Toro Santos FJ, Pinto Tasende JA, et al. Aspectos actuales del síndrome de Sjögren: etiopatogenia, manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento. *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología*. 2010;25(5):70-6.
145. Lee S, Kim J, Jang B, Hur S, Jung U, Kil K, et al. Fluctuation of peripheral blood T, B, and NK cells during a menstrual cycle of normal healthy women. *The Journal of Immunology*. 2010;185(1):756-62.
146. Notbohm HL, Moser F, Goh J, Feuerbacher JF, Bloch W, Schumann M. The effects of menstrual cycle phases on immune function and inflammation at rest and after acute exercise: A systematic review and meta-analysis. *Acta Physiologica*. 2023;238(4):e14013.
147. Gameiro CM, Romão F, Castelo-Branco C. Menopause and aging: changes in the immune system—a review. *Maturitas*. 2010;67(4):316-20.
148. Balasch J. Inducción de la ovulación: hormonas recombinantes. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*.

Anexo

Durante el desarrollo de la presente investigación, se colaboró en la publicación del artículo “ α 2,6 sialylation distinguishes a novel active state in CD4⁺ and CD8⁺ cells during acute *Toxoplasma gondii* infection”, en la revista científica *Frontiers in Immunology*. Dicho trabajo constituye un antecedente directo y relevante para el desarrollo de esta tesis, ya que sentó las bases para la exploración de conceptos que se profundizan en este estudio.

A continuación se presenta el artículo completo en virtud de que la revista no tiene restricciones en su publicación.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Masahiro Yamamoto,
Osaka University, Japan

REVIEWED BY

Raki Sudan,
Washington University in St. Louis,
United States
Anish Chakkumkal,
Janssen Vaccines and Prevention,
Pharmaceutical Companies of Johnson and
Johnson, Netherlands

*CORRESPONDENCE

Eda P. Tenorio

✉ ep.tenorio@unam.mx

Rafael Saavedra

✉ saavedra@unam.mx

[†]These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

RECEIVED 07 May 2024

ACCEPTED 02 August 2024

PUBLISHED 26 August 2024

CITATION

Sierra-Ulloa D, Fernández J, Cacelín M,
González-Aguilar GA, Saavedra R and
Tenorio EP (2024) α 2,6 sialylation
distinguishes a novel active state in
CD4⁺ and CD8⁺ cells during acute
Toxoplasma gondii infection.
Front. Immunol. 15:1429302.
doi: 10.3389/fimmu.2024.1429302

COPYRIGHT

© 2024 Sierra-Ulloa, Fernández, Cacelín,
González-Aguilar, Saavedra and Tenorio. This is
an open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](#). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or reproduction
is permitted which does not comply with
these terms.

α 2,6 sialylation distinguishes a novel active state in CD4⁺ and CD8⁺ cells during acute *Toxoplasma gondii* infection

Diego Sierra-Ulloa^{1†}, Jacqueline Fernández^{2†}, María Cacelín¹,
Gloria A. González-Aguilar^{1,3}, Rafael Saavedra^{2*}
and Eda P. Tenorio^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ²Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ³Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Toxoplasmosis is a worldwide parasitosis that is usually asymptomatic; cell-mediated immunity, particularly T cells, is a crucial mediator of the immune response against this parasite. Membrane protein expression has been studied for a long time in T lymphocytes, providing vital information to determine functional checkpoints. However, less is known about the role of post-translational modifications in T cell function. Glycosylation plays essential roles during maturation and function; particularly, sialic acid modulation is determinant for accurate T cell regulation of processes like adhesion, cell-cell communication, and apoptosis induction. Despite its importance, the role of T cell sialylation during infection remains unclear. Herein, we aimed to evaluate whether different membrane sialylation motifs are modified in T cells during acute *Toxoplasma gondii* infection using different lectins. To this end, BALB/c Foxp3^{EGFP} mice were infected with *T. gondii*, and on days 3, 7, and 10 post-infection, splenocytes were obtained to analyze conventional (Foxp3⁻) CD4⁺ and CD8⁺ populations by flow cytometry. Among the different lectins used for analysis, only *Sambucus nigra* lectin, which detects sialic acid α 2,6 linkages, revealed two distinctive populations (SN^{Bright} and SN^{-/Dim}) after infection. Further characterization of CD4⁺ and CD8⁺ SN^{-/Dim} lymphocytes showed that these are highly activated cells, with a TEf/EM or TCM phenotype that produce high IFN- γ levels, a previously undescribed cell state. This work demonstrates that glycan membrane analysis in T cells reveals previously overlooked functional states by evaluating only protein expression.

KEYWORDS

T lymphocytes, *Toxoplasma gondii*, α 2, 6 sialylation, T cell functional states, *Sambucus nigra*, flow cytometry

Introduction

Toxoplasmosis is a worldwide parasitosis caused by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. It is estimated that 30% of the population is infected, but most individuals remain asymptomatic throughout their lives. Infection during pregnancy may cause malformations or abortion, and reactivation due to immunosuppression can lead to encephalitis or death. The immune response against *T. gondii* has been widely studied, demonstrating that cell-mediated immunity is essential for infection control. This parasite induces high amounts of IL-12, TNF- α , IL-1, and IFN- γ produced by dendritic cells, macrophages, type 1 ILCs, and NK cells, which lead to a T_{H1} polarized response with INF- γ -CD4⁺ producing T cells that generate a vigorous CD8⁺ cytotoxic activity (1–4).

Analysis of T cell membrane proteins has allowed us to understand and associate particular expression profiles to specific phenotypes and cell processes like maturation, activation, cell polarization, exhaustion, memory generation, etc (5, 6). Studying these molecular fingerprints and their dynamics has provided essential clues to comprehend T cell biology better and promote immunotherapy design (7, 8). However, recent information obtained from single-cell analysis and transcriptomics has redefined our understanding of T cells. The amount of information obtained using this approach demonstrates that T cell plasticity could lead to an unimaginable amount of subsets and fates depending on the analyzed context and timing (9–13). This leads us to consider the inclusion of terms like cell types, fates, and/or states when talking about cell stability, function, and temporality rather than limiting our descriptions of different populations defined by a single phenotype (13).

Further complexity is revealed after recalling that T cell function is not solely related to protein expression; posttranslational modifications, like glycosylation, are essential for T cell activation and have been associated with different maturation and functional stages (14–16). For example, in the thymus, O-glycan and N-glycan α 2,6 sialylation occur during T cell maturation (17–20). In mature cells, previous studies showed that after activation, mouse T cells switch the expression of N-glycolylneuraminic acid to N-acetylneuraminic acid, followed by a sialic acid (Sial) linkage change from α 2,6 to α 2,3 (21). O-glycan biosynthesis in T cells changes after activation (22, 23); activated CD4⁺ T cells show a reduced expression of Sial α 2,6 and Sial α 2,3 while increasing the Sial α 2,8 linkage (24); and *in vitro* polarized T_{H1} and T_{H2} human CD4⁺ T cells present different glycophenotypes, this is, T_{H1} but not T_{H2} cells express less Sial α 2,6 molecules and higher levels of asialylated Core-1 O-GalNAc glycans, a modification related to apoptosis regulated by Galectin 3 (25).

However, little is known about the temporal dynamics of lymphocyte glycosylation during infection. Thus, this work aimed to analyze CD4⁺ and CD8⁺ glycophenotypes using a *T. gondii* acute infection mouse model. To this end, we first used *Sambucus nigra* (SN) and *Maackia amurensis* lectin II (MAL II) to analyze α 2,6 and α 2,3 sialylated molecules (Sial α 2,6 and Sial α 2,3), respectively, and Peanut agglutinin (PNA) along with *Amaranthus leucocarpus* lectin

(ALL) to determine asialylated and sialylated/asialylated core-1 O-GalNAc glycans, respectively. Given that only SN revealed two distinctive populations after infection (SN^{Bright} and SN^{-/Dim}), we further characterized them within CD4⁺ and CD8⁺ cells. We analyzed Sial α 2,6 coexpression with CD69 and CD25 to evaluate its possible relation with activation progression (7, 26) and determined IL-2, IFN- γ , and IL-10 production in each glycophenotype. Using CD44 and CD62L, we determined if these SN^{Bright} and SN^{-/Dim} cells belong to a naïve (TN), effector/memory (TEf/EM), central memory (TCM), or terminally differentiated effector memory (TEMRA) cell populations (27, 28). Finally, we propose that combining analysis of glycan, lineage, activation, and differentiation phenotypes provides a new perspective to describe T cell functional states.

Materials and methods

Mice

Six-eight-week-old BALB/c Foxp3^{EGFP} knock-in and Swiss-Webster mice were bred at Instituto de Investigaciones Biomédicas Animal House and kept in micro isolator cages according to local guidelines. All experiments were performed using age and sex-matched animals, and protocols were approved by the Institutional Bioethics Committee for Animal Research.

Parasites and infection

The ME49 strain of *T. gondii* was used for all experiments. Parasites were maintained in Swiss-Webster mice by i.p. infecting 10 cysts obtained from the brains of infected mice as previously described (29). For peroral experimental infection, mice were anesthetized with Sevoflurane (Abbott) and infected by gavage with 10 cysts obtained from Swiss-Webster mice infected 2–4 months earlier.

Splenocytes isolation

After 3-, 7- and 10 days post-infection, animals were euthanized, spleens were removed and cells were obtained by perfusion with Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS). Erythrocytes were lysed with a hypotonic NH₄Cl solution. Splenocytes were washed, resuspended with DPBS, and used immediately.

Flow cytometry, antibodies, lectins, and reagents

Monoclonal antibodies used for flow cytometry analysis were obtained from Miltenyi: anti-CD4 PE-Vio770 (REA604), -CD8 PE-Vio770 (REA601), -CD25 PE (REA568), and -CD69 PerCP-Vio700

(REA937), -CD44 PE (REA664), -CD62L PerCP-Vio700 (REA828), -CD16/CD32 Vio Bright FITC (REA377); from Biolegend: anti-CD4 APC-Cy7 (RM 4-5), -CD25 Brilliant Violet 421 (PC61) -IFN- γ PE-Cy7 (XMG1.2), and -IL-10 PE (JES5-16E3) or from eBioscience anti-IL2 eFluor 450 (JES6-5H4) or from Tonbo Biosciences anti-CD8 PerCP-Cy5.5 (53-6.7). Peanut agglutinin (PNA)-Cy5 (Gal β 1,3GalNAc α 1, O-Ser/Thr), *Sambucus nigra* (SN)-Cy5 (Neu5Ac(α 2,6)Gal/GalNAc), and biotinylated *Maackia amurensis* II (MAL II, Neu5Ac(α 2,3)Gal β 3GalNAc) lectins were acquired from Vector Laboratories. *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL) recognizes GalNAc within Gal β 1,3GalNAc α 1, O-Ser/Thr or GalNAc α 1, O-Ser/Thr structures, however unlike PNA, ALL can recognize its ligand despite the presence of sialic acid in the structure (30). This lectin was purified in-house as previously described (31) and biotinylated with the EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin kit (Thermo Fisher) following the manufacturer's instructions using a 1:2 lectin: biotin ratio. Biotinylated lectins were detected with Streptavidin-Brilliant Violet 421 (Strp-BV421) conjugate (Biolegend), and dead cells were excluded using Ghost Dye Red 780 (Tonbo Biosciences) or Zombie Green (Biolegend). Samples were analyzed in a MACSQuant Analyzer flow cytometer (Miltenyi Biotec) acquiring 150 μ l per sample.

Cell staining

One million cells were first incubated with the lectin(s) from the corresponding panel (Supplementary Table 2), followed by a second incubation with Strp-BV421 when required and a final incubation with the indicated antibody mix. All incubations were performed in washing buffer (DPBS, 1% FCS) for 30 min at 4°C, in the darkness, and two washes were performed between each step. The final wash was carried out with DPBS; cells were then incubated with Ghost Dye Red 780 or Zombie Green in DPBS (20 min, RT), washed with washing buffer, and resuspended in 200 μ l of DPBS. Samples were immediately analyzed by flow cytometry.

Intracellular cytokine detection

Ten million splenocytes were incubated with eBioscience Cell Stimulation Cocktail plus protein transport inhibitors (Invitrogen, Thermo) in 2 ml complete RPMI medium (RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2mM L-glutamine, 10 mM non-essential amino acids, 1mM sodium pyruvate, 25 mM HEPES, 50 μ M 2-ME, and IU/ml penicillin-streptomycin [GIBCO]) in each well of a 24 well plate (Costar) for 6 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air. Cells were harvested, washed, and stained with SN Cy5, the antibodies against surface molecules depicted in the Supplementary Table 1 and Zombie Green as described above. Samples were resuspended in 100 μ l of 4% paraformaldehyde in DPBS, mixed gently for 10 min at RT for fixation, washed with Perm Buffer (DPBS, FCS 1%, saponin, 0.025%), and stained for intracellular cytokines for 10 min at RT, in darkness, using the same buffer. Finally, cells were washed in

Perm Buffer, resuspended in 200 μ l DPBS, and analyzed by flow cytometry.

Data and statistical analysis

Flow cytometry data were analyzed using FlowJo Software V10.8 (Becton Dickinson) using the gating strategy depicted in Supplementary Figures 1–4, and statistical analysis was performed with the PRISM Software V9.2 (GraphPad). The Shapiro-Wilk test was used to assess data normal distribution and the Brown-Forsythe test for equal variances. Data with a normal distribution and equal variances were further analyzed using one-way ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test or two-tailed unpaired *t*-test; for data without a normal distribution, differences were determined using Kruskal-Wallis nonparametric test followed by Dunn's multiple comparison test or two-tailed Mann-Whitney test. Finally, for data with a normal distribution but different variances, the Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests followed by Dunnett T3 multiple comparison test or two-tailed unpaired *t*-test with Welch's correction were used; in all cases, a minimum *p* < 0.05 value was considered statistically significant.

Results

Sial α 2,6 downregulates in CD4⁺ and CD8⁺ splenocytes from mice acutely infected with *Toxoplasma gondii*

We studied cell surface glycosylation patterns and changes in spleen CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes during acute *T. gondii* infection. To that end, we analyzed the binding of 4 lectins: Peanut agglutinin (PNA) and *Amaranthus leucocarpus* lectin (ALL), which bind asialylated and sialylated/asialylated core 1-O-GalNAc glycans, respectively, and *Maackia amurensis* lectin II (MAL II) and *Sambucus nigra* lectin (SN), which bind to α 2,3 and α 2,6 sialylated molecules (Sial α 2,6 and Sial α 2,3), respectively (Supplementary Table 2). The binding patterns and changes of these lectins on conventional (Foxp3⁻) CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes were studied by flow cytometry using the strategy depicted in Supplementary Figure 1. We found that PNA lectin bound 82.19% of CD4⁺ and 96.15% of CD8⁺ lymphocytes from uninfected mice (Figures 1a, b, d, e) indicating that most cells of these subtypes express asialylated l-Core1 O-GalNAc glycans on the surface. Although the percentage of PNA⁺ cells, either CD4⁺ or CD8⁺, did not significantly change during *T. gondii* infection (Figures 1b, e), PNA expression did increase as infection progressed, and at 10 dpi a significant 2- and 1.5-fold increase was observed in CD4⁺ and CD8⁺ cells (Figures 1c, f), respectively. These results indicate that aSial Core-1 O-GalNAc glycan expression increased in both cell subtypes during infection.

In agreement with previous reports (32, 33), ALL binding was different between CD4⁺ and CD8⁺ cells from uninfected mice since only 50.85% of CD4⁺ cells and most CD8⁺ cells (94.54%) were ALL⁺ (Figures 1g, h, j, k). CD4⁺ ALL⁺ cells increased at 10 dpi, but it was

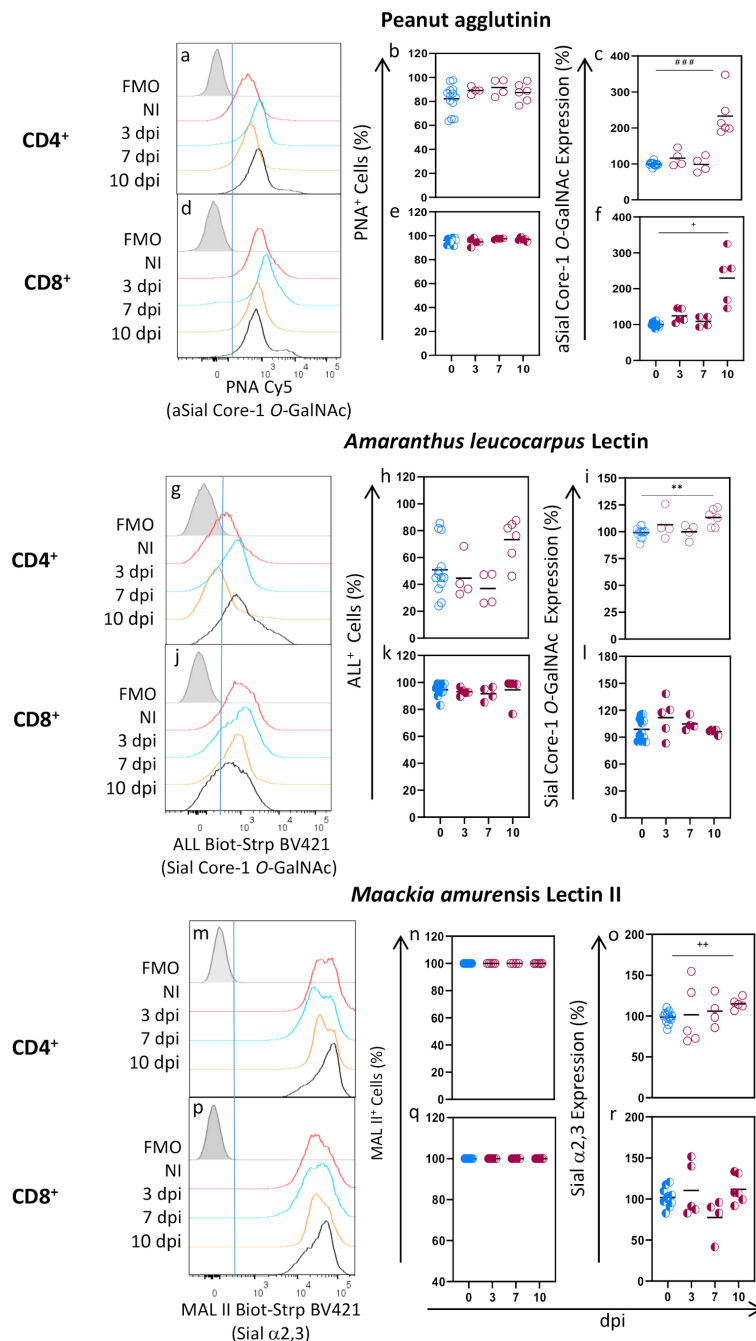


FIGURE 1

The proportion of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes binding PNA, ALL, and MALII does not change during acute *T. gondii* infection. BALB/c Foxp3^{EGFP} mice were orally infected with 10 cysts from the ME49 strain, and spleens were obtained after 3, 7, and 10 days post-infection (dpi). Splenocytes were obtained, stained using the panels indicated in [Supplementary Table 1](#), analyzed by flow cytometry, and gated as described in [Supplementary Figure 1](#). Representative histograms are shown for PNA (a, d), ALL (g, j) and MALII (m, p) binding to CD4⁺ and CD8⁺ cells at 3 (blue line), 7 (yellow line), and 10 (black line) days post-infection, or from uninfected mice (red line); Fluorescence minus one (FMO) controls for all lectins are shown in gray. Data were obtained from 2 independent experiments for 3 and 7 dpi analysis and 3 independent experiments for 10 dpi analysis, including at least 2 mice per group and are expressed as % cells binding each lectin (b, e, h, k, n, q) and as a percentage of glycosylation expression (c, f, i, l, o, r) in CD4⁺ (○) and CD8⁺ (●) cells. Geometric Mean Fluorescence intensity from infected animals (red) was normalized to the corresponding average value of uninfected mice (blue) per experiment and graphed as a percentage expression. Data were analyzed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test, **p<0.001; Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test, ###p<0.005; or the Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests followed Dunnett T3 multiple comparison test, +p<0.05, ++p<0.001.

not statistically significant (Figure 1h); the percentage of CD8⁺ ALL⁺ cells, however, remained unchanged during infection (Figure 1k) while a slight increase (13%) in CD4⁺ ALL⁺ cells was observed only at 10 dpi (Figure 1i). Accordingly, Sial core-1 O-GalNAc glycans expression remained unchanged through infection in CD8⁺ cells (Figure 1l) and slightly increased at 10 dpi in CD4⁺ cells only (Figure 1i). In contrast, all CD4⁺ and CD8⁺ cells expressed the Sial α 2,3 residue recognized by MAL II lectin (Figures 1m, n, p, q). We found that this glycosylation was highly expressed by both cell subtypes, as shown by a very high MFI, which remained unchanged during infection (Figures 1m, pm, o, r).

SN lectin binding was similar to MAL II on both subtypes since most (>98%) CD4⁺ and CD8⁺ cells from uninfected animals were SN⁺ and expressed an elevated density of Sial α 2,6 linkage surface glycoconjugates (Figures 2A-a, b, d, e). No changes were detected at early times after infection (3 and 7 dpi). However, at 10 dpi, a slight reduction of CD4⁺ SN⁺ and CD8⁺ SN⁺ cells (10.58 and 16.33%, respectively) was observed (Figures 2A-b, e) along with a statistically significant decrease of their Sial α 2,6 expression (Figures 2A-c, f). Moreover, as can be seen in the SN binding histograms (Figures 2A-a, d, red arrows), an SN^{-Dim} cell population emerged at 10 dpi in both subtypes, indicating the loss of Sial α 2,6 as a consequence of infection. The [SN^{Bright} cells: SN^{-Dim} cells] ratio at each time point showed that the SN^{-Dim} cells started to expand at 7 dpi (Figures 2A-g, h). Overall, these results show that each of the tested lectins bound CD4⁺ and CD8⁺ cells with different patterns, both among lectins and between subtypes. Although CD4⁺ and CD8⁺ glycophenotypes are different and are modified during acute *T. gondii* infection, SN was the only lectin whose binding revealed a novel T cell population that lost Sial α 2,6 due to infection.

The unexpected appearance of such a distinctive population (SN^{-Dim} cells) arising at 10 dpi prompted us to further examine it at this particular time point. We analyzed the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ cells that were SN^{Bright} and SN^{-Dim} and found that most cells (either CD4⁺ or CD8⁺) were SN^{Bright} (>96%) in uninfected mice (Figures 2B, C). At 10 dpi, a reduction of 30% and 50% of SN^{Bright} CD4⁺ and CD8⁺ cells, respectively, was detected (Figure 2C); consequently, a high proportion (40-60%) of both subtypes were essentially SN^{-Dim} cells at this time point (Figure 2D). Sial α 2,6 expression in the remaining SN^{Bright} cells remained unchanged (data not shown). These results demonstrate that losing Sial α 2,6 expression is a hallmark event for T cells after infection, which is probably related to activation.

Reduced Sial α 2,6 expression correlates to activation progression and IFN- γ production in CD4⁺ and CD8⁺ cells

We thus determined if Sial α 2,6 downregulation detected by SN binding during infection was related to activation progression. To that end, we used CD69 and CD25 expression to identify cells at different activation time points (Figure 3A): resting cells (*stage a*: CD69⁻ CD25⁻), early (*stage b*: CD69⁺ CD25⁻), intermediate (*stage c*: CD69⁺ CD25⁺), and late activated cells (*stage d*: CD69⁻ CD25⁺). As expected, most CD4⁺ and CD8⁺ cells from uninfected mice were on

stage a (Figures 3A, B, 89.87% and 92.22%, respectively), and very few cells were on *stage b-d* (<10%). At 10 dpi, a sizable proportion of activated lymphocytes (*stage b-d*) was apparent in both cell subtypes (Figures 3A, B). In contrast, a lower percentage of cells on *stage a* were detected (~60%), indicating that cells were indeed activated due to the infection. Notably, CD4⁺ cells activate faster than CD8⁺ since most activated CD4⁺ cells express CD25 only (*stage d*, 17.98%), while most CD8⁺ cells are primarily early activated CD69⁺ CD25⁻ cells (*stage b*, 63.36%).

Next, we analyzed SN binding in the stages mentioned above. Representative histograms (Figure 3C) indicated that CD4⁺ and CD8⁺ cell subtypes are SN^{Bright} during the first 2 activation steps but lost SN binding as activation progressed to *stages c* and *d*. Data from different experiments (Figure 3D) showed that most CD4⁺ (64.1%) and CD8⁺ (84.8%) cells in *stages a* and *b* are SN^{Bright} and only a small proportion (15% and 25%, respectively) are SN^{-Dim}; however, 60-80% of cells in *stage c* are SN^{-Dim}, this proportion increased on *stage d*, turning the SN^{-Dim} population into the predominant one. The increasing SN^{-Dim} cell population observed through the defined stages during infection indicates that Sial α 2,6 downregulation is related to CD4⁺ and CD8⁺ activation progress.

To further understand the relationship between Sial α 2,6 expression and T cell functionality, we analyzed the cytokines produced by the SN^{-Dim} and SN^{Bright} cells. As observed in Figures 4A, B, CD4⁺ cells from uninfected mice produced mainly IL-2, all of which had the SN^{Bright} glycophenotype, while very few cells producing IFN- γ or IL-10 were detected. As expected, in *T. gondii* infected mice, the main cytokine produced was IFN- γ (4, 34), whose detection along with IL-10 was, however, mainly produced by the SN^{-Dim} population. Both glycophenotypes produced IL-2, although to a lesser extent than non-infected animals, showing reduced IL-2 production in *T. gondii* infected mice; this observation agrees with previous reports (35). To further verify that each glycophenotype produced independent cytokine patterns, we analyzed the simultaneous production by both subtypes. Figure 4C shows that after infection, most IFN- γ and IL-2 are produced by independent populations, the SN^{-Dim} and SN^{Bright} cells correspondingly. A small SN^{-Dim} population produces both IFN- γ and IL-2, and a small amount of IL-10 was simultaneously detected with IFN- γ by SN^{-Dim} cells. A similar cytokine production pattern was observed on CD8⁺ cells (Figures 5A-C), that is, IFN- γ producing cells showed the SN^{-Dim} phenotype and IL-2 producing cells showed mainly an SN^{Bright} phenotype in infected animals; a small number of IL-10 producing cells was detected showing a SN^{-Dim} phenotype. These results show that T_{H1} and T_{Cl} polarized cells can be further sub-classified according to the predominant cytokine produced, and this is directly related to Sial α 2,6 expression.

Sial α 2,6 expression distinguishes a new active state in CD4⁺ and CD8⁺ cells

Then, we analyzed how Sial α 2,6 expression relates to T cell differentiation. To this end, we determined SN binding on each T-cell subpopulation identified by CD62L and CD44 expression: naïve (CD62L^{Bright} CD44^{-Low}), central memory (CM) (CD62L^{High}

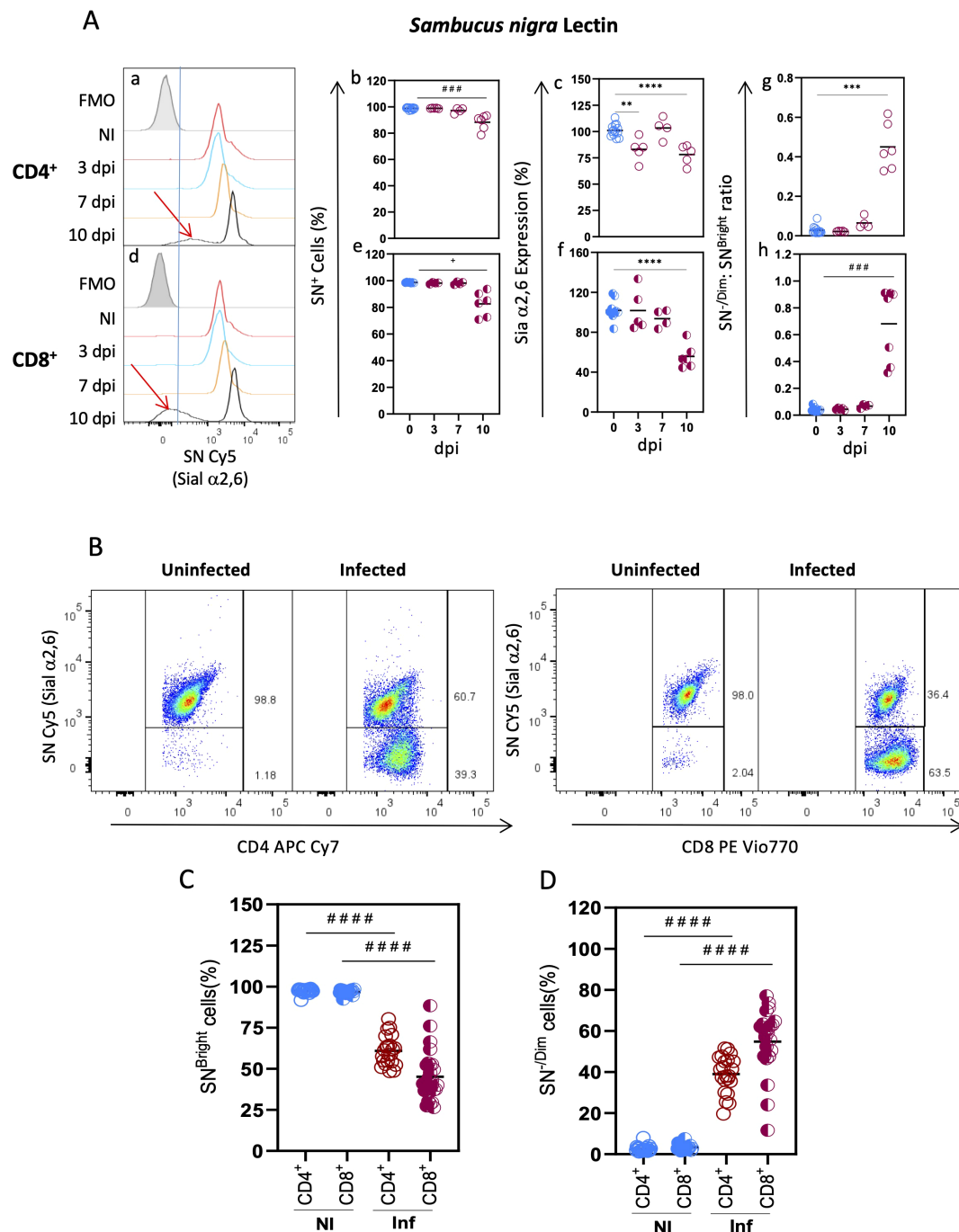


FIGURE 2

Decreased Sial α2,6 expression is a CD4⁺ and CD8⁺ hallmark event after *T. gondii* infection. Mouse splenocytes obtained at different dpi, as depicted in Figure 1, were stained using the panels indicated in Supplementary Table 1, analyzed by flow cytometry, and gated as described in Supplementary Figure 1. (A) Representative histograms are shown for SN binding to CD4⁺ (a) and CD8⁺ (d) cells at 3 (blue line), 7 (yellow line), and 10 (black line) dpi, or from uninfected mice (red line); FMO controls are shown in gray. Red arrows highlight the SN⁺/Dim⁺ populations found at 10 dpi (a, d). CD4⁺ (○) and CD8⁺ (●) cells, data were obtained from 2 independent experiments for 3 and 7 dpi analysis and 3 independent experiments for 10 dpi analysis, including at least 2 mice per group, and are expressed as percentage SN⁺ binding cells (b, e), levels of Sial α2,6 expression (c, f), and the [% SN^{Bright} cells]: [% SN⁺ cells] ratio (g, h). In (c, f), geometric mean fluorescence intensity from infected animals (red) was normalized to the corresponding average value of uninfected mice (blue) per experiment and graphed as a percentage expression. (B) Representative dot plots are shown for SN binding within CD4⁺ and CD8⁺ cells at 10 dpi and from uninfected mice. The percentage of SN^{Bright} (C) and SN⁺/Dim⁺ (D) cells from uninfected (NI, blue) and infected (Inf, red) mice within CD4⁺ (○) and CD8⁺ (●) lymphocytes is depicted; data were obtained from 7 independent experiments, including at least 2 mice per group. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test, **p<0.001, ***p<0.005, ****p<0.0001; Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test, ##p<0.005, ###p<0.0001 or the Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests followed Dunnett T3 multiple comparison test, +p<0.05.

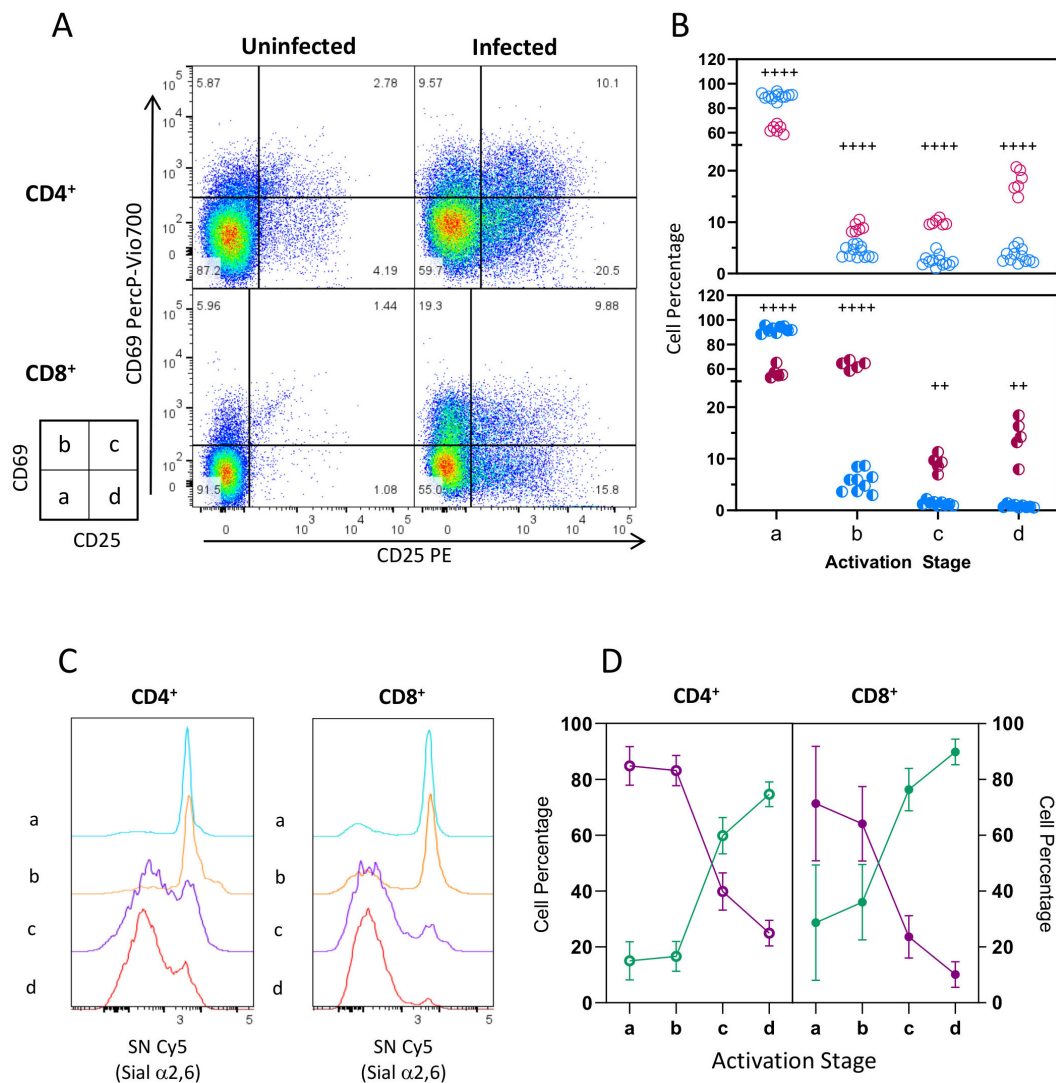


FIGURE 3

Sial $\alpha 2,6$ expression decreases in CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes as activation progresses. Mouse splenocytes obtained at 10 dpi, as depicted in Figure 1, were stained using the panels indicated in Supplementary Table 1, analyzed by flow cytometry, and gated as described in Supplementary Figure 2. (A) Representative dot plots show CD69 and CD25 expression in CD4⁺ and CD8⁺ cells from uninfected animals or at 10 dpi. Four activation stages were identified: Stage a (CD69⁻ CD25⁻, resting cells), Stage b (CD69⁺ CD25⁻, early activated cells), Stage c (CD69⁺ CD25⁺, intermediate activated cells), and Stage d (CD69⁻ CD25⁺, late activated cells). (B) CD4⁺ (○) and CD8⁺ (●) cell percentage per stage from infected (INF, red) and uninfected (NI, blue) animals. (C) Representative histograms showing SN binding on CD4⁺ and CD8⁺ cell subtypes on each activation stage at 10dpi. (D) Percentage of SN^{Bright} (purple) and SN^{-Dim} (green) cells at 10 dpi. Data were obtained from 3 independent experiments for 10 dpi analysis, including at least 3 mice per group, and analyzed using the Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests followed by Dunnett T3 multiple comparison test, * $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

CD44^{High}), effector or effector memory (Ef/EM) (CD62L^{-Low} CD44^{High}), and TEMRA (CD62L⁻ CD44^{Low/Int}) cells (27, 28). These subpopulations were clearly detected in CD4⁺ and CD8⁺ subtypes from uninfected and *T. gondii* infected mice (Figure 6A). Results showed that in both CD4⁺ and CD8⁺ naïve cells, either from uninfected or from infected mice, accounted for >91% of SN^{Bright} cells and expressed similar high amounts of Sial $\alpha 2,6$ (Figures 6A–C). TEf/EM and TCM from uninfected mice all show high SN binding, but in infected mice, a high proportion of cells became SN^{-Dim}, mostly in CD8⁺ cells; a similar pattern was observed in T_{CM} cells (Figures 6B, C). In TEMRA cells, the emergence of SN^{-Dim} cells was more discreet ($\leq 40\%$) in infected mice for both CD4⁺ and CD8⁺ cells.

Since the SN^{-Dim} population is detected only in infected animals, these results strongly suggest that Sial $\alpha 2,6$ allows the differentiation of quiescent cells (SN^{Bright}) from infection-induced active cells (SN^{-Dim}). A final analysis (Figure 7) demonstrates that all differentiated subpopulations of active cells (SN^{-Dim}) exhibit a distinctive pattern with high CD25 and CD4/CD8 expression levels. In contrast, quiescent cells (SN^{Bright}), either from uninfected or infected animals, show a lower CD4/CD8 and CD25 expression pattern. This confirms that in the absence or presence of infection, quiescent cells present similar characteristics that clearly differentiate them from infection-induced active cells and that they can be differentiated through their Sial $\alpha 2,6$ expression.

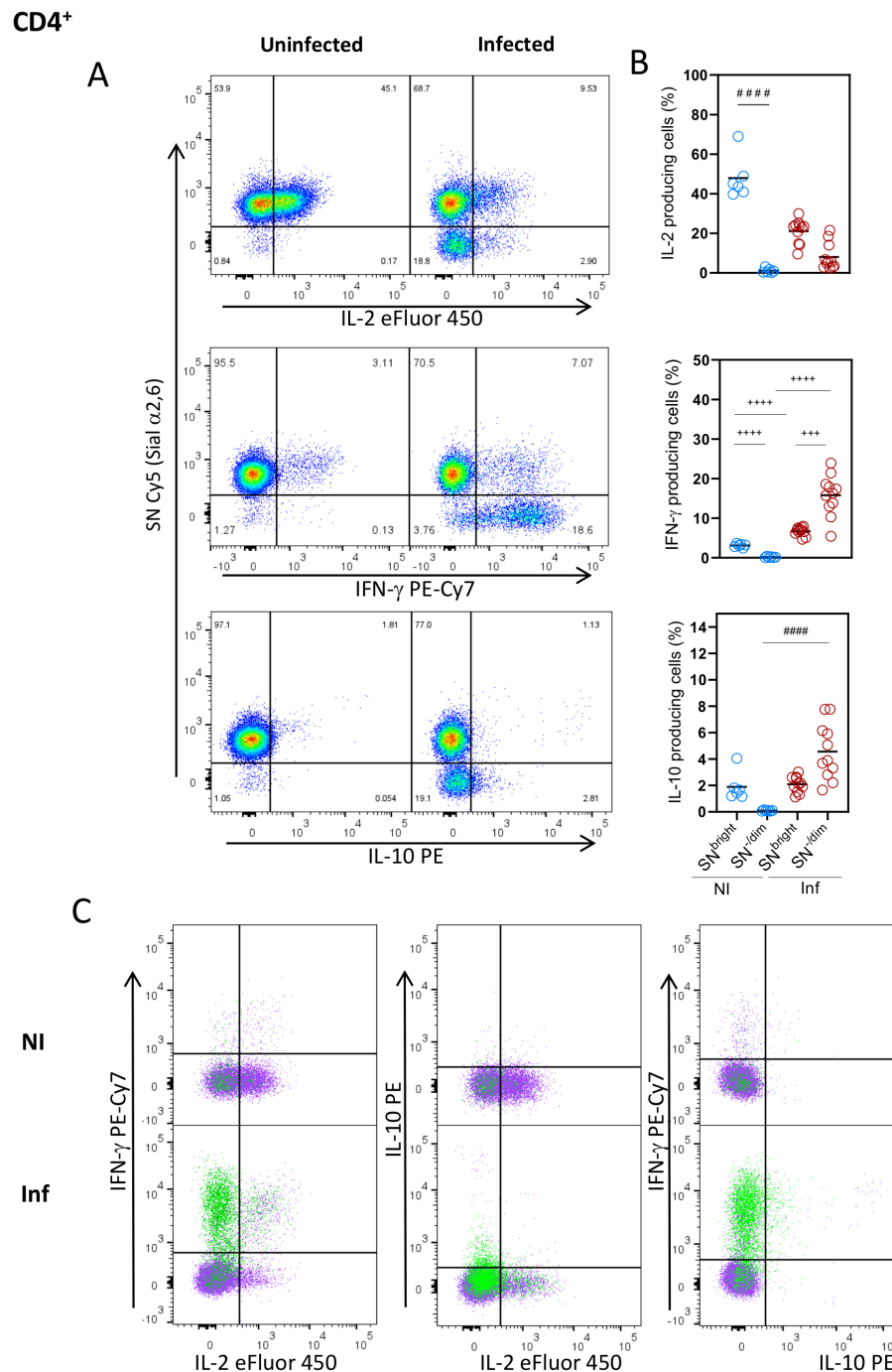


FIGURE 4

Sial α2,6 expression level relates to cytokine production patterns in CD4⁺ lymphocytes. Mouse splenocytes obtained at 10 dpi were stained using the panels indicated in [Supplementary Table 1](#), analyzed by flow cytometry, and gated as described in [Supplementary Figure 3](#). **(A)** Representative dot plots showing IL-2, IFN-γ and IL-10 produced by CD4⁺ cells from uninfected (NI) or infected (INF) mice. **(B)** Statistical analyses showing the percentage of IL-2, IFN-γ and IL-10 production in SN^{Bright} and SN^{Dim} CD4⁺ cells (o) from NI (blue) and INF (red) mice. **(C)** Overlaid data from SN^{Bright} (purple) and SN^{Dim} (green) is depicted. Cells were obtained from 3 independent experiments, including at least 2 mice per group. Data were analyzed using the Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test, #### $p < 0.0001$, or the Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests followed by Dunnett T3 multiple comparison test, + + + $p < 0.0005$, + + + + $p < 0.0001$.

Discussion

This work aimed to analyze sialylation dynamics in conventional CD4⁺ and CD8⁺ subtypes during *T. gondii* infection. We wanted to analyze previously reported

glycosylations involved in T cell activation and/or maturation, like Sial α2,3, Sial α2,6 linkages, and asialylated/sialylated Core-1 O-GalNAc glycans. To this end, we first evaluated the binding of SN, MAL II, PNA, and ALL lectins by flow cytometry in *T. gondii* infected mice splenocytes during the first ten days of infection.

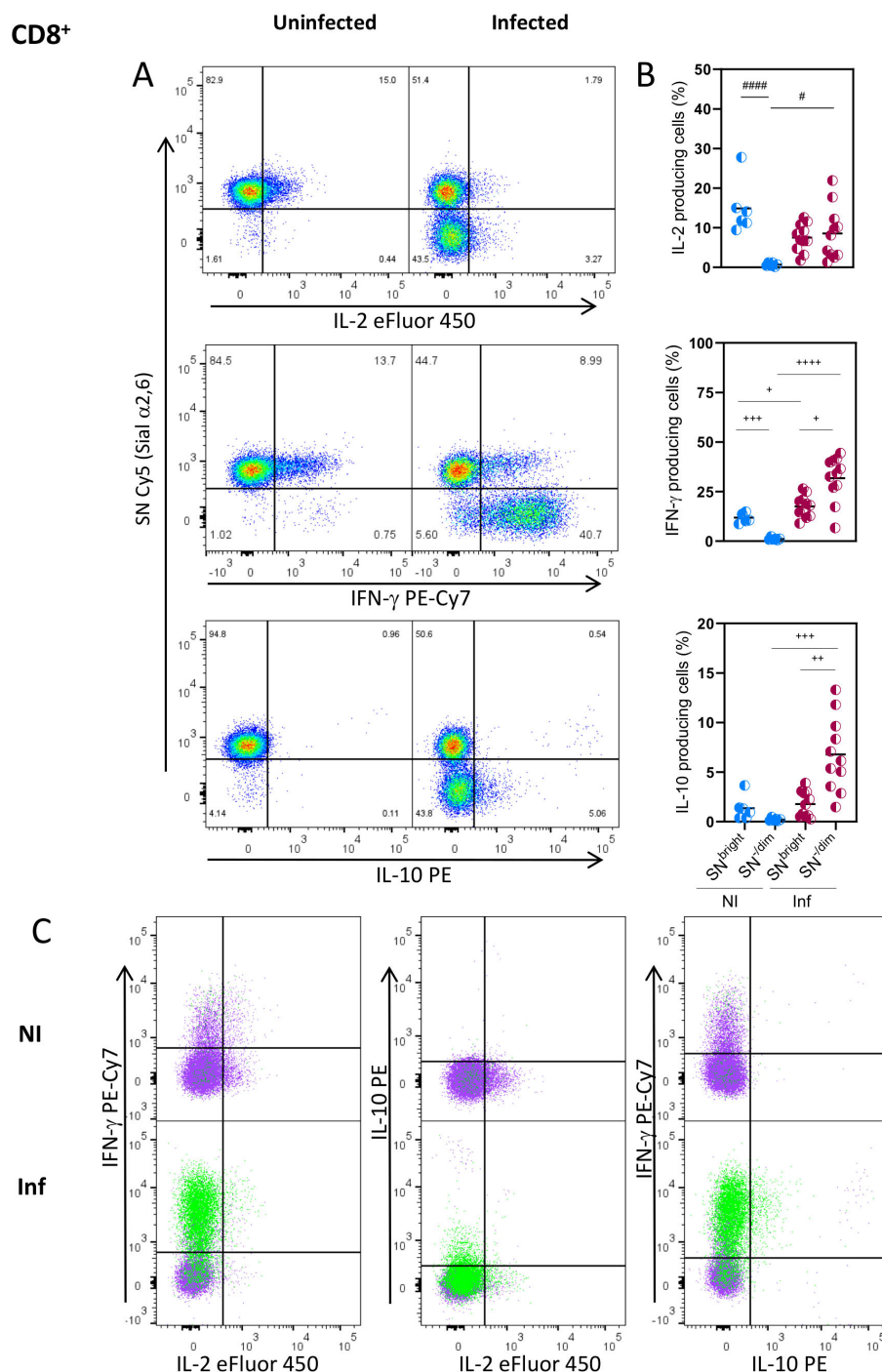


FIGURE 5

Sial α2,6 expression level relates to cytokine production patterns in CD8⁺ lymphocytes. Mouse splenocytes obtained at 10 dpi were stained using the panels indicated in [Supplementary Table 1](#), analyzed by flow cytometry, and gated as described in [Supplementary Figure 3](#). (A) Representative dot plots showing IL-2, IFN-γ and IL-10 produced by CD8⁺ cells from uninfected (NI) or infected (INF) mice. (B) Statistical analyses showing the percentage of IL-2, IFN-γ and IL-10 production in SN^{Bright} and SN^{Dim} CD8⁺ cells (●) from NI (blue) and INF (red) mice. (C) Overlaid data from SN^{Bright} (purple) and SN^{Dim} (green) is depicted. Cells were obtained from 3 independent experiments, including at least 2 mice per group. Data were analyzed using the Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test, # $p < 0.05$, #### $p < 0.0001$, or the Brown-Forsythe and Welch ANOVA tests followed by Dunnett T3 multiple comparison test, * $p < 0.05$, + $p < 0.001$, ++ $p < 0.0005$, +++ $p < 0.0001$.

Analyses revealed that while the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ cells binding PNA, ALL, and MAL II remained constant through infection, a slight expression increase in the glycans recognized by these lectins was found at ten dpi, particularly within the CD4⁺

population. PNA recognizes the OH-in C4 of Gal in the T-antigen, and ALL recognizes the OH- on C4 and the C-2 acetamido groups of the reduced GalNAc residue of the T-antigenic disaccharide; the former, but not the latter interaction is blocked by the presence of

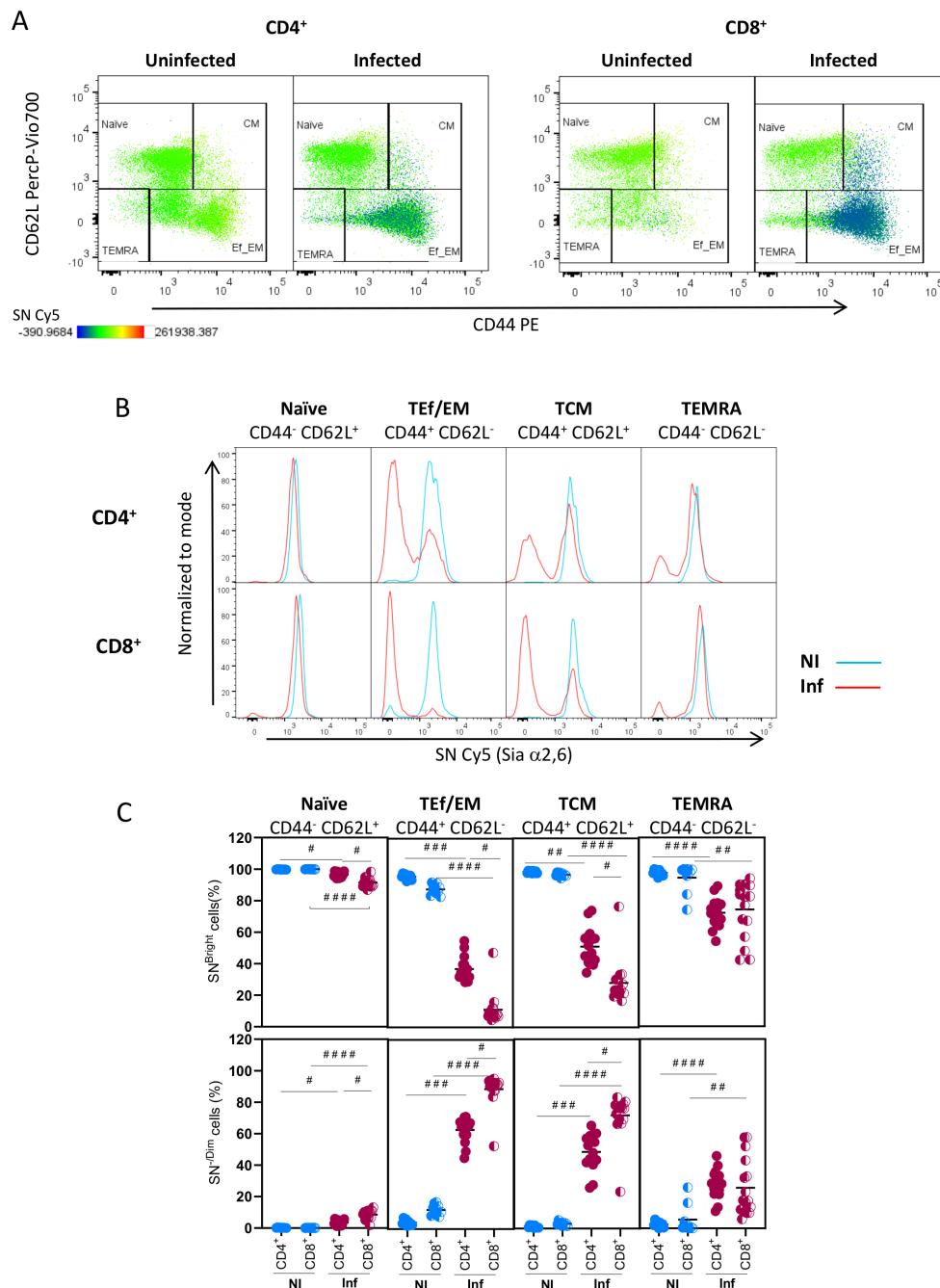


FIGURE 6

Tef/TCM and TCM subpopulations from CD4⁺ and CD8⁺ cells generated during acute *T. gondii* infection are mainly Sial α2,6⁻/Dim⁺. Mouse splenocytes obtained at 10 dpi were stained using the panels indicated in [Supplementary Table 1](#), analyzed by flow cytometry, and gated as described in [Supplementary Figure 4](#). (A) Representative dot plots for CD44, CD62L, and SN (Sial α2,6) analysis in CD4⁺ and CD8⁺ cells are shown. (B) Representative histograms of SN expression in naive (CD62L⁺ CD44⁻/Dim⁻), effector/effector memory T cells (Tef/EM, CD62L⁻ CD44⁺/Dim⁺), central memory cells (CM, CD62L⁺ CD44⁺/Dim⁺), and terminally differentiated effector memory cells (TEMRA, CD62L⁻ CD44⁺/Dim⁺) within CD4⁺ and CD8⁺ cells from uninfected (NI, blue) and 10 dpi infected animals (Inf, red). (C) Percentage of SN^{Bright} and SN^{Dim} cells within CD4⁺ (○) or CD8⁺ (●) naive, Tef/EM, TCM, and TEMRA subpopulations from uninfected (NI, blue circles) and 10 dpi infected animals (Inf, red circles). Data were obtained from 3 independent experiments, including at least 3 mice per group. Data were analyzed using Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test, #p<0.05, ##p<0.001, ###p<0.005, ####p<0.0001.

sialic acid at C-3 or C-6 (30). Glycans recognized by these two lectins are essential during T cell ontogeny since their differential expression relates to T cell maturation and thymus location. PNA binds mainly to cells found at the thymus cortex and ALL to cells at the medulla, which correlates with immature and mature

lymphocytes, respectively (18, 36, 37). Loss of the PNA⁺ glycophenotype is related to an increased α2,3 sialyltransferase expression (38), which could explain the PNA-ALL⁺ mature T cell glycophenotype observed in the thymus. Our results show that all mature CD4⁺ and CD8⁺ cells are PNA⁺ and that PNA ligands

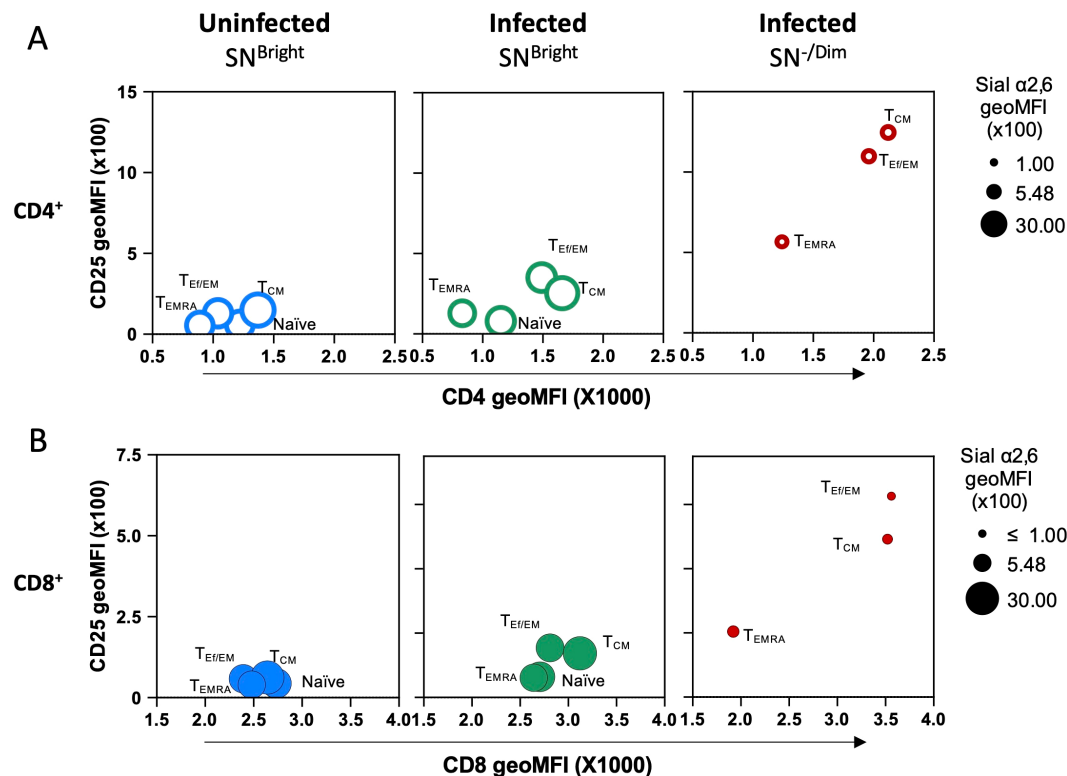


FIGURE 7

Sial α2,6 expression distinguishes quiescent and infection-induced active CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes during acute *T. gondii* infection. Average CD25, CD4, or CD8 and Sial α2,6 geoMFI from SN^{Bright} (quiescent) and SN^{-/Dim} (active) naïve, TEf/EM, TCM, and TEMRA subpopulations defined in Figure 7 were compared within CD4⁺ (A, ○) and CD8⁺ (B, ●) subsets using bubble plots. Phenotypic characteristics are observed comparing (A) CD4 or (B) CD8 expression (x-axis), CD25 expression (y-axis), and Sial α2,6 expression (circle perimeter). Raw data and statistical analysis are found in Supplementary Figure 5.

expression increases at ten dpi. These agree with the previously reported molecules recognized by this lectin (17, 23, 39); CD8, CD43, and CD45, among which the latter has been shown to convey most PNA ligands in activated CD8⁺ lymphocytes (40). Contrastingly, we found that while all CD8⁺ are ALL⁺, half of CD4⁺ cells bind ALL, and only a slight expression increase was observed at 10 dpi in the CD4⁺ subtype. Our observations agree with previous reports showing the same glycophenotype in CD4⁺ and CD8⁺ cell subtypes from healthy mouse splenocytes (32, 33). Additionally, the primary ALL ligand, Moesin, can provide a costimulatory signal, equivalent to CD28, *in vitro* that induces T cell activation, proliferation, and IL-2 production, suggesting that ALL ligands could be more related to signal amplification or maintenance at very early activation points rather than being involved in differentiation (33, 41). MAL II recognizes the Sial α2,3 linkage, critical for cell interactions, as described for human malignancies, T and B cell communication, and bacterial and viral infection (42–45). Although this moiety was found at the highest cellular density in all conventional CD4⁺ and CD8⁺ cells, only a subtle statistically significant increase was observed at ten dpi in the former population. The same analyses were performed on T_{reg} (Foxp3⁺) cells and no differences were found (data not shown), which agrees with previous reports (46). Interestingly, it has been

described that *T. gondii* PLK tachyzoites attach preferentially to cells expressing higher levels of Sial α2,3 than Sial α2,6 *in vitro* (45); the ubiquitous Sial α2,3 cell expression could partly explain *T. gondii* ability to infect a wide variety of cell types.

SN recognizes Sial α2,6 linkage within the minimal determinant Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAc (47); it is crucial for leukocyte adhesion, neutrophil transmigration (48, 49), fertility (50), and cell interaction between cancerous cells (51). SN binding analysis showed that Sial α2,6 expression in CD4⁺ and CD8⁺ cells from uninfected animals is constitutive and high. However, at 10 dpi, we found a distinctive population with an SN^{-/Dim} glycophenotype in both cell subtypes. A similar observation has been reported in human CD4⁺ cells, where after *in vitro* polyclonal activation, Sial α2,6 downregulates under T_{H1} polarizing conditions (25). However, this is the first time that such glycophenotype is described using a T_{H1} polarizing infectious model, demonstrating that Sial α2,6 downregulation is not limited to the CD4⁺ subtype and occurs *in vivo* due to an immunological response.

Infection with *T. gondii* induces a very strong T_{H1} immune response characterized by the production of high levels of IL-2 and IFN-γ, but also of TNF-α, IL-1β, IL-10, IL-27, and IL-13 (1). Innate immune response is essential for initiating the protective immune response against *T. gondii*. TLR11 and TLR12 expressed by CD8⁺

dendritic cells recognize a profilin-like protein (TgPRF) produced by the parasite (52, 53), and upon recognition of this protein, dendritic cells produce IL-12; this cytokine, in turn, stimulates the production of high levels of IFN- γ by NK cells and CD4⁺ T cells, leading to protection of the host (54). Thus, the parasite itself is responsible for the induction of the strong T_{H1} response. It is tempting to speculate that such a polarized T_{H1} immune response is responsible for the downregulation of Sial α 2,6 expression observed in CD4⁺ and CD8⁺ cells of infected mice, since Toscano et al. demonstrated *in vitro* that activated CD4⁺ T cells under T_{H1} and T_{H17}, but not under T_{H2} conditions, showed downregulation of Sial α 2,6 expression (25). Analysis of a different infection inducing a T_{H1} response would demonstrate if this hypothesis is true. Whether molecules produced by the parasite are also responsible for such downregulation remains to be established.

Previous reports describe that Sial α 2,6 downregulation provides a signal that increases apoptotic sensitivity (25), susceptibility to galectin-1-induced cell death (25), and phagocytosis of apoptotic lymphocytes (55). Viability analysis of our data showed that in both uninfected and infected animals, dead cells are primarily Sial α 2,6, especially within the CD8⁺ cell subset (Supplementary Figure 6). Thus, it is tempting to speculate that decreased Sial α 2,6 expression in IFN- γ -producing CD4⁺ and CD8⁺ subsets described herein also works as a regulating signal that helps to contract the response against the parasite. Future experiments analyzing these cells at longer time points and anatomic sites after infection would provide more insight into this idea.

Further characterization of CD4⁺ and CD8⁺ SN⁻/Dim populations showed that these are highly activated cells, as depicted by CD69 and CD25 expression, with a TEf/EM or TCM phenotype, as defined by their CD44 and CD62L expression pattern that produce high IFN- γ levels. This agrees with previous reports demonstrating that in T cells, particular glycosylations relate to specific cytokine production patterns. For example, cells with reduced N-glycosylation of TCR chains secrete higher levels of IL-2 and IFN- γ (56) and CD4⁺ T cells expressing β 1,6GlcNAc-branched N-glycans produce higher IL-4 and lower IFN- γ , promoting a T_{H2} microenvironment (57).

Recently, transcriptomic analyses have provided further insight into T cell heterogeneity and function, opening a perspective that now includes timing and novel transitional subsets (12, 58). Such complexity keeps expanding as more detailed analyses are performed; in our case, determining sialic acid expression adds another layer to the already complicated protein analysis. This is moving us to redefine the vocabulary we use to describe T cells. For example, Cano et al. coined the term *effectorness*, referring to the CD4⁺ T cell potential to initiate a rapid and robust response upon stimulation (58). Chung et al. have discussed the necessity of talking about cell types, fates, and states by considering their stability, function, and temporality rather than limiting our description to subsets as defined by phenotype (13).

Traditionally, the terms subsets and subpopulations are used indistinctively in T cell analysis regardless of the combination of

molecules used for phenotyping. Herein, we phenotyped cells regarding lineage, activation, differentiation, and glycosylation. Although each phenotypic analysis showed clear results (Figures 2–7), we still believe that a richer cell hierarchy depiction and more descriptive and integrative terms are needed to describe T cells better. To this end, we unified the terms used in this work using “*subtype*” to indicate lineage, “*subset*” to describe polarization, “*subpopulation*” for differentiation, and “*stage*” to describe steps within a process. Furthermore, we propose the use of the term “*state*” to describe the populations that we characterized herein; this is, we consider that SN^{Bright} cells are in a “quiescent state” and SN⁻/Dim cells in an “active state”. Thus, we use the term “*state*” as a result of the global analysis of different phenotypes.

Our results reveal Sial α 2,6 glycophenotyping as a novel, robust immune response analysis tool to easily detect active cells since it can be distinguished with a simple and single *ex vivo* staining without secondary *in vitro* activation processes to induce proliferation or activation marker expression (59). Moreover, this observation is not restricted to BALB/c mice, since the same results were obtained using mice from the C57BL/6J strain. Purifying the SN⁻/Dim state generated after infection could allow the identification of the complete TCR antigen repertoire of infection-specific expanded clones, which can be a determinant for the generation of more effective vaccines. *In vitro* experiments have shown that downregulation of Sial α 2,6 observed after activation occurs only under T_{H1} and T_{H17} but not T_{H2} conditions (25); thus, it remains to be determined if similar behavior is observed using other *in vivo* models with equivalent cell polarizations. It could also be an effective tool to study T cell proliferation and differentiation biology. Previous studies in CD8⁺ T cells show that after *in vivo* activation, a single naïve cell differentiates into both effector and memory cells (60), a process related to asymmetric division, where daughter cells proximal to the immunological synapse have an “effector phenotype” (FSC^{High}, SSC^{High}, CD62^{Low}, CD8^{High}, CD69^{High}, CD43^{High}, CD25^{High}, CD44^{High}) and express IFN- γ mRNA. In contrast, distal cells have an opposite phenotype, resembling a memory phenotype (61). Interestingly, our CD4⁺ and CD8⁺ SN^{Bright} and SN⁻/Dim cells resemble such phenotypes, suggesting that Sial α 2,6 expression could be a helpful marker to distinguish these populations using a single direct immunofluorescence.

These new described states open the door for new approaches to analyze T cell biology but also remind us that glycosylations are a fundamental path to further understanding how T cells adopt each of the roles they play, like becoming memory cells, getting activated, anergic, polarized, regulated or targeted for death. After all, the theoretical number of glycan determinants in the human glycome is approximately 7000 (62), with over 80 different glycan-binding proteins (63, 64). Finally, the potential clinical use of identifying active cells migrating to the infection/inflammation site by adding a single glycophenotypic marker provides novel approximations to patient monitoring, antigen discovery, and immunotherapy in infectious, autoimmune, or cancerous contexts.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The animal study was approved by Comité de Investigación y Comité de Ética de la Investigación. División de Investigación, Facultad de Medicina. UNAM. The study was conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements.

Author contributions

DS: Formal analysis, Investigation, Writing – review & editing. JF: Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing – review & editing. MC: Investigation, Writing – review & editing, Validation. GG: Validation, Visualization, Writing – review & editing. RS: Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. ET: Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing, Investigation, Validation.

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This work was supported by grants IN221124, IN218719, IN204717, IN213818, IN218919, and IN200321 from PAPIIT (DGAPA, UNAM, México), by grant 251116 from CONACYT (Mexico) and by División de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM.

References

1. Sasai M, Yamamoto M. Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Exp Mol Med*. (2019) 51:1–10. doi: 10.1038/s12276-019-0353-9
2. Sasai M, Pradipta A, Yamamoto M. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. *Int Immunol*. (2018) 30:113–9. doi: 10.1093/intimm/dxy004
3. Aliberti J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat Rev Immunol*. (2005) 5:162–70. doi: 10.1038/nri1547
4. Khan IA, Hwang S, Moretto M. *Toxoplasma gondii*: CD8 T cells cry for CD4 help. *Front Cell Infect Microbiol*. (2019) 9:136. doi: 10.3389/fcimb.2019.00136
5. Mousset CM, Hobo W, Woestenenk R, Preijers F, Dolstra H, van der Waart AB. Comprehensive phenotyping of T cells using flow cytometry. *Cytometry A*. (2019) 95:647–54. doi: 10.1002/cyto.a.23724
6. Swanson PA 2nd, Seder RA. OMIP-067: 28-color flow cytometry panel to evaluate human T-cell phenotype and function. *Cytometry A*. (2020) 97:1032–6. doi: 10.1002/cyto.a.24189
7. Shipkova M, Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clinica Chimica Acta*. (2012) 413:1338–49. doi: 10.1016/j.cca.2011.11.006
8. Edner NM, Wang CJ, Wang CJ, Petersone L, Walker LSK. Predicting clinical response to costimulation blockade in autoimmunity. *Immunotherapy Adv*. (2021) 1. doi: 10.1093/immadv/ltaa003
9. Guo X, Zhang Y, Zheng L, Zheng C, Song J, Zhang Q, et al. Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing. *Nat Med*. (2018) 24:978–85. doi: 10.1038/s41591-018-0045-3
10. Miller BC, Sen DR, Al Abosy R, Bi K, Virkud YV, LaFleur MW, et al. Subsets of exhausted CD8+ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol*. (2019) 20:326–36. doi: 10.1038/s41590-019-0312-6
11. Arsenio J, Kakaradov B, Metz PJ, Kim SH, Yeo GW, Chang JT. Early specification of CD8+ T lymphocyte fates during adaptive immunity revealed by single-cell gene-expression analyses. *Nat Immunol*. (2014) 15:365–72. doi: 10.1038/ni.2842
12. Sandu I, Oxenius A. T-cell heterogeneity, progenitor-progeny relationships, and function during latent and chronic viral infections. *Immunol Rev*. (2023) 316:136–59. doi: 10.1111/imr.13203
13. Chung HK, McDonald B, Kaech SM. The architectural design of CD8+ T cell responses in acute and chronic infection: Parallel structures with divergent fates. *J Exp Med*. (2021) 218. doi: 10.1084/jem.20201730

Acknowledgments

The authors are grateful to M.V.Z. Georgina Díaz for her expert advice and help with animal care, and Wilton Gómez for providing the biotinylated ALL for experiments. This work constitutes a part of GG-A productivity while obtaining her M.Sc. degree at Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM and of MC at Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas, UNAM. We thank CONAHCYT for supporting this work through fellowships for GAG-A (CVU 1190918) and MC (Registro 895813). In memory of Dr. Raúl Chávez Sánchez, who always shared enlightening comments during seminars and meetings, you will be missed as a great teacher, scientist, and friend.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be considered as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2024.1429302/full#supplementary-material>

14. Daniels MA, Hogquist KA, Jameson SC. Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat Immunol.* (2002) 3:903–10. doi: 10.1038/ni1002-903
15. Rabinovich GA, van Kooyk Y, Cobb BA. Glycobiology of immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* (2012) 1253:1–15. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06492.x
16. Gomez-Henao W, Tenorio EP, Sanchez FRC, Mendoza MC, Ledezma RL, Zenteno E. Relevance of glycans in the interaction between T lymphocyte and the antigen presenting cell. *Int Rev Immunol.* (2021) 40:274–88. doi: 10.1080/08830185.2020.1845331
17. Ellies LG, Tao W, Fellingner W, Teh HS, Ziltener HJ. The CD43 130-kD peripheral T-cell activation antigen is downregulated in thymic positive selection. *Blood.* (1996) 88:1725–32. doi: 10.1182/blood.V88.5.1725.1725
18. Alvarez G, Lascrain R, Hernandez-Cruz P, Tetaert D, Degand P, Gorocica P, et al. Differential O-glycosylation in cortical and medullary thymocytes. *Biochim Biophys Acta.* (2006) 1760:1235–40. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.03.024
19. Baum LG, Derbin K, Perillo N.L., Wu T, Pang M, Uittenbogaart C. Characterization of terminal sialic acid linkages on human thymocytes. Correlation between lectin-binding phenotype and sialyltransferase expression. *J Biol Chem.* (1996) 271:10793–9. doi: 10.1074/jbc.271.18.10793
20. Clark MC, Baum LG. T cells modulate glycans on CD43 and CD45 during development and activation, signal regulation, and survival. *Ann New York Acad Sci.* (2012) 1253:58–67. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06304.x
21. Naito-Matsui Y, Takada S, Kano Y, Iyoda T, Sugai M, Shimizu A, et al. Functional evaluation of activation-dependent alterations in the sialoglycan composition of T cells. *J Biol Chem.* (2014) 289:1564–79. doi: 10.1074/jbc.M113.523753
22. Piller F, Piller V, Fox RI, Fukuda M. Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J Biol Chem.* (1988) 263:15146–50. doi: 10.1016/S0021-9258(18)68157-8
23. Priatel JJ, Chui D, Hiraoka N, Simmons CJT, Richardson KB, Page DM, et al. The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity.* (2000) 12:273–83. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80180-6
24. Villanueva-Cabello TM, Mollicone R, Cruz-Munoz ME, Lopez-Guerrero DV, Martinez-Duncker I. Activation of human naive Th cells increases surface expression of GD3 and induces neexpression of GD2 that colocalize with TCR clusters. *Glycobiology.* (2015) 25:1454–64. doi: 10.1093/glycob/cwv062
25. Toscano MA, Bianco GA, Ilarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol.* (2007) 8:825–34. doi: 10.1038/ni1482
26. Tenorio EP, Saavedra R. Differential effect of sodium arsenite during the activation of human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Int Immunopharmacol.* (2005) 5:1853–69. doi: 10.1016/j.intimp.2005.06.006
27. Natalini A, Simonetti S, Favaretto G, Peruzzi G, Antonangeli F, Santoni A, et al. OMIP-079: Cell cycle of CD4(+) and CD8(+) naive/memory T cell subsets, and of Treg cells from mouse spleen. *Cytometry A.* (2021) 99:1171–5. doi: 10.1002/cyto.a.24509
28. Del Zotto G, Principi E, Antonini F, Baratto S, Panicucci C, Bruno C, et al. Comprehensive phenotyping of peripheral blood T lymphocytes in healthy mice. *Cytometry A.* (2021) 99:243–50. doi: 10.1002/cyto.a.24246
29. Pina-Vazquez C, Saavedra R, Herion P. A quantitative competitive PCR method to determine the parasite load in the brain of *Toxoplasma gondii*-infected mice. *Parasitol Int.* (2008) 57:347–53. doi: 10.1016/j.parint.2008.03.001
30. Zenteno E, Lascrain R, Montano LF, Vazquez L, Debray H, Montreuil J. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj J.* (1992) 9:204–8. doi: 10.1007/BF00731166
31. Zenteno E, Ochoa JL. Purification of a lectin from *Amaranthus leucocarpus* by affinity chromatography. *Phytochemistry.* (1988) 27:5. doi: 10.1016/0031-9422(88)83088-7
32. Ortiz B, Porras F, Jimenez-Martinez MC, Montano LF, Martinez-Cairo S, Lascrain R, et al. Differential expression of a 70 kDa O-glycoprotein on T cells: a possible marker for naive and early activated murine T cells. *Cell Immunol.* (2002) 218:34–45. doi: 10.1016/s0008-8749(02)00518-x
33. Gomez-Henao W, Saavedra R, Chavez-Sanchez FR, Lascrain R, Zenteno E, Tenorio EP. Expression dynamics of the O-glycosylated proteins recognized by *amaranthus leucocarpus* lectin in T lymphocytes and its relationship with moesin as an alternative mechanism of cell activation. *Front Immunol.* (2021) 12:788880. doi: 10.3389/fimmu.2021.788880
34. Young-Ha L, Channon JY, Matsuura T, Schwartzman JD, Shin D-W, Kasper LH. Functional and quantitative analysis of splenic T cell immune responses following oral *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Exp Parasitol.* (1999) 91:212–21. doi: 10.1006/expr.1998.4359
35. Tenorio EP, Fernandez J, Castellanos C, Olguin JE, Saavedra R. CD4+ Foxp3+ regulatory T cells mediate *Toxoplasma gondii*-induced T-cell suppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10. *Eur J Immunol.* (2011) 41:3529–41. doi: 10.1002/eji.201141507
36. Schuurman HJ, Brekelmans P, Daemen T, Broekhuizen R, Kater L. T-cell maturation in the human thymus and tonsil: peanut agglutinin binding T lymphocytes in thymus and tonsil differ in maturation stage. *Clin Immunol Immunopathol.* (1983) 29:271–81. doi: 10.1016/0090-1229(83)90029-6
37. Holladay S, Blaylock B, Smith B, Luster M. PNA lectin-based separation of thymocytes into mature and immature subpopulations: CD4-8- double negative cells display characteristics of PNAlo mature thymocytes. *Immunol Invest.* (1993) 22:517–29. doi: 10.3109/08820139309084180
38. Gillespie W, Paulson JC, Kelm S, Pang M, Baum LG. Regulation of alpha 2,3-sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin (PNA)+ to PNA- phenotype in developing thymocytes. *J Biol Chem.* (1993) 268:3801–4. doi: 10.1016/S0021-9258(18)53540-7
39. Wu W, Harley PH, Punt JA, Sharrow SO, Kears KP. Identification of CD8 as a peanut agglutinin (PNA) receptor molecule on immature thymocytes. *J Exp Med.* (1996) 184:759–64. doi: 10.1084/jem.184.2.759
40. Amado M, Yan Q, Comelli EM, Collins BE, Paulson JC. Peanut agglutinin high phenotype of activated CD8+ T cells results from *de novo* synthesis of CD45 glycans. *J Biol Chem.* (2004) 279:36689–97. doi: 10.1074/jbc.M405629200
41. Arenas-Del Angel M, Legorreta-Herrera M, Mendoza-Hernandez G, Garfias Y, Chavez R, Zenteno E, et al. *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes a moesin-like O-glycoprotein and costimulates murine CD3-activated CD4(+) T cells. *Immunity Inflammation Dis.* (2015) 3:182–95. doi: 10.1002/iid3.58
42. Brinkman-Van der Linden EC, Sonnenburg JL, Varki A. Effects of sialic acid substitutions on recognition by *Sambucus nigra* agglutinin and *Maackia amurensis* hemagglutinin. *Anal Biochem.* (2002) 303:98–104. doi: 10.1006/abio.2001.5539
43. Varki NM, Varki A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest.* (2007) 87:851–7. doi: 10.1038/labinvest.3700656
44. Pally D, Pramanik D, Hussain S, Verma S, Srinivas A, Kumar RV, et al. Heterogeneity in 2,6-linked sialic acids potentiates invasion of breast cancer epithelia. *ACS Cent Sci.* (2021) 7:110–25. doi: 10.1021/acscentsci.0c00601
45. Braesch-Andersen S, Stamenkovic I. Sialylation of the B lymphocyte molecule CD22 by alpha 2,6-sialyltransferase is implicated in the regulation of CD22-mediated adhesion. *J Biol Chem.* (1994) 269:11783–6. doi: 10.1016/S0021-9258(17)32640-6
46. Cabral J, Hanley SA, Gerlach JQ, O'Leary N, Cunningham S, Ritter T, et al. Distinctive surface glycosylation patterns associated with mouse and human CD4(+) regulatory T cells and their suppressive function. *Front Immunol.* (2017) 8:987. doi: 10.3389/fimmu.2017.00987
47. Smith DF, Song X, Cummings RD. Use of glycan microarrays to explore specificity of glycan-binding proteins. *Methods Enzymol.* (2010) 480:417–44. doi: 10.1016/S0076-6879(10)80033-3
48. Wright RD, Cooper D. Glycobiology of leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology.* (2014) 24:1242–51. doi: 10.1093/glycob/cwu101
49. Radovani B, Gudelj I. N-glycosylation and inflammation; the not-so-sweet relation. *Front Immunol.* (2022) 13:893365. doi: 10.3389/fimmu.2022.893365
50. Yi S, Feng Y, Wang Y, Ma F. Sialylation: fate decision of mammalian sperm development, fertilization, and male fertility†. *Biol Reprod.* (2023) 109:137–55. doi: 10.1093/biolre/ioad067
51. Dobie C, Skropeta D. Insights into the role of sialylation in cancer progression and metastasis. *Br J Cancer.* (2021) 124:76–90. doi: 10.1038/s41416-020-01126-7
52. Plattner F, Yarovsky F, Romero S, Didry D, Carlier MF, Sher A, et al. *Toxoplasma profilin* is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe.* (2008) 3:77–87. doi: 10.1016/j.chom.2008.01.001
53. Yarovsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol.* (2014) 14:109–21. doi: 10.1038/nri3598
54. Ihara F, Yamamoto M. The role of IFN-gamma-mediated host immune responses in monitoring and the elimination of *Toxoplasma gondii* infection. *Int Immunol.* (2024) 36:199–210. doi: 10.1093/intimm/dxae001
55. Meesmann HM, Fehr E-M, Kierschke S, Herrmann M, Bilyy R, Heyder P, et al. Decrease of sialic acid residues as an eat-me signal on the surface of apoptotic lymphocytes. *J Cell Sci.* (2010) 123:3347–56. doi: 10.1242/jcs.066696
56. Kuball J, Hauptrock B, Malina V, Antunes E, Voss R-H, Wolf M, et al. Increasing functional avidity of TCR-redirected T cells by removing defined N-glycosylation sites in the TCR constant domain. *J Exp Med.* (2009) 206:463–75. doi: 10.1084/jem.20082487
57. Morgan R, Gao G, Pawling J, Dennis JW, Demetriou M, Li B. N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5)-mediated N-glycosylation negatively regulates Th1 cytokine production by T cells. *J Immunol.* (2004) 173:7200–8. doi: 10.4049/jimmunol.173.12.7200
58. Cano-Gamez E, Soskic B, Roumeliotis TI, So E, Smyth DJ, Baldrighi M, et al. Single-cell transcriptomics identifies an effectness gradient shaping the response of CD4+ T cells to cytokines. *Nat Commun.* (2020) 11:1801. doi: 10.1038/s41467-020-15543-y
59. Poloni C, Schonhofer C, Ivison S, Levings MK, Steiner TS, Cook L. T-cell activation-induced marker assays in health and disease. *Immunol Cell Biol.* (2023) 101:491–503. doi: 10.1111/imcb.12636
60. Chang JT, Palanivel VR, Kinjyo I, Schambach F, Intlekofer AM, Banerjee A, et al. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science.* (2007) 315:1687–91. doi: 10.1126/science.1139393
61. Arsenio J, Metz PJ, Chang JT. Asymmetric cell division in T lymphocyte fate diversification. *Trends Immunol.* (2015) 36:670–83. doi: 10.1016/j.it.2015.09.004
62. Cummings RD. The repertoire of glycan determinants in the human glycome. *Mol Biosyst.* (2009) 5:1087–104. doi: 10.1039/b907931a
63. Schnaar RL. Glycans and glycan-binding proteins in immune regulation: A concise introduction to glycobiology for the allergist. *J Allergy Clin Immunol.* (2015) 135:609–15. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.057
64. Drickamer K. A genomics resource for animal lectins (2014). Available online at: www.imperial.ac.uk/research/animallectins/. (Accessed August 2021)