

11281

36

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Estudio de un nuevo marcador O-glicosilado de linfocitos

T murinos

PRESENTA

BLANCA ORTÍZ QUINTERO

Ciudad universitaria, marzo del 2002.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	2
INDICE DE FIGURAS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
JUSTIFICACIÓN	13
OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	38
BIBLIOGRAFÍA	47

ABREVIATURAS

Acmo	Anticuerpo monoclonal
ALL	Lectina de <i>Amaranthus leucocarpus</i>
ALLr	Receptor de la lectina del ALL
ALL-B	ALL unida a biotina
C2GnT	Núcleo 2 β 1,6- <i>N</i> -acetil-glucosaminiltransferasa
ConA	Concanavalina A
CPAs	Células presentadoras de antígeno
Cy-Chr	Cy-Chrome
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Gal	Galactosa
GalNAc	<i>N</i> -acetil-D-galactosamina
GlcNAc	<i>N</i> -acetil-D-glucosamina
MAA	Lectina de <i>Maackia amurensis</i>
MIF-I	Índice de la media de la intensidad de fluorescencia
PBA	PBS con albúmina de suero bovina
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PBS-T	PBS con tritón X-100
PE	Ficoeritrina
PMA	"phorbol 12-myristate 13-acetate"
PNA	Lectina de <i>Arachis hypogaea</i>
SNA	Lectina de <i>Sambucus nigra</i>
ST3Gal-I	α 2,3 sialiltransferasa
Sia α 2,3	Ácido siálico en unión alfa 2,3

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

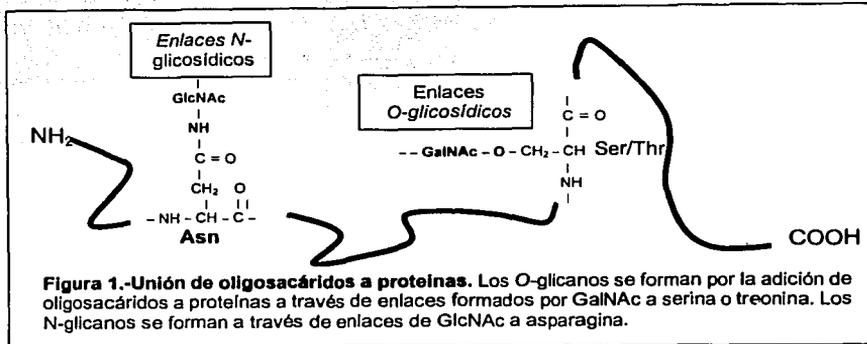
Figura 1	Unión específica de la ALL a timocitos murinos.	21
Figura 2	Expresión del ALLr en subpoblaciones de timocitos	23
Figura 3	Expresión del ALLr en subpoblaciones de timocitos CD3 ^{lo/int} y CD3 ⁺ .	24
Figura 4	Expresión de la ALLr y de otros marcadores de superficie de timocitos murinos	24
Figura 5	Expresión del ALLr en subpoblaciones de linfocitos T periféricos.	26
Tabla 1	Unión de la ALL a subpoblaciones de linfocitos T	27
Figura 6	El ALL no se une a los linfocitos B (CD19 ⁺) de periferia	27
Figura 7	Fenotipo de las células T ALL ⁺ .	28
Figura 8	Identificación del receptor de la lectina del <i>A. leucocarpus</i> en linfocitos.	30
Figura 9	Análisis por electroforesis en doble dimensión del ALLr aislado	30
Figura 10	Patrón de tinción de la ALL en relación al patrón de expresión de ácido siálico en subpoblaciones de linfocitos T.	31
Figura 11	Efecto del tratamiento con sialidasa en el patrón de tinción de la ALL en subpoblaciones de linfocitos T.	32
Figura 12	Unión de la ALL a subpoblaciones de linfocitos T activadas con mitógenos.	34
Figura 13	Unión de la ALL a subpoblaciones enriquecidas de linfocitos T CD4 ⁺ ALL ⁻ activadas con mitógenos	35
Figura 14	Patrón de sialilación, O-glicosilación y de ALL de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ activados.	37
Figura 15	Expresión del ALLr en células T	46

RESUMEN

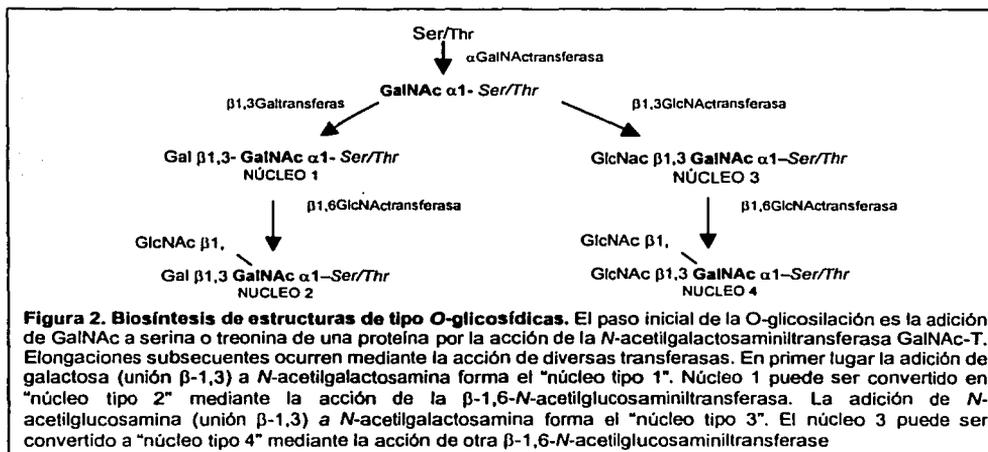
Los linfocitos T ocupan un papel central en el sistema inmunológico, y sus interacciones celulares son cruciales para el correcto funcionamiento de la respuesta inmunológica. En procesos como la maduración y activación de linfocitos T se involucran cambios en el patrón de O-glicosilación de moléculas de superficie. En este trabajo utilizamos como herramienta para el estudio de los O-glicanos de superficie de células del sistema inmunológico a la lectina *Amaranthus leucocarpus* (ALL) la cual reconoce específicamente a una molécula O-glicosilada de superficie de timocitos murinos, aparentemente no descrita, con un peso molecular de 70 kDa (ALLr). Para identificar la posible función de este receptor en este trabajo realizamos la determinación del patrón de expresión de esta molécula en poblaciones de linfocitos T en timo, en linfocitos T en reposo y linfocitos maduros activados. Los resultados demostraron que el 95-98% de los timocitos inmaduros CD4⁺8⁺ así como los maduros CD4⁺8⁺ expresan alta densidad al ALLr, no así los timocitos CD4⁺8⁻ quienes lo expresan en baja densidad (46-67%). El 89-95 % de los linfocitos T CD8⁺ provenientes de sangre periférica, ganglios linfáticos y bazo expresan el ALLr con alta densidad mientras que el 9-40 % de los linfocitos CD4⁺ lo expresan en baja densidad (ALL^{lo}). La mayoría de los linfocitos CD8⁺ALL⁺ muestran un fenotipo de células vírgenes CD62L^{hi}CD45RB^{hi}CD44^{lo}. Los linfocitos B CD19⁺ no expresan el ALLr. El estímulo mitogénico induce un decremento en el número de células CD8⁺ALL⁺ (72 h de cultivo), mientras que en células CD4⁺ALL^{lo} induce un incremento máximo en su número a las 24 h de cultivo, seguido de un rápido decremento. Los resultados sugieren que el ALLr es una O-glicoproteína expresada de manera selectiva por las células CD8⁺ vírgenes y en los primeros estadios de activación de las células CD4⁺.

INTRODUCCIÓN

La interacción celular es el evento central en una variedad de fenómenos biológicos tales como la fertilización, migración celular, infecciones microbianas, y la respuesta inmunológica (Sharon *et al*, 1989). La interacción célula-célula se basa en el reconocimiento de moléculas de superficie y prácticamente todas ellas presentan carbohidratos. En los últimos años ha habido un interés creciente en el estudio de carbohidratos de superficie debido al hallazgo de evidencias que indican el papel central que juegan en la comunicación celular. En la Inmunología se han encontrado múltiples evidencias que indican que la respuesta inmunológica no sólo depende del reconocimiento de proteínas de superficie, sino también del reconocimiento de la porción sacarídica de muchas de ellas. En particular se ha reportado que los O-glicanos se encuentran involucrados en los procesos de maduración, migración, apoptosis y activación de linfocitos T, los cuales juegan un papel central en la respuesta inmunológica (Galvan *et al*, 2000; Vespa *et al*, 1999; Galvan *et al*, 1998; Krishna, *et al* 1997; Perillo *et al*, 1995; Gillespie *et al*, 1993; Piller *et al*, 1988; Hernández *et al.*, 2002). Los O-glicanos son oligosacáridos unidos a proteínas mediante un enlace formado por GalNAc α 1-O-Ser/Thr, principalmente (Figura 1). En células eucarióticas normales se sintetizan principalmente 4 estructuras de O-glicanos, las cuales se designan como núcleos. El núcleo tipo 1 es el precursor del núcleo tipo 2, y el núcleo tipo 3 es el precursor del núcleo tipo 4 (Figura 2). Las 4 estructuras pueden sufrir elongaciones mediante la adición de ácido siálico, fucosa, sulfatos, y polilactosaminas. Las diferentes glicosiltransferasas se expresan de manera específica en determinados tejidos (Yamashita *et al* 1995, Hounsell *et al* 1996).



La mayoría de los O-glicanos expresados en la superficie de los leucocitos forman el núcleo tipo 2 (Schachter *et al* 1989, Brockhausen *et al* 1995), cuya síntesis es catalizada por la núcleo tipo 2 β 1,6-*N*-acetil-glucosaminiltransferasa (C2GnT), (Bierhuizen *et al* 1992, Fukuda *et al* 1986). Esta enzima es necesaria para formar ramificaciones posteriores sobre el núcleo tipo 2, mediante la acción de una β 1,3 GlcNAc transferasa. Esta última enzima cataliza la adición de múltiples secuencias de lactosaminas (Gal β 1,4GlcNAc) al núcleo tipo 2, formando la estructura ramificada "núcleo tipo 2 ramificado" ó "2-O-glicanos". La aparición de los 2-O-glicanos se encuentra relacionada con varios procesos de la respuesta inmunológica.



O-glicanos en el proceso de maduración de linfocitos T.

Durante el proceso de maduración de linfocitos T ocurren cambios en el patrón de O-glicosilación de moléculas de superficie de timocitos. La síntesis de 2-O-glicanos está restringida a los timocitos inmaduros corticales, y su expresión se detecta escasamente en timocitos maduros medulares (Baum *et al*, 1995). Lo anterior coincide con la alta expresión de la C2GnT en corteza y su declive hasta ser casi imperceptible en médula tímica. La regulación negativa de la síntesis de 2-O-glicanos en timocitos parece ser esencial para el proceso de apoptosis durante el desarrollo de linfocitos T (Perillo *et al*, 1995). La principal molécula portadora de estructuras O-glicosiladas en linfocitos T es el CD43, seguida por el CD45.

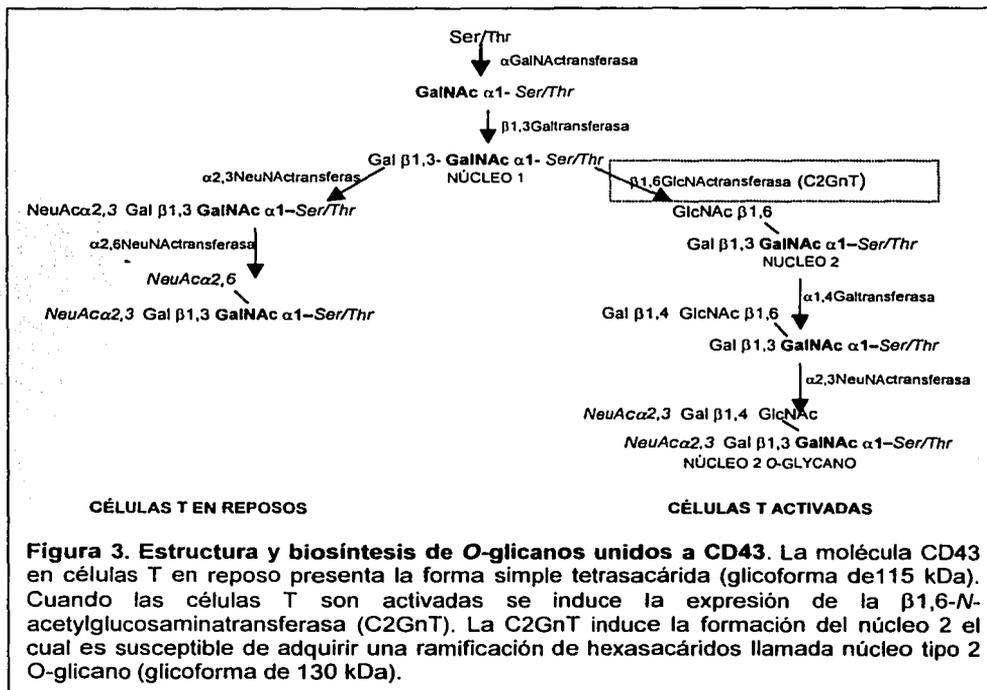
Mientras que los 2-O-glicanos dejan de ser expresados por los timocitos en médula, ocurre un incremento en la expresión de sialiltransferasa ST3Gal-I en la médula tímica. Esta enzima cataliza la adición de ácido siálico con enlaces α 2,3 a la galactosa presente en la estructura Gal β 1,3GalNAc (núcleo 1) (Kono *et al*, 1997, Despont *et al*, 1975 Gillespie *et al*, 1992), la cual es reconocida por la lectina proveniente de *Arachis hypogaea* (PNA ó "peanut agglutinin"). La adición de ácido siálico a dicha estructura impide la unión del PNA, de manera que los timocitos en corteza son PNA⁺ mientras que los timocitos en médula son PNA⁻. Se conoce que la PNA se une a su ligando sobre las moléculas CD43, CD45 y CD8 de linfocitos T (Skutelsky *et al*, 1975). La PNA es utilizada para analizar los cambios en los patrones de O-glicosilación sobre linfocitos T, especialmente aquellos involucrados con la adición de ácido siálico (Galvan *et al* 1998, Wu *et al* 1996, Priatel *et al* 2000).

O-glicanos en el proceso de activación de linfocitos T.

Las células T en reposo de periferia expresan el núcleo 1 sialilado NeuNAc α 2,3Gal β 1,3(NeuNAc α 2,6)GalNAc sobre la molécula CD43. Cuando las

células son activadas se induce la expresión de la C2GnT y la síntesis de la estructura ramificada de 2-O-glicanos NeuNAc α 2,3Gal β 1,3 (NeuNAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,6)GalNAc (Figura 3) (Piller *et al*, 1988).

En estudios con linfocitos T CD8⁺ se encontró que las células en estado naive expresan el núcleo 1 de O-glicanos altamente sialilado y cuando sufren un estímulo de activación con un antígeno o a través de entrecruzamiento del CD3, dicha estructura pierde el ácido siálico dentro de 48-72 h posteriores al estímulo, con lo cual adquieren el fenotipo de PNA^{high}. De manera paralela se incrementa la actividad de la C2GnT, la cual cataliza la síntesis de 2-O-glicanos (Priatel *et al*, 2000). Ésta última estructura es reconocida por el anticuerpo monoclonal B11, principalmente en la molécula CD43 (Piller *et al*, 1988).



El incremento de la expresión del epítipo reconocido por el anticuerpo B11 en linfocitos T CD8⁺ efector correlaciona fuertemente con su actividad citotóxica, pero es regulado negativamente cuando las células CD8⁺ son de memoria. Por lo anterior es posible distinguir claramente entre las células efectoras de las de memoria mediante el uso del anticuerpo monoclonal (Acmo) 1B11. Incluso es posible purificar la población efectora de linfocitos T CD8⁺ mediante el uso de anticuerpos anti-MHC I y B11 (Harrington *et al*, 2000).

Existen reportes que sugieren que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ regulan de manera diferente la síntesis de O-glicanos. Mukasa y col (1999) reportaron que el anticuerpo monoclonal 1D4 específico para estructuras 2-O-glicosiladas se une a la subpoblación de memoria CD4⁺CD45RO⁺ de células periféricas en humanos, lo cual no coincide con lo encontrado en células CD8⁺. Ellie y col (1994) reportaron que después de un estímulo de activación las glicofomas de 115 kDa y (1-O-glicanos) y 130 kDa (2-O-glicanos) del CD43 son reguladas positivamente en las células CD4⁺, mientras que en las células CD8⁺ la glicofoma de 115 kDa es regulada negativamente y la de 130 kDa es regulada positivamente. La primer glicofoma es reconocida por el Acmo S7 y la segunda por el Acmo B11. He y col (1999) reportaron que el Acmo S7 se une con alta afinidad a los linfocitos CD8⁺ efectoras y de memoria, mientras que sólo se une a los linfocitos T CD4⁺ de memoria.

O-glicanos y su influencia sobre la respuesta inmunológica.

Existe evidencia de que el patrón de O-glicosilación de moléculas de superficie influye directamente sobre la respuesta inmunológica. Tsuboi y col (1997) utilizaron ratones transgénicos cuyos linfocitos T sobre-expresaban la C2GnT y encontraron una respuesta inmune primaria reducida en las reacciones mediadas por linfocitos T de hipersensibilidad tardía, proliferación y producción de citocinas. En un trabajo posterior se reportó que también la respuesta inmune humoral hacia antígenos T-dependientes

estaba reducida, debido a un retardo en el cambio de isotipo e ineficiente estimulación de la proliferación de linfocitos B (Tsuboi *et al*, 1998). Se cree que lo anterior se debe a una interacción ineficiente del linfocito T con el linfocito B causada por la sobreexpresión de 2-O-glicanos.

Aunado a lo anterior, se encontró que la modificación de los O-glicanos por acción de la ST3Gal-I provee un mecanismo de regulación homeostática para linfocitos T CD8⁺. En ratones deficientes en ST3Gal-I ocurría una disminución dramática en el número de células T CD8⁺ periféricas y un incremento en el número de células CD8⁺ apoptóticas, lo cual no ocurría con las células CD4⁺. Los O-glicanos en CD4⁺ y CD8⁺ son sialilados por la ST3Gal-I pero únicamente las células CD8⁺ son predominantemente apoptóticas en ausencia de la ST3Gal-I (Priatel *et al*, 2000). Lo anterior indica que la adición de ácido siálico catalizada por dicha enzima es requerida para la supervivencia de los linfocitos T CD8⁺ maduros.

Nuevas evidencias acerca del papel de los O-glicanos en la respuesta inmunológica fueron encontradas con el hallazgo de la galectina-1. Esta molécula es expresada por las células epiteliales en timo y en ganglios linfáticos, y se une a los 2-O-glicanos de superficie de linfocitos T. Esta unión induce la apoptosis de células T inmaduras en timo y de células T activadas en periferia (Perillo *et al* 1995, Perillo *et al* 1997, Vespa *et al* 1999), influyendo sobre uno de los principales mecanismos de homeostasis del sistema inmunológico.

Estudio del papel de los de O-glicanos en la respuesta inmunológica.

Son múltiples las evidencias que señalan el papel central que juegan los O-glicanos en la respuesta inmunológica, lo cual dio lugar al nacimiento de la Inmunoglicobiología. Este campo de estudio relativamente reciente resulta ser tan interesante como apenas explorado. Así pues, nuestro propio interés en el estudio de los O-glicanos de superficie de células del sistema inmunológico y su participación en

los procesos de reconocimiento celular nos llevaron a buscar nuevas herramientas para hacer posible tal estudio. En nuestra búsqueda logramos aislar una lectina proveniente del *Amaranthus leucocarpus* (ALL) específica para la estructura Gal β 1,3GalNAc presente en O-glicanos (Zenteno *et al* 1988, Zenteno *et al* 1992). Otra lectina, la PNA, se une con alta afinidad a esta estructura, al hacer estudios comparativos, descubrimos que la ALL mostraba un patrón de reconocimiento de timocitos distinto al que presenta la PNA. Por medio de técnicas histoquímicas se determinó que la ALL se une específicamente a los timocitos presentes en corteza y médula tímica (Lascurain, *et al*, 1994). Mientras que las células reconocidas por PNA se encuentran básicamente distribuidas en la corteza. El aislamiento de la molécula que reconoce el ALL se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad. La glicoproteína aislada presenta un peso molecular de 70 kDa, lo cual difiere de los pesos moleculares correspondientes a los ligandos para PNA. Presenta una composición de 20% de carbohidratos, principalmente Gal y GalNAc en relación 1:3, y su composición de aminoácidos muestra una prevalencia en serinas, lo cual es típico en las proteínas O-glicosiladas.

La proteína aislada de timocitos o ALLr (receptor para el ALL) fue sometida al análisis para obtener la secuencia de aminoácidos de fragmentos peptídicos obtenidos por la digestión con tripsina, mediante la técnica de M ALDI-TOFF (espectrometría de masas asistada por láser, Porras *et al* 2000) comparar los resultados con la base de datos NCBI nr (Swiss-Prot) no se encontró homología significativa con otras proteínas ya descritas (Porras *et al* 2000). Al parecer, la ALL podría reconocer a un nuevo marcador O-glicosilado de superficie de timocitos.

Con los antecedentes mencionados, es posible especular que la molécula reconocida por la ALL pudiera estar involucrada en procesos celulares tales como adhesión intercelular (reconocimiento, migración, "homing") o activación celular y que además

es posible que sufra cambios en el patrón de glicosilación para llevar a cabo tales funciones. Así pues, es necesario determinar la distribución y densidad de expresión de dicha molécula, tanto en células en reposo como activadas, y su expresión en las células localizadas en los diferentes órganos linfoides, así como la posible relación en los procesos de activación.

JUSTIFICACIÓN

En el sistema inmunológico, al igual que en muchos otros sistemas biológicos, el correcto funcionamiento del mismo depende de la interacción de diferentes clases de células. Cada célula presenta en su superficie estructuras específicas y distintivas, involucradas en los procesos de comunicación celular. El estudio y caracterización de tales moléculas permite un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados en la cooperación célula-célula. En particular se han encontrado evidencias del papel determinante de las moléculas O-glicosiladas en los procesos de maduración, activación y muerte celular de linfocitos T, los cuales juegan un papel central en la respuesta inmunológica. Actualmente se han identificado que alteraciones en la porción sacarídica de proteínas O-glicosiladas en la superficie de linfocitos T resulta en una respuesta humoral y celular inadecuada, lo que indica la importancia del reconocimiento de los O-glicanos. El hallazgo de un posible receptor nuevo de la superficie de linfocitos T, gracias al uso de ALL, nos ofrece un modelo de estudio del papel de las moléculas O-glicosiladas en los procesos de interacción celular en la respuesta inmunológica, a través de la búsqueda de la posible función del receptor de la ALL en linfocitos T.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión y distribución de una nueva molécula O-glicosilada de superficie de linfocitos T y su posible participación en los procesos de comunicación celular, utilizando la ALL como herramienta.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la expresión del receptor de la ALL en linfocitos T inmaduros.
- Determinar la expresión del receptor de la ALL en los linfocitos T maduros en diferentes órganos linfoides.
- Identificar la molécula reconocida por la ALL en linfocitos T maduros e inmaduros.
- Determinar la expresión del receptor de la ALL en linfocitos T antes y después de un estímulo mitogénico.

MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE RATÓN

Se utilizaron ratones machos Balb-c de 6-8 semanas de edad. Se obtuvieron las células de timo, ganglio, bazo y sangre periférica y se suspendieron en solución amortiguadora de fosfatos fría (PBS: 0.15 M NaCl, 0.05 M fosfato de sodio, pH 7.2), que contiene 1% de albúmina sérica bovina y 0.1% de azida de sodio (PBA). Los eritrocitos se eliminaron por medio de un choque osmótico con cloruro de amonio (0.83%), seguido por dos lavados con PBA. Se determinó el número y viabilidad de las células mediante el uso de azul tripano (4%). Se utilizaron suspensiones celulares con >90% de viabilidad.

LECTINAS Y ANTICUEROS

Las semillas del *Amaranthus leucocarpus* se obtuvieron en Tulyehualco, Mexico, y la lectina se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando estroma de eritrocitos humanos tipo O (Zenteno *et al*, 1988). La lectina del *Amaranthus leucocarpus* (ALL) se marcó con éster de N-hidroxisuccinimida de biotina de la marca Pierce Chem. Co. (Rockford, IL, USA). En el análisis por citometría de flujo se detectó la unión de la lectina marcada con biotina (ALL-B) a las células, mediante el uso de estreptavidina unida a isotiocianato de fluoresceína ó a Cy-Chrome (estreptavidina-FITC ó estreptavidina-Cy-Chr) de la marca Pharmingen (San Diego, CA, USA). Se utilizaron anticuerpos monoclonales contra los marcadores de superficie de ratón CD3, CD62L, CD45RB, CD44, CD4, CD8 y CD19 unidos a ficoeritrina (PE), CD8, CD3 unido a FITC, y CD4 unido a Cy-Chr de la marca Pharmingen. La lectina de cacahuete (PNA, *Arachis hypogaea*) unida a FITC, *Sambucus nigra* (SNA) y *Maakia amurensis* (MAA) unida a biotina y los azúcares N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), N-acetil-D-

glucosamina (GlcNAc), D-manosa, D-galactosa, y L-fucosa se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

CITOMETRÍA DE FLUJO

Tinción simple.- Las células provenientes de los diferentes órganos linfoides (10^6) se incubaron con 0.1 μ g de ALL-B durante 30 min. a 4°C en PBA. Posteriormente se lavaron dos veces con PBA y se tiñeron con estreptavidina-FITC ó estreptavidina-Cy-Chr durante 15 min. a 4°C. Después de la incubación las células se lavaron dos veces con PBA y se fijaron en PBS conteniendo 1% de *p*-formaldehído. Se llevó a cabo el análisis por citometría de flujo en un aparato Excalibur de Becton & Dickinson (FACS, Mountain View, CA) con el programa de análisis Cellquest. Se adquirieron al menos 10^4 eventos y se analizaron las regiones correspondientes a los linfocitos, de acuerdo a su tamaño y granularidad. Se utilizaron como control de tinción a la estreptavidina-FITC o estreptavidina-Cy-Chr en ausencia de la lectina. Se determinó la especificidad de la tinción con la ALL-B utilizando ensayos de competencia con 0.2 M GalNAc o con otros azúcares como la GlcNAc, D-manosa, D-galactosa, y L-fucosa (0.2 M), durante 30 min. a 4°C.

Doble y triple tinción.- Las células se incubaron primero con la ALL-B ó la lectina correspondiente a 30 min. a 4°C seguido por estreptavidina-FITC ó estreptavidina-Cy-Chr, y posteriormente con el correspondiente anticuerpo durante 15 min. a 4°C. Se utilizaron controles de isotipo unidos a PE ó a FITC.

El número de células teñidas con la ALL se expresó como porcentaje y la densidad de tinción como un índice de la media de intensidad de la fluorescencia (MIF-I) de acuerdo a la siguiente fórmula: $MIF-I = MIF \text{ de la muestra (histograma)} / MIF \text{ del control (histograma)}$.

OBTENCIÓN DEL RECEPTOR DE ALL (ALLr)

Se agregó 10 μg de ALL-B a 10^8 células provenientes de timo, nódulos linfoides y bazo durante 30 min. a 4°C . Posteriormente se colocaron en una solución de albúmina sérica bovina al 7% durante 15 min. y se separaron las células aglutinadas (ALL⁺) que se encontraba en el fondo. Después de dos lavados con PBS frío las células se lisaron en una solución de PBS con 1% de Tritón X-100 e inhibidores de proteasas (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de aprotinina A, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pepstatina, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de leupeptina), durante 30 min. a 4°C en agitación. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se colocó en una columna de agarosa-avidina (3 x 1 cm), previamente equilibrada con PBS-T (PBS conteniendo 0.1% de Tritón X-100). Las proteínas que no se unieron a la columna se eluyeron con PBS. Posteriormente el ALLr se eluyó de la columna mediante la adición de GalNAc 0.2 M y se dializó contra PBS. La concentración de proteína se determinó mediante el *DC-protein assay kit* siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). El ALLr obtenido se analizó mediante la técnica de separación en geles de poliacrilamida al 10% de concentración (SDS-PAGE), en condiciones reductoras, utilizando el sistema discontinuo de Laemmli (1976). Las proteínas separadas se revelaron con la técnica de tinción con plata (Merril *et al*, 1984).

ELECTROFORESIS EN DOBLE DIMENSION

Se llevó a cabo el análisis de doble dimensión en un sistema de capilar con un gradiente de pH de 3-10 como primera dimensión y un gel SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras como la segunda dimensión, en un equipo Mini-Protean II 2-D Cell (Biorad Laboratories), según las especificaciones de los fabricantes.

Las muestras del ALLr obtenidas por cromatografía de afinidad se trataron (1:1) con el regulador de muestra que contiene urea 9.5 M, tritón X-100 2.0%, β -mercaptoetanol

5% y anfolitos 3-10 de pH 0.4% (ICN Biomedicals Inc.), durante 15 min. a temperatura ambiente. La muestra tratada de esta manera se sometió a un isoelectroenfoque (primera dimensión) en geles contenidos en tubos capilares (urea 9 M, acrilamida-bisacrilamida 30:54 al 4%, Tritón X-100 20%, anfolitos 3-10 0.4%, persulfato de amonio 0.01% y TEMED 0.1%), previamente sometidos a 200, 300 y 400 V de corriente durante 10, 15 y 15 min. respectivamente, en una cámara Biorad cuyo tanque superior contenía NaOH 20 mM y el tanque inferior H₃PO₄ 10 mM. Las muestras se sometieron a una corriente de 500 V por 10 min. y a 700 V por 2 h. Al término de lo anterior los geles fueron expulsados de los capilares, sumergidos en regulador de equilibrio (Tris-HCl 0.065 M pH 6.8, SDS 2.3%, β-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y trazas de azul de bromofenol) durante 15 min. y sometidos a electroforesis en condiciones reductoras SDS-PAGE al 10% en mini-geles (60x60x1.5 mm, Biorad) y se revelaron mediante la técnica de tinción de plata.

AISLAMIENTO DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4⁺ALL⁻.

Los linfocitos T CD4⁺ provenientes de ganglios linfáticos se aislaron mediante separación negativa en columnas magnéticas de separación utilizando anticuerpos anti-CD19, anti-Mac-1 y anti-CD8 unidos a PE seguido por anticuerpos anti-PE unidos a perlas magnéticas (Miltenyi Biotec, Sunnyvale California). Los linfocitos CD4⁺ fueron colectados de una columna de separación magnética (Miltenyi Biotec, Sunnyvale California) y se verificó su pureza mediante el uso de anticuerpos anti-CD3-FITC y anti-CD4-CyChr la cual resultó del 90-94%. Las células T CD4⁺ purificadas se incubaron con ALL-B durante 30 min. a 4°C, seguido por la incubación con perlas magnéticas unidas a estreptavidina durante 20 min. a 4°C. Las células se colocaron en una columna de separación magnética y se colectaron las células no retenidas. Se verificó su pureza con el uso de anticuerpos anti-CD4-CyChr y ALL-B seguido por

incubación con estreptavidina-FITC. La población de linfocitos T resultó ser >95% ALL⁺

OBTENCIÓN DE CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTIGENO (CPAs)

Se obtuvieron células mononucleares de bazo mediante la separación por gradiente en Ficoll-Hystopaque. Las células obtenidas se incubaron con anticuerpos anti-CD3-PE seguido por anticuerpos anti-PE unidos a perlas magnéticas y colocadas en una columna de separación magnética. Las células no retenidas se colectaron y su pureza se verificó con el uso de anticuerpos anti-CD3-FITC, resultando >95% células CD3⁺. Las células obtenidas fueron tratadas con Mitomicina C (Boehringer Mannheim Biochemica) a una concentración de 10 µg/10⁶ células durante 30 min. a 37°C.

CULTIVO Y ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T

10⁶ células totales provenientes de ganglios linfáticos ó 5x10⁵ células T CD4⁺ALL⁺ y 2x10⁶ de CPAs se cultivaron en RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal de ternera inactivado, 1% de L-glutamina, penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL), 10 mM HEPES, and 2- mercaptoetanol (50 µM) a 37°C en una atmósfera de CO₂ (5%), en una placa de 24 pozos. Como mitógeno se utilizaron 2 µg de Concanavalina A (Con A) ó 25 ng/mL de PMA / 300 nM de ionomicina. Las células se cultivaron durante 24, 48 y 72 h, se lavaron dos veces con PBA y se tiñeron para su posterior análisis por citometría de flujo. Se analizaron las regiones correspondientes a los linfoblastos de acuerdo a su tamaño y granularidad. Se confirmó la presencia de los marcadores fenotípicos de activación CD25 y CD69 en las células analizadas. La especificidad de la tinción con la ALL se confirmó mediante ensayos de competencia de la unión con GalNAc 0.2 M.

TRATAMIENTO CON NEURAMINIDASA

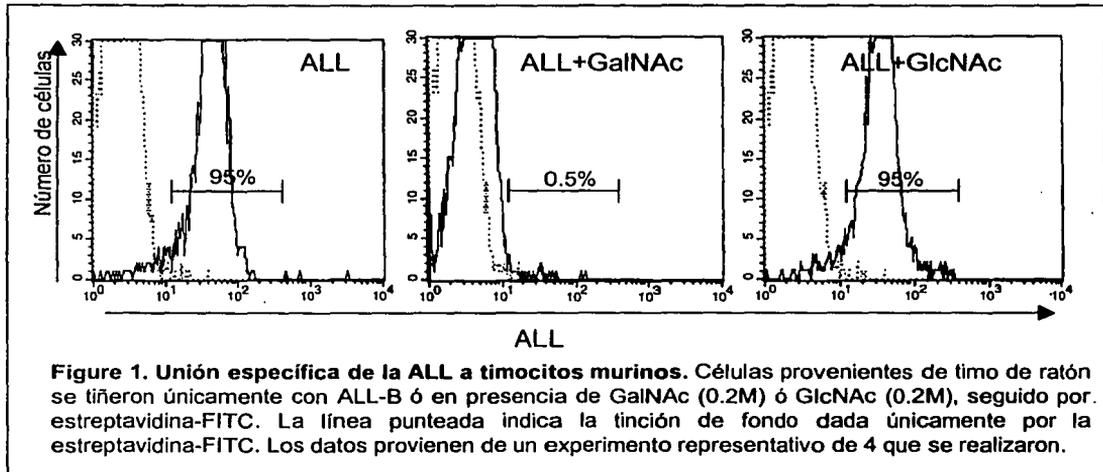
2×10^6 células provenientes de ganglio se trataron con 100 mU de neuraminidasa proveniente de *Clostridium perfringens* (SIGMA) durante 30 min. a 37°C. Posteriormente se lavaron 2 veces con PBA y se procedió a realizar la tinción con ALL-B y anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 seguido por estreptavidina FITC. El patrón de tinción del ALL en las células CD4⁺ y CD8⁺ se analizó por citometría de flujo.

RESULTADOS

DISTRIBUCIÓN Y EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DEL ALL (ALLr) EN SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T INMADUROS.

La distribución del receptor para la lectina ALL (ALLr) sobre las diferentes subpoblaciones de linfocitos T se determinó mediante el uso de la citometría de flujo. El análisis se llevó a cabo en células provenientes de timo, las cuales pueden ser identificadas en los diferentes estadios de maduración mediante marcadores de superficie ya conocidos. El uso de la ALL en citometría de flujo requirió que se verificara que la unión de esta lectina a las células fuera específica, para lo cual se realizaron ensayos de inhibición con el azúcar GalNAc, el cual compite por el sitio de unión al receptor.

Nuestros resultados indicaron que la unión de la ALL al total de los timocitos (90-95%) fue inhibida en más del 80% en presencia de la GalNAc, lo cual no ocurrió en presencia de otro tipo de monosacáridos como la GlcNAc (Fig. 1), y confirma la especificidad de la unión del ALL a las células analizadas.



Posteriormente se realizaron triples tinciones con los anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y la ALL y se analizaron las subpoblaciones correspondientes a las células inmaduras doble negativas CD4⁻8⁻, doble positivas CD4⁺8⁺, y a las células maduras monopositivas CD4⁺8⁻ y CD4⁻8⁺ (**Fig. 2A**, regiones R1, R2, R3 y R4 respectivamente). Se encontró que la ALL se une al 93-98% de las células CD4⁺8⁺ y CD4⁻8⁺, al 46-69% de las CD4⁺8⁻ y al 45-70% de las CD4⁻8⁻ (**Figure 2B**). La densidad de la unión de la ALL se determinó mediante el índice de la media de la intensidad de fluorescencia (MIF-I, ver material y métodos). Los resultados demostraron que el MIF-I fue significativamente más elevado en las células CD4⁺8⁺ y CD4⁻8⁺ (11±2.5 y 13±2.6 respectivamente), que en las células CD4⁺8⁻ (6±0.85, **Figura 2C**). Lo anterior indica claramente que el patrón de expresión del ALLr varía en las células con diferentes estados de maduración y entre el linaje de células CD4 y CD8 positivas. Prácticamente todos los timocitos inmaduros CD4⁺8⁺ expresan el ALLr con alta densidad (**Fig. 2B, R2**), cuando éstos maduran hacia el estado CD4⁺8⁻ (T cooperadores) la expresión del ALLr disminuye significativamente, tanto el porcentaje de células que lo presentan como en la densidad de expresión del receptor (**Fig. 2B, R3 y Fig. 2C**), mientras que los timocitos que maduran hacia el estado CD4⁻8⁺ (T citotóxico) presentan un alto porcentaje de células ALL positivas y densidad de expresión del ALLr similar al de la población doble positiva (**Fig. 2B, R4 y Fig. 2C**). La regulación negativa del ALLr en el linaje de células CD4⁺ se observó nuevamente cuando se analizaron las subpoblaciones inmaduras CD4⁺3^{lo/int} y las maduras CD4⁺3^{hi} (95% y 65% respectivamente, **Fig. 3**), mientras que las células CD8⁺3^{hi} mantenían una alta expresión del ALLr (90%). Cuando comparamos la expresión de la ALLr con otros marcadores de superficie conocidos de timocitos, encontramos que las células inmaduras PNA⁺, CD69⁺, CD62L^{in/lo} expresan el ALLr, y conforme maduran a células PNA⁻, CD69⁻, CD62L^{hi} disminuye dicha expresión (**Fig. 4**). De este resultado podemos

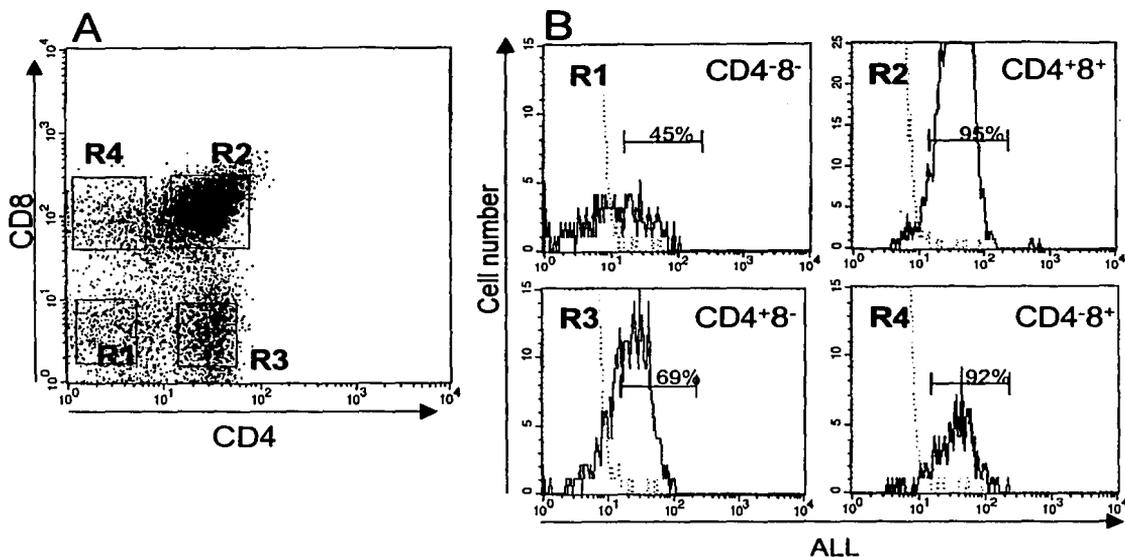


Figure 2. Expresión del ALLr en subpoblaciones de timocitos. Se realizó el análisis por citometría de flujo de una triple tinción de timocitos de ratón con anticuerpos anti-CD4 (Cy-Chrome), anti-CD8 (PE) y con ALL-B, seguido por estreptavidina-FITC. **A)** Se seleccionaron las subpoblaciones de timocitos mediante su expresión de CD4 y CD8 en regiones (R1-R4). Los números indican el porcentaje de células positivas en cada cuadrante. **B)** Se analizó la tinción con la ALL en cada una de las subpoblaciones. La línea punteada indica la tinción de fondo dada por la estreptavidina-FITC. **C)** La intensidad de fluorescencia de la tinción con la ALL se expresa como el índice de la media de la intensidad de fluorescencia (MIF-I, ver material y métodos). Las barras representan la media \pm la desviación estándar de seis experimentos realizados. Se encontró diferencia estadísticamente representativa entre el MIF-I de CD4⁺8⁺ versus CD4⁺8⁻ y CD4⁻8⁺ versus CD4⁻8⁻: *p < 0.05.

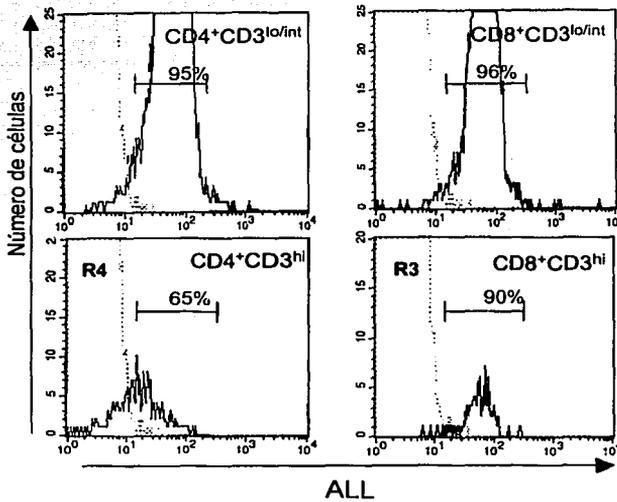


Figure 3. Expresión del ALLr en subpoblaciones de timocitos $CD3^{lo/int}$ y $CD3^+$. Se realizaron triples tinciones de timocitos con ALL-B y con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4 ó anti-CD3 y anti-CD8 seguido por estreptavidina FITC y se analizó por citometría de flujo el patrón de tinción de la ALL en las poblaciones $CD4^+3^{lo/int}$, $CD4^+3^{hi}$, $CD8^+3^{lo/int}$ y $CD8^+3^{hi}$. La línea punteada indica la tinción de fondo dada por la estreptavidina-FITC.

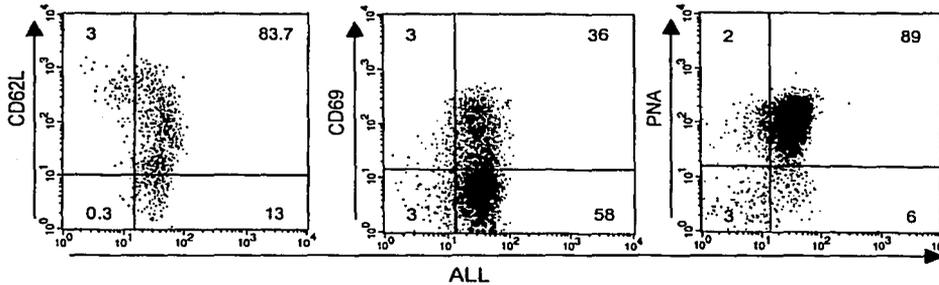


Figure 4. Expresión de la ALLr y de otros marcadores de superficie de timocitos murinos. Se realizó el análisis por citometría de flujo de dobles tinciones con ALL-B junto con anticuerpos anti-CD69, CD62L (PE) ó PNA-FITC, seguido por estreptavidina-FITC ó estreptavidina-Cy-Chrome, según corresponda. Se determinaron los patrones de tinción sobre la base de la tinción de fondo dada únicamente por la estreptavidina-FITC ó estreptavidina-Cy-Chrome. Los datos provienen de un experimento representativo de cuatro realizados. Los números indican el porcentaje de células positivas en cada cuadrante.

obtener una información adicional: el análisis por citometría de flujo nos indica que la ALL reconoce una molécula distinta a las que reconoce la PNA, ya que la tinción de ninguna de ellas se modifica como resultado de la presencia de la otra, y el patrón de unión de ambas lectinas es completamente distinto entre sí. La PNA es una lectina que reconoce principalmente el disacárido Gal β 1,3GalNAc sobre las moléculas CD43 y CD45 de linfocitos T, y la ALL reconoce preferencialmente al mismo disacárido.

DISTRIBUCIÓN Y EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DEL ALL (ALLr) EN SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T MADUROS (PERIFÉRICOS).

Los resultados del análisis por citometría de flujo del patrón de unión de la ALL en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ provenientes de sangre periférica, nódulos linfoides y bazo, demostraron una clara diferencia en el patrón de tinción de la ALL en ambas subpoblaciones que concuerda con lo encontrado en las células provenientes del timo. Se observa que prácticamente todos los linfocitos T CD8⁺ (75-95% **Fig. 5A**) presentan el receptor con alta densidad, mientras que la mayoría de los linfocitos T CD4⁺ no expresan el ALLr y quienes lo presentan (10-40%, **Fig. 5A**) es en mucho menor densidad que los CD8⁺ (**Fig. 5B**). Debido a que la densidad de expresión del ALLr en linfocitos T CD4⁺ periféricos es menor incluso que la que presentan los timocitos CD4⁺8⁺ (**Tabla 1**), llamamos a esta subpoblación de linfocitos T como CD4⁺ALL^{lo}. Un análisis adicional demostró que los linfocitos B periféricos no presentan el ALLr (**Fig. 6**).

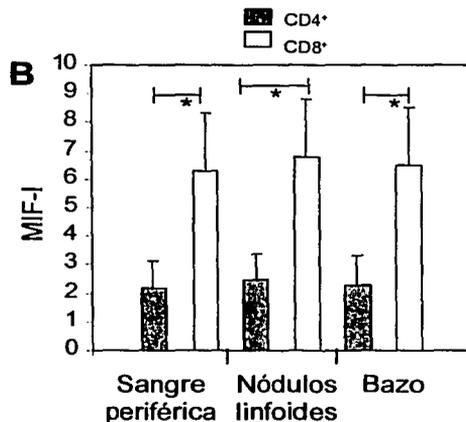
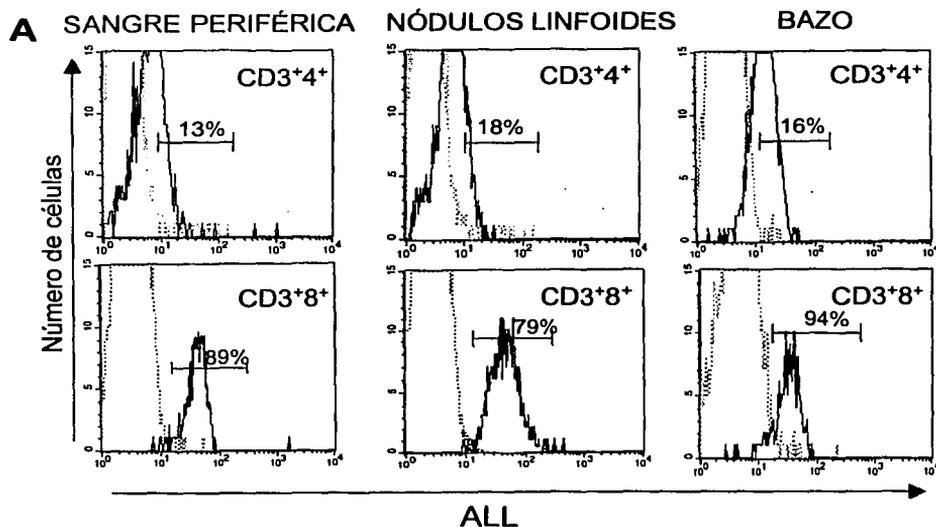


Figure 5. Expresión del ALLr en subpoblaciones de linfocitos T periféricos. Se obtuvieron células de sangre periférica, nódulos linfoides y bazo y se tiñeron con ALL-B y anticuerpos anti-CD3 (PE) junto con anticuerpos anti-CD4 ó anti-CD8

(FITC), seguido por estreptavidina- CyChrome. Se seleccionó la población CD3⁺ y se determinó el patrón de unión de la ALL a las células CD4⁺ ó CD8⁺. **A)** Se muestra el análisis representativo de la población CD3⁺ en cada uno de los órganos linfoides secundarios y en sangre periférica. Los números indican el porcentaje de células teñidas en cada cuadrante. **B)** Se muestra la intensidad de fluorescencia de la tinción con ALL en células T CD4⁺ y CD8⁺ los resultados representan el índice de la intensidad de fluorescencia (MIF-I). Las barras representan la media \pm la desviación estándar de seis experimentos realizados. Se encontró diferencias estadísticamente representativas entre la MIF-I de células T CD4⁺ versus CD8⁺. *p < 0.05.

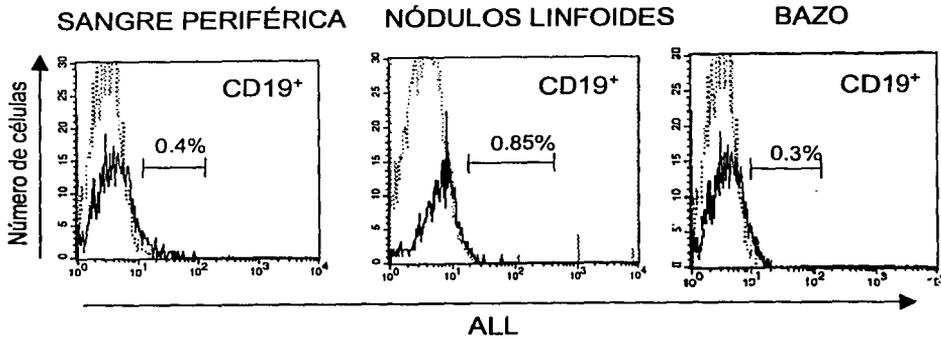


Figure 6. El ALL no se une a los linfocitos B (CD19⁺) de periferia. Se realizó el análisis por citometría de flujo de dobles tinciones con ALL-B junto con anticuerpos anti-CD19, seguido por estreptavidina-FITC de células provenientes de sangre periférica, nódulos linfoides y bazo. Las líneas punteadas indican la tinción dada por la estreptavidina-FITC.

Tabla 1.- Unión de la ALL a subpoblaciones de linfocitos T

Tinción con ALL	TIMO		PERIFERIA	
	CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Porcentaje (%)	46-67	95-98	10-40	79-95
MIF-I	6.0±85	13±2.6	2.3±0.9	6.5±1.2

Los resultados del análisis por citometría de flujo de la tinción de la ALL a subpoblaciones de linfocitos T se expresan en porcentajes de células teñidas en relación con el porcentaje de la tinción control, y como el índice de la media de la intensidad de fluorescencia ± la desviación estándar.

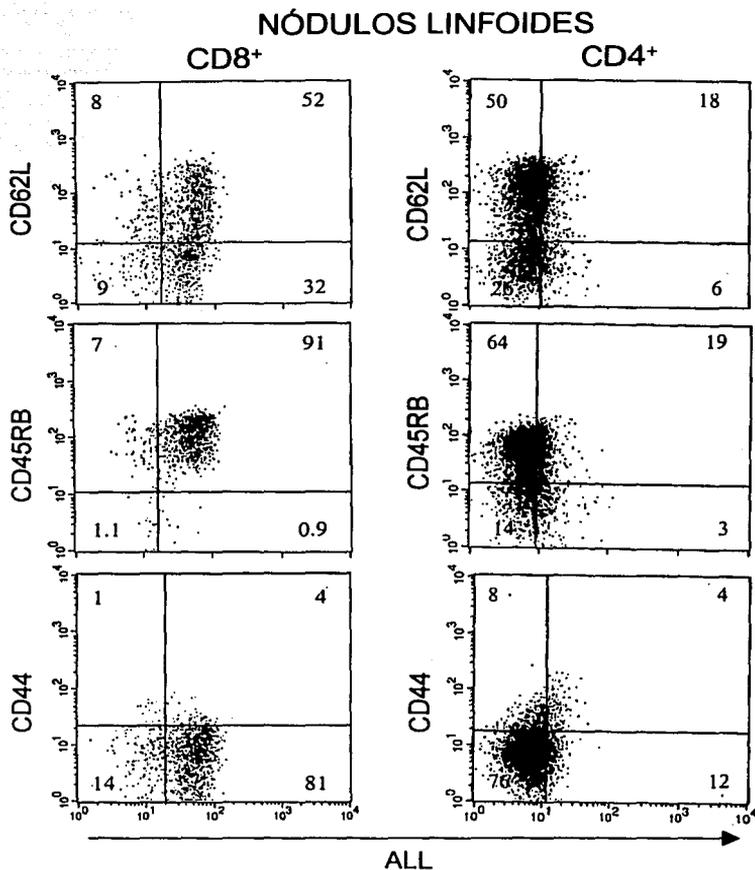


Figure 7. Fenotipo de las células T ALL⁺. Se realizaron triples tinciones de células provenientes de nódulos linfoides con ALL-B y anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD45RB ó anti-CD44 ó anti-CD62L, seguido por estreptavidina-FITC y se analizaron por citometría de flujo. Los datos representan el análisis de las regiones correspondientes a las células CD8⁺ ó CD4⁺. Los números indican el porcentaje de células positivas en cada cuadrante. Los datos son representativos de cuatro experimentos realizados.

FENOTIPO DE LAS CÉLULAS ALL⁺

La **figura 7** representa el análisis por citometría de flujo en el que se demuestra que todos los linfocitos T CD8⁺ALL⁺ presentan el fenotipo CD45RB^{hi} CD62L^{hi} CD44^{lo} (naive), así como prácticamente todas las células CD8⁺ con fenotipo naive presentan el ALLr. En el caso de los linfocitos T CD4⁺ALL^{lo} la clasificación no fue tan marcada ya que dichas células presentaron ambos fenotipos. Aproximadamente el 75% de células T CD4⁺ALL^{lo} presentaban el fenotipo característico de células naive y el restante no. Sólo una mínima fracción de las células CD4⁺ con fenotipo naive expresan el ALLr.

IDENTIFICACIÓN DEL ALLr EN LINFOCITOS T PERIFÉRICOS

Se llevó a cabo el aislamiento de la estructura detectada por la ALL en células provenientes de ganglio bazo y timo. La **Fig. 8** muestra el gel de poliacrilamida en condiciones reductoras en el que observamos una banda homogénea de 70 kDa para cada una de las muestras analizadas. De manera adicional se realizó el análisis de las isoformas que presenta la ALLr mediante electroforesis en doble dimensión.

Encontramos que el ALLr proveniente de células de ganglio presenta 3 isoformas (**Fig. 9**), lo cual concuerda con lo encontrado por Porras *et al*, donde se analizó por cromatografía de intercambio iónico al ALLr aislado de timocitos, y se encontraron 3 probables isoformas de la molécula.

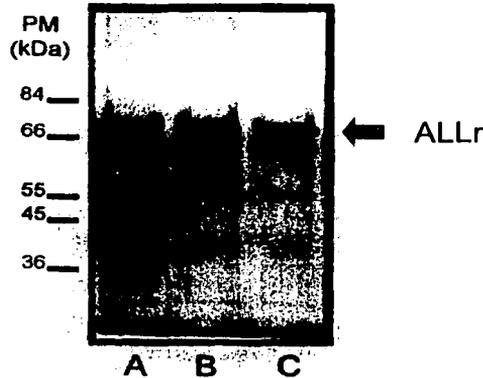


Figura 8. Identificación del receptor de la lectina del *A. leucocarpus* en linfocitos. El receptor de la ALL se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando ALL-B y una columna de agarosa-avidina. La figura muestra el gel de poliacrilamida (10%) en condiciones reductoras del ALLr purificado a partir de células de **A)** timo, **B)** ganglios linfáticos, y **C)** bazo (0.5 µg). El gel se reveló mediante la técnica de tinción de plata. Marcadores de peso molecular: fructosa-6-fosfatasa de músculo de conejo (84 kDa); albúmina de suero bovino (66 kDa); deshidrogenasa glutámica de hígado bovino (55 kDa); albúmina de huevo (45 kDa) y gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa).

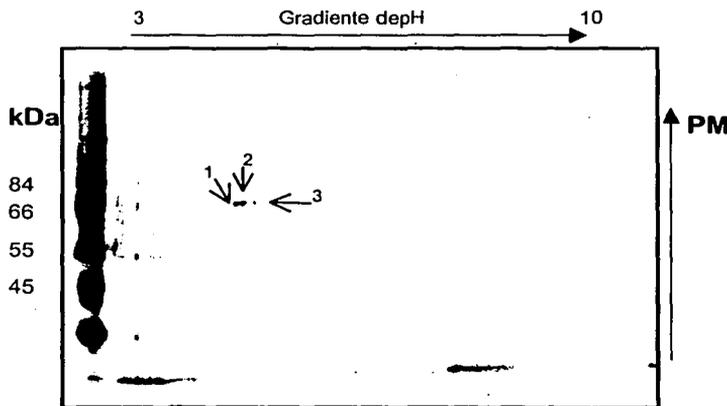


Figura 9. Análisis por electroforesis en doble dimensión del ALLr aislado. Se realizó la electroforesis en doble dimensión del ALLr obtenido a partir de células provenientes de nódulos linfoides. La primera dimensión se realizó en un gradiente de pH de 3.5 a 15, mientras que la segunda dimensión se realizó en un gel de poliacrilamida en condiciones reductoras al 10% y revelado por tinción con plata.

PATRON DE SIALILACION DE LINFOCITOS CD4 Y CD8 EN RELACION AL PATRON DE UNION DE LA ALL.

Se determinó la presencia de ácido siálico en la superficie de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ provenientes de timo y nódulos linfoides mediante el uso de las lectinas MAA y SNA (que reconocen Sia α 2,3GalNAc y Sia α 2,6GalNAc respectivamente), así como el efecto en el patrón de unión de la ALL después de un tratamiento con neuraminidasa que elimina el ácido siálico con ambos tipos de uniones. La **figura 10** muestra que las células monopositivas CD4 y CD8 no presentan diferencias significativas en el patrón de sialilación (SNA⁺ 95 y 85% respectivamente, MAA⁺ 90 y 93% respectivamente), ni tampoco las células periféricas (SNA⁺ 95% y 99%, MAA⁺ 87% y 92% respectivamente). Se observó que la densidad de expresión de Neu α 2,3GalNAc (MAA) era menor en las células CD4⁺ que en las células CD8⁺.

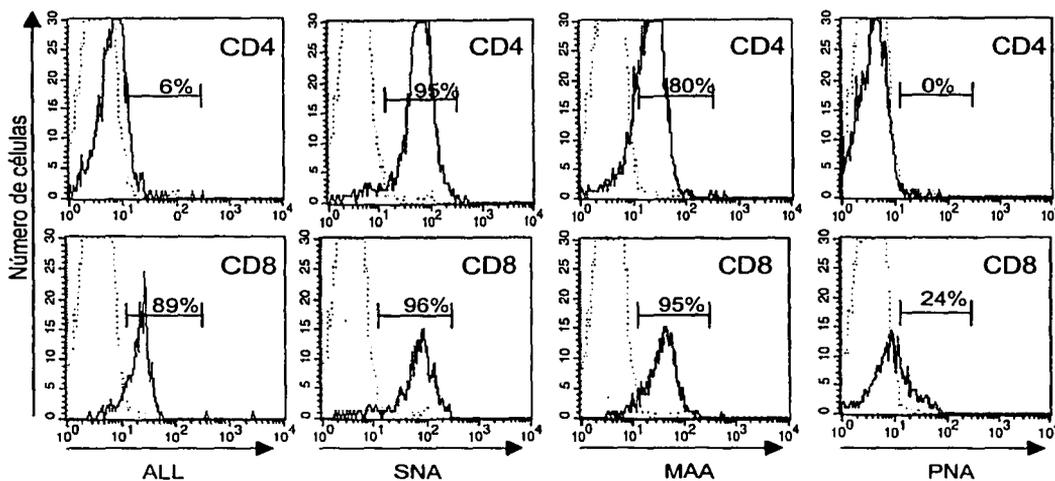


Figura 10. Patrón de tinción de la ALL en relación al patrón de expresión de ácido siálico en subpoblaciones de linfocitos T. Análisis por citometría de flujo del patrón de tinción de las lectinas ALL, SNA, MAA, y PNA en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ provenientes de nódulos linfoides. Las líneas punteadas indican la tinción dada por la estreptavidina-FITC.

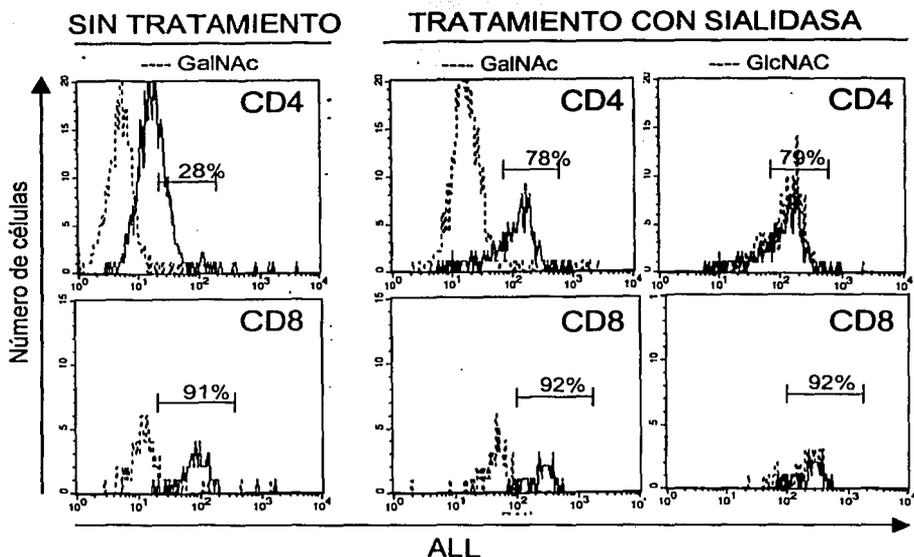


Figura 11. Efecto del tratamiento con sialidasa en el patrón de tinción de la ALL en subpoblaciones de linfocitos T. Análisis por citometría de flujo del patrón de tinción de la ALL en células provenientes de nódulos linfoides tratadas con neuraminidasa (Material y Métodos). Las células se tiñeron con ALL-B y anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8 seguido por estreptavidina-FITC. La figura indica los histogramas representativos de la tinción de la ALL en base a la tinción dada en presencia del azúcar competidor GalNAc y no competidor GlcNAc (línea punteada).

El tratamiento con neuraminidasa afecta de diferente manera la unión de la ALL a las células CD4⁺ y CD8⁺. En la **figura 11** se muestra que en las células CD4⁺ tratadas se incrementa la unión de la ALL (60-73%) de manera equivalente al incremento que se observa en las células activadas. En las células CD8⁺ tratadas se observa un incremento no significativo en la unión de la ALL.

UNION DE LA ALL A LINFOCITOS T ACTIVADOS.

Realizamos cultivos de células totales provenientes de ganglios linfáticos y las sometimos a un estímulo mitogénico con Concanavalina A (ConA) y con PMA/ionomicina, a diferentes tiempos. Posteriormente analizamos por citometría de flujo la unión de la ALL a las células activadas CD4⁺ y CD8⁺ (blastos, **figura 12A**). Encontramos que la unión de la ALL a los linfocitos T activados CD8⁺ disminuye dramáticamente mientras que en las células activadas CD4⁺ aumenta (**Fig.12B**, datos representativos de 24 h de cultivo). Durante el cultivo el porcentaje de células CD8⁺ALL⁺ disminuye progresivamente hasta ser prácticamente cero a las 72 h, al igual que la densidad de unión de la ALL (**Fig. 12C**), en presencia de ConA. Por otro lado el aumento en el porcentaje de células CD4⁺ reconocidas por la ALL presenta un valor máximo a las 24 h de cultivo (65-75%), disminuyendo posteriormente hasta ser prácticamente cero a las 72 h de cultivo (**Fig. 12C**). Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizó como mitógeno a la PMA/ionomicina.

UNION DE LA ALL A LINFOCITOS T CD4⁺ PURIFICADOS Y ACTIVADOS.

Las células CD4⁺ALL⁻ se separaron y cultivaron en presencia de un mitógeno. El análisis por citometría de flujo demostró que la unión de la ALL se incrementa rápidamente en las células CD4⁺ activadas alcanzando un índice de la intensidad de fluorescencia y porcentaje de células teñidas equivalente al encontrado en las células CD4⁺ provenientes de cultivos totales (**Fig.13**). Sin embargo, el máximo grado de unión de la ALL a las células activadas fue a las 48 h de cultivo, a diferencia de las 24 h en el cultivo de células totales.

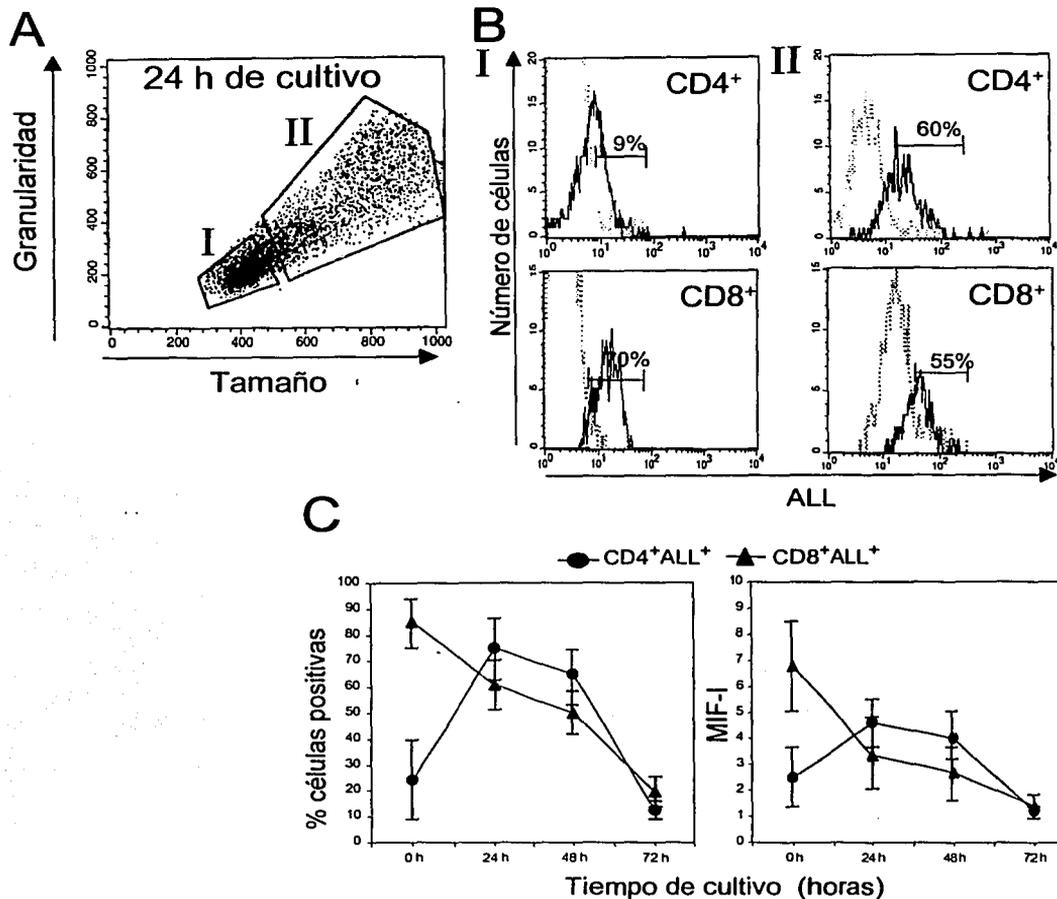


Figure 12. Unión de la ALL a subpoblaciones de linfocitos T activadas con mitógenos. Se obtuvieron células de ganglios linfáticos y se cultivaron en presencia de Concanavalina A 24, 48 y 72 h. Posteriormente se tiñeron con ALL-B y anticuerpos anti-CD4 (CyChrome) y anti-CD8 (PE) seguido por estreptavidina-FITC. **A)** Ejemplo representativo de las poblaciones de linfocitos identificadas después del estímulo mitogénico, identificadas por su tamaño y granularidad: región I compuesta por células en reposo, y región II compuesta de blastos. **B)** Resultados representativos del patrón de tinción del ALL en las subpoblaciones de linfocitos T analizadas a las 24 h de cultivo. Las líneas punteadas indican la tinción de fondo dada por la estreptavidina-FITC ó -CyChr. **C)** Las gráficas representan los resultados obtenidos de 6 experimentos en que se indican el porcentaje de células ALL⁺ a diferentes tiempos de cultivo, y la densidad de tinción de la ALL expresada como el índice de la media de la intensidad de fluorescencia ó MIF-I (material y métodos). Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de células CD4⁺ALL⁺ a las 0 y 24 h de cultivo ($p < 0.05$), y entre el porcentaje de células CD8⁺ALL⁺ a las 0 y 24 h de cultivo ($p < 0.05$), $n = 6$. Diferencias entre el MIF-I de células CD4⁺ a las 0, 24 y 48 h de cultivo: $p = 0.39$. Diferencias entre el MIF-I de células CD8⁺ a las 0 and 48 h: $p < 0.05$, $n = 6$.

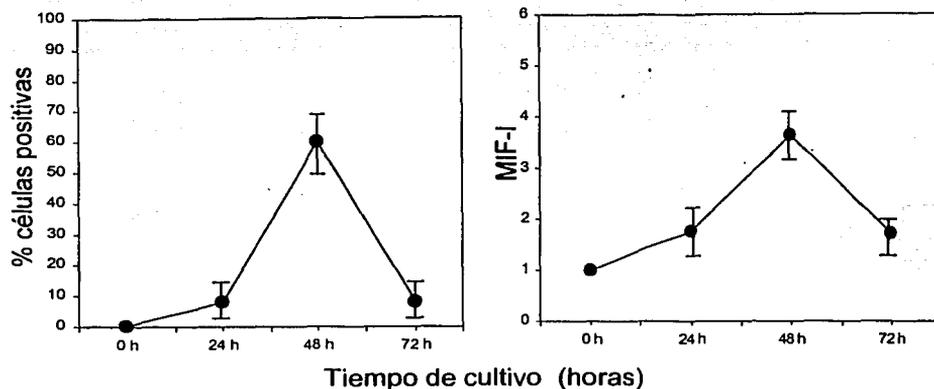


Figura 13. Unión de la ALL a subpoblaciones enriquecidas de linfocitos T CD4⁺ALL⁻ activadas con mitógenos. Se obtuvieron células CD4⁺ALL⁻ de ganglios linfáticos y se cultivaron en presencia de CPAs y Concanavalina A durante 24, 48 y 72 h. Posteriormente se tiñeron con ALL-B y anticuerpos anti-CD4 (CyChrome) seguido por estreptavidina-FITC. Las gráficas representan los resultados obtenidos de 4 experimentos en que se indican el porcentaje de células ALL⁺ a diferentes tiempos de cultivo, y la densidad de tinción de la ALL expresada como el índice de la media de la intensidad de fluorescencia ó MFI-I (material y métodos). Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de células ALL⁺CD4⁺ a las 24 y 48 h de cultivo ($p < 0.05$), y entre el MFI-I de las células CD4⁺ a las 24 y 48 h de cultivo ($p < 0.05$), $n=4$.

PATRÓN DE TINCIÓN DE LA ALL EN RELACION AL PATRÓN DE SIALILACIÓN Y O-GLICOSILACION DE LINFOCITOS T CD4⁺ Y CD8⁺ ACTIVADOS.

En la **figura 14** puede observarse que la tinción con MAA (α 2-3Sia) se mantiene en un alto porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ durante las 24 y 48 h de cultivo después del estímulo mitogénico (90 y 99% en CD4⁺, 95 y 98% en CD8⁺, respectivamente), para después observarse una disminución en la tinción a las 72 h de cultivo en ambas subpoblaciones celulares (41 y 45% respectivamente). De manera similar, el patrón de tinción de SNA (α 2-6Sia) muestra un alto porcentaje de células CD4⁺SNA⁺ y CD8⁺SNA⁺ a las 24 y 48 h de cultivo (95 a 97% y 90 a 96% respectivamente), y una disminución de ese porcentaje a las 72 h de cultivo (64 y 30% respectivamente), en ambas subpoblaciones celulares. La tinción con el anticuerpo 1B11 anti-CD43 (núcleo 2-O-glicano) demuestra que las células CD8⁺ activadas presentan un aumento progresivo en la expresión de la estructura núcleo 2-O-glicano a las 24 h (20-51%), 48 h (66-74%) y 72 h (75-86%), mientras que las células CD4⁺ activadas presentan un aumento moderado en la expresión de dicha estructura, siempre por debajo de los valores observados en las células CD8⁺, 24 h (6-10%), 48 h (21-28%) y 72 h (28-37%).

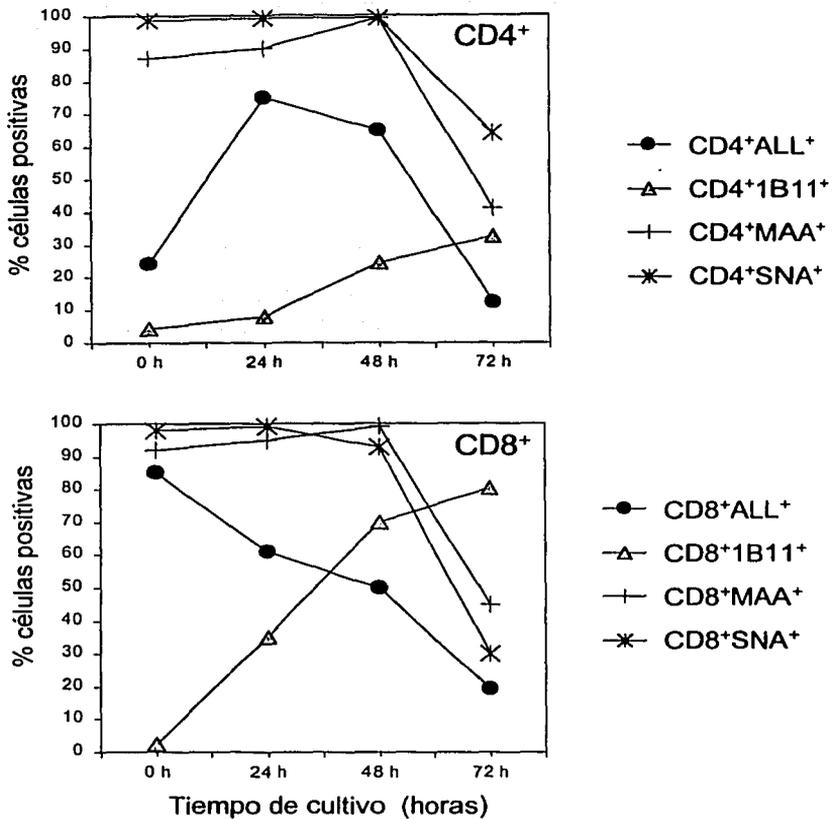


Figura 14. Patrón de sialilación, O-glicosilación y de ALL de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados. Se cultivaron células totales provenientes de nódulos linfoides en presencia de Con A durante 24, 48 y 72 h. Posteriormente se realizaron dobles tinciones con ALL ó las lectinas correspondientes ó el anticuerpo 1B11 (anti-CD43 de 130 kDa) con los anticuerpos anti-CD4 (PE ó FITC) ó anti-CD8 (PE ó FITC). Las gráficas muestran el análisis de los patrones de tinción de cada una de las lectinas y el anticuerpo 1B11 en las poblaciones activadas de células T CD4⁺ y CD8⁺, de 4 experimentos realizados.

DISCUSIÓN

La lectina aislada de la semilla de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) nos permite identificar en timocitos a una O-glicoproteína de 70 kDa (ALLr), la cual no posee aparentemente homología en la secuencia de aminoácidos con otros marcadores fenotípicos reportadas en leucocitos (Porras *et al*, 2000). Resultados previos en cortes histológicos de timos de ratón, indicaron que la ALL se une de manera diferencial a los timocitos ubicados en diferentes regiones del timo (Lascurain *et al*, 1994), sin embargo hasta este momento no se habían identificado las sub-poblaciones de timocitos a las cuales se unía la lectina.

El análisis por citometría de flujo demostró que el patrón de unión de la ALL varía a través de los diferentes estados de maduración de los linfocitos T provenientes del timo, pero además que dicho patrón varía entre las subpoblaciones de timocitos con linaje CD4 y CD8. El análisis de las subpoblaciones doble negativas, doble positivas y monopositivas indicó que las células con linaje CD4 regulan negativamente el ALLr mientras que las células CD8⁺ no. Este comportamiento se observó nuevamente en el análisis de las subpoblaciones inmaduras CD3^{lo/int} y maduras CD3^{hi} que expresan el marcador CD4, así como en las células inmaduras PNA⁺ y maduras PNA⁻. El bajo porcentaje de células CD4⁺ que expresan con baja densidad al ALLr fueron también observadas en la periferia así como el alto porcentaje de células CD8⁺ que expresan con alta densidad al ALLr. Este patrón de expresión difiere de aquéllos reportados para las moléculas O-glicosiladas de linfocitos T, CD43 y CD45. La glicofoma de 115 kDa del CD43 (identificada por el AcMo S7) se encuentra distribuida uniformemente en todos los timocitos, mientras que la glicofoma de 130 kDa (identificada por el AcMo 1B11) es regulada negativamente en los timocitos monopositivos. En periferia la glicofoma de 115 kDa continúa siendo expresada por la mayoría de las células T, con

la diferencia de que las células T CD4⁺ la expresan con una densidad menor que las células T CD8⁺, mientras que la glicofoma de 130 kDa mantiene su baja expresión en periferia. Las diferentes isoformas del CD45 se expresan de manera homogénea en ambas subpoblaciones de linfocitos de timo y en periferia. Por otro lado la proteína aislada mediante el ALL presenta un peso molecular diferente (ALLr 70 kDa) a aquéllos reportados para las diferentes glicofomas del CD43 (95-130 kDa) y del CD45 (180-220 kDa).

Las variaciones observadas en el patrón de unión de la ALL a las células T CD4⁺ pueden deberse exclusivamente a la modificación de la O-glicosilación sobre la molécula de 70 kDa (ALLr), o bien que el receptor en si ya no sea expresado en la superficie de la célula. Debido a que una de las variaciones en la glicosilación de linfocitos T ocurre en la médula tímica con un incremento en la síntesis de ST3Gal y ST6Gal lo que trae como consecuencia la aparición de ácido siálico, de manera que las células T maduras en timo y periferia se encuentran altamente sialiladas, se decidió averiguar la influencia del ácido siálico sobre la capacidad de unión de la ALL a las células. El tratamiento con neuraminidasa de timocitos y células T periféricas demostró que la unión de la ALL a las células T CD4⁺ depende de la presencia de ácido siálico, pero no en las células T CD8⁺. Sin embargo encontramos que el contenido de ácido siálico en unión α 2,3 ó α 2,6 en ambas subpoblaciones celulares era equivalente. Aún cuando la densidad de expresión del Sia α 2,3 en células CD8⁺ fue ligeramente mayor que en las células CD4⁺, esta última diferencia no podría explicar la dramática diferencia en la tinción con la ALL en las células CD4 y CD8 tratadas con neuraminidasa. Sin embargo Krishna and *et al* reportaron en 1997 que las células CD4⁺ presentaban una 9-O-acetilación en el ácido siálico, lo cual no fue detectado en los linfocitos CD8⁺, tanto en timo como en periferia. Esto último podría explicar las diferencias en el patrón de tinción de la ALL a las subpoblaciones de

linfocitos T cuando ambas presentan prácticamente el mismo patrón de sialilación. Así pues, los datos obtenidos nos indican que las variaciones en el patrón de unión de la ALL a linfocitos T CD4⁺ en timo y periferia se deben a un cambio en el patrón de glicosilación atribuible a cambios en el estado de sialilación de las células, mientras que en los linfocitos CD8⁺ la unión de la ALL no es afectada por la presencia de ácido siálico.

Estos resultados sugieren que tenemos una herramienta para detectar una proteína desconocida con un patrón de O-glicosilación particular y cuya expresión es modulada de manera diferencial en las subpoblaciones cooperadoras y citotóxicas de linfocitos T.

La capacidad funcional de las células se encuentra estrechamente relacionada con las características de sus moléculas de superficie y con el microambiente en el que se encuentran. Para llevar a cabo un análisis de la presencia del ALLr y la capacidad funcional de las células T maduras debemos tomar en cuenta que en la periferia los linfocitos T en reposo representan células que nunca han tenido contacto con su antígeno (naive), o bien células de memoria. Por lo anterior se determinó el fenotipo de las células CD4⁺ALL^{lo} y CD8⁺ALL⁺. En el caso de las células T de ratón es posible clasificar a las células como "naive" o no, de acuerdo al patrón de expresión de 3 marcadores de superficie: CD45RB^{hi} CD62L^{hi} CD44^{lo} para el primer caso y CD45RB^{lo} CD62L^{lo} CD44^{hi} para el segundo (Bradley *et al*, 1992; Butterfield *et al*, 1996; Sawain *et al*, 1996). Encontramos que las células CD8⁺ALL⁺ presentan un fenotipo de células naive así como prácticamente todas las células naive expresaban el ALLr. Lo anterior nos indica que el ALLr es necesario para realizar alguna función propia de una célula que nunca ha tenido contacto con su antígeno, aunque trabajos posteriores nos permitirán identificar plenamente el papel funcional de este receptor, pero es muy

probable que esté relacionada con el proceso de "homing" que sufre la célula hasta el encuentro con su antígeno.

En el caso de las células CD4⁺ no encontramos un patrón de expresión definido del ALLr en algún fenotipo específico de linfocitos T. Aparentemente la célula T CD4⁺ naive no requiere estrictamente al ALLr para realizar alguna función específica, entonces ¿porqué un pequeño porcentaje de células CD4⁺ con diferente fenotipo presentan el ALLr?. Tal vez debemos tomar en cuenta en este punto la densidad de expresión del receptor, recordemos que es muy baja si lo comparamos con la densidad de expresión en las células CD8⁺. Probablemente el ALLr no es necesario para realizar alguna función propia de células CD4⁺ que no han tenido contacto con su antígeno.

Hasta este momento hemos hablado del ALLr como la estructura detectada por la ALL. Sabíamos que el ALLr era una glicoproteína de 70 kDa en timocitos, pero no teníamos evidencia de que se tratara de una proteína con las mismas características en linfocitos T periféricos. Así pues, procedimos a identificar dicha estructura mediante su aislamiento a partir de células provenientes de ganglio y bazo (ver sección de Material y Métodos). Encontramos que aparentemente la ALL reconoce a una misma glicoproteína en células provenientes de timo, ganglio y bazo, sin embargo resulta evidente que la confirmación de lo anterior requiere de la obtención de la secuencia de aminoácidos.

Se podría considerar que el patrón de expresión de moléculas de superficie permanece constante cuando las células se encuentran en su estado virgen y varía cuando la célula encuentra a su antígeno y requiere de moléculas distintas para llevar a cabo otras funciones concomitantes al encuentro adecuado con su antígeno, como la de adhesión y activación. ¿Qué ocurrirá con la expresión del ALLr cuando la célula recibe un estímulo de activación?. Existen evidencias de la importancia del

reconocimiento de O-glicanos en las interacciones célula a célula involucradas en los procesos de activación celular, así como de la existencia de variaciones en el patrón de glicosilación durante los procesos de activación (Piller *et al*, 1988; Ellies *et al*, 1994; Priatel *et al*, 2000), así que decidimos averiguar si ocurría una modificación en la expresión del ALLr en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ posterior a un estímulo de activación. Nuevamente observamos que el patrón de unión de la ALL es distinto en ambos tipos celulares, mientras que en las células CD8⁺ ocurre una disminución gradual en la tinción con el ALL, en las células CD4⁺ se observa un rápido incremento seguido por un decremento en la unión de dicha lectina. Quisimos relacionar estos cambios en el patrón de tinción de la ALL con los cambios en el patrón de sialilación de las células activadas, así como en la síntesis de las estructuras núcleo 2 O-glicosiladas. Los datos publicados al respecto indican que los linfocitos T maduros altamente sialilados sufren de la pérdida de ácido siálico al sufrir un estímulo de activación, lo cual corresponde con el decremento en la síntesis de ST3Gal y un incremento en la síntesis de la C2GnT. Estos cambios en O-glicosilación han sido ampliamente estudiados en linfocitos T CD8⁺ que han sufrido una activación antígeno específica (viral) y en los cuales se observa un incremento en la tinción con la PNA (disminución del ácido siálico), y un incremento en la expresión de la glicofoma de 130 kDa del CD43 con el anticuerpo 1B11 (incremento de la estructura núcleo 2). Para ello utilizamos las lectinas que preferencialmente se unen a las formas sialiladas y no sialiladas de los O-glicanos, MAA SNA y PNA. Encontramos que la disminución en la tinción con MAA y SNA ocurre tiempo después del incremento en la tinción de la ALL en células CD4⁺ activadas, lo que indica que los cambios en la expresión de Sia α 2,3Gal y Sia α 2,6Gal no corresponden con los cambios en la tinción con la ALL. Los cambios en la tinción con la MAA y SNA son similares en ambas subpoblaciones de linfocitos T después del estímulo mitogénico, sin embargo el incremento en la

tinción con la PNA en las células CD4⁺ fue mucho menor que en las células CD8⁺, lo que indicaría que el reconocimiento de esta lectina no sólo depende del estado de sialilación (correspondiente a Sia α 2,3Gal y Sia α 2,6Gal) sino a otras estructuras O-glicosiladas reguladas de manera diferente en ambas subpoblaciones celulares después del estímulo mitogénico. El decremento de la expresión del ácido siálico no parece tener relación con la disminución de la tinción de la ALL a los linfocitos T CD8⁺, sin embargo el incremento en la tinción con la PNA corresponde al decremento en la tinción con la ALL. Quisimos monitorear la aparición de las estructuras O-glicosiladas núcleo 2 mediante el uso del anticuerpo 1B11 (glicofoma de 130 kDa del CD43) y observamos que el incremento en la aparición de esta glicofoma corresponde con el decremento de la tinción con la ALL. Lo anterior abre la posibilidad de que la disminución en la unión de la ALL a células CD8⁺ activadas por mitógenos pueda ser debida a cambios en las estructuras O-glicosiladas núcleo 2, pero no descarta la posibilidad de que sea debida a una disminución en la síntesis de la molécula reconocida por la ALL.

Uniendo los datos recabados tenemos en primer lugar a las células CD8⁺: el ALLr se expresa con alta densidad en células monopositivas CD8⁺ que salen del timo y en células CD8⁺ periféricas con fenotipo naive; cuando la célula T CD8⁺ sufre un proceso de activación la expresión del ALLr disminuye progresivamente. Este comportamiento concuerda con el que presentan las moléculas relacionadas con la migración de linfocitos T, ya que dichas moléculas son expresadas en alta densidad por células naive que requieren migrar a los órganos linfoides secundarios y dejan de ser expresadas cuando las células encuentran a su antígeno y requieren ser retenidos en sitio de reconocimiento del antígeno e iniciar el proceso de activación. Por lo anterior, es posible que la molécula detectada con el ALL presenta alguna función relacionada con la migración o "homing" hacia órganos linfoides secundarios.

En cuanto a las células CD4⁺, el ALLr presenta un patrón de expresión típico de los marcadores de activación temprana. Las células cuando comienzan el proceso de activación requieren de expresar moléculas que las capaciten para llevar a cabo procesos concomitantes como la adhesión celular. Aparentemente el ALLr podría participar en las primeras señales requeridas para la activación celular, ya que dicho marcador es regulado negativamente de manera temprana.

Si realizamos una comparación con los patrones de expresión de moléculas de activación ya descritas, podríamos decir que el del ALLr es similar al marcador de activación temprana CD69, cuya expresión se incrementa rápidamente (12 h) después del estímulo de activación con un máximo a las 24-48 h dependiendo del tipo de estímulo, y decae rápidamente a las 72 h de cultivo.

En este punto nos preguntamos si las clonas de linfocitos T CD4⁺ALL^{lo} se expandieron debido al estímulo mitogénico, o los linfocitos T CD4⁺ALL⁻ comenzaron a expresar el receptor de la ALL después del estímulo mitogénico. Para contestar estas preguntas decidimos purificar a las células T CD4⁺ALL⁻ y cultivarlas en presencia del mitógeno y posteriormente analizar la unión de la ALL a las células activadas. Los resultados indicaron que las células CD4⁺ALL⁻ son capaces de expresar el ALLr después del estímulo mitogénico, pero el tiempo de cultivo en el que ocurre la máxima unión de la ALL a las células activadas(48 h) difiere del encontrado en el cultivo de células totales (24 h) lo cual podría indicar que las células CD4⁺ALL^{lo} y CD4⁺ALL⁻ presentan una capacidad diferente de proliferación, sin embargo, se requieren de otro tipo de ensayos para poder confirmarlo.

Aparentemente las células CD4⁺ y CD8⁺ regulan la expresión de O-glicanos de manera diferencial para llevar a cabo sus funciones. Nuestros datos contribuyen a la información obtenida en diversos estudios los cuales señalan que estas subpoblaciones celulares presentan diferentes patrones de glicosilación (tinción con el

anticuerpo S7, He *et al* 1999), o bien diferentes maneras de regulación de los O-glicanos para realizar diferentes funciones: Priatel *et al* reportaron que los O-glicanos en las células CD4 y CD8 son sialilados por la ST3Gal-I por igual, pero en un sistema donde se anula la síntesis de dicha enzima, la mayoría de los linfocitos T CD8⁺ sufren apoptosis mientras que sólo un pequeño porcentaje de células CD4⁺ lo sufren. Lo anterior apoya la idea de que las células CD4⁺ sufren apoptosis por mecanismos diferentes a las células CD8⁺ y en los cuales se encuentran involucrados la modulación de los O-glicanos de superficie. Harrington *et al* encontraron que las células CD8⁺ efectoras expresan con mayor densidad la estructura núcleo 2 que las células de memoria (usando el anticuerpo 1B11, células de ratón), mientras que Mukasa *et al* reportó que esta estructura se presenta predominantemente en células CD4⁺ de memoria (usando el anticuerpo 1D4, células humanas).

En conclusión, de acuerdo a los datos obtenidos tenemos que un posible nuevo receptor O-glicosilado de linfocitos T reconocido por la ALL presenta un patrón de expresión diferente para las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en timo, en periferia, y en células activadas por mitógenos. (Resumen **Figura 15**). Nuestros datos contribuyen a señalar al ALLr como un posible candidato para un nuevo receptor de linfocitos T, aún cuando no haya sido completamente caracterizado.

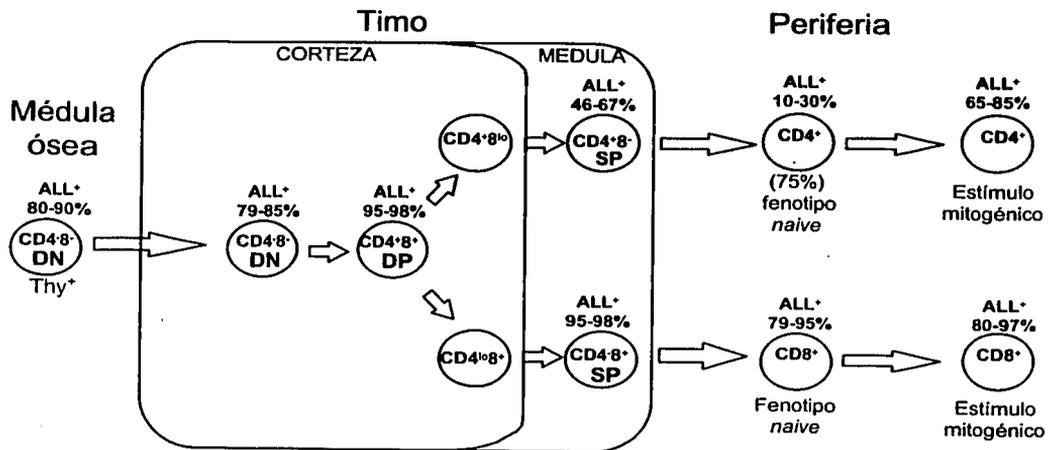


Figure 15. Expresión del ALLr en células T. La figura muestra de distribución del ligando para la ALL en células T en desarrollo, células T periféricas en reposo y células T activadas con mitógenos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bagriacik, E.U., Miller, K.S., Cell surface sialic acid and the regulation of immune cell interactions: the sialidase effect reconsidered. *Glycobiology* **9**, 267-275, 1999.
2. Baum, L., Derbin, K., Perillo, N., Wu, T., Pang, M., Uittenbogaart, C., Characterization of terminal sialic acid linkages on human thymocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 10793-10799, 1996.
3. Baum, L., Pang, M., Perillo, N., Wu, T., Delegeane, A., Uittenbogaart, C.H., Fukuda, M., Seilhamer, J.J., Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med.* **181**, 877-887, 1995.
4. Boyd, RL, Hugo, P., Towards an integrated view of thymopoiesis. *Immunol. Today* **12**, 71-78, 1991.
5. Bradley, L.M., Atkins, G.G., Swain, S.L., Long-term CD4⁺ memory T cells from the spleen lack MEL-14, the lymph node homing receptor. *J. Immunol.* **148**, 324-331, 1992.
6. Butterfield, K., Fathman, C.G., Budd, R.C., A subset of memory CD4⁺ helper T lymphocytes identified by expression of Pgp-1. *J. Exp. Med.* **169**, 1461-1466, 1989.
7. Chervenak, R., Cohen, J.J., Peanut lectin binding a marker for activated T-lineage lymphocytes. *Thymus* **4**, 61-67, 1982.
8. Ellie, L.G., Tomlinson Jones A., Williams, M.J., Ziltener, H.J. Differential regulation of CD43 glycoforms on CD4 and CD8 T lymphocytes in graft-versus-host disease. *Glycobiology* **4**:885-901, 1994.
9. Fabbi, M., Geginat, J., Tiso, M., Ramarli, D., Parent, D., Bargellesi, A., Remold-O'Donnell, E., 8B4/20, a private CD43 epitope on developing human thymocytes, is involved in thymocyte maturation. *J. Immunol.* **163**, 5964-5970, 1999.

10. Fowlkes, B.J., Waxdal, M.J., Shadow, S.O., Thomas, C.A., Asofsky, R., Mathieson, B.J., Differential binding of fluorescein-labeled lectins to mouse thymocytes: subsets revealed by flow microfluorometry. *J. Immunol.* **125**, 623-630, 1980.
11. Fujii Y., Okumura M., Inada K., Nakahara K., Matsuda H. CD45 isoform expression during T cell development in the thymus. *Eur. J. Immunol.* **22**, 1843-1850, 1992.
12. Fukuda, M., Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res.* **56**, 2237-2244, 1996.
13. Galvan, M., Murali-Krishna, K., Lau Ming, L., Baum, L., Ahmed, R., Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from virally infected mice can distinguish effector/memory on CD8⁺ T cells from naive cells. *J. Immunol.* **161**, 641-648, 1998.
14. Galvan, M., Tsuboi, S., Fukuda, M., Baum, L., Expression of a specific glycosyltransferase enzyme regulates T cell death mediated galectin-1. *J. Biol. Chem.* **275**, 16730-16737, 2000.
15. Gillespie, W., Paulson, J.C., Kelm, S., Pang, M., Baum, L.G., Regulation of α 2,3-sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin (PNA⁺) to PNA⁻ phenotype in developing thymocytes. *J. Biol. Chem.* **268**, 3801-3811, 1993.
16. Gorocica, P., Lascurain, R., Hernández, P., Porras, F., Bouquelet, S., Vázquez, L., Zenteno, E., Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine peritoneal macrophages. *Glycoconj. J.* **15**, 809-814, 1998.
17. Harrington, L.F., Galvan, M., Baum, L.G., Altman, J.D., Ahmed, R., Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans. *J. Exp. Med.* **191**, 1241-1246, 2000.
18. He, Y.W., Bevan, M.J. High level expression of CD43 inhibits T cell receptor/CD3-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* **190**:1903-1908, 1999.

19. Hernández, J., Garfias, Y., Reyes-Leyva, J., Chávez, R., Lascurain, R., Zenteno, E.. Peanut agglutinin (PNA) and *Amaranthus leucocarpus* (ALL) lectins discriminate between memory and naive porcine lymphocytes. *Vet. Immunology Immunopathol.* **84**, 71-82, 2002
20. Jones, A.T., Federspiel, B., Ellies, L.G., Williams, M.J., Burgener, R., Duronio, V., Smith, C.A., Takei, F., Ziltener, H.J., Characterization of the activation-associated isoform of CD43 on murine T lymphocytes. *J. Immunol.* **153**, 3426-3439, 1994.
21. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685, 1970.
22. Lascurain, R., Chávez, R., Gorocica, P., Pérez, A., Montaña, L.F, Zenteno, E., Recognition of a CD4⁺ mouse medullary thymocytes subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Immunology* **83**, 410-413, 1994.
23. Lascurain, R., Porras, F., Baez, R., Chávez, R., Martínez-Cairo, S., Alvarez, G., Zenteno, E., *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes human naive T cell subpopulations. *Immunol. Invest.* **26**, 579-587, 1997.
24. Lis, H., Sharon, N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* **218**, 1-27, 1993
25. Mackay, C.R., Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 423-432, 1993.
26. Merril, C.R., Goldman, D., Van Keuren, M.L., Gel protein stains: Silver stain. *Methods Enzymol.* **104**, 441-447, 1984.
27. Mukasa, R., Homma, T., Ohtsuki, T., Hosono, O., Souta, A., Kitamura, T., Fukuda, M., Watanabe, S., Morimoto, C. Core 2- containing O-glycans on CD43 are preferentially expressed in the memory subset of human CD4 T cells. *Int. Immunol.* **11**:259-268, 1999.

28. Nakano T., Oguchi, Y., Imai, Y., Osawa, T., Induction and separation of mouse helper T cells by lectins. *Immunology* **40**, 217-222, 1980.
29. Natarajan, K., Sawicki, M.W., Margulies, D.H., Mariuzza, R.A., Crystal structure of human CD69: a C-type lectin-like activation marker of hematopoietic cells. *Biochemistry* **39**, 14779-14786, 2000.
30. Pace, K.E., Hahn, H.P., Pang, M., Nguyen, J. T., baum, L.G. Cutting Edge: CD7 delivers a pro-apoptotic signal during galectin-1 induced T cell death. *J. Immunol.* **165**, 2331-2334, 2000.
31. Perillo N.L., Uittenbogaart C.H., Nguyen J.T., Baum L.G. Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J. Exp. Med.* **185**(10) 1851-1858, 1997.
32. Perillo N.L., Pace K.E., Seihamer J.J., baum L.G. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* **378**, 736-739, 1995.
33. Piller, F., Piller, V., Fox, R.I., Fukuda, M., Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **263**,15146-15150, 1988.
34. Porras, F., Lascurain, R., Chávez, R., Ortíz, B., Hernández, P., Debray, H., Zenteno, E., Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine naive thymocytes. *Glycobiology* **10**, 459-465, 2000.
35. Priatel, J.J., Chui, D., Hiraoka, N., Simmons C.J.T., Richardson, K.B., Page, D.M., Fukuda, M., varki N.M., and Marth, J.D. The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8⁺ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycans biosynthesis. *Immunity* **12**:273-283, 2000.
36. Reed D.S., Olson S., Lefrancois L. Glycosyltransferase regulation mediated by pre-TCR signaling in early thymocyte development. *Int. Immunol.* **10**(4), 445-451, 1998.

37. Savage, D., Mattson, G., Desai, S., Nielander, G., Morgensen, S., Conklin, E., *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*, Pierce Chemical Company, Rockford, IL. 25-42, 1992.
38. Sutton, P., Stoddart, R. W., Hutchinson, L.V. Altered patterns of glycosylation on rat lymphocytes associated with activation. *Immunology* **76**, 472-477, 1992.
39. Swain, S.L., Croft, M., Dubey, C., Haynes, L., Rogers, P., Zhang, X., Bradley, L.M., From naïve to memory T cell. *Immunol. Rev.* **150**, 143-167, 1996.
40. Swat, W, Dessing, M, von Boehmer, H, Kieselow, P., CD69 expression during selection and maturation of CD4⁺8⁺ thymocytes. *Eur. J. Immunol.* **23**, 739-746, 1993.
41. Tomlinson Jones, A.T., Federspiel, B., Ellies, L.G., Williams, M.J., Burgener, R., Smith, C.A., Takei, F., Ziltener, H.J. Characterización of the activation isoform of CD43 on murine T lymphocyte. *J. Immunol.* **153**:3426-3431, 1994.
42. Tsuboi, S., Fukúda, M., Branched O-linked oligosaccharide ectopically expressed in transgenic mice reduce primary T-cell immune response. *EMBO J.* **16**, 6364-6373, 1997.
43. Tsuboi, S., Fukuda, M., Over expression of branched O-linked oligosaccharides on T cell surface glycoproteins impairs humoral immune responses in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **273**: 30680-30687, 1998.
44. Vespa, G.N., Lewis, L.A. Kozak, K.R. Moran, M. Nguyen, J.T. Baum, L.G., Miceli, M.C., Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.* **162**, 799-806, 1999.
45. Westermann J., Bode U. Distribution of activated T cells migrating through the body: a matter of life and death. *Immunol. Today*, **20**(7), 302.306, 1999.

46. Wu, W., Harley, P.H., Punt, J.A., Sharrow, S.O., Kears, K.P., Identification of CD8 as a peanut agglutinin (PNA) receptor molecule on immature thymocytes. *J. Exp. Med.* **184**, 759-764, 1996.
47. Wu, W., Punt, J.A., Granger, L., Sharrow, S.O., Kears, K.P., Developmentally regulated expression of peanut agglutinin-specific glycans on murine thymocytes. *Glycobiology* **7**, 349-356, 1997.
48. You-Wen ,H., bevan, M.J. High level expression of CD43 inhibits T cell receptor/CD3-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* **190**(12), 1903-1908, 1999. **(S7)**
49. Zenteno, E., Ochoa, J.L., Isolation and purification of *Amaranthus leucocarpus* lectin on stroma column. *Phytochemistry* **27**, 313-317, 1988.
50. Zenteno, E., Lascurain, R., Montañó, L.F., Debray, H., Montreuil, J., Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj. J.* **9**, 204-208, 1992.