

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

2

**IDENTIFICACION DE ESTRUCTURAS
GLICOSILADAS EXPRESADAS DURANTE LA
REGULACION DE LA APOPTOSIS EN LA
ONTOGENIA DEL LINFOCITO T**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(BIOQUIMICA)**

P R E S E N T A

M. EN C. GEORGINA ALVAREZ FERNANDEZ

L

México, D.F.

2001

01/02/01

ESTE TESIS NO SE
SOLICITA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina UNAM y financiado por CONACYT (27609-M y 26068N), DGAPA PAPIIT-UNAM No. IN224598. PROGRAMA ECOS, México-Francia (M97B05); y por la Coordinación de Investigación Clínica del IMSS y por la Dirección General de Estudios de Posgrado No. 012301. Fue dirigido por los Dres. Edgar Zenteno (Facultad de Medicina, UNAM), Luis Felipe Montaña Estrada, (Instituto Nacional de Cardiología) y Pierre Degand (Unidad INSERM 377, 59000 Lille Francia).

INDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| Abreviaturas | 4 |
| Abstract | 5 |
| Resumen | 6 |
| Introducción | 7 |
| • El timo | 9 |
| • Ontogenia de las células T | 10 |
| • Generación de prolinfocitos T | 11 |
| • Diferenciación de las células T en el timo | 13 |
| • Procesos de Selección | 15 |
| • Apoptosis: una forma de muerte celular programada | 17 |
| • Regulación de la apoptosis durante la ontogenia de los linfocitos T | 18 |
| • Papel de los carbohidratos en los procesos de reconocimiento y diferenciación celular | 20 |
| • Los ácidos siálicos y las sialiltransferasas | 24 |
| • Las lectinas | 27 |
| Justificación | 29 |
| Objetivos | 31 |
| Material y Métodos | 32 |
| • Animales | 32 |
| • Apoptosis <i>in vivo</i> | 32 |
| • Obtención de timocitos | 32 |
| • Preparación de los cortes de timo | 32 |
| • Histoquímica con Lectinas | 33 |
| • Separación de timocitos ALL+ y ALL- | 34 |
| • Obtención de las fracciones microsomales | 35 |
| • Actividad de las GalNAc transferasas | 36 |
| • Electroforesis capilar | 37 |

| | |
|--|-----------|
| • Caracterización fenotípica de las células ALL+ | 37 |
| Resultados | 39 |
| • Expresión diferencial de sialoglicoconjugados en el timo de ratones tratados con dexametasona | 39 |
| • Actividad de las GalNAC transferasas de timocitos murinos normales y tratados con dexametasona | 42 |
| • Actividad de las GalNAC transferasas de timocitos ALL+ y ALL- | 42 |
| • Electroforesis capilar | 44 |
| • Determinación del fenotipo de las células ALL+ | 48 |
| • Análisis de la subpoblación celular R1 | 51 |
| Discusión | 53 |
| Conclusiones | 64 |
| Perspectivas | 65 |
| Bibliografía | 66 |
| Anexo | 74 |
| • Publicación original | |

ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| ALL | Lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i> |
| BCIP | 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| c-kit | Receptor para un factor de crecimiento de las células progenitoras hematopoyéticas |
| CPA | Célula presentadora de antígeno |
| DC | Células dendríticas |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| Gal | Galactosa |
| GalNAc | N-acetil-galactosamina |
| Glc | Glucosa |
| GlcNAc | N-acetil-glucosamina |
| HAS | Antígeno estable al calor |
| MAA | Lectina de <i>Maackia amurensis</i> |
| Man | Manosa |
| MHC | Complejo Mayor de Histocompatibilidad |
| NBT | Azul de tetrazolio . |
| NeuAc | Ácido acetilneuramínico |
| NK | Células asesinas |
| PE | Ficoeritrina |
| PNA | Lectina de <i>Arachis hypogaea</i> |
| Sca | Antígeno de las células progenitoras hematopoyéticas |
| SCF | Factor de crecimiento de las células progenitoras hematopoyéticas |
| SNA | Lectina de <i>Sambucus nigra</i> |
| SP-Cy | Estreptavidina cychrome |
| TCR | Receptor de células T |

ABSTRACT

T cell differentiation is characterized by the variable expression of co-receptor molecules CD4/CD8, T cell receptors and modification in the glycosylation of molecules expressed on the surface of the cell. We have evaluated the changes in the sialylation patterns of thymus cells isolated from dexamethasone treated and untreated mice, using *Sambucus nigra* and *Maackia amurensis* lectins, which recognize sialic acid (Neu5Ac) in α 2,6 and α 2,3 position, respectively. Our results showed that thymus cells in the initial differentiation stages express sialic acid in position α 2,6 and as the maturation process progresses there is a switch to the α 2,3 phenotype. We also evaluated the possible differences in the O-glycosylation process by determining the GalNAc transferase activity in microsomal fractions of the dexamethasone treated and untreated animals as well as in subpopulations detected by their *Amaranthus leucocarpus* agglutination pattern. Using different synthetic acceptor peptides we showed that O-glycosylation in the cortical thymocytes is different to the more mature cells and that immature *A. leucocarpus* negative cells, which are sensitive to dexamethasone treatment, have a higher GalNAc transferase activity than the *A. leucocarpus* positive cells, suggesting that the regulation of the O-glycosylation process is related to the differentiation process. Phenotypic characterization of the *A. leucocarpus* positive cell subpopulation by flow cytometry showed that the majority of these cells have the CD4+CD8+ and CD4+ phenotype, thus suggesting that the glycosylation process which begins with the double positive cortical thymocytes is associated to the survival of the CD4+ T cells.

RESUMEN

La diferenciación de los linfocitos T se caracteriza por la expresión variable de los correceptores CD4/CD8, receptores de células T y cambios en la glicosilación en la superficie celular. En este trabajo se evaluaron los cambios de los patrones de sialilación en timos de ratones control o tratados con dexametasona, utilizando las lectinas *Sambucus nigra* y *Maackia amurensis*, que reconocen específicamente ácido siálico (Neu5Ac) en posición $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ respectivamente. Nuestros resultados demostraron que en las primeras etapas de diferenciación las células expresan Neu5Ac $\alpha 2,6$ y conforme maduran, expresan Neu5Ac $\alpha 2,3$. Con este modelo se evaluaron también diferencias en el proceso de O-glicosilación. Se determinó la actividad de GalNAc transferasas en fracciones microsomales de timocitos de ratones tratados con dexametasona, así como de células tímicas aglutinadas con la lectina *Amaranthus leucocarpus* específica para O-glicanos. Utilizando como aceptores péptidos sintéticos, demostramos que la O-glicosilación es distinta en las células inmaduras de la corteza y las más diferenciadas de la médula; y que los timocitos inmaduros ALL-, sensibles al tratamiento con dexametasona, presentan mayor actividad de las GalNAc transferasas que aquellos ALL+, sugiriendo que la regulación de la O-glicosilación podría estar asociada al proceso de diferenciación de las células T. La caracterización fenotípica de los timocitos ALL+ de ratones por citometría de flujo, mostró que la mayoría presentan fenotipo CD4+CD8+ y CD4+, sugiriendo que los procesos de glicosilación que se inician en los timocitos DP de la corteza están asociados a la supervivencia de las células CD4+.

INTRODUCCION

En los vertebrados el sistema inmune ha evolucionado proporcionando a los individuos, además de la inmunidad innata, complejos mecanismos de defensa con una mayor especialización y capacidad de discriminación, que constituyen la inmunidad específica o adaptativa. La inmunidad adaptativa permite reconocer de manera específica a una gran variedad de antígenos a los cuales el organismo está expuesto y gracias a la memoria inmunológica le permite responder con más intensidad a exposiciones repetidas al mismo antígeno. Estas funciones están mediadas principalmente por los linfocitos, los cuales, además de reconocer antígenos de todos los patógenos potenciales, deben ser tolerantes con los antígenos de los tejidos propios.

Los linfocitos constituyen entre el 20 y el 30% de los leucocitos sanguíneos, se desarrollan en la médula ósea y pueden transformarse en linfocitos B, que son células productoras de anticuerpos que participan en la respuesta inmune humoral, o bien, en linfocitos T, los cuales se diferencian en el timo y son los responsables de la respuesta inmune celular, efectuando funciones muy diversas como son la cooperación con las células B para la producción de anticuerpos, la regulación de la respuesta inmune y la estimulación de la actividad citotóxica y microbicida de otras células efectoras, incluyendo los macrófagos. Para la realización de estas funciones es necesario que exista una comunicación constante entre los diferentes tipos de células del sistema inmune, la cual requiere de contacto directo célula-célula o de la estimulación por factores solubles como algunas citocinas o los anticuerpos.

La respuesta inmune adaptativa se inicia con una fase de reconocimiento, que consiste en la unión de antígenos extraños a receptores específicos que se encuentran en la superficie de los linfocitos. Cada linfocito porta en su superficie un solo tipo de receptor que reconoce un determinante antigénico en particular. El número total de especificidades antigénicas de los linfocitos en un individuo se denomina repertorio de linfocitos y es extremadamente amplio. Se estima que el sistema inmune de los mamíferos puede reconocer de manera específica al menos 10^9 determinantes antigénicos diferentes (Abbas et al., 1999). Esta diversidad en el repertorio es el resultado de la variabilidad estructural de los sitios que unen antígenos en los receptores presentes en los linfocitos. La variabilidad se genera durante el desarrollo de los linfocitos por medio de procesos de recombinación somática y mutación que actúan sobre un número inicial relativamente pequeño de genes en línea germinal. El receptor del antígeno de células T o TCR es una molécula constituida por dos cadenas polimórficas que pueden ser los heterodímeros $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ (producto de cuatro genes diferentes) y se asocian con el CD3, el cual es un complejo polipeptídico, constituido por cinco cadenas invariables γ , δ , ϵ , ζ y η ; este complejo está involucrado en la transducción de señales al interior de la célula durante la activación del linfocito T y es necesario para la expresión del TCR en la superficie del mismo. Otros marcadores que permiten distinguir subpoblaciones de células T funcionalmente distintas son el CD4 y el CD8, los cuales actúan como correceptores para las moléculas del MHC clase II y clase I, respectivamente, y participan en la fase de reconocimiento y de activación celular de los linfocitos T.

Los linfocitos T se originan en la médula ósea y migran al timo en un estadio de diferenciación muy temprano. Este órgano linfoide primario posee un *microambiente especializado* en el que se efectúan los rearrreglos genéticos que darán lugar a la generación de TCRs y en donde ocurre la maduración de las células T. Debido a que las células T están restringidas por el MHC y reconocen al antígeno extraño solamente en forma de fragmentos peptídicos unidos a moléculas codificadas por el MHC, sólo aquellas células T capaces de reconocer las moléculas del MHC propio podrán contribuir a la respuesta inmune adaptativa (Abbas et al., 1999). Sin embargo, existen excepciones como es el caso de las moléculas de la familia del CD1, que permiten la presentación de lípidos y glicolípidos a las células T (Porcelli and Modlin, 1999; Burdin and Kronenberg, 1999). Se sabe que existen presentaciones antigénicas mediadas por TCR- $\gamma\delta$ que no requieren de péptido.

El Timo.

El timo de los mamíferos es un órgano bilobulado situado en la cavidad torácica, por encima del corazón y los grandes vasos sanguíneos. En cada uno de los lóbulos, las células linfoides (timocitos), se encuentran distribuidas entre una zona cortical externa y una médula interna. En la zona cortical se agrupan la mayoría de los timocitos relativamente inmaduros, en fase de proliferación, mientras que las células que se encuentran en la médula son más maduras, lo que implica la existencia de un gradiente de diferenciación desde la corteza hasta la médula. En el seno de los lóbulos existe una red de células epiteliales necesaria para la diferenciación en el que los precursores procedentes de la médula ósea se

transforman en linfocitos T maduros. Se pueden distinguir al menos tres tipos diferentes de células epiteliales, tomando en cuenta su estructura función y fenotipo: las células epiteliales nodriza, que se localizan en la corteza externa (región subcapsular), las células epiteliales corticales, que forman la red epitelial y las células epiteliales medulares, que suelen disponerse en forma de agregados. En la zona limítrofe entre la corteza y la médula se encuentran también las células dendríticas interdigitantes y los macrófagos, que al igual que las células epiteliales expresan en su superficie moléculas del MHC, que son esenciales para la maduración y selección de las células T.

El timo es esencial para la producción de la mayor parte de las células T, como lo demuestran la ausencia casi total de células T periféricas en ratones con atimia congénita o adquirida, así como en los que el timo ha sido removido en etapa neonatal. Sin embargo, se han identificado sitios de diferenciación de células T fuera del timo, como son la mucosa intestinal, el hígado y la piel . El timo se desarrolla a partir de la tercera, y en algunas especies también de la cuarta, bolsa faríngea, en forma de un rudimento epitelial de origen endodérmico, que es colonizado por células madre transportadas por la sangre, procedentes probablemente del saco vitelino.

Ontogenia de las células T

Durante la embriogénesis, las células precursoras de los linfocitos T se originan en el hígado fetal y posteriormente en la médula ósea. Estas células penetran en el timo atravesando las paredes de los vasos sanguíneos que se encuentran en el tejido conectivo que envuelve a este órgano y migran a través del mesénquima al interior del epitelio del rudimento tímico. La migración de las

células precursoras hasta el timo no es un proceso aleatorio, sino que está dirigido por señales quimiotácticas emitidas intermitentemente por el rudimiento tímico. Además, el timo es receptivo a estas células solo en determinados estadios de la ontogenia (Lydyard and Grossi, 1997). En el timo, los timocitos se van diferenciando durante la ruta migratoria que va desde la región subcapsular hasta la médula, bajo la influencia de los distintos microambientes tímicos, en los que establecen comunicación con diferentes células del estroma, como son las células epiteliales de la corteza y de la médula, los macrófagos y las células reticulares interdigitantes o células dendríticas. Durante la migración de la corteza hasta la médula, los timocitos van sufriendo cambios fenotípicos, que consisten en la aparición o pérdida de moléculas de superficie relacionadas con su maduración morfológica y funcional.

Generación de Prolinfocitos T

Durante la embriogénesis las células precursoras de los linfocitos T se originan en el hígado fetal y en el adulto en la médula ósea, en ambos casos a partir de células madre pluripotenciales (HSCs, hematopoyetic stem cells), las que también dan origen a las demás células sanguíneas. Las células madre pluripotenciales de la médula ósea murina y humana son heterogéneas en su capacidad para producir reconstitución a largo plazo del sistema hematopoyético, el estado de su ciclo celular, propiedades físicas y expresión de antígenos de superficie (Ikuta et al., 1992), de tal manera que la población total de estas células parece estar constituida por subpoblaciones celulares que representan distintos estadios de diferenciación que van desde las células más primitivas, con gran capacidad reconstitutiva, hasta las células progenitoras comprometidas con un

linaje (Spangrude et al., 1991; Uchida and Weissman, 1992; Morrison et al., 1994; Morrison et al., 1995; Trevisan and Iscove, 1995). Diversos estudios sugieren que las células madre pluripotenciales pueden sufrir diferentes cambios fenotípicos antes de abandonar la médula ósea para poblar el timo. En este sentido, han resultado de gran utilidad para una caracterización positiva de estas células, marcadores de superficie como: Sca-1 (Stem cell antigen 1), Thy-1, c-kit en el ratón y CD34 en el humano, que también se expresan en células inmaduras de diferentes linajes (Uchida and Weissman, 1992). La caracterización de poblaciones de células progenitoras de los timocitos en sangre fetal murina, revelaron la existencia de dos subpoblaciones de células pluripotenciales con capacidad para reconstituir el timo: las células Thy-1⁻, c-kit⁺, con capacidad para colonizar tanto la médula ósea como el timo; y las células Thy-1⁺, c-kit^{low} comprometida con el linaje de células T. La mayor parte de los pro-timocitos de la sangre fetal portan los genes para la cadena β del TCR en línea germinal, exceptuando una pequeña subpoblación de Thy-1⁺ c-kit^{low}, que presenta re-arreglos de los segmentos D(J) de la cadena β . La presencia de esta subpoblación de pro-timocitos en sangre fetal de ratones normales y atímicos, sugiere que el compromiso con el linaje de células T puede anteceder a la colonización del timo (Rodewald et al., 1994; Rodewald, 1995).

En el timo adulto, ha sido caracterizada una pequeña población de timocitos, que representa el ~0.05% del total de timocitos CD4^{low} (Wu et al., 1991) con los genes de TCR en la línea germinal. Estas células tienen capacidad para reconstituir timos en receptores irradiados, cuando son transferidas

intratímicamente originando timocitos con TCR $\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$. Sin embargo, cuando esa misma subpoblación se transfiere por vía intravenosa, puede originar células T y algunas células B en médula ósea, bazo y nódulos linfáticos, pero son incapaces de diferenciarse en macrófagos o granulocitos. También se han aportado evidencias de que en el timo de ratón adulto existen poblaciones de células precursoras tempranas que pueden originar células T, células B, células asesinas (NK) y células dendríticas (DC) (En: Shortman and Wu, 1996). En conjunto, estos datos sugieren que los pro-linfocitos T pueden originarse de una subpoblación de células pluripotenciales capaces de diferenciarse también en otros linajes hematopoyéticos, o bien de una pequeña subpoblación comprometida con el linaje de células T antes de su ingreso al timo.

Diferenciación de las Células T en el Timo

Como todos los procesos relacionados con la maduración en los timocitos, el paso de una etapa de diferenciación a otra parece estar finamente regulada por el microambiente tímico y cada etapa involucra al menos un punto de control. Los timocitos inmaduros que se encuentran en la corteza tímica constituyen una población muy heterogénea que puede ser subdividida con base en la expresión de diversos marcadores de superficie como son el antígeno estable al calor (HSA), CD44 (Pgp-1 o Phagocytic glycoprotein), que es una molécula de adhesión; CD25, que es la cadena α del receptor para interleucina 2 (IL-2R α); c-Kit, que es el receptor para un factor de crecimiento de las células progenitoras hematopoyéticas; SCF (stem cell factor), también denominado ligando de c-Kit y el

antígeno 2 de las células madre hematopoyéticas (Sca-2: Stem cell antigen 2) (Godfrey and Zlotnik, 1993; Shortman and Wu, 1996; Abbas et al., 1999).

Los precursores de los timocitos podrían clasificarse como CD3-, CD4-, CD8- o triples negativos (TN) y pueden subdividirse posteriormente considerando principalmente la presencia de los marcadores CD44, CD25 y c-kit. Una fase muy temprana de expansión de los timocitos tiene lugar en el momento en el que las células progenitoras CD4^{low} proliferan para generar a los timocitos CD25+, CD44+, c-Kit+, TN. Por lo tanto el primer punto de control que definiría la transición al estadio TN incluiría la regulación negativa de la expresión de CD4, la inducción de la expresión de CD25 y probablemente el compromiso con el linaje de las células T. En este estadio, los genes que codifican para las cadenas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ del TCR se encuentran en línea germinal y los timocitos son capaces de responder a diversas citocinas, incluyendo IL-1, IL-2, IL-6, IL-7 y SCF (ligando de c-kit).

El siguiente paso en el proceso de diferenciación de los timocitos se inicia con el reordenamiento de las cadenas β del TCR que ha sido detectado por primera vez dentro de los timocitos CD25+, TN. La cadena β del TCR se expresa posteriormente en la superficie de estas células asociada a una glicoproteína de membrana de 33 kDa denominada cadena α pre-T ($pT\alpha$) y al CD3 formando el denominado complejo pre-TCR. Este complejo genera señales al interior de los timocitos que producen al menos tres respuestas importantes: 1) La inhibición de los reordenamientos posteriores de la cadena β en cada cromosoma, permitiendo la exclusión alélica de la cadena β ; 2) la proliferación de los timocitos que presentan este receptor pre-T, originando múltiples descendientes con una forma

única de cadena β , pero con potencial para expresar diferentes cadenas α y, 3) la inducción de la expresión de CD4 y CD8, que es un requisito indispensable para que tengan lugar los procesos de selección posteriormente. Durante esta etapa se expresa transitoriamente CD25 y los niveles de CD44 y c-Kit disminuyen (Godfrey and Zlotnik, 1993; von Boehmer, 1994; Shortman and Wu, 1996, Male et al., 1996; Abbas et al., 1999).

La maduración de los timocitos dará origen a la subpoblación de las células CD4+CD8+ o dobles positivos (DP), proceso que está determinado por la pérdida de CD25, la expresión de CD4 y CD8 y está regulado principalmente por el reordenamiento de la cadena α del TCR. Al inicio de este período de diferenciación, las células DN pasan por una etapa transitoria en la que expresan cantidades muy bajas de CD4 o CD8, para convertirse posteriormente en células DP, estas células constituyen el 80% de la población total de timocitos en un ratón adulto. Una vez reordenados los genes de la cadena β , se inicia la expresión del TCR $\alpha\beta$. Este proceso tiene lugar antes o durante la migración de los timocitos de la corteza a la médula y marca el inicio de los procesos de selección.

Procesos de Selección

La “educación tímica” consiste en la selección positiva de los timocitos con TCRs capaces de reconocer antígenos extraños presentados por el MHC clase I o II y la delección o selección negativa de aquellas células portadoras de receptores que reconocen antígenos propios. Se ha demostrado que las interacciones entre las células del estroma y los timocitos son necesarias en todas las etapas de diferenciación de los mismos, ya que juegan un papel fundamental en el desarrollo

y la selección positiva o negativa de las células T (Rev. en: Anderson et al., 1996). Resultan así de particular importancia las denominadas células presentadoras de antígeno (CPAs), entre las que se incluyen las células epiteliales, las células dendríticas y los macrófagos. Los timocitos inmaduros que se encuentran en la corteza son seleccionados negativamente, al activarse un proceso de muerte celular por apoptosis, cuando los reordenamientos genéticos de sus TCRs no son exitosos, o bien cuando estos receptores no son capaces de reconocer a las moléculas del MHC o si presentan gran afinidad por las mismas. Los timocitos con receptores que reconocen con mediana afinidad a las moléculas de MHC son rescatados de la apoptosis y seleccionados positivamente para proseguir su proceso de diferenciación; sin embargo, algunas de estas células, pueden tener receptores que reconozcan antígenos propios y entonces ser eliminados después de interactuar con el antígeno y el MHC de las CPAs que se encuentran en la interfase entre la corteza y la médula. Las células DP que se encuentran en esta región también presentan una gran susceptibilidad a la selección negativa.

La eliminación de las células autorreactivas se lleva a cabo por un proceso de selección negativa (Nossal, 1994) y la eliminación clonal se efectúa generalmente por medio de un proceso de muerte celular por apoptosis (Cohen and Duke, 1984), que puede ocurrir en distintos momentos de la diferenciación de los timocitos. Más del 90% de los timocitos inmaduros mueren por apoptosis y cada vez se acumulan mas evidencias que sugieren que este tipo de respuesta es un componente fundamental del proceso de selección intratímica que se lleva a cabo para prevenir la autoinmunidad.

Apoptosis: una forma de Muerte Celular Programada

La apoptosis es un mecanismo de autodestrucción celular dirigido genéticamente. Tiene un significado biológico relacionado con el mantenimiento de la homeostasis funcional, como sucede en la atresia folicular (O'Shea et al., 1978), en la regresión de las glándulas mamarias durante el destete (Walker et al., 1989) en la selección negativa durante la diferenciación de los linfocitos (Cohen et al., 1992) y en el transcurso de la embriogénesis (Farbman, 1968) o de la metamorfosis (Kerr et al., 1974). También se puede inducir apoptosis durante infecciones por patógenos como *Pseudomona*, *Mycobacterium*, y *Plasmodium* (Duan et al., 2001; Jendrossek et al., 2001; Helmbj et al., 2000), así como después de la exposición a drogas citotóxicas (McConkey et al., 1988), glucocorticoides (Cohen and Duke, 1984), lipopolisacáridos (Thomas and Caffrey, 1991), radiaciones ionizantes (Sellins and Cohen, 1987; Forster, et al., 1992) o hipertermia (Harmon et al., 1990).

El término apoptosis (Kerr, 1972) describe una forma de muerte celular programada, basada en los cambios morfológicos y estructurales sufridos por la célula durante este proceso. Los cambios celulares que se observan en el transcurso de la apoptosis son: 1) condensación de la cromatina, acompañada de la fragmentación del DNA en oligómeros nucleosomales, 2) contracción celular, condensación del citoplasma y dilatación del retículo endoplásmico, sin cambios aparentes en la morfología de otros organelos, 3) vesiculización de la membrana plasmática (zeiosis) 4) formación de cuerpos apoptóticos, que son fagocitados con rapidez, principalmente por los macrófagos y, 5) ausencia de reacción inflamatoria circundante, distinguiéndose así de la necrosis (Kerr and Harmon, 1991).

Estos cambios van acompañados o precedidos de diferentes eventos bioquímicos y moleculares, como la transducción de señales generadas extracelularmente por diferentes estímulos, la activación de diferentes enzimas y la expresión de genes que codifican a los componentes moleculares involucrados en la apoptosis. Uno de los eventos mas críticos en el proceso de apoptosis parece ser la fragmentación del DNA nuclear en oligómeros nucleosomales, que se pueden observar por electroforesis en geles de agarosa, que presentan un patrón característico “en escalera” que ha sido utilizado ampliamente para identificar la apoptosis (Wyllie, 1980).

Estudios realizados con diferentes agentes para inducir apoptosis, así como el uso de ionóforos de Ca^{2+} , han mostrado que este proceso está precedido por un aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular y que el flujo de calcio por sí mismo puede ser un potente inductor de apoptosis (Seamus et al., 1994). En varios modelos para el estudio de la apoptosis, se ha observado que después de la exposición a distintos inductores del proceso, se desencadena la expresión de nuevos genes como respuesta a señales externas, que pueden ser bloqueados por inhibidores de la síntesis de mRNA o de proteínas. Se han identificado los productos de algunos genes que participan en la apoptosis o que están implicados en el control de la misma, como Fas/APO-1, Bcl-2 (Kramer et al., 1991; Ashwell, 1994), c-myc, p53 y TRPM-2/SGP (Cohen, 1993).

Regulación de la Apoptosis durante la Ontogenia de los Linfocitos T

La estimulación de los timocitos con anticuerpos anti- CD3 y anti-TCR, conduce a algunas subpoblaciones de células inmaduras a un proceso de muerte celular por apoptosis, mientras que en los linfocitos T maduros, el mismo estímulo

trae como consecuencia la proliferación celular (Finkel et al., 1989). Un modelo para el estudio de la apoptosis es la inducción de ésta en timocitos por glucocorticoides (Wyllie, 1980; Cohen, 1984). Los timocitos inmaduros de la corteza con mayor susceptibilidad a la selección negativa son mas sensibles a los inductores de muerte celular por apoptosis, mientras que las células más maduras localizadas en la médula y los linfocitos T periféricos son relativamente resistentes a la acción de los mismos inductores (Roelants et al., 1979; Boyer and Rothenburg, 1988). Un hecho interesante es que tanto la estimulación del TCR como la exposición a los glucocorticoides inducen apoptosis en algunas líneas celulares, mientras que la estimulación simultánea de ambos tiene un efecto antagónico que permite la supervivencia de estas células (Zacharchuk et al., 1990; Iwata et al., 1991). Otros estudios para explorar el papel de los glucocorticoides durante el desarrollo del timo *in vivo*, han mostrado que una subpoblación de células epiteliales son esteroideogénicas. Estudios de cultivo de órganos con timo fetal, mostraron que la inhibición de la síntesis de esteroides en el 17º día de cultivo incrementaba la eliminación de los timocitos en respuesta a la estimulación del TCR (Vacchio et al., 1994; King et al., 1995).

Estudios con ratones transgénicos que portaban una construcción anti-sentido del gen que codifica para el receptor de glucocorticoides, bajo el control del promotor de *lck* (que es activo preferentemente en timocitos inmaduros) mostraron un incremento en la susceptibilidad a la muerte por apoptosis mediada por TCR, siendo los timocitos DN los eliminados en mayor número, lo que sugiere que los glucocorticoides podrían jugar un papel importante en la transición del estadio CD4⁻ CD8⁻ al CD4⁺ CD8⁺, así como en la supervivencia de células

inmaduras cuyo TCR ha sido estimulado. Estos hallazgos indican además, que los timocitos cuyo TCR no es capaz de unirse al MHC son eliminados por los esteroides endógenos, mientras que aquellas células cuyo TCR se une con afinidad moderada al MHC son rescatados de la muerte por apoptosis (seleccionados positivamente), vía el efecto antagónico glucocorticoides/TCR. Por otra parte, aquellos timocitos cuyo TCR se une con alta afinidad al MHC son eliminados, probablemente por la anulación del antagonismo glucocorticoides/TCR (Osborne, 1996).

Papel de los Carbohidratos en los Procesos de Reconocimiento y Diferenciación Celular

El reconocimiento celular es un evento central en una gran variedad de fenómenos biológicos y frecuentemente constituye la primera etapa en numerosos procesos basados en la interacción célula-célula, como son: la fertilización, la embriogénesis, la migración celular, la formación de órganos, la respuesta inmune y la infección microbiana. Este proceso requiere de una gran especificidad que involucra la existencia de parejas de estructuras complementarias en la superficie de las células que establecen contacto. Se ha propuesto que dichas interacciones celulares están mediadas por oligosacáridos (Sharon and Lis, 1989; Sharon and Lis, 1993). Entre las evidencias más importantes están las siguientes: 1) la observación de que la gran diversidad estructural de los oligosacáridos puede generar combinaciones ilimitadas de monosacáridos; 2) el hecho de que la mayor parte de las células presentan en su superficie oligosacáridos complejos en forma de glicoproteínas o glicolípidos; y, 3) la participación de proteínas, denominadas

lectinas, que reconocen específicamente secuencias sacarídicas, en el control de la diferenciación y formación de órganos (Sharon and Lis, 1989).

Prácticamente todas las células presentan en su superficie estructuras sacarídicas en forma de glicolípidos o glicoproteínas, respectivamente. Debido a la complejidad de su naturaleza y a su amplia distribución en los organismos vivos, el papel de estos glicoconjugados es extremadamente variado. El desarrollo de nuevas tecnologías, en las últimas décadas, ha permitido el estudio de la estructura, la biosíntesis y las funciones biológicas de los azúcares o de los glicoconjugados complejos, evidenciando su importancia en diversos procesos biológicos. Entre otras funciones es ahora ampliamente aceptado el papel que juegan los glicanos en la protección del polipéptido contra la acción de enzimas proteolíticas, así como en la estabilización de la conformación tridimensional de las glicoproteínas. Además, algunos glicanos actúan como receptores para una gran variedad de virus, bacterias y parásitos, o bien, como ligandos específicos para receptores endógenos en un organismo, determinando el tiempo de circulación de algunas células o participando en procesos de recambio o tráfico intracelular de diversas proteínas. No menos importante es el papel que juegan en las interacciones célula-célula o en los procesos de adhesión celular. Por otra parte, numerosas evidencias sugieren la existencia de modificaciones en el perfil de glicosilación de grupos celulares que son indicativos de diversos estados patológicos (Varki et al., 1999).

La glicosilación de proteínas, es un evento co- y post-traducciona l que se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi. Este proceso adquiere gran relevancia en organismos eucariotas, ya que permite el transporte

de diversas glicoproteínas desde el retículo endoplásmico hasta el aparato de Golgi, determinando además el destino final de estas moléculas, sea como proteínas de membrana, de secreción o lisosomales (Alberts et al., 1994). Las cadenas de carbohidratos pueden estar unidas a un residuo de asparagina por un enlace N-glicosídico, para formar los N-glicanos o bien, establecer una unión O-glicosídica con un residuo de serina o treonina, para constituir los O-glicanos.

En el caso de los N-glicanos, se ensambla un oligosacárido precursor ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) sobre el transportador Dolicol fosfato, que es transferido en bloque a un residuo de asparagina de la cadena polipeptídica recién sintetizada en el retículo endoplásmico, siempre que el residuo de asparagina se encuentre en la secuencia Asp-X-Ser/Thr (en donde X puede ser cualquier aminoácido, excepto prolina). La transferencia de este oligosacárido es catalizada por un complejo multienzimático, unido a la membrana del retículo endoplásmico (ER), denominado oligosacaril transferasa, cuyo sitio activo está expuesto hacia el interior del ER. Una vez unido a la proteína, el oligosacárido sufre una serie de modificaciones entre las cuales se encuentran la remoción y re-adición de unidades de glucosa que participan en los mecanismos de plegamiento de las proteínas. La síntesis de los N-glicanos se completa en el aparato de Golgi, con la adición de residuos de N-acetilglucosamina, galactosa, fucosa y ácido siálico en reacciones individuales catalizadas por glicosiltransferasas específicas (Varki, 1999).

Los O-glicanos presentan una gran variedad estructural y se sintetizan por medio de un proceso de modificación postraduccional de las proteínas, que se inicia con la transferencia de UDP-GalNAc a los residuos de serina o treonina de

la cadena polipeptídica (Clausen and Bennett, 1996). Esta reacción es catalizada por las UDP-GalNAc:polipéptido N-acetilgalactosaminil transferasas (GalNAc transferasas, E.C 2.4.1.41), que son enzimas intracelulares localizadas principalmente en la región *cis* del aparato de Golgi, aunque existen estudios que sugieren su presencia en el retículo endoplásmico (Schachter and Brockhausen, 1992; Marth, 1996). Investigaciones recientes han establecido la existencia de una familia de GalNAc transferasas que se expresan en las células animales; cada enzima difiere en su especificidad por el sustrato aceptor y la expresión de los genes que las codifican está regulada diferencialmente en distintas células y órganos (Clausen and Bennett, 1996). La especificidad de las GalNAc transferasas controla la primera etapa en la biosíntesis de los O-glicanos y, hasta ahora, no se ha podido encontrar una secuencia consenso para el sitio aceptor de estas enzimas. Después de la fase inicial, la síntesis del oligosacárido se continúa con la adición de diferentes unidades de monosacáridos por la acción de múltiples glicosiltransferasas. Tanto en los N- como en los O-glicanos, la síntesis de los oligosacáridos finaliza con la adición de moléculas de ácido siálico.

Por su gran complejidad y diversidad, los O-glicanos pueden participar en diversas funciones como son la conformación de la estructura secundaria y terciaria de algunas proteínas del tipo mucina (Carraway and Hull, 1991) o en procesos que requieren del reconocimiento celular, actuando como ligandos (Chapman et al., 1996; Lai et al., 1991; Powell and Varki, 1994). También intervienen en la regulación de la respuesta inmune, debido a que la O-glicosilación de epítopes de moléculas extrañas es importante en la interacción de grupos celulares (Nguyen et al., 1993) y en la transducción de señales (Willougby,

1993). Además, la presencia de estructuras O-glicánicas anormales en las proteínas ha sido asociada con el desarrollo de tumores (Yamashita et al., 1995).

Los Ácidos Siálicos y las Sialiltransferasas

Los ácidos siálicos constituyen una familia de monosacáridos que se derivan del ácido acetilneuramínico (NeuAc) y están constituidos por nueve átomos de carbono. El grupo amino puede estar sustituido ya sea por un residuo acetilo o glicolil y los grupos hidroxilo pueden estar metilados o esterificados con un grupo acetilo, lactilo, sulfato o fosfato. En algunas ocasiones varios de estos sustituyentes están presentes en una sola molécula de ácido siálico, lo cual genera una gran diversidad estructural (Schauer, 1985; Varki, 1992).

Los ácidos siálicos poseen una carga negativa neta a pH fisiológico, debido a la presencia de un grupo carboxilo en el C1 y se encuentran en el extremo terminal no reductor de las cadenas sacarídicas de los oligosacáridos, glicoproteínas o glicolípidos localizadas en la superficie celular. Pueden estar unidos por un enlace α -glicosídico a los grupos 3- o 6-hidroxilo de los residuos de galactosa o al grupo 6-hidroxilo de los residuos de GlcNAc o de GalNAc (Harduin-Lepers et al., 1995).

Debido a su posición terminal en los glicanos y a su carácter ácido, los ácidos siálicos confieren a las moléculas en las que se encuentran propiedades físicas y biológicas particulares, por lo que han sido consideradas desde hace tiempo, como moléculas informacionales y determinantes importantes en los procesos de reconocimiento célula-célula (Rademacher et al., 1988). Además, los residuos de ácido siálico están involucrados en procesos de adhesión y movilidad

celular (Pilatte et al., 1993). Las sialiltransferasas constituyen una familia de glicosiltransferasas que catalizan la transferencia de una unidad de NeuAc al extremo terminal no reductor de la cadenas oligosacáridicas de las glicoproteínas o glicolípidos utilizando, como donador, al citidil monofosfato-ácido acetil neuramínico (CMP-NeuAc). (Sadler, 1984; Kornfeld and Kornfeld, 1985). Estas enzimas se localizan en las cisternas de la región trans del aparato de Golgi y en la red trans Golgi, aunque existen estudios que sugieren que pueden tener una distribución más amplia a través del aparato de Golgi en algunas células (Berger and Hesford, 1985; Roth, 1987). Se han encontrado hasta 19 diferentes sialiltransferasas, cada una de las cuales presenta una especificidad bien definida, tanto por la estructura oligosacáridica aceptora del ácido siálico como por el tipo de enlace cuya formación catalizan (Tabla 1) (Harduin-Lepers et al., 1994). La expresión de estas enzimas está regulada de manera específica en diferentes células y tejidos, así como durante el desarrollo, la diferenciación y la transformación oncogénica. El mecanismo más común de regulación se efectúa a nivel transcripcional, ya sea por la utilización de diferentes promotores o por splicing alternativo, aunque también pueden regularse a nivel de la traducción, por la alteración en la eficiencia de la misma o, por presentar diferentes sitios de inicio de este proceso (Dinter and Berger, 1995).

TABLA 1
LA FAMILIA DE LAS SIALILTRANSFERASAS

| NOMBRE | | No. EC | A | B |
|--|--|----------|-----------|-----------------------|
| α2.6-sialil transferasas= α2.6-ST | | | | |
| 1. | CMP- ácido sialico: Gal β 1-4GlcNac α 2.6-sialiltransferasas | 2.4.99.1 | ST6(N) | ST6Gal |
| 2. | CMP- ácido sialico: sialil α 2-3Gal β 1-3GlcNac β α 2.6- sialiltransferasa | 2.4.99.- | | ST6GlcNac |
| 3. | CMP- ácido sialico: R ^a -GalNac α 1-Ser(Thr) α 2.6- sialiltransferasa | 2.4.99.3 | ST6(O)-I | ST6GalNac-I |
| 4. | CMP- ácido sialico: R ^b -Gal β 1-3GalNac α 1-Ser(Thr) α 2.6- sialiltransferasa | 2.4.99.- | | ST6GalNac-II |
| 5. | CMP- ácido sialico: sialil α 2-3Gal β 1-3GalNac α 1-Ser(Thr) α 2.6-sialiltransferasas | 2.4.99.7 | ST6(O)-II | ST6GalNac-III |
| α2.3-sialiltransferasa= α2.3-ST | | | | |
| 6. | CMP- ácido sialico: Gal β 1-3/4GlcNac-R α 2.3- sialiltransferasa | 2.4.99.6 | ST3(N) | ST3Gal-II |
| 7. | CMP- ácido sialico: Gal β 1-3/4GlcNac β -R α 2.3- sialiltransferasa | 2.4.99.- | | |
| 8. | CMP- ácido sialico: Gal β 1-4GlcNac-R α 2.3- sialiltransferasa | 2.4.99.- | ST3(N)-II | |
| 9. | CMP- ácido sialico: Gal β 1-3GalNac β -R α 2.3- sialiltransferasa | 2.4.99.4 | ST3(O)-I | ST3Gal-1 ^a |
| 10. | CMP- ácido sialico: Gal β 1-3GalNac α 2.3- sialiltransferasa | 2.4.99.- | ST3(O)-II | ST3Gal-1b |
| 11. | CMP- ácido sialico: Gal β 1-4GlcNac or Gal β 1-3GalNac α 2.3- sialiltransferasa | 2.4.99.- | ST3(O/N) | ST3Gal-III |
| 12. | CMP- ácido sialico: Gal β 1-4 Glc β 1-O-Cer α 2,3-sialiltransferasa | 2.4.99.9 | | |
| 13. | CMP- ácido sialico: Gal β 1-3GalNac β 1-4(R ^c -) Gal β 1-4Glc β 1-O-Cer α 2.3-sialil-Transferasa | 2.4.99.2 | | |
| α2.8- sialiltransferasa=α2.8-ST | | | | |
| 14. | CMP- ácido sialico: NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNac-R α 2.8- sialiltransferasa | 2.4.99.- | STX | ST8Sia-II |
| 15. | CMP- ácido sialico: NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-GlcNac-R α 2.8- sialiltransferasa | 2.4.99.- | | ST8Sia-III |
| 16. | CMP- ácido sialico: NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-GlcNac-R α 2.8- sialiltransferasa | 2.4.99.- | | ST8Sia-IV |
| 17. | CMP- ácido sialico: Sialil α 2-3 Gal β 1-4Glc β 1-O-Cer α 2.8- sialiltransferasa | 2.4.99.8 | | ST8Sia-I |
| 18. | CMP- ácido sialico: Sialil α 2-8 sialil α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-O-Cer α 2.8- sialiltransferasa | 2.4.99.- | | |
| 19. | CMP- ácido sialico: NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNac β 1-(R ^c -)Gal β 1-4Glc β 1-O-Cer α 2.8- sialiltransferasa | 2.4.99.- | | |

A: Nomenclatura de Paulson
B: Nomenclatura de Tsuji

^aR = H-, Gal β 1-3, sialil α 2-3Gal β 1-3.

^bR = H-, sialil α 2-3

^cR = H-, sialil α 2-3, sialil α 2-8 sialil α 2-3, sialil α 2-8sialil α 2-8 sialil α 2-3

Modificada de: Harduin-Lepers et al. (1994)

Las Lectinas

Debido a la importancia de las estructuras oligosacáridicas en las funciones celulares, se han desarrollado diversas técnicas para el estudio y caracterización de dichas estructuras, una de las cuales incluye el empleo de lectinas, especialmente de origen vegetal, por lo que representan una herramienta para el estudio y caracterización de las estructuras sacarídicas. Las lectinas son proteínas que reconocen específicamente secuencias de oligosacáridos y se unen a ellos por puentes de hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas y en algunos casos por enlaces de coordinación, aunque no tienen actividad catalítica, ni son el resultado de una respuesta inmune (Lis and Sharon, 1998). En el caso de las lectinas vegetales no se ha identificado una función determinada; sin embargo, en diversos organismos animales, se ha demostrado su participación en funciones biológicas importantes, como son la señalización intercelular, la remoción de glicoproteínas del sistema circulatorio, el control del tráfico de glicoproteínas, el reclutamiento de leucocitos a sitios de inflamación, la modulación de la respuesta inmune y la adhesión de agentes infecciosos (Licastro et al., 1993).

Lectinas conjugadas con compuestos fluorescentes, partículas de oro o enzimas han resultado excelentes herramientas en estudios histoquímicos y citoquímicos para detectar glicoconjugados en cortes de tejidos (Alroy et al., 1987; Taatjes et al., 1988), células (Shimizu and Yamada, 1986) y organelos celulares (Jurgen, 1987). También se han utilizado para evaluar los cambios en los patrones de glicosilación en diversos tejidos durante el desarrollo (Calderó and Campo, 1988; Vallejo et al., 2000), así como para el estudio de las interacciones célula-célula (McCoy Jr, 1987; Peacock, 1990) y el aislamiento y la caracterización de

poblaciones celulares (Reisner and Sharon, 1984; Hellström et al., 1984; De Dios et al., 1986). Algunas lectinas que reconocen específicamente O-glicanos que contienen las estructuras Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1-O Ser/Thr y GalNAc α -O Ser/Thr, se han utilizado ampliamente en el fraccionamiento de glicoproteínas y de subpoblaciones celulares (Sharon and Lis, 1986; Nesser et al., 1986). Se ha podido aislar por aglutinación con la lectina de *Arachis hypogaea* (PNA), a una población de timocitos inmaduros, sensibles al tratamiento con glucocorticoides, localizados en la corteza tímica (Reisner et al., 1976a; De Maio et al., 1986). En cambio, la lectina aislada de las semillas de *Amaranthus leucocarpus* (ALL), específica para la GalNAc en los antígenos Tn (GalNAc α 1,O-Ser/Thr) y T (Gal β 1,3GalNAc α 1,O-Ser/Thr) reconoce poblaciones de timocitos de ratón en los últimos estadios de diferenciación y células vírgenes o no estimuladas, como los linfocitos CD4 humanos y murinos o los macrófagos peritoneales murinos (Lascurain et al., 1994; Gorocica et al., 1998). Con el uso de lectinas se han podido también distinguir poblaciones de linfocitos T y B en el bazo murino, por diferencias en sus oligosacáridos, detectadas por medio de la lectina *Glycine max* (SBA) (Reisner et al., 1976b). También es posible distinguir entre el enlace α 2,3, y α 2,6 del NeuAc, utilizando las lectinas *Maackia amurensis* (MAA) y *Sambucus nigra* (SNA) (Kaku et al., 1993; Mrkoci et al., 1996).

JUSTIFICACIÓN

La diferenciación de los linfocitos T se caracteriza no sólo por la expresión variable de los correceptores CD4 y CD8 y el incremento en la densidad del TCR, sino también por los cambios en los patrones de glicosilación. Un evento central durante el desarrollo de las células T es la “educación” de las poblaciones de timocitos para distinguir entre lo propio y lo extraño, de tal manera que las células autorreactivas sean eliminadas por apoptosis (Cohen and Duke, 1984). Los glucocorticoides, como la dexametasona, inducen la apoptosis de los timocitos (Wyllie, 1980; Cohen and Duke, 1984). Las células más sensibles a los efectos letales de estos esteroides, son los timocitos inmaduros localizados en la corteza, mientras que las células de la médula son más resistentes (Roelants et al., 1979). Se ha demostrado que los carbohidratos de la superficie celular cambian durante la diferenciación y maduración de los timocitos (Gillespie et al., 1993; Wu et al., 1997; Krishna and Varki, 1997) y que las lectinas, debido a su capacidad para reconocer carbohidratos en secuencias específicas, han sido ampliamente utilizadas para identificar cambios en los patrones de glicosilación por histoquímica (Alroy et al., 1987) o para el aislamiento de subpoblaciones celulares (Reisner and Sharon, 1984; De Dios et al., 1986). En particular, la lectina de las semillas de *Amaranthus leucocarpus*, ha permitido el aislamiento de una subpoblación de timocitos en los últimos estadios de maduración (Lascurain et al., 1994).

La adición de carbohidratos a las proteínas por medio de un proceso de O-glicosilación está asociada a una gran variedad de actividades biológicas y se inicia con la transferencia de GalNAc a las cadenas laterales de un residuo de serina o treonina de la cadena polipeptídica (Clausen and Bennett, 1996). Esta

reacción está mediada por las GalNAc transferasas, cuya actividad puede ser evaluada *in vitro* con el uso de péptidos sintéticos (Brockhausen et al., 1996; Hennebicq-Reig et al., 1996). Con base en lo anterior, se consideró interesante establecer si existía alguna relación entre la diferenciación funcional, la selección negativa por apoptosis de los timocitos y la expresión de diferentes estructuras sacarídicas o los procesos de O-glicosilación. Se eligió como modelo experimental el murino debido a que en el ratón se puede inducir la apoptosis fácilmente con glucocorticoides. Este trabajo puede contribuir a la mejor comprensión de la participación de los procesos de glicosilación en la diferenciación y la selección de los linfocitos T.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer la relación entre la expresión de estructuras glicosiladas y la regulación de la apoptosis durante la ontogenia de los linfocitos T en ratones normales y tratados con dexametasona.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1) Determinar la localización de las diferentes subpoblaciones de timocitos que expresan distintos sialoglicoconjugados asociados al proceso de diferenciación, por medio del uso de lectinas.
- 2) Localizar en cortes de timo la presencia de células en proceso de apoptosis y determinar si existe alguna relación entre este proceso y la presencia de diferentes sialoglicoconjugados.
- 3) Evaluar la actividad de las GalNAc-transferasas en poblaciones de timocitos de ratones control o tratados con dexametasona
- 4) Evaluar la actividad de las GalNAc-transferasas en subpoblaciones de timocitos murinos aisladas con la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL).
- 5) Caracterizar fenotípicamente la subpoblación de timocitos provenientes de ratones control o tratados con dexametasona, aislados con la lectina de ALL.

MATERIAL Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c, de veintiocho días de edad, obtenidos en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Apoptosis *in vivo*

Para inducir el proceso de apoptosis en los timocitos se inyectó a los ratones con dexametasona intraperitonealmente, a una dosis de 5 mg/Kg.; a los animales control se les inyectó agua destilada. Después de 3 a 5 h, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se disecó el timo, lavándolo una vez con medio (DMEM) y otra con PBS.

Obtención de timocitos

Para obtener los timocitos, cada uno de los timos se sumergió en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium. Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo, USA.) y se disgregó mecánicamente con una aguja. Las células obtenidas se pasaron a través de una malla de nylon, colectándolas en una caja de petri. Posteriormente, se lavaron dos veces con DMEM, centrifugándose en cada ocasión 5 min a 1 500 rpm, luego el paquete celular se resuspendió en 2 ml de amortiguador de fosfatos (PBS: 0.1 M Na₂HPO₄, 0.1 M NaH₂PO₄; H₂O, 0.15 M NaCl, pH 7.2) y se contaron en un hemocitómetro. Se determinó la viabilidad por el método de exclusión de azul de tripano (Tennant, 1964), que fue superior al 90%.

Preparación de los Cortes de Timo

Los timos se fijaron en solución de Bouin durante 3 h, prosiguiendo después a la deshidratación e inclusión en parafina siguiendo el proceso de rutina para microscopía de luz. Se obtuvieron cortes estrictamente seriados de 3 µm de

grosor, que se montaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina al 0.1%. Posteriormente, se procedió a desparafinar y rehidratar los cortes obtenidos; los cortes con números pares fueron procesados para histoquímica con lectinas y los cortes con números nones se tiñeron con hematoxilina-eosina, con el objeto de detectar a los timocitos que se encontraban en proceso de apoptosis. La distribución de las células apoptóticas fue confirmada utilizando naranja de acridina y yoduro de propidio, siguiendo la metodología de McGahon (1996).

Histoquímica con Lectinas

Los cortes de timo con números pares se sumergieron en una solución al 2%, de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS, lavándose posteriormente con PBS dos veces, durante 5 min en cada ocasión. Para evaluar la distribución de los sialoglicoconjugados en los cortes, estos fueron incubados durante 45 min a temperatura ambiente con las lectinas de *Sambucus nigra* (SNA, específica para Neu5Ac α 2,6Gal/GalNAc) y de *Maackia amurensis* (MAA, específica para Neu5Ac α 2,3Gal) conjugadas con biotina y diluidas en PBS 1:50 y 1:100 respectivamente. Después de la incubación los cortes se lavaron primero con PBS y luego con una solución amortiguadora de Tris 0.1M, NaCl 100mM y MgCl₂ 5mM, pH 9.5. Enseguida, los cortes se incubaron de 30 a 45 min con extravidina conjugada a fosfatasa alcalina (dil. 1:500); se lavaron dos veces con PBS durante 15 min y la localización de la enzima unida a la lectina biotinilada se detectó utilizando la mezcla sustrato-cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y azul de tetrazolio (NBT).

Para determinar si las lectinas utilizadas reconocían células epiteliales o dendríticas, se efectuaron dobles tinciones utilizando las lectinas biotiniladas y el anticuerpo monoclonal NLDC-145, específico para una glicoproteína integral de membrana de 205 kDa, denominada DEC-205, presente en las células epiteliales (Swiggard et al., 1995; Witmer-Pack et al., 1995). Para esto, se obtuvieron cortes por congelación de 10 μm de espesor que se montaron en portaobjetos tratados previamente con poli-L-lisina y se fijaron posteriormente con acetona fría durante 15 min, dejándolos secar a temperatura ambiente y almacenándolos a 4°C hasta efectuar las pruebas de histoquímica. Posteriormente los cortes fueron incubados con las lectinas SNA o MAA biotiniladas de la manera descrita anteriormente, pero las lectinas unidas se detectaron utilizando extravidina acoplada a peroxidasa de rábano (diluida 1:200), empleando la mezcla sustrato cromógeno diamino bencidina y H_2O_2 . Por último, los cortes fueron incubados en PBS con 1% de BSA y 0.01 % tritón X-100 durante 1 h a temperatura ambiente y después con el anticuerpo NLDC-145 (dilución 1:20) 12 h a 4°C. Como segundo anticuerpo se utilizaron anticuerpos de cabra anti-IgG de rata, acoplado a fluoresceína, con el cual se incubaron los cortes durante 45 min a 37°C en cámara húmeda y en la oscuridad.

Separación de Timocitos ALL+ y ALL-

La obtención de las timocitos ALL+ y ALL- se efectuó por aglutinación selectiva utilizando la lectina ALL siguiendo la metodología reportada por Lascurain et al. (1994). 2×10^6 células se incubaron con 10 μg de ALL, posteriormente las células se agregaron a una solución de BSA al 8% en PBS y

las células aglutinadas se sedimentaron después de 30 min, identificándose dos grupos celulares, las células aglutinadas (ALL+) y las no aglutinadas (ALL-), posteriormente estos dos grupos celulares se incubaron con D-GalNAc 0.2 M durante 30 min a temperatura ambiente y se lavaron dos veces en PBS. Finalmente, se resuspendieron en 200 μ l de solución de Hanks (Gibco BRL, Inc. Grand Island, NY, USA) se congelaron a -70°C en 1 ml de una solución de suero fetal bovino y dimetil sulfóxido (DMSO) 9:1, hasta su procesamiento para obtener las fracciones microsomales.

Obtención de las Fracciones Microsomales

Las células se descongelaron y se resuspendieron inmediatamente en 6-8 ml de DMEM y se centrifugaron a 1200 rpm durante 7 min para eliminar la solución de suero fetal- DMSO. Este procedimiento se repitió dos veces, resuspendiendo las células en DMEM la primera ocasión y en PBS la segunda. El precipitado fue resuspendido en 1 ml de una solución fría de sacarosa 0.25 M en HEPES 0.1 M (pH 7.4) y se incubó con 5U de DNAsa I durante 10 min en agitación, para eliminar el ADN liberado por la lisis de algunas células. Posteriormente, la suspensión celular se homogeneizó 10 veces con un homogeneizador de tejidos Potter – Elvehjem y se centrifugó a $10\,000 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante se sometió después a ultracentrifugación a $140\,000 \times g$, 30 min, para sedimentar la fracción microsomal. Esta fracción fue resuspendida en la solución sacarosa/HEPES y se almacenó a -70°C hasta su uso para la evaluación de la actividad de las GalNAc transferasas. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (1951).

Actividad de GalNAc Transferasas

Se utilizaron tres diferentes péptidos como sustratos exógenos. Uno de ellos fue el octapéptido NH₂-TTSAPTTS-COOH (AP), correspondiente a una secuencia repetida en tandem del gene MUC 5AC de la mucina estomacal humana (Audié et al., 1993; Guyonnet Duperat et al., 1995). Los otros dos, NH₂-SSTTGVAM-COOH (M) y NH₂-LSTTEVAM-COOH (N), correspondían a las secuencias amino terminales de los grupos sanguíneos M y N respectivamente (Pepe et al., 1991). El ensayo se efectuó con 40 µl de una solución que contenía los siguientes componentes a las concentraciones finales indicadas: 3 mM de péptido aceptor en 10 µl de amortiguador MES 125 mM, pH 7.0, 10 µl de tritón X-100 al 0.2% (v/v) con MnCl₂ 12.5 mM, PMSF 1 mM, AEBSF 1 mM y E64 1mM; 5 µl de UDP-[³H]-GalNAc (0.3 X 10⁶ dpm), 5 µl de UDP-GalNAc 1mM fría y la preparación microsomal a una concentración de 6 µg/10 µl de solución de sacarosa. Después de agregar los microsomas, las muestras fueron incubadas durante 3 h a 37°C y se finalizó la reacción agregando 8 volúmenes de borato de sodio 20 mM en ácido etilendiaminotetraacético 1 mM (pH 9.1). Los productos de la reacción de O-glicosilación *in vitro* fueron separados del exceso de UDP-GalNAc utilizando una columna que contenía la resina de intercambio aniónico AG1-X8 y eluyendo con agua destilada. La incorporación de UDP-[³H]-GalNAc se cuantificó en un contador de centelleo Beckman LS 6000 TA. Antes de efectuar la electroforesis capilar, se procedió a eliminar las sales de los eluidos acuosos obtenidos después del uso del intercambiador AG1-X8, utilizando columnas de fase reversa de Sep-Pak C18. Estas últimas fueron activadas haciendo pasar por

ellas primero, 10 ml de metanol y después, 10 ml de agua desionizada con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1%. Las sustancias polares se lavaron con 10 ml de agua/TFA, mientras que las fracciones glicopeptídicas se obtuvieron por elución con 10 ml de acetonitrilo al 25% en agua/TFA.

El análisis de los resultados se efectuó mediante la prueba no paramétrica de la T de student's y todos los resultados con un valor de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Electroforesis Capilar

La electroforesis capilar se llevó a cabo en un sistema P/ACE modelo 5000 (Beckman, Fullerton, Ca.), controlado por un programa System Gold V 810. La absorbancia de la luz UV fue monitoreada con un detector de longitud de onda a 200nm. La inyección de las muestras (10-20 pmol) se efectuó a presión, siendo la duración de este procedimiento de aproximadamente 6 seg, utilizando un capilar de silica de 57 cm X 75 μm . La electroforesis se realizó a 23°C utilizando un amortiguador de ácido fórmico 2N y el voltaje que se aplicó a través del capilar fue de 20 kV. Después de cada separación el capilar fue lavado con acetonitrilo al 25% en PBS a pH 7.2 durante 2 min.

Caracterización Fenotípica de las Células ALL+

Las células ALL+ se analizaron por citometría de flujo, utilizando el método de triple marcaje, con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los correceptores CD4 y CD8 acoplados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) y a ficoeritrina (PE) respectivamente y con la lectina ALL acoplada a biotina, la cual se detectó con estreptavidina-cychrome (SP-Cy). Se obtuvieron suspensiones celulares de

timocitos de ratones control y tratados con dexametasona durante 3 y 5 h, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Se fraccionaron en alícuotas de 1×10^6 células en tubos eppendorf y se lavaron con 500 μ l de PBS. Posteriormente, se incubaron con 10 μ l de anticuerpos monoclonales anti-CD4-FITC (dil. 1:200) y anti CD8-PE (dil. 1:300) en 500 μ l de PBS-BSA-azida (PBS con 0.2% de albúmina de suero bovino y 0.2% de azida de sodio) durante 30 min a 4°C. Después de cada incubación, se lavaron 2 veces con PBS-BSA-azida y se incubaron nuevamente durante 15 min a temperatura ambiente con la lectina ALL biotinilada a una concentración final de 0.1 μ g en 500 μ l de PBS-BSA-azida, por cada 1×10^6 células, se lavaron y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente con 10 μ l de estreptavidina-cychrome (dil 1:300) en 500 μ l de PBS-BSA-azida y se lavaron 2 veces con PBS-BSA-azida. Finalmente se resuspendieron en 500 μ l de solución salina con *p*-paraformaldehído al 1% y se analizaron en un citofluorómetro Becton & Dickinson (Mountain view, Ca, USA), utilizando el programa Cell Quest.

RESULTADOS

Expresión diferencial de Sialoglicoconjugados en Timo

La distribución de sialoglicoconjugados en cortes de timo de ratones control y tratados con dexametasona, fue evaluada con dos lectinas: *Sambucus nigra* (SNA) y *Maackia amurensis* (MAA), que reconocen de manera específica ácido siálico unido en posición $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$, respectivamente. Nuestros resultados mostraron que en el timo de los ratones control, SNA reconoce de manera preferencial timocitos de la corteza y algunas células de la zona cortico-medular (Figura 1a). La mayor parte de las células SNA+ fueron localizadas en la región media de la corteza tímica. En el caso de los timos provenientes de los ratones tratados con dexametasona, se observaron grupos de aproximadamente 10-15 células distribuidos por toda la corteza, incluyendo grupos más pequeños localizados en la zona subcapsular (Figura 2a); muchos de éstos grupos, contenían timocitos en apoptosis, como lo demuestra la presencia de cuerpos apoptóticos en los cortes seriados correspondientes teñidos con H-E (Figura 2 b). En contraste con lo anterior, los timocitos de los animales control, reconocidos por la lectina MAA se localizaron principalmente en la médula y en un porcentaje pequeño en la región cortico-medular, mientras que los timocitos de la corteza resultaron MAA-. El patrón de distribución de las células no se modificó con el tratamiento con dexametasona y no se observó ninguna correlación con la presencia de cuerpos apoptóticos (Figura 3 a,b). Ninguna de las células epiteliales o interdigitantes NLDC-145 positivas fueron reconocidas por las lectinas SNA o

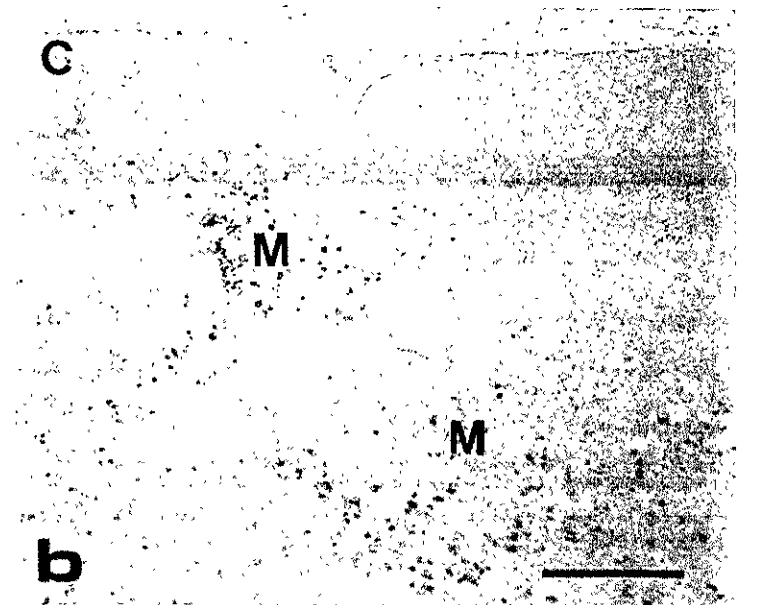
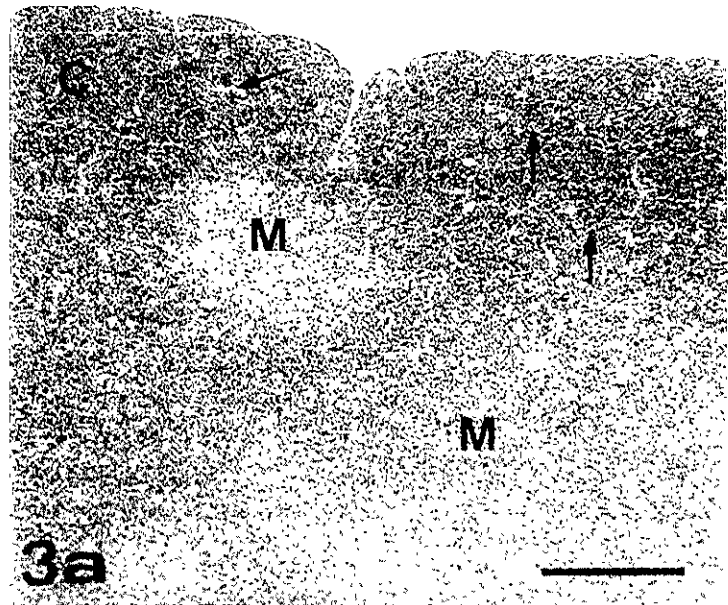
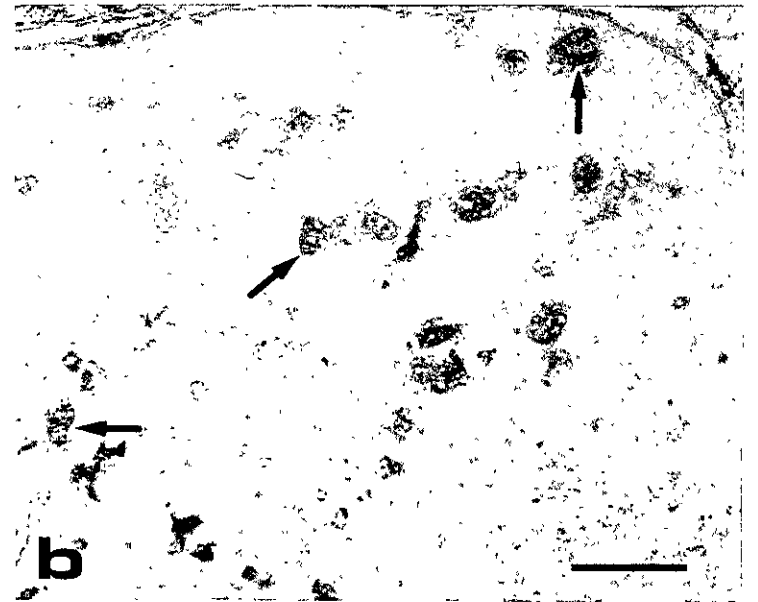
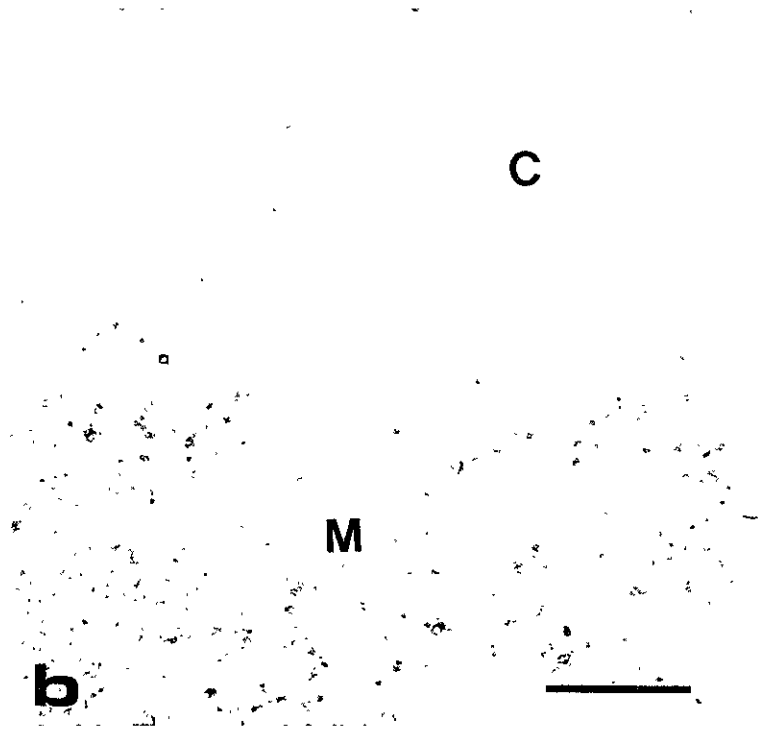
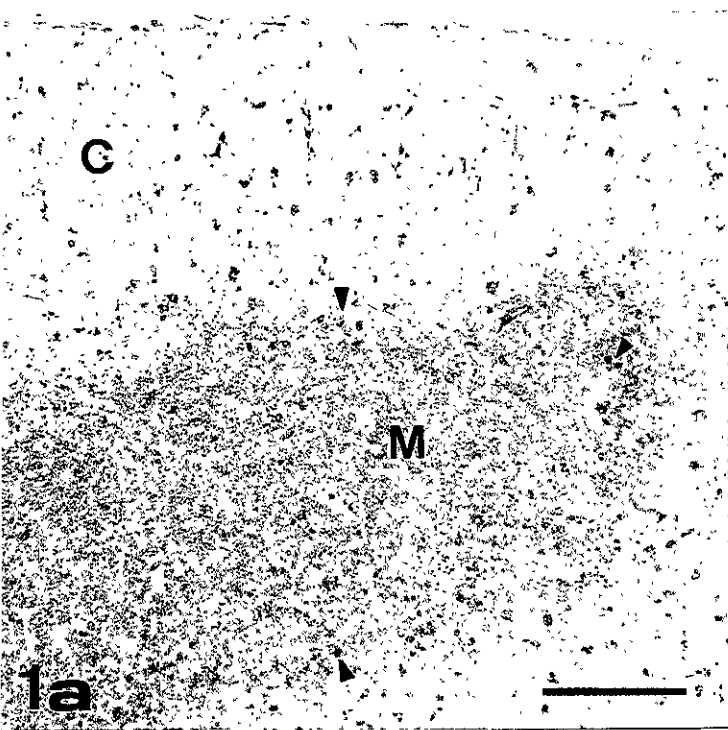


FIGURA 1. Localización por histoquímica con las lectinas SNA y MAA biotiniladas, de glicanos con ácido siálico unido en posición $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ en timocitos de ratones normales. Las lectinas se detectaron con extravidina-fosfatasa alcalina, utilizando NBT/BCIP como cromógenos. **a)** Las células SNA+ se localizaron preferentemente en la corteza del timo (C); aunque también se observaron en la región cortico-medular (\downarrow) y ocasionalmente en la médula (M). **b)** Las células reconocidas por la lectina MAA se localizaron principalmente en la médula y en la región cortico-medular.

FIGURA 2. Histoquímica con la lectina SNA, en un corte del timo de un ratón tratado con dexametasona. Correlación entre timocitos en proceso de apoptosis y células SNA+ en cortes seriados de timo de ratones tratados con dexametasona. **a)** Grupos de cuerpos apoptóticos distribuidos extensamente en la corteza de del timo. Corte teñido con HE (\downarrow). **b)** Acúmulos de células SNA+ (\downarrow) que correlacionan con las células en proceso de apoptosis en los cortes teñidos con HE.

FIGURA 3. Histoquímica con la lectina MAA de un corte del timo de un ratón tratado con dexametasona. No se observó correlación entre las células MAA+ y la distribución de células apoptóticas detectadas en el corte teñido con HE (**a**). El patron de distribución de las células MAA+ no se modificó después del tratamiento con dexametasona (**b**).

MAA y no se observó ninguna diferencia en la distribución de dichas células en los cortes de timo provenientes de ratones control con respecto de los tratados con dexametasona.

Actividad de GalNAc Transferasas de Timocitos Murinos.

Cuando se utilizó el péptido AP como sustrato, la incorporación de GalNAc fue 6 veces superior (84.0 ± 0.6 nmol GalNAc/h/mg proteína) con microsomas de timocitos de ratones control, que con microsomas de timocitos provenientes de ratones tratados con dexametasona (14.0 ± 0.7 nmol GalNAc/h/mg proteína) (Fig. 4 a). Los microsomas de timocitos provenientes de ratones control, incorporaron 11.0 ± 0.6 y de 4.9 ± 1.7 nmol GalNAc/h/mg proteína en los péptidos M y N respectivamente; mientras que las fracciones microsomales de timocitos provenientes de ratones tratados con dexametasona no mostraron actividad de GalNAc transferasas en presencia de estos péptidos (Tabla 2).

Actividad de GalNAc Transferasas de Timocitos ALL+ y ALL-

La separación de los timocitos ALL+ (maduros) y ALL- (inmaduros) se llevó a cabo por aglutinación selectiva con la lectina ALL. Posteriormente se evaluaron las modificaciones de la O-glicosilación, determinando la actividad de las GalNAc transferasas en fracciones microsomales de células tímicas ALL+ y ALL-, bajo las mismas condiciones utilizadas anteriormente. Cuando se utilizó el péptido AP como aceptor y la fracción microsomal de timocitos ALL- como fuente de las GalNAc transferasas, la incorporación de GalNAc al sustrato fue dos veces mayor (77.8 ± 7.7 nmol GalNAc/h/mg proteína) en relación a la tasa de incorporación observada al utilizar los microsomas de timocitos ALL+ (30.9 ± 0.4 nmol

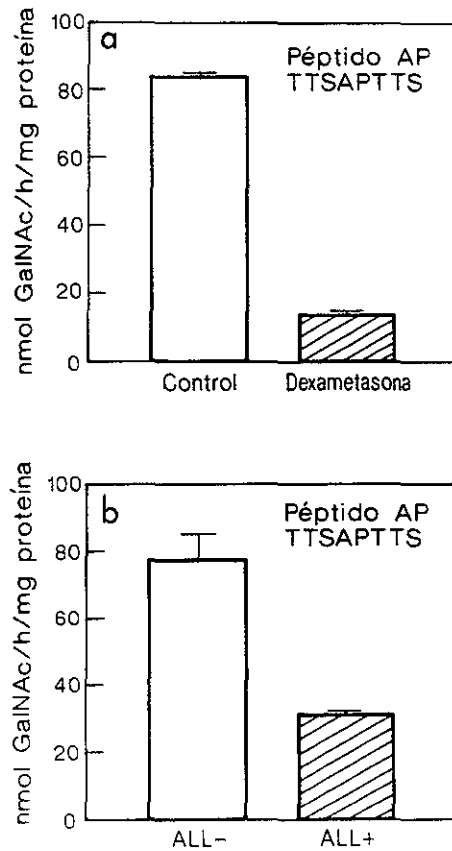


FIGURA 4. Incorporación de GalNAc al péptido sintético AP por acción de las GalNAc transferasas de microsomas obtenidos de timocitos de ratones control y tratados con dexametasona (**a**) y de subpoblaciones de timocitos murinos maduros (ALL+) e inmaduros (ALL-), separadas por aglutinación selectiva con la lectina de la semilla de *A. leucocarpus* (**b**). El octapéptido AP corresponde a una secuencia repetida en tándem de una región altamente glicosilable de la mucina estomacal humana codificada por el gen MUC 5AC (Guyonnet-Duperat et al, 1995).

GalNAc/h/mg proteína) (Figura 4 b). Al igual que en la determinación de la actividad de las transferasas de timocitos de animales control o tratados con dexametasona, las GalNAc transferasas de las fracciones microsomales de timocitos ALL+ y ALL- fue inferior cuando se utilizó como sustrato el péptido del grupo sanguíneo N y mínima o indetectable, al utilizar como aceptor al péptido M (Tabla 2). Estos resultados indican que el proceso de glicosilación por parte de las transferasas de los timocitos estudiados es mas específica para los péptidos AP.

Tabla 2.

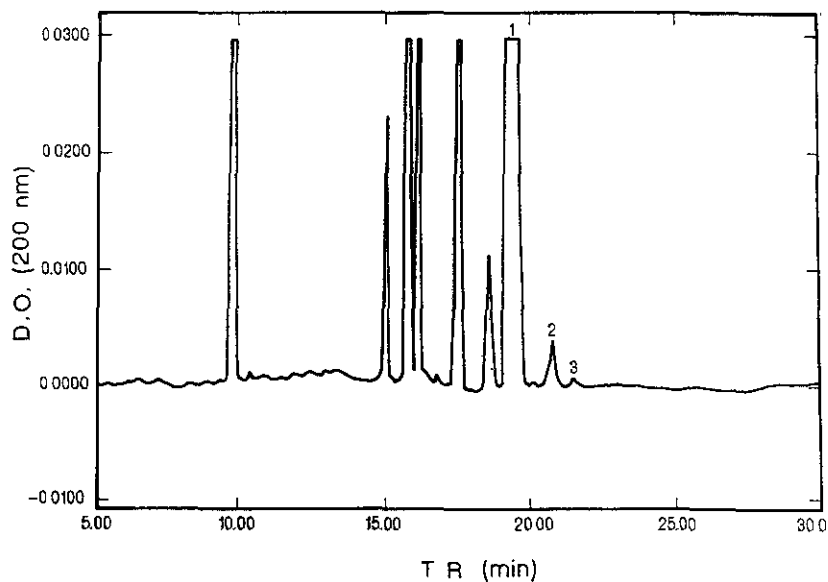
Incorporación de GalNAc a los péptidos M y N, utilizando diferentes fracciones microsomales de timocitos murinos como fuente de GalNAc transferasas.

| Fracción Microsomal | Péptido M SSTGVAM | Péptido N LSTTEVAM |
|---------------------|----------------------|-----------------------|
| Control | 4.9 ± 1.7 | 11.0 ± 0.61 |
| Dexametasona | 0.1±0.05 | 0.66 ± 0.06 |
| ALL+ | 1.4±0.2 | 2.08 ± 0.62 |
| ALL- | 3.8 ± 1.3 | 9.21 ± 3.11 |

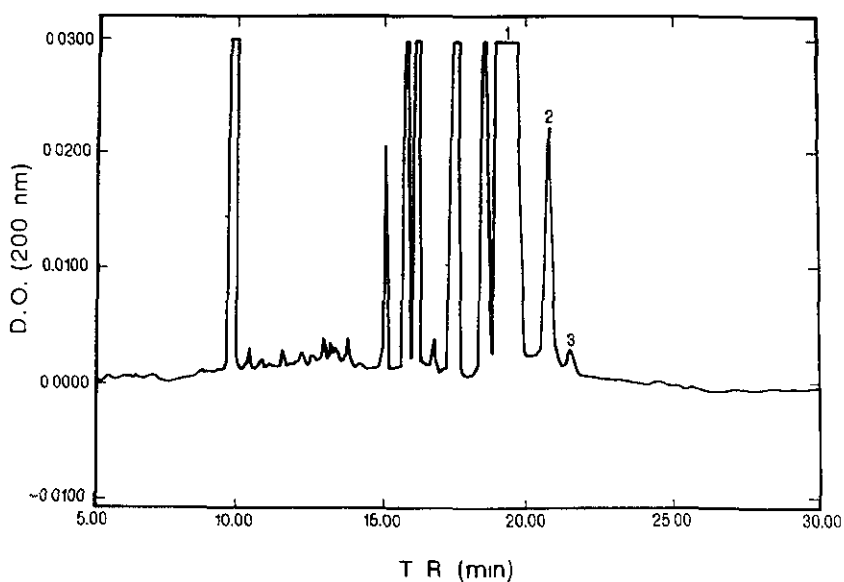
* La actividad de las GalNAc transferasas está expresada en nmol/h/mg proteína

Electroforesis Capilar

La separación e identificación de los productos de la O-glicosilación se efectuó por electroforesis capilar, en las muestras de microsomas de timocitos utilizando como sustrato solo el péptido AP. En el caso de las muestras de los ratones control, la fracción correspondiente al péptido no glicosilado se observó a un tiempo de retención de 19.6 ± 0.3 min y se detectaron dos picos más a tiempos de retención de 21.4 ± 0.4 y 22.2 ± 0.2 min, que correspondían a los péptidos mono y diglicosilados respectivamente, de acuerdo con el tiempo de retención mostrado por péptidos glicosilados estándares (Fig. 5 A).



A



B

FIGURA 6. Electroforogramas del péptido AP, O-glicosilado por microsomas de timocitos murinos aislados por aglutinación selectiva con la lectina ALL. Fracciones microsomales de células ALL+ (**A**); y ALL- (**B**). La electroforesis capilar se llevó a cabo en un sistema P/ACE modelo 5000. La absorbancia UV fue monitoreada a 200 nm. Las electroforesis se efectuó a 23°C, utilizando una solución de ácido fórmico 2N y el voltaje a través del capilar se mantuvo a 20 kV, durante 30 min. Los números 1, 2 y 3 indican la posición del péptido AP y de los péptidos mono- y di-glicosilados respectivamente.

En las muestras de ratones tratados con dexametasona, los péptidos no glicosilados se detectaron a un tiempo de retención de 19.1 ± 0.5 min, mientras que con los péptidos mono y diglicosilados se observaron a tiempos de retención de 20.9 ± 0.1 y 21.7 ± 0.2 min respectivamente (Fig. 5 B). La proporción de péptidos monoglicosilados fue dos veces mayor en las muestras de ratones control con respecto de las obtenidas de los animales tratados con dexametasona, mientras que la proporción de péptidos diglicosilados fue muy similar en ambos casos (Tabla 3).

En el caso de las muestras que contenían microsomas de timocitos ALL+ los péptidos mono y diglicosilados se observaron a tiempos de retención de 20.8 ± 0.2 y 21.5 ± 0.2 min, mientras que los péptidos no glicosilados se detectaron a un tiempo de retención de 19.2 ± 0.3 min (Fig.6 A). De manera similar, en las muestras que contenían las fracciones microsomales de los timocitos ALL-, también se observaron dos picos correspondientes a los péptidos mono y diglicosilados a tiempos de retención de 20.7 ± 0.2 y 21.4 ± 0.1 min respectivamente, mientras que los péptidos no glicosilados se detectaron a un tiempo de retención de 18.8 ± 0.3 min (Fig 6 b). La proporción de péptidos monoglicosilados fue 6 veces mayor en las muestras de timocitos ALL- con respecto a las células ALL+; mientras que la proporción de péptidos diglicosilados fue 4 veces superior en las muestras de los timocitos ALL- en relación a la evaluada en las células ALL+ (Tabla 3).

Tabla 3.

Proporción de péptidos mono y diglicosilados por fracciones microsomales de timocitos obtenidos de ratones control y tratados con dexametasona, así como de timocitos ALL+ y ALL-

| Fracciones Microsomales de Timocitos | Péptidos Monoglicosilados * | Péptidos Diglicosilados * |
|---|------------------------------------|----------------------------------|
| Control | 1.27 | 0.30 |
| Dexametasona | 0.66 | 0.28 |
| ALL+ | 0.53 | 0.11 |
| ALL- | 3.37 | 0.49 |

*La proporción de péptidos mono y diglicosilados se expresa como el área bajo la curva de los picos correspondientes a cada uno de ellos después de la separación e identificación por electroforesis capilar.

Determinación del Fenotipo de las Células ALL+

Se realizó un análisis por citometría de flujo de una subpoblación de células murinas (R1) provenientes de ratones control o tratados con dexametasona, la cual por tamaño y complejidad corresponde a linfocitos (Fig. 7A). A esta subpoblación se le caracterizó fenotípicamente utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD4, anti-CD8 y su reactividad con ALL, determinando el porcentaje de células doble negativas (CD4-CD8-), doble positivas (CD4+CD8+), y CD4+ o CD8+ (Fig. 7 B), así como el porcentaje de las células reconocidas por la lectina de amaranto (ALL+) considerando además la media de la intensidad de fluorescencia (IF) de las células ALL+.

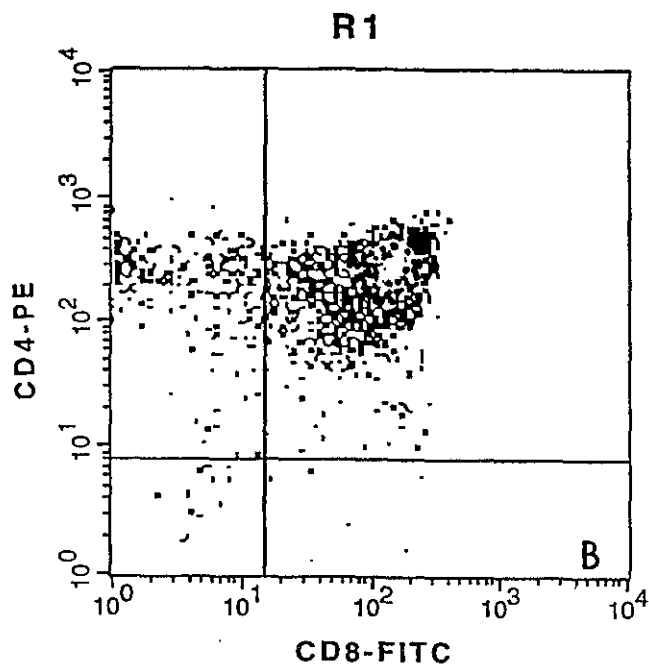
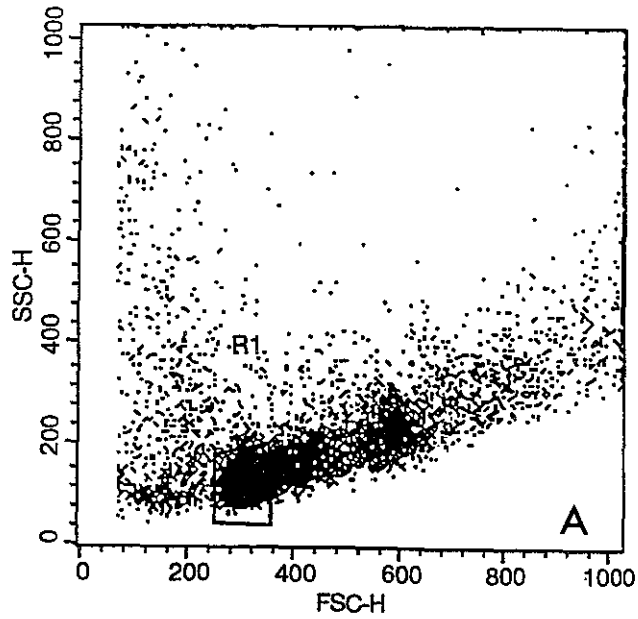


FIGURA 7. Caracterización fenotípica de los timocitos obtenidos de ratones control o tratados con dexametasona por citometría de flujo. **A)** Se seleccionó la población celular que por su tamaño (FSC) y complejidad interna (SSC) corresponderían a la población de linfocitos (R1). **B)** La caracterización fenotípica de los timocitos se llevó a cabo utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD4 y CD8, acoplados a ficoeritrina (PE) o a isotiocianato de fluoresceína (FITC) respectivamente, para determinar el grado de maduración de las células.

Análisis de la Subpoblación Celular R1

En los timocitos CD4-CD8-, provenientes de ratones control, el porcentaje de células ALL+ fue del 0.1% mientras que el de las células obtenidas de ratones sacrificados a las 3 y a las 5 h después de haberles aplicado la dexametasona fue de 0.35% y de 0.19%, respectivamente. La IF aumentó notablemente en ambos casos (Tablas 3 y 4). El mayor porcentaje de células ALL+ se identificó en los timocitos DP. En las células DP provenientes de los ratones control, el porcentaje de células ALL+ fue del doble con respecto a las obtenidas de los ratones sacrificados después de 3 h de la inyección con dexametasona; en cambio la proporción observada en los ratones que fueron sacrificados 5 h después del tratamiento, fue casi idéntica al control. El promedio de la intensidad de fluorescencia de las células ALL+, se incrementó un 98% en las células obtenidas 3 h después de aplicada la inyección con dexametasona y un 58% en las células obtenidas 5 h después del tratamiento (Tablas 3 y 4).

En los timocitos CD4+, el porcentaje de células ALL+ aumentó al doble en las células obtenidas después de 3 h del tratamiento en comparación con los ratones control; sin embargo, en los ratones sacrificados 5 h después de la inyección con dexametasona, el porcentaje de células ALL+ fue prácticamente el mismo al observado en los ratones control (2.01% vs 1.9%). También se detectó un incremento en la IF de alrededor del doble en las células ALL+ de los ratones sacrificados después de 3 h (90%) y 5 h (66%) posteriores a la inyección con dexametasona, con respecto a las provenientes de los ratones control (Tablas 3 y 4).

En relación con las células CD8+ reconocidas por ALL se observó un aumento de 3 y 15 veces el porcentaje de células a las 3 y a las 5 h después del tratamiento con dexametasona, respecto de los ratones control (Tabla 3). Fue interesante observar como la IF casi no se modificó en las células ALL+ de los ratones sacrificados después de 3 y 5 h de tratamiento con dexametasona en relación con las provenientes de los animales control (Tabla 4).

Tabla 3.

Timocitos ALL+ (%) de la subpoblación celular de menor tamaño y complejidad (R1), provenientes de ratones control o tratados con dexametasona.

| TIMOCITOS | % CELULAS ALL+ | | |
|-----------|----------------|-------|-------|
| | Control | 3 h | 5 h |
| CD4- CD8- | 0.10 | 0.35 | 0.19 |
| CD4+ CD8+ | 42.40 | 19.20 | 41.30 |
| CD4+ | 2.01 | 4.50 | 1.90 |
| CD8+ | 0.03 | 0.09 | 0.46 |
| TOTAL | 44.54 | 24.14 | 43.85 |

Tabla 4.

Promedio de la intensidad de fluorescencia de timocitos ALL+ R1, obtenidos de ratones control o después del tratamiento con dexametasona.

| TIMOCITOS | Promedio de la Intensidad de Fluorescencia (IF) | | |
|-----------|---|------|------|
| | Control | 3 h | 5 h |
| CD4- CD8- | 3.4 | 5.7 | 10.2 |
| CD4+ CD8+ | 36.0 | 71.5 | 57.2 |
| CD4+ | 27.5 | 52.3 | 45.7 |
| CD8+ | 32.2 | 29.2 | 45.2 |

DISCUSION

La diferenciación y la maduración de la gran mayoría de los linfocitos T se caracteriza no sólo por la expresión de los correceptores CD4/CD8, o el incremento en la densidad de expresión del receptor de linfocitos T (TCR), sino también por los cambios en los patrones de glicosilación, como hemos tratado de demostrar en este trabajo. La presencia de receptores sacarídicos como el antígeno T (Gal β 1,3 GalNAc α -1-O Ser/Thr) y Tn (GalNAc α -O Ser/Thr), tiene una particular importancia debido a que estas estructuras pueden ser modificadas por la adición de ácido siálico (NeuAc) originando variantes sialiladas de dichas estructuras. Se ha reportado que una de las modificaciones más importantes durante la maduración tímica es el incremento de ácido siálico en los glicoconjugados expresados en la superficie de los timocitos (Toporowicz and Reisner, 1986; Whiteheart et al., 1990) y la expresión de un derivado O-acetilado del ácido siálico (9-O-acetil-siálico, Neu5,9Ac), la cual también es regulada durante la maduración y activación de los linfocitos T (Krishna and Varki, 1997).

En este trabajo, evaluamos los cambios en los patrones de sialilación de timocitos en cortes de timo de ratones control y tratados con dexametasona, utilizando dos lectinas: la aglutinina de *Sambucus nigra* y la aglutinina de *Maackia amurensis* que reconocen de manera específica NeuAc α 2,6-Gal (Shibuya et al., 1987) y NeuAc α 2,3-Gal (Randall et al., 1991) respectivamente. Nuestros resultados confirmaron que el patrón de sialilación se modifica durante el proceso de maduración de los timocitos, ya que las células inmaduras de la corteza DN o DP fueron reconocidas por SNA, mientras que MAA se unió principalmente a los

timocitos CD4+ o CD8+, localizados en la médula. Sin embargo, en la región cortico-medular, se encontraron tanto células SNA+ como MAA+. Estos resultados sugieren que en los estadios iniciales de diferenciación muchos timocitos expresan en su superficie glicanos con ácido siálico unido en posición $\alpha 2,6$ y, conforme pasan a etapas posteriores de maduración el patrón de sialilación cambia expresando ácido siálico unido en posición $\alpha 2,3$, probablemente debido a la expresión de diferentes sialiltransferasas, que están siendo reguladas diferencialmente.

El tratamiento con glucocorticoides induce un proceso de muerte celular programada en timocitos inmaduros de la corteza y no así en los timocitos maduros de la médula (Roelants et al., 1979; Boyer and Rothenburg, 1988). Nuestros resultados mostraron grupos de timocitos en proceso de apoptosis en la corteza de cortes de timo de ratón tratados con dexametasona. Los acúmulos de cuerpos apoptóticos de estos timocitos fueron similares a los observados por Fehsel et al. (1994) utilizando técnicas de microscopía electrónica y "nick-translation" *in situ*. No se observaron diferencias respecto al patrón de distribución de las células MAA+ (Neu5Ac $\alpha 2,3$) entre los animales normales y los tratados con dexametasona. Sin embargo, se observó una correlación entre los acúmulos de cuerpos apoptóticos observados en los cortes de timo teñidos con HE y los timocitos corticales SNA+ de los animales tratados con dexametasona. Estos resultados demuestran la existencia de una subpoblación celular de timocitos inmaduros que expresa estructuras con ácido siálico en posición $\alpha 2,6$ en

sus glicoconjugados de superficie y, sugieren que dicha subpoblación corresponde a timocitos sensibles al tratamiento con dexametasona, en proceso de apoptosis.

La transferencia de ácido siálico a los extremos terminales de los glicolípidos y las glicoproteínas está catalizada por una familia de sialiltransferasas y se requieren mas de 12 sialiltransferasas diferentes para sintetizar todas las estructuras oligosacáridicas sialiladas conocidas (Harduin-Lepers et al., 1995). Se ha demostrado que los glucocorticoides, como la dexametasona incrementan la actividad de la β -Gal α 2,6-sialiltransferasa, incrementando las estructuras NeuAc(α 2,6)Gal de glicoproteínas aisladas de líneas celulares tratadas con dexametasona (Vandamme et al., 1993). No se puede descartar por lo tanto, la posibilidad de que el incremento en la adición de residuos de NeuAc en posición α 2,6 se deba a la modificación específica de alguna sialiltransferasa en la subpoblación de timocitos sensibles al tratamiento con dexametasona, aunque no tenemos evidencias del significado biológico de las sialoglicoproteínas en la maduración, crecimiento, selección y activación de las células T (Hintzen et al., 1993; Gallart et al., 1997; Milner et al., 1997).

La modificación de las estructuras sacarídicas que se encuentran en las proteínas de membrana está regulada, de manera específica, en diferentes células y tejidos por la expresión de distintas glicosil-transferasas. Esta expresión sufre cambios característicos durante el desarrollo, la diferenciación celular, y la transformación oncogénica (Singhal et al., 1990; Dinter, 1995; Osako et al., 1993). En el caso particular del desarrollo de las células T en el timo, se ha demostrado que los patrones de glicosilación y la expresión de algunas glicosiltransferasas

también se modifica durante la diferenciación y la maduración de los timocitos (Wu et al., 1997; Gillespie et al., 1993)

Una de las formas de glicosilación que ocurre más frecuentemente en las células de los vertebrados es la O-glicosilación, que se inicia por la transferencia de GalNAc a las cadenas laterales de los residuos de serina o treonina presentes en diferentes polipéptidos. Esta reacción está mediada por las GalNAc-transferasas, cuya actividad ha sido evaluada en una gran variedad de órganos, así como en diferentes líneas celulares y hasta ahora, no se ha encontrado ningún tipo de célula animal que carezca de dicha actividad (Clausen and Bennett, 1996).

La identificación de los péptidos aceptores presentes en regiones altamente glicosilables de algunas mucinas (Gum et al., 1991; Guyonnet-Duperat et al., 1995) ha permitido la realización de estudios utilizando péptidos sintéticos como sustrato para evaluar la actividad de GalNAc transferasas obtenidas de distintas fuentes. Estos trabajos han mostrado que el uso de estos aceptores sintéticos constituye un modelo experimental extremadamente útil para estudiar las reacciones de O-glicosilación (Young et al., 1979; Brockhausen et al., 1996; Hennebicq-Reig et al., 1996).

Con el objeto de evaluar la actividad de estas enzimas en fracciones microsomales obtenidas de timocitos murinos, se utilizaron tres diferentes péptidos como aceptores de GalNAc. Como se indica en los resultados, solamente el péptido AP (TTSAPTTS) resultó ser un buen aceptor, incorporando 7 y 15 veces más GalNAc que los péptidos M (SSTTGVAM) y N (LSTTEVAM), respectivamente. Estudios de O-glicosilación in vitro utilizando como sustrato diferentes péptidos derivados de secuencias repetidas en tandem de las mucinas

gástricas humanas codificadas por los genes MUC5 y fracciones microsomales de mucosa gástrica humana, demostraron que la presencia de residuos de prolina en sitios cercanos a treoninas potencialmente glicosilables, incrementaba el reconocimiento de las GalNAc transferasas por los péptidos (Henebicq et al. 1997). Tomando en cuenta lo anterior, consideramos que la disminución en la incorporación de GalNAc a los péptidos M y N podría explicarse por la ausencia de residuos de prolina en dichos péptidos.

Con el objeto de determinar si existían diferencias en el proceso de O-glicosilación en diferentes etapas de maduración de los timocitos, se utilizaron timos de ratones tratados con dexametasona y se evaluó la actividad de las GalNAc transferasas de las fracciones microsomales obtenidas de timocitos de estos animales. Cuando se utilizó el péptido AP como aceptor, la actividad de las GalNAc transferasas fue 6 veces mayor en los timocitos de los ratones control con respecto a los provenientes de ratones tratados con dexametasona (Fig. 3 A), sugiriendo que los timocitos más maduros, resistentes al tratamiento con dexametasona, presentan una actividad de las GalNAc transferasas inferior a la de los timocitos inmaduros de la corteza.

Las lectinas han resultado herramientas muy útiles para el aislamiento y estudio de subpoblaciones celulares, debido a su gran especificidad en el reconocimiento de diferentes oligosacáridos (Reisner and Sharon, 1984; Hellström et al., 1984; De Dios et al., 1986). La lectina *Amaranthus leucocarpus* (ALL) que interactúa específicamente con el núcleo interno de O-glicanos (Zenteno et al., 1992), reconoce principalmente timocitos en los últimos estadios de maduración (Lascurain et al., 1994). Con el objeto de corroborar los resultados anteriores, se

separaron las células tímicas con la lectina ALL y se evaluó la actividad de las GalNAc transferasas en los timocitos ALL- y ALL+. Cuando se utilizó el péptido AP, la actividad de las GalNAc transferasas en los timocitos ALL- fue superior al doble que la observada en las células ALL+. La subpoblación de timocitos ALL-, estaba constituida por células corticales, y correspondía aproximadamente al 85-90% de la población total obtenida de los ratones control, mientras que el 5-10% restante estaba representado por los timocitos maduros de la médula (Lascurain, et al., 1994). La actividad de las GalNAc transferasas de los timocitos totales de los ratones control fue muy similar a la observada en las células ALL-; sin embargo la actividad resultó ser un 50% menor en los timocitos ALL+. Al utilizar los péptidos M y N, a pesar de que no eran buenos aceptores para las GalNAc transferasas, se observó un comportamiento semejante, entre los timocitos provenientes de ratones control y las células ALL-, mientras que en los timocitos ALL+ no se detectó actividad de GalNAc transferasas (Tabla 2).

El tratamiento con dexametasona tenía como propósito eliminar a los timocitos inmaduros de la corteza (Cohen and Duke, 1984) para obtener una población de células en las últimas etapas de maduración, similar a la aislada con la lectina de *Amaranthus leucocarpus*. Cuando se utilizó el péptido AP como aceptor, la actividad de las GalNAc transferasas de microsomas provenientes de timocitos ALL+ fue del doble en relación a la observada con los microsomas de los timocitos resistentes al tratamiento con dexametasona. Esta diferencia podría explicarse por el hecho de que la lectina ALL reconoce también un porcentaje de timocitos CD4+CD8+ (dobles positivos, DP), localizados en la región cortico-medular (Lascurain et al., 1994), algunos de los cuales probablemente fueron

eliminados en la población total por el tratamiento con dexametasona, ya que ésta afecta de manera importante a la subpoblación de timocitos DP (Roelants, 1979). El conjunto de los datos anteriores, obtenidos bajo nuestras condiciones experimentales, demuestra que la actividad de las GalNAc transferasas en los timocitos inmaduros de la corteza es mayor con respecto a las células más diferenciadas de la médula y sugiere que la regulación de la O-glicosilación podría estar asociada al proceso de diferenciación de los linfocitos T.

La electroforesis capilar es una técnica que permite una separación rápida, con alta resolución, y buena cuantificación (Karger and Foret, 1993), por lo que resulta una herramienta muy útil para analizar los productos O-glicosilados (Hennebicq-Reig et al., 1997). Esta técnica electroforética se utilizó para establecer diferencias en la O-glicosilación del péptido AP por las diferentes fracciones microsomales empleadas y permitió detectar, en todos los casos, la existencia de dos fracciones correspondientes a los péptidos con una (monoglicosilados) o con dos moléculas de GalNAc (diglicosilados). Sin embargo, la proporción de péptidos monoglicosilados fue dos veces mayor en las muestras provenientes de los ratones control en relación con las obtenidas de los animales tratados con dexametasona, mientras que la proporción de péptidos diglicosilados fue muy similar en ambas. Estos datos sugieren que la monoglicosilación de este péptido es más activa en los timocitos inmaduros. Por otra parte, en las muestras que contenían microsomas de timocitos ALL-, la proporción de péptidos mono y diglicosilados fue 6 y 4 veces mayor respectivamente, en relación a las de los microsomas de timocitos ALL+. Estos resultados demuestran que la O-glicosilación del péptido utilizado también es distinta en las células inmaduras con

respecto a aquellas en los últimos estadios de maduración. La diferencia más notable reside en que la monoglicosilación es mas intensa con las fracciones microsomales de timocitos corticales, inmaduros ALL-, mientras que al efectuar las incubaciones en presencia de los microsomas de los timocitos maduros ALL+ la proporción de péptidos monoglicosilados es seis veces menor. La proporción de péptidos diglicosilados es inferior a la de los péptidos monoglicosilados tanto en las muestras que contenían microsomas de timocitos ALL+, como en las que se emplearon fracciones microsomales de timocitos ALL-, sin embargo, la adición de una segunda molécula de GalNAc al péptido aceptor ocurre también en mayor proporción con las fracciones microsomales de los timocitos ALL-.

Ensayos realizados *in vitro* (Brockhausen et al.,1996) utilizando como sustrato una serie de péptidos sintéticos que contenían secuencias repetidas de una región de la mucina MUC2 y una GalNAc transferasa purificada del calostro bovino, mostraron que la presencia de una treonina glicosilada en el péptido aceptor, disminuía la actividad de la enzima, haciendo más difícil la adición de una segunda molécula de GalNAc en otra treonina adyacente o cercana. Es posible, por lo tanto, que la diferencia en la proporción de péptidos mono y diglicosilados se debiera a que la presencia de una molécula de GalNAc en el péptido aceptor hiciera más difícil la segunda glicosilación, aunque hay que considerar que los ensayos de O-glicosilación *in vitro* se efectuaron con preparaciones microsomales que contenían potencialmente todas las GalNAc transferasas que podrían estar involucradas en la primera etapa de esta reacción. En este sentido, un gran número de evidencias sustentan la existencia de una familia de GalNAc

transferasas con diferente especificidad por el sustrato aceptor, codificadas por genes independientes, cuya expresión está regulada de manera diferencial en distintos tipos celulares, así como durante los procesos de diferenciación celular (Clausen and Benett, 1996). La O-glicosilación en células secretoras de mucinas (HT-29MX), sugieren que la diferenciación celular está asociada a la regulación de los procesos de glicosilación en general y que, los estados de crecimiento y diferenciación de las células tienen influencia en los procesos de O-glicosilación (Hennebicq-Reig et al., 1997). Por lo tanto, no se puede descartar la posibilidad de que sean diversas GalNAc transferasas involucradas en los procesos de O-glicosilación de los timocitos y que existan mecanismos de regulación asociados a los procesos de diferenciación de estas células.

En relación a los resultados obtenidos al determinar el fenotipo de las células tímicas reconocidas por ALL, y de acuerdo a parámetros bien establecidos de citofluorometría (Training Manual, Beckton & Dickinson, 1995), se seleccionaron las células que por su tamaño y granularidad corresponderían a timocitos. El análisis de marcadores de superficie, que nos permiten evaluar diferentes estadios de madurez, corroboraron la presencia de timocitos CD4⁺ CD8⁺ (DP), así como de células CD4⁺ o CD8⁺. En los ratones control encontramos que la mayoría de las células ALL⁺ (42%) eran DP, el porcentaje de CD4⁺ fue del 2.01 y el de CD8⁺ fue de 0.03. Estas cifras mostraron variaciones importantes al analizar las células ALL⁺ obtenidas de ratones tratados con dexametasona, la cual elimina células inmaduras de la corteza. Las poblaciones celulares obtenidas 3 h después de haber tratado al animal con dexametasona mostraron una importante disminución en el porcentaje de células DP y un importante aumento en el porcentaje de

timocitos CD4+ (100%) y CD8+ (300%); al analizar las células aisladas 5 h después del tratamiento con dexametasona, observamos que el porcentaje de timocitos DP y CD4+ era similar al obtenido en los ratones control, a diferencia del porcentaje de células CD8+ que mostró un incremento de 15 veces con respecto al control. Llama mucho la atención el hecho de que al evaluar la IF de estas células, que de alguna manera traduce la cantidad de receptores expresados en la superficie de las células analizadas, aumenta notablemente en las células CD4+, mientras que en las CD8+ se mantiene prácticamente constante después de 3 h y aumenta discretamente 5 h después del tratamiento con el glucocorticoide.

En resumen, todos estos resultados sugieren que el proceso de glicosilación que se inicia en los timocitos de la corteza, que son DP, esta asociado con aquella subpoblación particularmente del fenotipo CD4 que sobrevive al proceso de apoptosis al cual están sujetas la mayoría de las células DP que ya sea de manera interna o inducida experimentalmente, están en contacto con glucocorticoides. Este probable mecanismo de protección que se observa en las células con mayor actividad de GalNAc transferasas y se traduce en una mayor IF, también está sujeto a los cambios en los patrones de sialilación, lo que sugiere que la función de las células epiteliales y/o dendríticas del timo va más allá de la presentación de antígenos a timocitos con TCRs de mediana afinidad, que son los que se sabe logran sobrevivir a los procesos de apoptosis.

CONCLUSIONES:

1. La expresión de ácido siálico en posición α -2,6 ocurre principalmente en las células localizadas en la corteza tímica (SNA⁺), mientras que las células que expresan glicanos que contienen ácido siálico en posición α -2,3 (MAA⁺) se localizan en la médula.
2. Existe una correlación entre el patrón de distribución de los timocitos corticales que expresan ácido siálico en posición α -2,6 y la localización en la corteza tímica de cuerpos apoptóticos generados por el tratamiento con dexametasona.
3. La distribución de las células reconocidas por la lectina MAA no se ve alterada por el tratamiento con dexametasona y la expresión de ácido siálico en posición α -2,3 no correlaciona con los cuerpos apoptóticos observados.
4. Los timocitos sensibles a dexametasona presentan una mayor actividad de las GalNac transferasas.
5. La O-glicosilación es diferente en corteza y en médula.
6. El proceso de maduración de los timocitos está relacionado con un aumento en los receptores que reconoce la lectina de *Amaranthus leucocarpus*.
7. La mayoría de los timocitos ALL⁺ mantienen el fenotipo CD4⁺ durante el proceso de maduración.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. (1999). Cellular and Molecular Immunology W.B. Saunders Company. USA, 457 pp.
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, D. (1994). Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., New York & London, Tercera edición, 1294 pp.
3. Alroy, J., Goyal, V., and Skuteski, E. (1987). Lectin histochemistry of mammalian endothelium. Histochemistry 603 – 607.
4. Anderson et al., (1996). Cellular interactions in the thymocyte development. Annu. Rev. Immunol. 14: 73 - 99
5. Ashwell, J.D. (1994). Coming to terms with death: apoptosis in cancer and immune development. Immunol. Today. 15: 147 - 151.
6. Audié, J. P. Janine, A., Porchet, N., Coping, M. C., Gosselin, B. and Aubert, J. P. (1993). Expression of Human mucin genes in respiratory, digestive and reproductive tracts ascertained by *in situ* hybridization. J. Histochem. Cytochem. 41: 1479 – 85.
7. Berger, E.G. and Hesford, F. J. (1985). Localization of galactosyl-sialyltransferase by immunofluorescence: evidence for different sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 4736 – 39.
8. Boyer, P.D. and Rothenburg, E.V. (1988) IL-2 receptor inductibility is blocked in cortical type thymocytes. J. Immunol. 140: 2886-92.
9. Brockhausen, I., Toki, D., Brockhausen, J., Peters, S., Bielfeldt, T., Kleen, A., Paulsen, H., Meldal, M., Hagen, F. and Tabak, L. A. (1996). Specificity of O-glycosylation by bovine colostrum UDP-GalNAc: polypeptide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase using synthetic glycopeptide substrates. Glycoconj. J. 13 (5): 849 - 856.
10. Burdin, N. and Kronenberg, M. (1999). CD1 – mediated immune responses to glycolipids. Curr. Opin. Immunol. 11: 326 – 331.
11. Calderó, J., Campo, E. Calomarde, X. and Torra, M. (1988). Distribution and changes of glycoconjugates in rat colonic mucosa during development. Histochemistry. 90: 261 – 270.
12. Cantrell, D. and Smith, K. (1983). Transient expression of interleukin 2 receptors. The J. Exp. Med. 158:1895-1911.
13. Carraway, K. L. and Hull, S. R. (1991). Cell surface mucin-type glycoprotein and mucin like domains. Glycobiology. 1: 131 - 138.

14. Clausen, H. and Bennett, E.P. (1996). A family of UDP –GalNac: polypéptide N-acetylgalacosamyl—transferase control the initiation of mucin type O-linked glycosylation. *Glycobiology*. 6: 635 – 646.
15. Chapman, B. S., Eckart, M. R., Kaufman, S. E. and Lapointe, G. R. (1996). O-linked oligossacharide on the 75 kDa neurotrophin receptor. *J. Neurochem*. 66:1707 - 16.
16. Cohen, J. J. (1993) Apoptosis. *Immunol. Today*. 14: 126 - 130.
17. Cohen, J.J. and Duke, R.C. (1992). Apoptosis and prograded death cell in immunity. *Ann. Rev. Immunol*. 10: 267 - 293.
18. Cohen, J.J. and Duke, R.C. (1984). Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol*. 132: 38 - 42.
19. De Dios, I., Manso, M., León, V. and López Borrasca, A. (1986). Separation of human lymphocyte subclasses by rosettes with latex-lectin particles. *Biochem. Med. Metab. Biol*. 35:12 -17.
20. De Maio, A., Lis, H., Gershoni, J. and Sharon, N. (1986). Indentification of glycoproteins that are receptores for peanut agglutinin on immature (cortical) mouse thymocytes. *FEBS Lett*. 194: 28 - 32.
21. Dinter, A. and Berger, E. G. (1995). EG.The regulation of cell- and tissue-specific expression of glycans by glycosyltransferases. *Adv. Exp. Med. Biol*. 376: 53 - 82.
22. Duan, L., Gan, H., Arm, J. and Remold, H.G. (2001). Cytosolic phospholipase A2 participates with TNF –alpha the induction of apoptosis of human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J. Immunol*. 166: 7469 – 76.
23. Farbman, A.I. (1968). Electron microscope study of the palate fusion in mouse embryos. *Dev. Biol*. 18: 93-116.
24. Finkel, T.H., Marrack, P., Kappler, J.W., Kubo, R.T. and Cambier, J.C. (1989) $\alpha\beta$ T cell receptor and CD3 transduce different signals in immature T cells. Implications for selection and tolerance. *J. Immunol*. 142: 3006 – 12.
25. Fehsel, K., Kröncke, K., Kolb, H. and Kolb-Bachofen, V. (1994) *In situ* nick-translation detects focal apoptosis in thymuses of glucocorticoid- and lipopolisaccharide- treated mice. *J. Histochem. Cytochem*. 42: 613 - 619.
26. Forster, T.H., Allan, D.J., Gobe, G.C., Harmon, B., Walsh, T.P. and Kerr, J.F.R. (1992). Radiation from tracer doses of ^{32}P induces massive apoptosis in a Burkitt's lymphoma cell line. *Int. J. Radiat. Biol*. 3: 365 - 367.

27. Gallart, T., De la Fuente, M., Barcelo, J., Alberola-Ila, J. and Lozano, F. (1997). Desialylation of T lymphocytes overcomes the monocyte dependency of pokeweed mitogen-induced T-cell activation. *Immunology*. 90: 57 - 65.
28. Gillespie, W., Paulson, J.C., Kelm, S., Pang, M. and Baum, L.G. (1993). Regulation of alpha 2,3- sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin (PNA)+ to PNA- phenotype in developing thymocytes. *J. Biol. Chem.* 268: 3801 - 04.
29. Godfrey, D. and Zlotnik, A. (1993). Control points in early T-cell development. *Immunol. Today*. 14: 547 - 553.
30. Gorocica, P., Lascrain, R., Hernández, P., Porras, F., Bouquelet, S., Vázquez, L. and Zenteno, E. (1998). Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine peritoneal macrophages. *Glycoconj. J.* 15: 809 - 814.
31. Gum, J.R. Jr., Hicks, J. W., Lagace, R. E., Byrd, J. C., Toribara, N.W., Siddiki, B., Fearney, F. J., Lampert, D. T. and Kim, Y.S. (1991). Molecular cloning of rat intestinal mucin. Lack of conservation between mammalian species. *J Biol. Chem.* 266(33): 22733-8.
32. Guyonnet Duperat, V., Audie, J.P., Debailleul, V., Laine, A., Buisine, M. P., Galiegue-Zouitina, S., Pigny, P., Degand, P., Aubert, J.P. and Porchet, N. (1995). Characterization of the human mucin gene MUC5AC: a consensus cysteine-rich domain for 11p15 mucin genes?. *Biochem. J.* 305: 211 - 219.
33. Harduin - Lepers, A., Recchi, M.A. and Delannoy, P. (1995). 1994, the year of sialyltransferases. *Glycobiology*. 5: 741 - 758.
34. Harmon, B.V., Corder, R.J., Collins, G.C., Gobé, J., Allen, J., Alan, D.J. and Kerr, J.F.R. (1990) Cell death induced in a murine mastocytoma by 42-47°C heating in vitro: Evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. *Int. Radiat. Biol.* 58: 845 - 858.
35. Hellstrom, U., Hammarstrom, M.L., Hammarstrom, S. and Perlmann, P. (1984). Fractionation of human lymphocytes on *Helix pomatia* a hemagglutinin-sepharose and wheat germ agglutinin-sepharose. *Methods Enzymol.* 108: 153 - 68.
36. Helmbj, H., Jonsson, G. and Troye-Blomberg, M. (2000). Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Infect. Immun.* 68: 6087-89.
37. Hennebicq-Reig, S., Tetaert, D., Soudan, B., Kim, I., Huet, G., Briand, G., Richet, C., Demeyer, D. and Degand, P. (1997). O-Glycosylation and cellular differentiation in a subpopulation of mucin-secreting HT-29 cell line. *Exp. Cell. Res.* 235: 100 - 107.
38. Hennebicq-Reig, S., Soudan, B., Tetaert, D., Briand, G., Richet, C., Demeyer, D. and Degand, P. (1996). Capillary electrophoresis separation of mucin motif

- MUC 5AC glycopeptides from *in vitro* O- glycosylation reactions. *Carbohydr. Res.* 280: 125 – 126.
39. Hintzen, R.Q., de Jong, R., Lens, S.M., Brouwer, M., Baars, P. and van Lier, R.A. (1993). Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes. *J. Immunol.* 151: 2426 - 35.
 40. Iwata, M., Hanaoka, S. and Sato, K. (1991). Rescue of thymocytes and T cell hybridomas from glucocorticoid-induced apoptosis by simulation via the T cell receptor/CD3 complex: a possible *in vitro* model for positive selection for the T cell repertoire. *Eur. J. Immunol.* 21: 643 – 648.
 41. Ikuta, K., Uchida, N., Friedmann, J. and Weissman, IL. (1992). Lymphocyte development from stem cells. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 759 - 83.
 42. Jendrossek, V., Grassme, H., Mueller, I., Lang, F. and Gulbins, E. (2001). *Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis involves mitochondria and stress activated protein kinases. *Infect. Immun.* 69: 2675 – 83.
 43. Jurgen R. (1987). Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Acta* 906: 405 - 430.
 44. Kaku, H., Morini, Y., Goldstein, I. and Shibuya, N. (1993). Monomeric, monovalent derivative of *Maackia amurensis* leucoagglutinin. Preparation and application to the study of cell surface glycoconjugates by cytometry. *J. Biol. Chem.* 268:13237 - 41.
 45. Karger, B. L. and Foret, F. (1993). Guzman N. A. (ED.), *Capillary Electrophoresis Technology*. Marcel Dekker, New York, pp. 3 - 64
 46. Kerr, J.F.R. and Harmon, B.V. (1991). Definition and incidence of apoptosis: An historical Perspective. En: *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*, 1a. ed. Editado por: L. David Tomei y Frederick O. Cope. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. 5 - 29.
 47. Kerr, J.F.R., Harmon, B. and Searle, J. (1974). An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. *J. Cell. Sci.* 14: 571 - 585.
 48. Kerr, J.F.R. and J. Searle (1972). A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J. Pathol.* 107: 41 - 44.
 49. King, L.B., Vacchio, M.S., Hunziker, R., Margulies, D.H. and Ashwell, J.D. (1995). A targeted glucocorticoid receptor antisense transgene increases thymocyte apoptosis and alters thymocyte development. *Immunity.* 5: 647 – 656.
 50. Kornfeld, R. and Kornfeld, S., (1985). Assembly of asparagine – linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54: 631 – 664.

51. Krammer, P.H., Behrman, I., Bier, V., Daniel, P., Dhein, J., Falk, M. H., Garcin, G., Klas, C., Knipping, E., Lücking-Famira, K.M., Matzku, S., Oehm, A., Richards, S., Trauth, B.C., Bornkamm, G.W., Falk, W., Möller and Debatin, K.M. (1991). Apoptosis in the APO-1 system. En: Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death, 1a. ed. Editado por: L. David Tomei y Frederick O. Cope. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA., 87-99.
52. Krishna, M. and Varki, A. (1997). 9-O-Acetylation of Sialomucins: a novel marker of murine CD4 T Cells that Is Regulated during Maturation and Activation. J. Exp. Med. 185: 1997 – 2013.
53. Lai, R., Visser, L. and Poppema, S. (1991). Tissue distribution of restricted leucocyte common antigen. A comprehensive study with proteins and carbohydrate-specific CD45R antibodies. Lab. Invest. 64: 844 - 854.
54. Lascurain, R., Chávez, R., Gorocica, P., Pérez, A., Montaña, L. y Zenteno E. (1994). Recognition of a CD4+ mouse medullary thymocyte by *Amaranthus leucocarpus* lectin. Immunology. 83: 410 - 413.
55. Licastro F., Lizabeth, J. y Morini, M. (1993). Lectins and superantigens: Membrane interactions of these compounds with T lymphocytes affect immune responses. Int. J. Biochem. 25: 845 - 852.
56. Lis, H. and Sharon N. (1998). Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. Chem. Rev. 98: 637 - 674.
57. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folling phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 – 275.
58. Lydyard, P. y Grossi, C. (1997). Desarrollo del sistema inmunitario. En: Inmunología. Roitt, I., Brostoff, J. y Male, D. (Eds.) Cap. 10. Harcourt Brace. Madrid, España.
59. Male, D., Cooke, A., Owen, M., Trowsdale, J. and Champion, B. (1996). Advanced Immunology. Cap. 6: Leukocyte development. Mosby. Turin, Italy. P. 1 – 15.
60. Marth, J. D. (1996). Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. Glycobiology. 6: 701-705.
61. McCoy JP Jr. (1987). The application of lectins to the characterization and isolation of mammalian cell populations. Cancer Metastasis Rev. 6: 595-613.
62. McConkey, D. J., Hartzell, P., Duddy, S. K., Håkannsson, H. and Orrenius, S. (1988). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin kills immature thymocytes by Ca²⁺-mediated endonuclease activation. Science. 242: 256 - 259.
63. McGahon, A. J., Martin, S. J., Bissonnette, R. P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R. J., Nishioka, W. K. and Green, D. R. The end of (cell) line: methods for the

- estudy of apoptosis *in vitro*. In *Methods in Cell Biology*. Vol. 46. Schwartz, L. M. and Osborne, B. A. eds. Academic Press, USA (1996). pp 153 – 185.
64. Milner, C. M., Smith, S. V., Carrillo, M. B., Taylor, G. L., Hollinshead, M. and Campbell, R. D. (1997). Identification of a sialidase encoded in the human major histocompatibility complex. *J. Biol. Chem.* 272: 4549 - 58.
 65. Morrison, S.J., Uchida, N. and Weissman, I.L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11: 35 – 71.
 66. Morrison, S.J., Lagasse, E. and Weissman, I. L. (1994). Demonstration that Thy 1^{lo} subsect of mouse bone marrow that express high levels of lineage markers are not significant hemopoietic progenitors. *Blood.* 83: 3480 – 90.
 67. Mrkoci, K., Kelm, S., Crocker, P., Schauer R. and Berger, E. (1996). Constitutively hyposialylated human T-lymphocytes clones in Tn-syndrome: binding characteristics of plant and animal lectins. *Glycoconj. J.* 13: 567 - 573.
 68. Nesser, J.R., Koellreutter, B. and Wuersch, P. (1986). Oligomannoside-type glycopeptides inhibiting adhesion of *Escherichia coli* strains mediated by type 1 pili: preparation of potent inhibitors from plant glycoproteins. *Infect. Immun.* 52: 428-436.
 69. Nguyen Q. V., Knapp W. and Humpreys R. E. (1993). Characterization of the invariant chain C-terminus (Glu183-Glu193) epitope which is sylation site at Thr 104 results in generation of a soluble human transferring receptor. *Blood.* 83: 580-586.
 70. Nossal, G. J. V. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell.* 76: 229–239.
 71. Osako, M., Yonezawa, S., Siddiki, B., Huang, J., Ho, J. J., Kim, Y. S. and Sato, E. (1993). Immunohistochemical study of mucin carbohydrates and core proteins in human pancreatic tumors. *Cancer.* 71: 2191 – 99.
 72. Osborne, A. B. (1996). Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 245 – 254.
 73. O'Shea, J. D., Hay, M. F. and Cran, D. G. (1978). Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 54: 183 - 187.
 74. Peacock, J. S., Colsky, A. S. and Pinto, V. B. (1990). Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions. *J. Immunol. Methods.* 126: 147 - 157.
 75. Pepe, G., Siri, D., Oddon, Y., Pavia, A. and Reboul, J. P (1991). Conformational analysis of the amino termini (5 residues) of human glycoporphin A_M and A_N: differentiation of the structural features of the T_N and T antigenic determinants in relation to their specificity. *Carbohydr. Res.* 209: 67-81.
 76. Pilatte, Y., Bignon, J. and Lambré, C. R. (1993). Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. *Glycobiology.* 3: 201 – 208.

77. Porcelli, S. A. and Modlin, R. L. (1999). The CDI system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 297 – 329.
78. Powell, L.D. and Varki, A. (1994). The oligosaccharide binding specificities of CD22 beta, a sialic acid-specific lectin of B cells. *J. Biol. Chem.* 269: 10628 – 36.
79. Rademacher, T.W., Parck, R.B. and Dwek, R.A. (1988). *Glycobiology. Ann. Rev. Biochem.* 57: 785 – 838.
80. Randall, N.K., Goldstein, I.J., Ratcliffe, M.N. and Shibuya, N. (1991). Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leukoagglutinating lectin from *Maackia amurensis*. *J. Biol. Chem.* 266: 83 – 88.
81. Reisner, Y. and Sharon, N. (1984). Fractionation of subpopulation de mouse and human lymphocytes by peanut agglutinin or soybean agglutinin. *Methods enzymol.* 108: 168 -179.
82. Reisner, Y., Linker-Israeli, M. and Sharon, N. (1976a). Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cell. Immunol.* 25: 129 - 134.
83. Reisner, Y., Ravid, A. and Sharon, N. (1976b) Use of soybean agglutinin for the separation of mouse B and T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72: 1585 - 1591.
84. Rodewald, H.R. (1995). Pathways from hematopoietic stem cells to thymocytes. *Curr. Op. Immunol.* 7: 176 – 187.
85. Rodewald, H.R., Kretzschmar, K., Takeda, S., Hohl, C. and Dessing, M. (1994). Identification of pro-thymocytes in murine fetal blood: T lineage commitment can precede thymus colonization. *EMBO J.* 13: 4229 - 40.
86. Roelants, G.E., London, J., Mayor-Whitney, K.S. and Serrano, B. (1979). Peanut agglutinin. II. Characterization of the Thy-1, T1a and Ig phenotype of peanut agglutinin-positive cells in adult embryonic and nude mice using double immunofluorescence. *Eur. J. Immunol.* 9: 139 - 145.
87. Roth, J. (1987). Subcellular organization of glycosylation in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Acta* 906: 405 – 436.
88. Sadler, J. E. (1984). Biosynthesis glycoproteins formation of O-linked oligosaccharide. In Guinsburg, V. and Robbins P.W. (eds.) *Biology of Carbohydrates*. Wiley New York, pp 200 - 287.
89. Schachter, H. and Brockhausen, I. (1992). The biosynthesis of serine (threonine)- n-acetylgalactosamine-linked carbohydrate moieties. En: *Glycoconjugates. Composition, Structure, and Function*. Allen, H. J. ando Kisailus, E. C. (eds.), Marcel Dekker, New York, 263 – 332.

90. Sharon, N. and Lis, H. (1993). Carbohidratos en el reconocimiento celular. *Inv. y Ciencia*. 198: 20 - 27.
91. Sharon, N. and Lis, H. (1989). Lectins as cell recognition molecules. *Science* 246: 227 -246.
92. Sharon, N. and Lis, H. (1986). The lectins properties, function and application. In *Biology and Medicine*. Academic Press, 226 – 270.
93. Schauer, R. (1985). Sialic acids and their role as biological masks. *TIBS* 357 – 360.
94. Seamus, J., Douglas, M., Green, R. and Cotter, T.G. (1994). Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *TIBS*. 19: 26 - 30.
95. Sellins, K.S. and Cohen, J.J. (1987). Gene induction by γ -irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J. Immunol.* 139: 3199 – 206.
96. Shibuya, N., Goldstein, I. J., Broekaert, W. F., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B. and Peumans, W. J. (1987). The Elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J. Biol. Chem.* 262: 1596 – 601.
97. Shimizu, S. and Yamada, K. (1986). The cytochemistry of glycoconjugates in the zona pellucida of murine ovarian oocytes and two cell embryos. *Histochem. J.* 18, 357 – 363.
98. Shortman, K. and Wu, L. (1996). Early T lymphocyte progenitors. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 29 – 47.
99. Singhal, A. and Hakamori, S. (1990). Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *BioEssays*. 12: 223-230.
100. Spangrude, G. L., Smith, L., Uchida, N., Ikuta, K., Heimfeld, S., Friedmann, J. and Weissman I. L. (1991). Mouse hematopoietic stem cells. *Blood*. 78: 1395 – 402.
101. Swiggard, W. J., Mirza, A., Nussenzweig, M. C. and Steinman, R. M. (1995). Protein DEC-205, a 205-kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *Cell Immunol.* 165: 302-311.
102. Taatjes, D. J., Roth, J., Peumans, W. and Goldstein, I. J. (1988). Elderberry bark lectin-gold techniques for the detection of Neu5Ac (α 2,6) Gal/GalNAc sequences: applications and limitations. *Histochem. J.* 20: 478- 490.
103. Tennant, J. R. (1964). Evaluation of the trypan blue technique for the determination of cell viability. *Transplantation*. 2: 685 – 694.

117. Wu, L., Scollay, R., Egerton, M., Pearse, M., Spangrude, G. J. and Shortman, K. (1991). CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature*. 349: 71 – 74.
118. Wu, W., Punt, J. A., Granger, L., Sharrow, S. O. and Kearse, K. (1997) Developmentally regulated expression of peanut agglutinin (PNA)-specific glycans on murine thymocytes. *Glycobiology*. 7: 349 – 356.
119. Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 284: 555 - 556.
120. Yamashita, Y., Chung, Y. S., Horie, R., Kanagi, R. and Sowa M. (1995). Alterations in gastric mucin with malignant transformation novel pathway for mucin synthesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 441 – 446.
121. Young, J. D., Tsuchiya, D. E. and Holroyde, M. J. (1979). Enzymic O-glycosylation of synthetic peptides from sequences in basic myelin protein. *Biochemistry*. 18: 4444 – 48.
122. Zacharchuk, C. M., Mercep, M. and Ashwell, J. D. (1990). Programmed T lymphocyte death: cell activation- an steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *J. Immunol.* 145: 4037 – 45.
123. Zenteno, E., Lascrain, R., Vázquez, L., Montaña, L., Debray H. and Montreuil, J. (1992). The sugar specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj. J.* 9: 204 - 208.

ANEXO

RELEVANCE OF SIALOGLYCONJUGATES IN MURINE THYMOCYTES DURING MATURATION AND SELECTION IN THE THYMUS

**RELEVANCE OF SIALOGLYCOCONJUGATES IN MURINE THYMOCYTES
DURING MATURATION AND SELECTION IN THE THYMUS**

Georgina Alvarez¹, Ricardo Lascurain², Armando Pérez³, Pierre Degand⁴, Luis Felipe Montañó⁵, Salvador Martínez-Cairo⁶, and Edgar Zenteno^{1*}

¹Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, P. O. Box 70159, 04510 México;

²Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Secretaría de Salud, Calzada de Tlalpan 4502, 14080, México, ³Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México; ⁴Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, U.R. 377, 59045 Lille Cedex-France, ⁵Laboratorio de Biología Celular, Instituto Nacional de Cardiología, 14080 México and ⁶Unidad de Investigación, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México.

ABSTRACT

Differentiation of most T lymphocytes is characterized not only by the variable expression of CD4/CD8 coreceptor molecules and increased surface density of the T cell antigen receptor, but also by changes in the glycosylation pattern of cell surface glycolipids or glycoproteins. In this work we evaluated the changes in the sialylation pattern in thymus sections from normal and dexamethasone treated mice. We used sialic acid specific lectins, such as *Sambucus nigra* agglutinin (SNA, NeuAc α 2,6-Gal specific) and *Maackia amurensis* agglutinin (MAA, NeuAc α 2,3-Gal specific). Our results indicate that the sialylation pattern was modified during the maturation process of thymic cells. The immature CD4-CD8- and CD4+CD8+ cortical thymocytes were recognized by SNA, whereas the mature single positive (CD4+ or CD8+) medullary cells, preferentially bound MAA lectin. However, in the cortico-medullary region we found not only SNA+ cells, but also MAA+ cells. In the thymus of dexamethasone treated mice, the clusters of thymocytes undergoing apoptosis in the cortex were characteristically stained by SNA. These results suggest that in the initial stages of the differentiation pathway, a great number of thymocytes express an α 2,6 linked sialic acid on their surface and as they progress to more mature stages there is a change in the sialylation pattern to α 2,3 linked sialic acids probably due to a

*Corresponding author (e-mail: ezenteno@servidor.unam.mx)

regulated expression of different sialyltransferases, which could be modulated by the thymic microenvironment. Abbreviations: SNA (*Sambucus Nigra* agglutinin); MAA (*Maackia amurensis* agglutination); NeuAc (N-acetyl-neuraminic acid); Gal (Galactose); GalNAc (N-acetyl-galactosamine); GlcNAc (N-acetyl-glucosamine); Ser (Serine); Thr (Threonine); CMP (Cytidine monophosphate); LPA (*Limulus polyphemus* agglutinin); DAB(3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride); HE (Hematoxylin-eosin); FITC (Fluorescein isothiocyanate)

INTRODUCTION

The major function of the thymus is the maturation and selection of antigen-specific T lymphocytes from marrow derived precursor cells. Thymocytes differentiate within the thymus along the CD4/CD8 developmental pathway by a highly ordered process termed thymic selection (1,2). The maturation status of thymocytes is commonly assessed by the expression of the coreceptor proteins CD4 and CD8 and surface density of $\alpha\beta$ T cell receptor ($\alpha\beta$ TCR) molecules (1). Generally, immature CD4-CD8- (double-negative) and CD4+CD8+ (double-positive) thymocytes are located in the thymic subcapsular zone and cortex whereas the mature single positive (CD4+ or CD8+) cells are found in the medulla. A central event during T cell development is the education of immature thymocyte populations to discriminate between self and non-self, in such a way that potentially autoreactive immature thymocytes are deleted in the thymus by negative selection (3). It has been well demonstrated that clonal deletion occurs by a programmed death cell process termed apoptosis (4). Glucocorticoids, such as dexamethasone, are potent means to induce thymocyte apoptosis (5,6) and the most sensitive cells to the lethal effects of these steroids are the immature thymocytes located in the thymic cortex, whereas medullary cells are relatively resistant (7,8).

On the other hand, it is well documented that the glycan moieties of glycoconjugates play important roles in recognition phenomena such as protein targeting (9), or cell-cell interactions (10,11), and that N-acetylneuraminic acid (sialic acid) residues are involved in adhesion, mobility, and recognition of cells (12). Sialic acids constitute a family of nine-carbon carboxylated sugars usually found at the non-reducing terminal position of mammalian cell surface sugar chains of glycoproteins, glycolipids, and oligosaccharides (13).

It has been demonstrated that the cell surface carbohydrates change during differentiation and maturation of thymocytes (14-16); lectins, due to their high specificity toward carbohydrates on specific sequences, have been currently used to identify modifications of glycosylation in cytochemistry and histochemistry (17). The

aim of this work was to evaluate the changes in the sialylation pattern of thymocytes from normal and dexamethasone treated mice, and to determine if such changes relate to the apoptotic process.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Bovine serum albumin fraction V (BSA), HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), *Limulus polyphemus* agglutinin (LPA), *Maackia amurensis* agglutinin (MAA), *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), poly-L-lisine, extravidin-horseradish peroxidase, extravidine-alkaline phosphatase, and all chemical reagents were from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) was purchased from DAKO (Carpinteria, CA, USA). Biotin-labeled murine monoclonal antibodies directed to CD4 and CD8 molecules, and NLDC-145 were from Serotec LTD (Oxford, England). FITC-labeled rat anti-mouse IgG was obtained from ZYMED (San Francisco, CA, USA). All lectins were conjugated with immunopure sulfo-NHS-biotin according to (18).

Animals Twenty eight days old male BALB/c mice received 5mg/Kg of dexamethasone, intraperitoneally; control mice were injected with distilled water. After 3 h the animals were killed by cervical dislocation and the thymus gland was surgically removed, and washed twice with phosphate-buffered saline, pH 7.2 (PBS)

Preparation of thymus sections. Thymus glands were fixed in Bouin's solution for three hours, dehydrated and embedded in paraffin, according to routine procedures for light microscopy. Serial sections of 3 μ m thickness were mounted on slides precoated with 0.1% poly-L-lysine. After deparaffinization and rehydration, the even numbered sections were processed for lectin histochemistry and the odd numbered sections were stained with HE, in order to detect the thymocytes undergoing apoptosis. The distribution of apoptotic cells was confirmed with the uptake of acridine orange and propidium iodide, according to the methodology used by McGahon (19).

Lectin Histochemistry Thymus sections were immersed for 10 min in 0.2% BSA/PBS and washed twice for 5 min with PBS before staining. Sections were incubated for 45 min at room temperature in a humidified chamber with SNA-biotin or MAA-biotin, diluted 1:50 and 1:100 in PBS, respectively. The sections were then washed two times, one with PBS and the other with 0.1M Tris-buffered 100mM NaCl

and 5mM MgCl₂ pH 9.5. Alkaline phosphatase-labeled extravidin, diluted 1:500 in PBS was used as second ligand and bound enzyme was detected with the chromogenic substrate NBT/BCIP. The sections were then washed for 15 min two times with PBS and mounted with aquamount (Merck, Mexico). Specificity controls were performed using non-conjugated lectins at the same concentration range as the first layer reagents.

To determine whether the lectins used recognized epithelial or dendritic cells, double stains were performed with the biotin-labeled lectins and NLDC-145, a specific monoclonal antibody against a 205 kDa integral membrane glycoprotein called DEC-205, present in epithelial and dendritic cells (20,21). For this purpose, frozen thymus sections of 10 μ m thickness mounted on precoated poly-L-lysine slides were fixed in cold acetone for 15 min, air dried and kept at 4°C until use. Tissue sections were stained with biotin-labelled SNA or MAA, as described above, but bound lectins were detected with extravidine-horseradish peroxidase (diluted 1:200), and DAB was used as chromogen. Subsequently, sections were incubated with PBS containing 1% BSA and 0.01% triton X-100 for 1h at room temperature, and then with unlabelled NLDC-145 (diluted 1:20) overnight at 4°C. As secondary antibody FITC-labeled goat anti-rat IgG diluted 1:40 in PBS/BSA/Triton X-100 was used.

RESULTS

The distribution of sialoglycoconjugates in thymus sections obtained from control- and dexamethasone-treated mice was evaluated with three sialic acid specific lectins, *Sambucus nigra* agglutinin (SNA) *Maackia amurensis* agglutinin (MAA), specific for α 2,3- and α 2,6-linked sialic acids, and *Limulus polyphemus* agglutinin (LPA), which binds N-acetylneuraminic acid independently of its position. Histochemical analysis with LPA demonstrated that sialic acid positive cells were widely spread throughout the thymus, therefore we tried to analyze the thymus cells more specifically. Our results show that SNA recognizes preferentially cortical thymocytes although positive cells were also found in the cortico-medullary and medullar region of the thymus of non-dexamethasone treated mice (Figure 1a). Most of SNA positive cells were located in the middle region of the cortical zone. The cells recognized by the lectin in dexamethasone-treated animals formed clusters of approximately 10-15 cells which were widely distributed all over the cortex including

antigen containing Gal β 1,3GalNAc α 1-O Ser/Thr and GalNAc α 1-O Ser/Thr, respectively. Substitution of T and Tn antigens with NeuAc originates the cryptic equivalent forms that represent the developmental or activated state of the containing structure or cells. These antigens are highly expressed in different organs during fetal life and through maturation states, and the thymus is no exception (22-24). Moreover, it has been reported that one of the most important modifications during thymic maturation is an increase in the amount of sialic acid expressed on the surface of thymocytes (25,26), and recent data indicate that the appearance of 9-O-acetylated sialic acids is modulated during maturation and activation of T cells (16).

Sialic acids are a family of closely related nine-carbon carboxylated sugars found at the non-reducing terminal position of mammalian cell surface sugar chains of glycoproteins, glycolipids, and oligosaccharides. They are α - glycosidically linked to either the 3- or 6-hydroxyl groups of galactose residues (Gal), or to the 6-hydroxyl group of N-acetyl-glucosamine or N-acetyl-galactosamine (GalNAc) residues (13). In this work we evaluated the changes in the sialylation pattern in thymus sections from normal or dexamethasone treated mice. For this purpose we used two lectins: *Sambucus nigra agglutinin* (SNA), specific for NeuAc α 2,6-Gal (27) and *Maackia amurensis agglutinin* (MAA), specific for NeuAc α 2,3Gal (28).

Our results confirmed that the sialylation pattern is modified during the maturation process of thymic cells. The immature CD4-CD8- and CD4+CD8+ cortical thymocytes were recognized by SNA, whereas the mature, single positive (CD4+ or CD8+) medullary cells, preferentially bound to MAA lectin. However, in the cortico-medullary region we found not only SNA+ cells, but also MAA+ cells. These results suggest that in the initial stages of the differentiation pathway, many thymocytes express α 2,6 linked sialic acid on their surface and as they progress to more mature stages there is a change in the sialylation pattern to α 2,3 linked sialic acids, probably due to a regulated expression of different sialyltransferases.

Glucocorticoid treatment induces programmed cell death in cortical thymocytes but not in medullary cells (7,8). As our results show, we detected clusters of thymocytes undergoing apoptosis in the cortex of thymus sections stained with H-E from dexamethasone treated mice. This focal arrangement of the apoptotic thymocytes was similar to that observed with *in situ* nick-translation and electron microscopy studies by Fehsel *et al.* (29).

The staining pattern with MAA of thymocytes from control and dexamethasone treated animals did not show differences, however, cortical SNA+ thymocytes of

dexamethasone-treated animals, grouped in clusters related with the foci of apoptotic cells observed in the H-E stained serial thymus sections. These results demonstrate the existence of a cortical cell subpopulation of immature thymocytes, that express NeuAc- α 2,6Gal structures on their surface glycoconjugates, and suggest that this subpopulation corresponds to the subset of dexamethasone sensitive cells that undergo apoptosis.

The transference of sialic acids from CMP-NeuAc onto terminal positions of glycolipids and glycoproteins is catalyzed by a family of sialyltransferases and more than 12 sialyltransferases are required for the synthesis of all known sialyl-oligosaccharide structures (13). It has been shown that glucocorticoids, such as dexamethasone enhance the activity of β -galactoside α -2,6-sialyltransferase, leading to an increase in NeuAc(α 2,6)Gal sequences of proteins isolated from FR3T3 dexamethasone-treated cells (30). The possibility of an increase in the rate of NeuAc α 2,6 branched residues by a specific modification of the sialyltransferase activity induced by dexamethasone treatment in a thymocyte subpopulation sensitive to this glucocorticoid, cannot be ruled out; although we have no evidence of the biological significance of sialoglycoproteins in T-cell activation, differentiation, selection, maturation, and growth (31-33). The possibility that specific sialylated oligosaccharide sequences could be the target for specific receptors or further modifications by membrane sialidases present in T-cells, as a mechanism for the regulation of T-cell interactions, should not be ruled out (34).

Our results indicate that the sialoglycoconjugates determined with lectins such as SNA and MAA could be a useful tool in the isolation of thymocyte subsets and in the study of the role of sialylated lymphocyte receptors in cell-proliferation and differentiation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Miss Diana Millán for technical assistance, and Mrs. Ma. Luisa Rodríguez for the elaboration of tissue sections. This work was financed in part by CONACyT (grants 1595PM and 2151PM), PADEP and PAPIIT-UNAM (IN 224598), Mexico and ECOS Program (M97-B05) ANUIES, Mexico-Francia.

REFERENCES

- 1 Fowlkes, B.J. and Pardoll, D.M., *Adv. Immunol.*, **44**, 207-265 (1989).
2. Von Boehmer, H., *Cell*, **76**, 219-227 (1994).
3. Nossal, G.J.V., *Cell*, **76**, 229-239 (1994).

4. Cohen, J.J. and Duke, R.C., *Annu. Rev. Immunol.*, 10, 267-293 (1992).
5. Wyllie, A.H., *Nature*, 284, 555-556 (1980).
6. Cohen, J.J. and Duke R.C., *J. Immunol.*, 132, 38-42 (1984).
7. Roelants, G.E., London J., Mayor-Withey K.S. and Serrano B., *J. Immunol.* 9, 132-1 (1979).
8. Boyer, P.D. and Rothenburg E.V., *J. Immunol.*, 140, 2886-28 (1988)
9. Kornfeld, S. *FASEB J.*, 1, 462-468 (1987).
10. Sharon, N.L. and Lis H., *Science*, 246, 227-234 (1989).
11. Stoolman, L.M. *Cell*, 56, 907-910 (1989)
12. Pilatte, Y., Bignon J. and Lambré C.R., *Glycobiology*, 3, 201-218 (1993).
13. Harduin-Lepers, A., Recchi M. A., and Delannoy P., *Glycobiology*, 5, 741-758 (1995).
14. Gillespie, W., Paulson J.S., Kelm S, Pang M. and Baum L., *J. Biol. Chem.*, 268, 3801-3804 (1993)
15. Wenyu, W., Punt J.A., Granger L., Sharrow S.O. and Kearse K.P., *Glycobiology*, 7, 349-356 (1997).
16. Krishna, M. and Varki, A. *J. Exp. Med* 185, 1997-2013 (1997).
17. Alroy, J., Goyal V., and Skutelsky E., *Histochemistry*, 86, 603-607 (1987).
18. Savage, D., Mattson, G., Desai S, Nielander S., Morgensen G., and Conklin E. *Avidin-biotin Chemistry. a Handbook*, Pierce Chemical Company, Rockford, IL, (1992) p. 47.
19. McGahon, A.J., in: *Methods in Cell Biology*. Vol. 46., L.M. Schwartz and B. A Osborne, eds. Academic Press, USA, (1996) pp 153-185.
20. Swiggard, W.J., Mirza, A., Nussenzweig, M.C. and Steinman, R.M., *Cell Immunol.*, 165, 302-311 (1995)
21. Witmer-Pack, M.D., Suiggard, W.J., Mirza, A., Inaba, K. and Steinman, R.M., *Cell Immunol*, 163, 157-162 (1995)
22. Piller, V., Piller, F. and Fukuda, M., *J. Biol. Chem*, 265, 9264- 9271 (1990).
23. Lascurain, R., Chavez, R., Gorocica, P., Pérez, A., Montañó, L.F. and Zenteno, E. *Immunology*, 83, 410-413 (1994)
24. Lascurain, R., Porras, F., Báez, R., Chávez, R., Martínez-Cairo, S., Alvarez, G. And Zenteno, E., *Immunological Investigations*, 26, 579-587 (1997).
25. Toporowicz, A. and Reisner, Y., *Cell Immunol.*, 100, 10-19 (1986)
26. Whiteheart, S.W., McLenithan, J.C. and Hart, G.W., *Cell Immunol.*, 125, 337-353 (1990).

27. Susuki, T., Kitajima, K., Inoue, S. And Inoue, Y., Glycoconjugate, 12, 183-193 (1995).
28. Shibuya, N., Goldstein, I.J., Broekaert, W.F., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B. And Peumans, W.J. J., Biol. Chem., 262, 1596-1601 (1987).
29. Fehsel, K., Kröncke, K.D., Kolb, H. and Kolb-Bachofen, V. J., Histochem. Cytochem., 42, 613-619 (1994).
30. Vandamme, V., Pierce, A., Verbert, A. and Delannoy, P., Eur. J. Biochem., 211, 135-140 (1993).
31. Hintzen, R.Q., de Jong, R., Lens, S.M.A., Brouwer, M., Baars, P and Van Lier, R.A.W. ,J. Immunol. 151, 2426-2435 (1993)
32. Gallart T., Angel de la Fuente M., Josep Barcelo J., Alberola-Ila J. and Lozano F., Immunology, 90, 57-65 (1997).
33. Milner, C. M., Smith S.V., Carrillo M. B., Taylor G. L., Hollinshead M. and Campbell R. D., J. Biol. Chem., 272, 4549-4558 (1997).
34. Guthridge J. M., Kaplan A.M. and Cohen D. A. , Immunol. Invest., 23, 393-411 (1994).

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

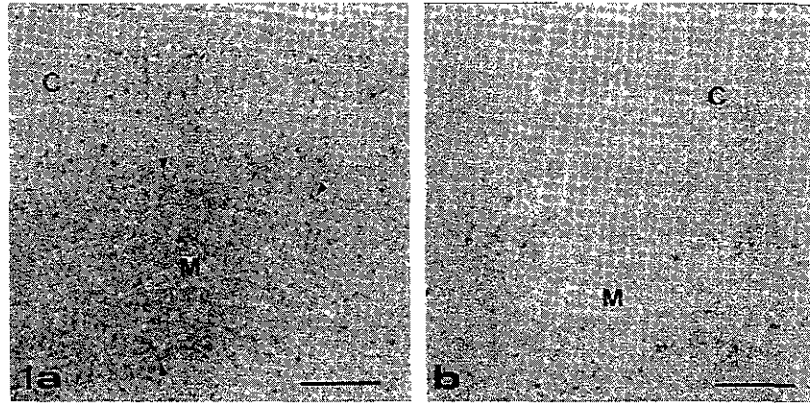


FIGURE 1. Location of $\alpha 2,6$ - and $\alpha 2,3$ - linked glycans in thymocytes from normal mice by lectin histochemistry with biotinilated SNA and MAA. Lectins were detected with extravidine-alkaline phosphatase. NBT/BCIP were used as chromogens. **a)** SNA+ cells were located preferentially in the thymus cortex (C); although some positive cells were also observed in the cortico-medullary region (arrowheads) and occasionally in the medulla (M). **b)** Stained cells with MAA were mainly located in the thymus medulla and in the cortico-medullary region. The cortex did not stain with this lectin.

small cell-clumps in the subcapsular zone (Figure 2a); many of these cell clusters contained cells that were on the process of programmed cell death as demonstrated by the presence of apoptic bodies in the H-E stained serial thymus sections (Figure 2b). On the contrary, MAA stained thymocytes of non-dexamethasone treated mice were mainly located in the thymus medulla with only a small percentage of positive cells being found in the cortico-medullary junction (Figure 1b). The cortex was negative for MAA cells. The MAA-staining pattern was not modified by dexamethasone-treatment, and no correlation could be made between MAA positive cells and the presence of apoptotic bodies (Figure 3 a,b). Immunocytochemical analysis with murine anti-CD4 and anti-CD8 monoclonal antibodies showed that more than 80% of the MAA positive cells found in the thymic medulla were CD4 positive, with a small percentage (12%) being CD8+; there were no double CD4,CD8 positive MAA+ cells.

None of the NLDC-145 positive epithelial or interdigitating cells were SNA or MAA positive cells, we also observed that there was no difference in the distribution of NLDC-145 positive cells in thymus sections from control and dexamethasone-treated mice (not shown).

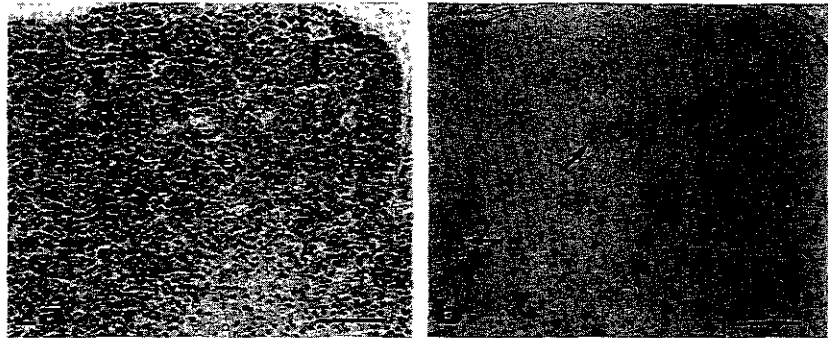


FIGURE 2. Lectin histochemistry with SNA of thymus from dexamethasone treated mice. Correlation between apoptotic thymocytes and SNA+ cells in thymus serial sections from dexamethasone treated mice. **a)** Foci of apoptotic cells were extensively distributed in the cortex of thymus sections stained with HE (arrows). **b)** Clusters of SNA+ cells (arrowheads) that correlates with apoptotic cells in HE stained sections.

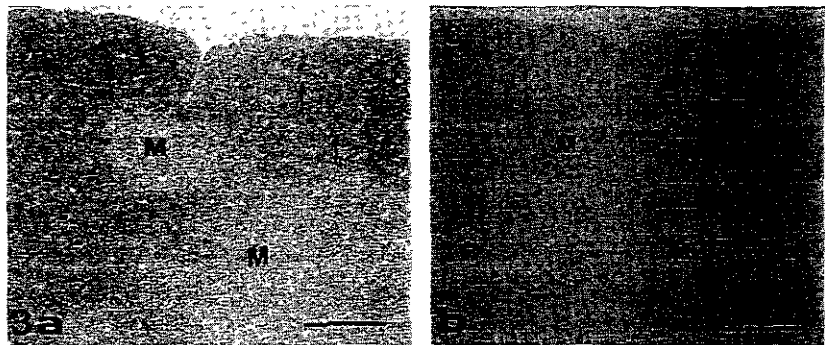


FIGURE 3. Lectin histochemistry with MAA of thymus from dexamethasone treated mice. No correlation could be made between MAA+ cells and the presence of apoptotic cells in HE staining sections (**a**) and MAA-staining pattern was not modified with dexamethasone treatment (**b**).

DISCUSSION

Differentiation of most T lymphocytes is characterized not only by the variable expression of CD8/CD4 coreceptor molecules and increased surface density of T cell antigen receptor, but also by changes in the glycosylation pattern. Presence or prevalence of specific saccharidic sequences has been considered as an indicator of maturity or cell transformation: e.g. the Thomsen Friedenreich (T) antigen and the Tn