



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PARTICIPACION DE MOLECULAS GLICOSILADAS EN LOS MECANISMOS DE ANERGIA CELULAR EN TUBERCULOSIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

DOCTORA EN CIENCIAS

(INMUNOLOGIA)

P R E S E N T A :

MARIA DEL CARMEN JIMENEZ MARTINEZ

Tutor: EDGAR ZENTENO GALINDO

Facultad de Medicina



MEXICO, D. F.

2004

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 se realizó en el Departamento de Investigación en Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, bajo la dirección de Ricardo Lascurain Ledesma y Edgar Zenteno Galindo. Este trabajo fue apoyado parcialmente por CONACYT (34814-M) y DGAPA-UNAM (PAPIIT-IN224598)

AGRADECIMIENTOS

A los miembros de mi jurado que con sus comentarios y sugerencias enriquecieron esta tesis, doctores:

Moisés Selman Lama, Edgar Zenteno Galindo, Iris Estrada García, Vianney Ortiz Navarrete, Ricardo Rosales Ledesma, Rogelio Hernández Pando, Luis Felipe Montaña, Ricardo Lascurain Ledesma.

Al Dr. Edgar Zenteno, por haberme aceptado como parte de su equipo de trabajo cuando todavía era estudiante de medicina.

Al Dr. Ricardo Lascurain, por sus anécdotas.

Al Dr. Raúl Chávez por causarme el estrés suficiente para tener a la mano "estampitas" que intercambiar y qué comentar.

Al Dr. Salvador Martínez-Cairo por las interminables charlas que siempre dejan algo de aprendizaje extra-académico.

A Yonathan por todos los momentos laboratorísticos y no laboratorísticos que hemos pasado juntos.

A BOQ, Gis y Pedro, por su amistad.

A Marisela por ser la primera persona en el laboratorio que a mi llegada me tendió una mano.

A la Sra. Rosita porque su trabajo es invaluable.

A todos mis demás compañeros de trabajo que están y que ya no están: Del INER: Paty, Flor, BEM, ISO, mis alumnetos (NAT, Jesús, JL, Adrián), Hugo, Jesús H; de la UNAM, Dra. Conch y los miembros de su lab. Y los nuevos.

A todos los pacientes que colaboraron en este estudio.

A mis padres, pero en especial a mi mamá que me aguantó todas mis angustias cuando no me salían los experimentos.

A Eduardo por apoyarme en todo momento.

A Dios

DEDICATORIA

A mis padres:

César Jiménez Cázares (q.e.d.): Te extraño, incluso tus regaños.

María Carmen Jiménez Martínez, gracias por tu alegría, paciencia, tolerancia y mente abierta que hacen que seas la persona que más admiro.

A Eduardo: Simplemente porque te amo.

PARTICIPACIÓN DE MOLÉCULAS GLICOSILADAS EN LOS MECANISMOS DE ANERGIA CELULAR EN TUBERCULOSIS

INDICE

Resumen.....	1
Introducción y Antecedentes.....	2
Planteamiento del Problema.....	7
Hipótesis.....	7
Objetivos.....	7
Material y Métodos.....	8
Resultados.....	
Capítulo 1. Frecuencia y fenotipo de la población de linfocitos T CD4+ ALL+ en pacientes con tuberculosis	14
Capítulo 2. Evaluación <i>in vitro</i> de los linfocitos T CD4+ ALL+	24
Capítulo 3. Expresión intracelular de IL-4 e IFN- γ en linfocitos T CD4+ CD57+ con fenotipo de memoria antígeno-estimulados en pacientes con tuberculosis	36
Capítulo 4. Expresión de moléculas coestimuladoras en la subpoblación de linfocitos T CD4+ CD57+ y células adherentes CD14+	55
Discusión General	63
Bibliografía	69

RESUMEN

En este trabajo se demostró que en pacientes con tuberculosis (TB) existe un incremento del doble de una subpoblación de linfocitos T CD4+ que expresan una O-glicoproteína reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) ($p < 0.001$); estas células presentaron un fenotipo relacionado a activación, al expresar CD25 y CD124 en proporción significativa ($p < 0.001$). Los ensayos *in vitro*, demostraron que la proteína O-glicosilada reconocida por ALL fue inducida después de la activación antigénica, teniendo una expresión de tres veces más a las 48 h ($p < 0.001$) y que la IL-2 podría estar jugando un papel importante en la generación de linfocitos T CD4+ALL+ pues en su ausencia se reduce significativamente el número de estas células. Por otra parte también se demostró que las células que proliferaron al estímulo antigénico fueron predominantemente los linfocitos T CD4+ ALL+ ($p < 0.001$), con producción predominante de IFN- γ sobre IL-4. Otro marcador sacarídico estudiado fue CD57, el cual se encuentra presente en poblaciones de linfocitos T CD4+ expandidas en estados de estimulación antigénica crónica, en este trabajo se demostró un incremento en la subpoblación de linfocitos T CD4+CD57+ en pacientes con TB ($p < 0.001$), encontrando que el fenotipo de esta subpoblación correspondía a células de memoria/efectoras CD28⁻ CD45RO⁺ CD62L. Los estudios *in vitro*, demostraron que los linfocitos T CD4+ CD57+ producen citocinas (IL-4 e IFN- γ) en mayor proporción que los linfocitos T CD4+CD57- ($p < 0.001$). En resumen los datos presentados permiten sugerir que durante la estimulación del sistema inmunitario se generan cambios en la glicosilación de proteínas de superficie en células linfoides involucradas en la respuesta, en el caso de la tuberculosis en los linfocitos T CD4+; de esta forma la subpoblación de linfocitos T CD4+ que expresa Gal, GalNAc, es la población que responde al estímulo antigénico del resto de linfocitos T CD4 con proliferación celular, mientras que la subpoblación de linfocitos T CD4 que expresan la estructura SO₄-3GlcA β 1,3Gal β 1,4 GlcNAc son células que ya cumplieron con esta etapa y que se encuentran en periferia dirigiéndose al sitio de lesión, para cumplir su función efectora.

INTRODUCCIÓN

La resistencia inmunológica o la susceptibilidad ante microorganismos intracelulares se encuentra superditada a la función de los linfocitos T CD4+ mediante sus distintas subpoblaciones Th1 y Th2¹. La respuesta inmunitaria de tipo celular mediada por los linfocitos Th1, es la que confiere resistencia y resolución a las infecciones intracelulares. Los linfocitos Th1 producen primordialmente interleucina 2 (IL-2) e Interferón gamma (IFN- γ). Los macrófagos, activados por el IFN- γ eliminan con mayor eficacia a la micobacteria, además de que contribuyen con la respuesta celular al producir más citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e IL-12. En algunas ocasiones, durante la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, la IL-2 favorece mayor reclutamiento de linfocitos T cooperadores (CD4+) y T citotóxicos (CD8+) para mejorar la eliminación del bacilo², pero la respuesta Th1 es muy agresiva, provocando hipersensibilidad retardada en el pulmón, generando necrosis caseosa y licuefacción de las lesiones granulomatosas^{3,4}. La lesión pulmonar y las manifestaciones clínicas se deben a este mecanismo. Por otra parte, los linfocitos Th2 producen IL-4 e IL-10, principalmente, estas citocinas favorecen la activación de linfocitos B para la producción de anticuerpos. La respuesta mediada por los linfocitos Th2 se denomina respuesta inmunitaria humoral y es considerada ineficaz para infecciones intracelulares debido a que la micobacteria puede sobrevivir dentro del macrófago, evadiendo la respuesta inmunitaria humoral². Por lo anterior, se considera que la elección de la respuesta inmunitaria de tipo Th1 sobre la de tipo Th2, es determinante en la eliminación de la micobacteria⁵. Sin embargo, los estudios en humanos son contradictorios, algunos autores identifican una respuesta Th1, caracterizada por IFN- γ e IL-2⁶; otros, detectan un patrón de secreción de citocinas Th0 donde hay producción de IL-2, IL-4 e IFN- γ ⁷ y algunos, sugieren que el progreso de la enfermedad está relacionado con una disminución de la respuesta Th1⁸. Hirsch y colaboradores demostraron que el incremento en la producción de TGF- β puede disminuir la producción de radicales del oxígeno y del nitrógeno en

macrófagos, inhibir la proliferación celular y disminuir la producción de IFN- γ .⁹ En pacientes anérgicos con cavitaciones pulmonares se ha demostrado un incremento en la producción de IL-4¹⁰ e IL-10¹¹ suprimiendo la respuesta inmunitaria protectora.

Estos fenómenos de cooperación y comunicación celular dependen del reconocimiento célula-célula, en el cual participan proteínas y lípidos de la superficie celular con sus estructuras glicosídicas asociadas.¹² La glicosilación de proteínas es un proceso postraducciona l llevado a cabo en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi. Las reacciones de glicosilación son catalizadas por glicosiltransferasas, a partir de precursores monosacáridos de origen endógeno o exógeno.¹³ Los tipos más comunes de glicoproteínas encontrados en células eucarióticas son definidos de acuerdo a la naturaleza química en las regiones de unión con la proteína, siendo las más frecuentes las de tipo N y O. Los N-glicanos son una cadena de oligosacáridos unidos en forma covalente a una asparagina de una cadena polipeptídica dentro de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, con la N-acetilglucosamina (GlcNAc). Los O-glicanos son oligosacáridos unidos covalentemente a un residuo de serina o treonina (Ser/Thr-O) generalmente con una N-acetilgalactosamina (GalNAc)¹². Las glicoproteínas recién sintetizadas son transportadas a la superficie celular o como moléculas de secreción para realizar sus funciones biológicas¹⁴. En la última década, las glicoproteínas de membrana, han cobrado importancia por su función durante la comunicación celular¹⁵, el interés se ha enfocado en aquellos procesos de glicosilación de proteínas que dan lugar a estructuras O-glicosídicas, debido a que estos arreglos tienden a generar estructuras de corta longitud, que conforman ligandos que participan en el reconocimiento por moléculas de adhesión celular¹⁶.

La síntesis y la diversificación de los O-glicanos es consecuencia de la acción enzimática de glicosiltransferasas sobre la estructura del O-glicano (GalNAc α Ser/Thr), a la que se agregan Gal, GlcNAc y otros sacáridos por ejemplo el ácido siálico ocasiona la restricción de futuras elongaciones. Estas modificaciones ocurren durante la ontogenia de los linfocitos T y durante procesos

de activación celular. Estudios *in vitro* con linfocitos T humanos han demostrado que las células en reposo expresan el Núcleo 1 disialilado en una estructura tetrasacarídica sobre la molécula CD43, cuando estos mismos linfocitos son activados con un anticuerpo anti-CD3 se observan cambios en las estructuras O-glicosídicas, expresando una ramificación hexasacárida del Núcleo 2 (2-O-glicano). El cambio en los O-glicanos de los linfocitos T activados es aparentemente causado por la disminución en la actividad enzimática de α 2,6 sialiltransferasa y por un incremento en la actividad enzimática de la β 1,6 GlcNAc transferasa¹⁷

Debido a la gran cantidad de procesos biológicos en los que se encuentran involucrados, los cambios en la glicosilación también son fenómenos comunes en las enfermedades humanas.¹⁸ Los primeros reportes de este tipo de alteraciones fueron hechos hace más de 20 años, los ejemplos más notables de cambios en el patrón de glicosilación son los procesos de transformación maligna¹⁹, donde existe glicosilación incompleta, expresando estructuras que comúnmente se encuentran formando la base del oligosacárido, como los antígenos T y Tn. Entre las neoplasias que presentan esta alteración se encuentran el carcinoma epidermoide de la mucosa respiratoria²⁰, el carcinoma colorrectal²¹ el carcinoma mamario²², entre otros. La característica que comparten estas enfermedades son alteraciones en las mucinas, las cuales son O-glicoproteínas que forman parte de los componentes estructurales de la superficie celular y del moco protector en los tractos respiratorios, gastrointestinales y reproductivos²³. Otros cambios en la glicosilación se han observado durante respuestas inmunitarias crónicas²⁴ como en la infección por VIH²⁵ artritis reumatoide²⁶ o malaria²⁷, donde se ha reportado clonas de linfocitos T CD4+ que expresan un polisacárido sulfatado (SO₄-3GlcA β 1,3Gal β 1,4 GlcNAc), denominado HNK-1 ó CD57²⁸, originalmente este carbohidrato fue descrito como un epítoto expresado en moléculas de adhesión del SNC²⁹ como NCAM, telencefalina o glicolípidos³⁰ en células NK³¹ y algunas subpoblaciones de linfocitos T productoras de citocinas Th2³². Aunque se ha sugerido que este epítoto puede interactuar con P y L-selectina³³, así como con IL-6³⁴, la función de las subpoblaciones de linfocitos T que lo expresan todavía no es conocida^{28, 31}.

La dificultad en el estudio de las alteraciones de la glicosilación durante las enfermedades humanas, se debe al desconocimiento de las enzimas involucradas en los procesos de glicosilación normal y a la gran diversidad de estructuras moleculares generadas por un mismo tipo de sacárido¹². Una manera de estudiar las estructuras sacarídicas es a través de la utilización de lectinas, las cuales son proteínas, capaces de interactuar específicamente y de manera reversible con carbohidratos presentes en la superficie de las proteínas³⁵. Por lo cual, las lectinas debido a su especificidad por carbohidratos, son útiles herramientas para el estudio de estructuras glicosídicas en linfocitos T, permitiendo la identificación, aislamiento y estudio funcional tanto de glicoproteínas en solución como de subpoblaciones celulares. Desde hace algunos años nuestro interés se ha enfocado en una O-glicoproteína reconocida por la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL). Esta lectina reconoce específicamente a GalNAc en los antígenos Tn y T (GalNAc, Gal β 1-3 GalNAc) que se encuentran en timocitos medulares, debido a que puede interactuar con GalNAc en el sialil-T^{36, 37}. El receptor para ALL en el modelo murino (ALLr), es una glicoproteína de 70 kDa, compuesta en un 20% de carbohidratos (GalNAc y Gal, 3:1 respectivamente) y serina en concentraciones importantes, lo que es característico de las proteínas O-glicosiladas. El análisis de los aminoácidos provenientes de fragmentos peptídicos (Espectrofotometría de masas asistida por láser, MALDI-TOF) de la O-glicoproteína reconocida por ALL, ha demostrado que no se trata de una proteína ya descrita pues no se ha encontrado ninguna homología significativa con alguna otra molécula proteica similar en las bases de datos que fueron consultadas (NCBI nr, Swiss-Prot).³⁸ Los estudios realizados en nuestro laboratorio indican que el ALLr se encuentra presente en timocitos de ratón, durante las últimas etapas de diferenciación³⁷, mientras que en seres humanos ALLr se encuentra presente en un 5% de las células linfoides de individuos adultos sanos con predominio de linfocitos T CD4⁺³⁹ y en individuos sanos se ha identificado que estas células tienen transcritos para citocinas tipo Th2⁴⁰. Recientemente, en el modelo de ratón, se observó que ALLr

tiene un patrón de expresión diferente en linfocitos T CD4+ activados por mitógenos que en linfocitos T CD4+ en reposo, lo que ha sugerido que esta molécula tiene diferente patrón de expresión de acuerdo al estado de activación celular⁴¹.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis es una enfermedad crónica que genera una estimulación persistente del sistema inmunitario, en particular de los linfocitos T CD4+. Es conocido que durante los procesos de activación celular se generan cambios en la O-glicosilación de proteínas, los cuales pueden ser reconocidos por la lectina de ALL, por lo que se propone la siguiente hipótesis:

HIPOTESIS

Durante la tuberculosis pulmonar existen cambios en la O-glicosilación de los linfocitos T CD4+, los cuales pueden ser detectados con la lectina de ALL.

OBJETIVO

General

Identificar los cambios en la O-glicosilación de linfocitos T CD4+ reconocidos por ALL, durante la tuberculosis.

Particulares

- 1.- Determinar la frecuencia y el fenotipo de la población de linfocitos T CD4+ (CD25, CD45RA, CD45RO, CD57 y CD124) que expresan la O-glicoproteína reconocida por ALL en pacientes con tuberculosis.
- 2.- Determinar la frecuencia *in vitro*, de los linfocitos T CD4+ ALL+ durante los procesos de activación y proliferación celular, así como el perfil de citocinas posterior al estímulo antigénico.
- 3.- Determinar la frecuencia, el fenotipo de la población de linfocitos T CD4+ que expresa la molécula CD57, así como el perfil de citocinas durante la estimulación antigénica *in vitro*.
- 4.- Determinar las diferencias en los marcadores de membrana en células co-cultivadas con linfocitos T CD4+ CD57+ ó CD4+ CD57-.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis es una enfermedad crónica que genera una estimulación persistente del sistema inmunitario, en particular de los linfocitos T CD4+. Es conocido que durante los procesos de activación celular se generan cambios en la glicosilación de proteínas, por lo que se propone la siguiente hipótesis:

HIPOTESIS

Durante la tuberculosis pulmonar existen cambios en la glicosilación de los linfocitos T CD4+.

OBJETIVO

General

Identificar los cambios en la glicosilación de linfocitos T CD4+, durante la tuberculosis.

Particulares

- 1.- Determinar la frecuencia y el fenotipo de la población de linfocitos T CD4+ (CD25, CD45RA, CD45RO, CD57 y CD124) que expresan la estructura sacarídica reconocida por ALL en pacientes con tuberculosis.
- 2.- Determinar la frecuencia *in vitro*, de los linfocitos T CD4+ ALL+ durante los procesos de activación y proliferación celular, así como el perfil de citocinas posterior al estímulo antigénico.
- 3.-Determinar la frecuencia, el fenotipo de la población de linfocitos T CD4+ que expresa la molécula CD57, así como el perfil de citocinas durante la estimulación antigénica *in vitro*.
- 4.- Determinar las diferencias en los marcadores de membrana en células co-cultivadas con linfocitos T CD4+ CD57+ ó CD4+ CD57-.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes. En este estudio participaron individuos con tuberculosis, todos ellos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, con diagnóstico clínico y de laboratorio de tuberculosis pulmonar activa TB(3)I, de acuerdo a los criterios de la American Thoracic Society (2000)⁴² sin tratamiento o al inicio del mismo (1sem), a todos los pacientes se les aplicó PPD tomándose la prueba como positiva si la induración era igual o mayor a 10 mm y como negativa cuando no se presentó induración (0 mm), a las 72 h posteriores a su aplicación. No participaron en este estudio sujetos VIH+ o con compromiso grave de vida. Los individuos que participaron como grupo control también se les aplicó PPD bajo su consentimiento y además de estar clínicamente sanos, solamente participaron en este estudio aquellos que tuvieran una induración igual o superior a 10 mm a las 72 h de aplicada la prueba. En cada capítulo se detallarán las características particulares de los grupos de estudio acuerdo a la fase experimental de que se trate.

Reactivos. La lectina de *Amaranthus leucocarpus* fue purificada mediante cromatografía de afinidad utilizando estroma de eritrocitos humanos tipo "O"⁴³. El medio de cultivo RPMI-1640, saponina, anticuerpos monoclonales contra marcadores de superficie humanos anti-CD4 y anti-CD8 conjugados a Quantum Red, anti-CD25, las sales utilizadas en la preparación de los amortiguadores y la Concanavalin-A (Con-A), fueron obtenidas de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA). Los anticuerpos monoclonales contra el marcador de superficie CD124 humano, anti IL-2 y anti-IL2R α , fueron obtenidos de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Los anticuerpos monoclonales anti-IgG2a de ratón conjugados a ficoeritrina (PE) anti IgM, anti-CD4, anti-CD45RA, conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC); así como los anticuerpos anti CD4, CD45RO, conjugados a PE se obtuvieron de Southern Biothechnology Associates, Inc. (Birmingham, AL, USA). Los anticuerpos monoclonales contra los marcadores de superficie CD69, CD28, TCR $\gamma\delta$, CD44, conjugados a PE y los anticuerpos monoclonales contra CD62L,

CD69, TCR $\alpha\beta$, conjugados FITC, streptavidina conjugada a CyChrome y Fast Immune System^R, fueron obtenidos de PharMingen (San Diego, CA, USA). Los anticuerpos monoclonales conjugados a FITC contra el antígeno nuclear Ki-67 fueron obtenidos de DAKO (Copenhagen, Denmark). El Lymphoprep (Ficoll con densidad de 1.077) fue obtenido de Nycomed Pharma As. (Nyegaard, Oslo, Norway). El suero fetal bovino fue obtenido de HyClone Labs. (Logan, TU, USA). Los anticuerpos monoclonales del isotipo IgM anti CD57 humano, IgM-Cy3 e IgM-biotina fueron obtenidos de Zymed Lab. (San Francisco, CA, USA), anti IgM, anti-CD4, anti-CD45RA, conjugados a FITC; así como los anticuerpos anti-CD4, CD45RO, conjugados a PE se obtuvieron de Southern Biotech Inc. (Birmingham, AL, USA). Los anticuerpos anti-IL-4 conjugados a PE fueron obtenidos de Becton and Dickinson (San Jose, CA, USA). Anticuerpos monoclonales anti-CD14, CD19 e IFN- γ conjugados a FITC fueron obtenidos de Serotec Inc (Raleigh, NC, USA). El kit de separación magnética (MACS) de linfocitos T CD4+ fue obtenido de Miltenyi-Biotech (Bergisch Gladbach, Germany). El piruvato de sodio, L-glutamina, 2-mercaptoetanol fueron de Gibco BRL. (Rockville, MD, USA). CFSE fue obtenido de Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Las placas para cultivo de Nalgene Nunc International, (Denmark) El antígeno utilizado proviene de un extracto de sobrenadante de *M. tuberculosis* cepa H37Rv (ATCC 27294) ⁴⁴.

Separación de Células Mononucleadas. Las células mononucleadas (CMN) de los sujetos que participaron en este estudio fueron separadas del paquete eritrocitario por centrifugación a 1,750 rpm en Lymphoprep (1.077 de densidad), durante 30 min a 4°C. Las células mononucleadas se lavaron y se valoró su viabilidad por exclusión del colorante azul Tripano, cuantificándose en un hemocitómetro.

Obtención de linfocitos T CD4+ por magneto selección negativa. Las CMN fueron incubadas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD8, CD11b, CD19, CD36, CD56 unidos a un hapteno En un segundo tiempo se utilizó un anticuerpo

monoclonal dirigido contra el hapteno, este anticuerpo se encontraba conjugado a perlas magnéticas. Posteriormente, la suspensión celular se hizo pasar a través de una columna magnética, la cual seleccionó positivamente a las células unidas al anticuerpo monoclonal conjugado a perlas magnéticas, mientras que dejó pasar a las células no reconocidas por el anticuerpo, obteniendo una población enriquecida con linfocitos T CD4+, el grado de pureza se evaluó por citometría de flujo siendo siempre superior al 95%.

Especificidad de la unión lectina-ligando. Para confirmar que la unión de la lectina por su ligando fuera específica, se realizaron ensayos de inhibición. Se incubaron en cada caso 2×10^5 de linfocitos T CD4+ ó CMN con ALL (25 μ g/ ml), durante 30 min a 4°C. Después de la incubación, los linfocitos T CD4+ fueron lavados con PBA (PBS, BSA 1%, Azida de Sodio 1%) e/o incubados con GalNAc 0.2M, durante 15 min a 4°C. Al finalizar la incubación, las células fueron lavadas con PBA y fijadas con *p*-formaldehído al 1%, analizándose por citometría de flujo (Cell Sorter, Beckman, USA)

Fenotipo Celular. Para determinar el fenotipo de las células mononucleadas o de los linfocitos T CD4+, se incubaron 2×10^5 células, con distintos anticuerpos monoclonales, dirigidos contra marcadores de superficie de linfocitos humanos (CD4, CD25, CD45RA, CD45RO, CD57 y CD124). Se realizó una segunda incubación con anticuerpos conjugados a un fluorocromo (FITC o PE), dirigidos contra los anticuerpos utilizados en el primer paso. Por último en una tercera incubación las células fueron incubadas con ALL conjugada a FITC o Biotina. En el caso de que la lectina estuviera conjugada a biotina se realizó una incubación más con streptavidina-PE o -SACy y finalmente se analizaron en total 1×10^4 células, obteniéndose los porcentajes de células positivas para una o dos marcas, mediante citofluorometría de flujo.

Obtención de células adherentes. Los monocitos fueron aislados de las células mononucleares mediante adhesión durante 2 h en placas de cultivo con medio RPMI-1640 a 37°C y en una atmósfera de CO₂ al 5%. Después de la incubación los monocitos fueron recuperados de la placa de cultivo lavando con PBS frío/0.05mM EDTA, modificado de Kumagai y cols⁴⁵. Las células adherentes obtenidas fueron resuspendidas en medio y contadas en un hemocitómetro para determinar su viabilidad por exclusión del colorante azul tripano y su pureza se evaluó mediante citometría de flujo con la expresión de los marcadores CD14 y CD19, siendo superior al 85% para las células CD14+.

Cultivos celulares. Se utilizaron linfocitos T CD4+ y células adherentes autólogas, aisladas de pacientes con tuberculosis. Las células fueron puestas en placas de cultivo en presencia de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 0.5%, a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 h. Al siguiente día, el medio de cultivo fue cambiado por un medio suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina, piruvato de sodio y gentamicina. Enseguida se realizó el reto antigénico con proteínas de sobrenadante de cultivo micobacteriano (H37Rv), se utilizó como control positivo el estímulo de un mitógeno policlonal (Con A) a dosis y tiempos óptimos. Los cultivos celulares fueron realizados en medio de cultivo RPMI-1640 a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y el estado de activación celular fue evaluado con la expresión de CD69, mientras que la proliferación celular se evaluó con la determinación del antígeno nuclear Ki-67 y/o succimidil-éster de carboxifluoresceína (CFSE), analizando los resultados por citometría de flujo.

Citocinas intracelulares. Cuatro h antes de finalizar los cultivos celulares, se añadió al cultivo brefeldina-A (10 µg/ml); al final de la incubación las células fueron cosechadas, lavadas con PBA e incubadas con ALL; después de 30 min de incubación las células fueron lavadas con PBA y fijadas con *p*-formaldehído en PBS durante 10 min a 4°C, posteriormente las células fueron lavadas dos veces con PBS y permeabilizadas con amortiguador de saponina (saponina 0.1%, IgG de cerdo

0.01%, 10 mM HEPES, BSA al 10% en PBS), dejándose en agitación continua durante 10 min. Inmediatamente después las células fueron incubadas con anticuerpos anti IL-4-PE y anti-IFN- γ -FITC o con anticuerpos anti-isotipo conjugados a los mismos fluorocromos.⁴⁶ Después de 30 min de incubación las células fueron lavadas con PBS y fijadas de nuevo con *p*-formaldehído al 1% y analizadas por citometría de flujo.

Obtención de linfocitos T CD4+ CD57+. Los linfocitos T CD57+ fueron aislados a partir de los linfocitos T CD4+ purificados mediante selección negativa, a los cuales se les incubó con anticuerpo monoclonal del isotipo IgM dirigido contra CD57 durante 15 min, las células se lavaron en PBS estéril y en un segundo tiempo fueron incubadas con un anticuerpo anti-IgM conjugado a perlas magnéticas, posteriormente la suspensión celular se hizo pasar a través de una columna magnética, la cual seleccionó positivamente a los linfocitos CD57+ y negativamente a los linfocitos T CD57-, la pureza de las poblaciones obtenidas se evaluó por citometría de flujo siendo mayor del 80% en los linfocitos CD57+ y mayor al 90% para los linfocitos CD57-.

Evaluación de la proliferación celular. Se incubaron 1×10^7 céls en 15 ml de CFSE al 0.5M, durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad, después de la incubación las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en RPMI-1640 suplementado, incubándose 2×10^5 céls en 200 μ l, en placas de 96 pozos con fondo plano en una atmósfera de CO₂ a 37°C, las células fueron estimuladas con concentraciones óptimas de Con A y recuperadas a diferentes tiempos de incubación, analizándose por citometría de flujo. La proliferación celular a través de la expresión de Ki-67 siguió la misma metodología en la permeabilización celular que la utilizada para el marcaje de las citocinas intracelulares, los datos también fueron analizados por citometría de flujo.

Neutralización de la bioactividad de IL-2. Se utilizaron dos anticuerpos monoclonales, el primero dirigido contra IL-2 humana y el segundo contra IL-2R α . Para definir la concentración óptima neutralizante, se tomó como referencia la dosis recomendada por el fabricante.

Análisis estadístico. Se realizó con el programa SigmaStat 2.03TM, la prueba utilizada fue la U de Mann-Whitey y se consideró una diferencia estadísticamente significativa a una $p < 0.05$. Los resultados presentados en esta tesis, se muestran en gráficas realizadas con los programas SigmaPlot 8.0TM, WinMDI2.8 y CellQuest (Beckton-Dickinson).

RESULTADOS.

Los resultados se exponen en capítulos de acuerdo a la fase experimental planteada en los objetivos particulares.

CAPITULO 1. Frecuencia y fenotipo de la población de linfocitos T CD4+ ALL+ en pacientes con tuberculosis y grupo control

INTRODUCCIÓN

La resistencia inmunológica contra la tuberculosis se encuentra bajo el control de los linfocitos T CD4+^{1, 2}. La lectina de ALL reconoce específicamente GalNAc, en secuencias oligosacáridicas específicas³, el receptor celular para ALL se demostró en 5% de las células mononucleadas (CMN) de individuos adultos sanos, las cuales presentan un predominio de linfocitos T CD4+⁴. En el modelo murino se ha sugerido que una O-glicosilación alterada podría afectar la respuesta celular⁵ y que en estados de estimulación crónica circulan en sangre formas inmaduras de linfocitos T con patrones alterados de glicosilación⁶. Por esta razón la lectina ALL puede ser utilizada como una herramienta en la identificación de subpoblaciones celulares que en el caso de la tuberculosis al ser un estado patológico donde hay persistencia del antígeno, es posible que se generen cambios en la O-glicosilación que sean detectados con esta lectina.

RESULTADOS

La frecuencia de la expresión de la O-glicoproteína reconocida por ALL se determinó en linfocitos T CD4 purificados de CMN de sangre periférica (Ver material y métodos). Los grupos de estudio se dividieron en tres: Pacientes PPD+, Pacientes PPD- y grupo control PPD+ (Tabla 1)

Tabla 1. Distribución de los pacientes y grupo control

	Respuesta a PPD	n	Edad	Estadio clínico
Pacientes	PPD+	30	37 ± 10	TB(3)I
	PPD-	21	48 ± 7	TB(3)I
Individuos sanos	PPD +	30	35 ± 14	-

Determinación de la frecuencia de linfocitos T CD4+ ALL+

En la figura 1 se observa que el reconocimiento de ALL por su ligando en linfocitos T CD4+ de pacientes con tuberculosis PPD+ ($p < 0.001$) y PPD- ($p = 0.04$) es casi 4 veces mayor que en los linfocitos T CD4+ de individuos sanos, sin diferencia estadística entre los grupos de pacientes con TB (Tabla 2).

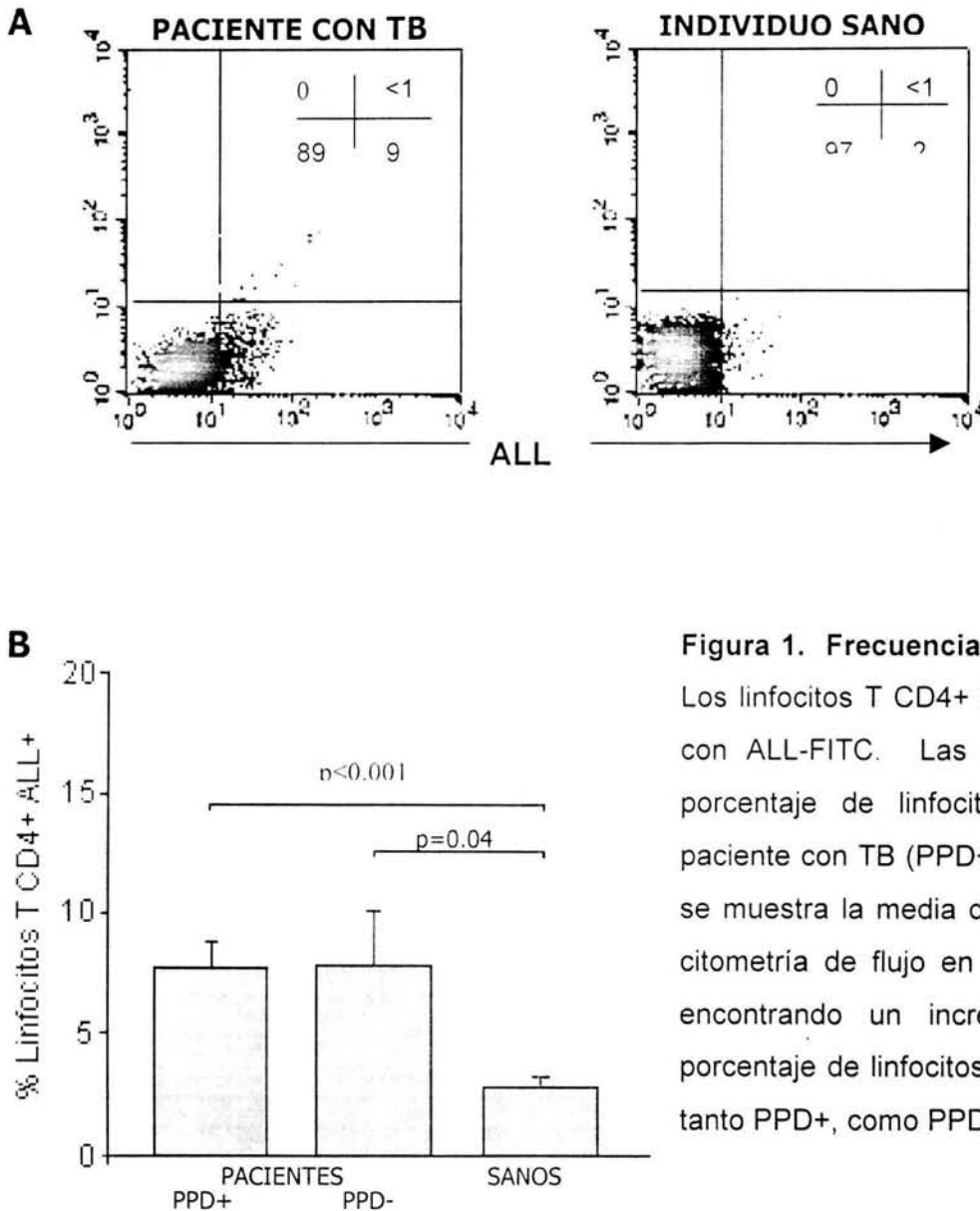


Figura 1. Frecuencia de linfocitos T CD4+ALL+.

Los linfocitos T CD4+ purificados fueron incubados con ALL-FITC. Las gráficas muestran en **A** el porcentaje de linfocitos T CD4+ ALL+ en un paciente con TB (PPD+), y un individuo sano. En **B** se muestra la media del porcentaje obtenido en la citometría de flujo en los tres grupos de estudio, encontrando un incremento significativo en el porcentaje de linfocitos T CD4+ ALL+ en pacientes tanto PPD+, como PPD-.

Determinación del fenotipo de los linfocitos T CD4+ALL+

Además de determinar la expresión de la O-glicoproteína reconocida por ALL en los linfocitos T CD4+ purificados, se realizaron marcas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra marcadores de superficie relacionados con memoria celular, específicamente las isoformas de CD45⁷ y contra el trisacárido sulfatado SO₄-3GlcAβ1,3Galβ1,4 GlcNAc (CD57), expresado en linfocitos T crónicamente estimulados^{10, 11}, además de que se había relacionado a esta subpoblación celular con células productoras de citocinas Th2¹² compartiendo esta característica con linfocitos T CD4+ALL+ de individuos sanos¹³

En este trabajo no se encontró asociación entre la expresión de la estructura sacarídica reconocida por ALL+ en linfocitos T CD4+ con las isoformas CD45RA ó CD45RO, en ninguno de los tres grupos de estudio (Tabla 2). En cuanto a la expresión de CD57 en los linfocitos T CD4+ ALL+ se observó que en sanos menos del 1% de la subpoblación de linfocitos T CD4+ CD57+ expresa la estructura O-glicosídica reconocida por ALL; al analizar la expresión de la molécula O-glicosilada en los linfocitos T CD4+ CD57+ en los dos grupos de pacientes (PPD+ y PPD-), se observó que en comparación con el grupo control, los pacientes PPD+ presentan casi tres veces más células CD4+ CD57+ ALL+(p<0.001); mientras que los pacientes PPD- presentan casi dos veces más células CD4+ CD57+ ALL+(p=0.003), no se encontraron diferencias entre ambos grupos de pacientes (Figura 2)(Tabla 1).

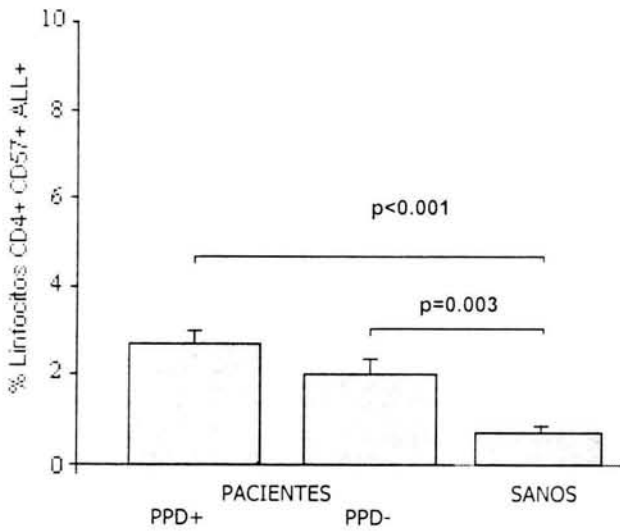
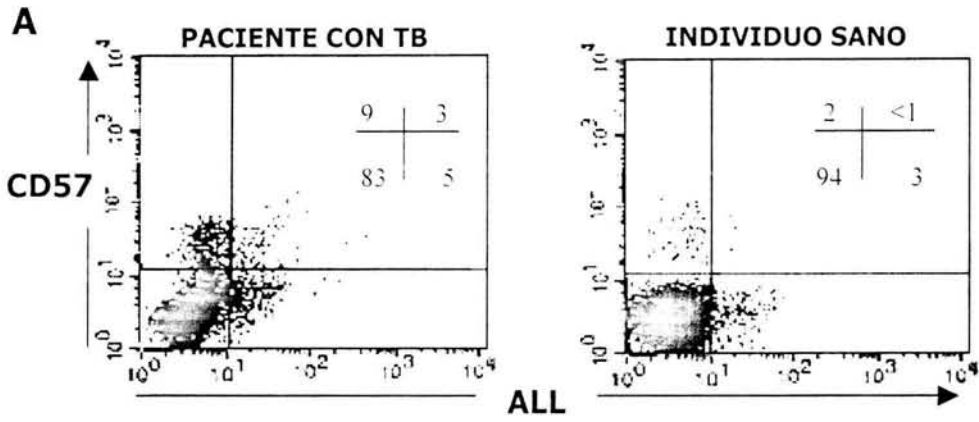


Figura 2. Expresión de CD57 y de la proteína O-glicosilada reconocida por ALL en linfocitos T CD4+. En A, se observa la expresión de CD57 y de ALL en linfocitos T CD4+ en un paciente con tuberculosis PPD+, en comparación con un sujeto sano. En B, se muestra la media del porcentaje de linfocitos T CD4+ CD57+ ALL+ en pacientes PPD+, PPD- e individuos sanos. Media \pm SD

Tabla 2. Porcentaje de expresión de los marcadores fenotípicos analizados en los linfocitos T CD4+ que co-expresan la O-glicoproteína reconocida por ALL, en los diferentes grupos de estudio.

	Pacientes con TB		Individuos Sanos
	PPD+	PPD-	PPD+
CD4	7.9 ± 1.3 ^a	8.0 ± 2.2 ^a	2.5 ± 0.4 ^a
CD45RA	5.8 ± 1.4	4.0 ± 1.8	4.0 ± 1.0
CD45RO	14.7 ± 7.0	5.2 ± 2.9	7.4 ± 3.9
CD57	2.7 ± 0.4 ^a	2.0 ± 1.0 ^b	<1 ± 0.3 ^{a,b}

Media ± SEM

^a p <0.001, ^bp=0.003

Expresión de los receptores para IL-2 e IL-4 en linfocitos T CD4+ ALL+.

Con el objetivo de evaluar si los linfocitos T CD4+ ALL+ expresaban marcadores relacionados con activación celular se determinó CD25 (IL-2R α) y CD124 (IL-4R α)¹⁴ en los diferentes grupos de estudio. No se encontraron diferencias en la expresión de ninguno de los dos marcadores mencionados en los linfocitos T CD4+ ALL-. Al analizar la expresión de CD25 en los linfocitos T CD4+ ALL+ se observó que en sanos había un incremento de tres veces más en el número de células CD25+ en comparación con los linfocitos T CD4+ALL- (p=0.004). En pacientes PPD+, observamos que el número de células CD25+ estaba incrementado 23 veces más en comparación con sus linfocitos T CD4+ ALL-(p<0.001). Mientras que el porcentaje de células CD124+ en pacientes PPD+ se encontraba incrementado 32 veces en comparación con sus linfocitos T CD4+ ALL- (p<0.001). En pacientes

PPD- se encontró un comportamiento similar en la expresión de los marcadores de activación evaluados, ya que el porcentaje de células CD25+ se encontraba incrementado once veces en las células CD4+ ALL+ y las células CD124+ se encontraban incrementadas casi 14 veces más en los linfocitos T CD4+ ALL+ que en los ALL-. (Figura 3 y Tabla 3).

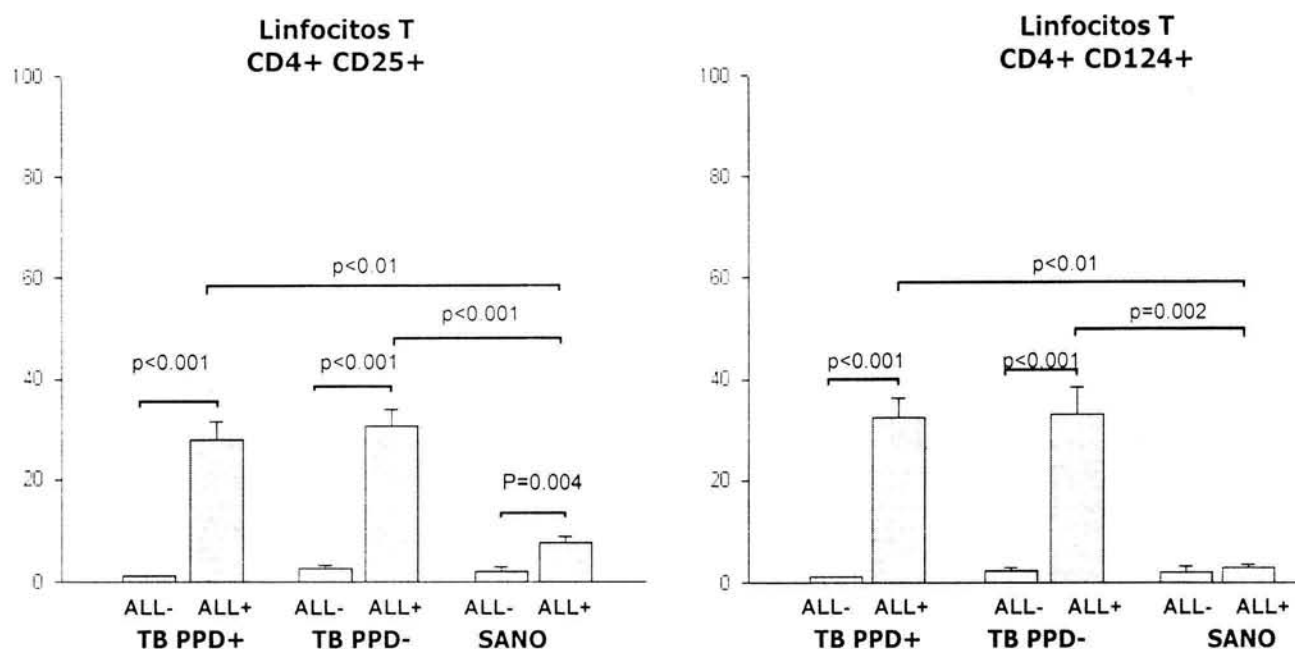


Figura 3. Expresión de CD25 y CD124 en linfocitos T CD4+ ALL- y linfocitos T CD4+ ALL. Las gráficas mostradas en esta figura muestran la media de los porcentajes obtenidos por citometría de flujo para los linfocitos T CD4+ de los tres grupos de estudio. Media \pm SEM

Tabla 3. Expresión de CD25 y CD124 en linfocitos T CD4+

	PACIENTES TB				CONTROLES SANOS	
	PPD+		PPD-		PPD+	
	ALL-	ALL+	ALL-	ALL+	ALL-	ALL+
CD25	1.2 ± 0.7 ^a	28 ± 3.5 ^{a,c}	2.6 ± 1.0 ^a	30 ± 3.3 ^a	2.2 ± 0.6 ^b	7.6 ± 1.3 ^{a,b,c}
CD124	1.0 ± 0.6 ^a	32.3 ± 4.0 ^{a,d}	2.4 ± 0.5 ^a	32.9 ± 5.3 ^{a,d}	2.0 ± 1.0	3.0 ± 0.5 ^{c,d}

Media ± SEM. ^ap<0.001, ^bp<0.004, ^cp<0.01, ^dp=0.002

Las comparaciones son entre los linfocitos T CD4+ ALL- vs CD4+ ALL+ del mismo grupo y entre los linfocitos T CD4+ ALL+ de todos los grupos.

DISCUSION

La respuesta inmunológica protectora durante la tuberculosis es mantenida por los linfocitos T CD4+^{1,2}, es por esta razón que nos enfocamos a su estudio. El interés se centró en los cambios de la glicosilación que se originan en procesos de infección crónica⁷. Con esta finalidad se utilizó a la lectina de ALL que reconoce una estructura sacarídica³ presente en linfocitos T CD4+ de individuos sanos⁴ y que en el modelo murino permite identificar células en procesos de activación temprana⁵. Desde hace algunos años se ha sugerido que el incremento de las estructuras O-glicosídicas correlaciona con una respuesta inmunitaria anómala^{6,15}, por lo que en este trabajo esperábamos encontrar que en los pacientes PPD- existiera un incremento significativo en estas estructuras, sin embargo al comparar los resultados con los pacientes PPD+ no se encontraron diferencias que permitieran sugerir cambios en la calidad de la respuesta inmunitaria asociados al incremento en la O-glicosilación. Los resultados expuestos en este capítulo propusieron cuatro

situaciones: La primera, que existen cambios en la O-glicosilación durante la tuberculosis pulmonar activa, que son detectados con la lectina de ALL, quedando pendiente el estudio de su funcionalidad. La segunda, que las diferencias en la expresión de las moléculas glicosiladas estudiadas se encuentran presentes al comparar el grupo control contra el grupo de pacientes con tuberculosis, independientemente de si estos últimos son reactivos o no al PPD. La tercera, cuando nos enfocamos al estudio de la población celular reconocida por ALL, observamos que se expresaban marcadores relacionados con activación celular (CD25, CD124)¹⁴, sugiriendo que los linfocitos T CD4+ALL+ podrían ser una subpoblación celular en activación temprana como ocurre en el modelo murino⁵. La cuarta, que además de los cambios en la O-glicosilación observados, se detectó una subpoblación celular que expresaba otra estructura sacarídica (reconocida con el anticuerpo anti-CD57) que también se encontraba con mayor frecuencia en los linfocitos T CD4+ de pacientes y que no correspondía a células ALL+.

Estas cuatro situaciones definieron el curso de este trabajo, ya que en base a estos datos se trabajó exclusivamente con pacientes PPD+, focalizando la atención en el estudio de los linfocitos T CD4+ ALL+ y T CD4+ CD57+, así como en las diferencias que hay en estas estirpes celulares entre los individuos sanos y los pacientes con TB.

Referencias

1. Bonecini-Almeida MG, Chitale S, Boutsikakis I, Geng J, Doo H, He S, Ho JL. Induction of *in vitro* human macrophage anti-Myco bacterium tuberculosis activity: requirements of IFN-gamma and prime lymphocytes. J Immunol 1998; 160: 4490-4499.
2. Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer J M, Madrid V D. Correlation between the kinetic of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. Immunology 1996, 86: 26-33.

3. Zenteno E, Lascurain R, Montaña LF, Vazquez L, Debray H, Montreuil J. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj J* 1992, 9: 204-208.
4. Lascurain R, Porrás F, Báez R, Chávez R, Martínez-Cairo S, Alvarez G, Zenteno E. *Amaranthus leucocarpus* lectin recognize human naive T cell subpopulation. *Immunol Invest* 1997, 26:579-587.
5. Ortiz B, Porrás F, Jiménez-Martínez MC, Montaña LF, Martínez-Cairo S, Lascurain R and Zenteno E. Differential expression of a 70 kDa O-glycoprotein on T cells: a possible marker for naive and early activated murine T cells. *Cellular Immunol* 2002, 218: 34-45
6. Tsuboi S, Fukuda M. Branched O-linked oligosaccharides ectopically expressed in transgenic mice reduce primary T-cell immune responses. *EMBO J*. 1997 Nov 3;16(21):6364-73
7. Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1999.
8. Tsuboi S, Fukuda M. Branched O-linked oligosaccharides ectopically expressed in transgenic mice reduce primary T-cell immune responses. *EMBO J* 1997;16:6364-73.
9. Akbar AN, Terry L, Timms A, Beverley PC, Janossy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol* 1988;140:2171-8
10. Warren HS. CD57. *J Biol Regul Homeost Agents* 2000;14:322-3.
11. d'Angeac AD, Monier S, Pilling D, Travaglio-Encinoza A, Reme T, Salmon M. CD57+ T lymphocytes are derived from CD57- precursors by differentiation occurring in late immune responses. *Eur J Immunol* 1994;24:1503-11.
12. Brinkmann V, Kristofic C. Massive production of Th2 cytokines by human CD4+ effector T cells transiently expressing the natural killer cell marker CD57/HNK1. *Immunology* 1997;91:541-7.
13. Chávez R Purificación de una subpoblación de linfocitos Th2, empleando la lectina de *Amaranthus leucocarpus*. IPN, 2000.

14. Paul W. Fundamental Immunology. Lippincott-Raven Publishers. 4th ed. Philadelphia 1999.
15. Tsuboi S, Fukuda M Overexpression of branched O-linked oligosaccharides on T cell surface glycoproteins impairs humoral immune responses in transgenic mice. J Biol Chem 1998;273:30680-7.

CAPITULO 2. EVALUACION *IN VITRO* DE LOS LINFOCITOS T CD4+ ALL+

RESULTADOS

En el capítulo anterior se confirmó que durante el proceso crónico-infeccioso de la tuberculosis existen diferencias en la expresión de O-glicanos en linfocitos T CD4+, se decidió explorar si la presencia de estas estructuras estaban relacionadas con deficiencias en la respuesta inmunitaria^{1,2} o simplemente eran cambios relacionados con la activación celular, como se ha reportado para el modelo murino³

Expresión de la O-glicoproteína reconocida por ALL en linfocitos T CD4 activados.

Se realizaron cultivos celulares con linfocitos T CD4+ purificados a partir de CMN a los que les fue añadido Ag micobacteriano (H37Rv) o Con A en concentraciones óptimas (Ver material y métodos), observando que la expresión de la estructura O-glicosídica reconocida por ALL se modifica a medida que avanza el tiempo de estimulación, teniendo su máxima expresión a las 48 h (Figura 1), obteniendo casi tres veces más células CD4+ALL+ con el Ag ($p=0.005$) y 4.2 veces más células CD4+ ALL+ con Con A ($p<0.001$), que al inicio del cultivo.

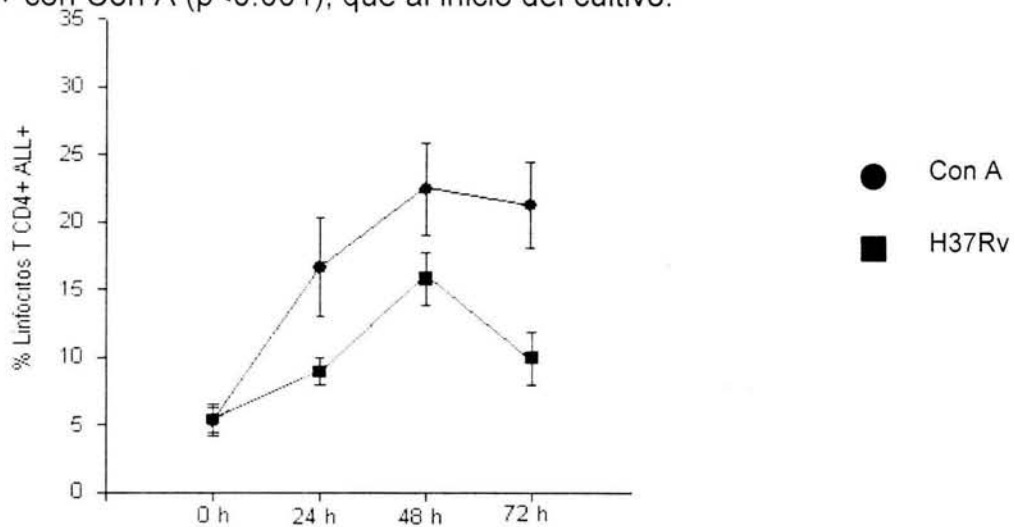


Figura 1. Cambios en el porcentaje de linfocitos T CD4+ ALL+ durante los cultivos celulares. La gráfica muestra los cambios observados en el porcentaje de linfocitos T CD4+ALL+ en los diferentes tiempos de cultivo y con los diferentes estímulos utilizados (antígeno o Con A) en pacientes con TB. \pm SD, $n = 5$.

Los linfocitos T CD4+ALL+ son células en proliferación.

Una vez que se demostró que en respuesta al antígeno micobacteriano se inducía un mayor número de linfocitos T CD4+ ALL+, la siguiente pregunta fue si además de correlacionarse de manera positiva con la activación celular, lo haría de la misma forma con la proliferación celular. Para contestar esta pregunta, se realizaron cultivos celulares con linfocitos T CD4+ purificados y se estimularon con el Ag-micobacteriano, recuperándose a las 48 h que es el tiempo de máxima expresión de la O-glicoproteína reconocida por ALL y determinando la presencia de Ki-67, el cual es un antígeno nuclear expresado durante la proliferación celular⁴.

En la Figura 2A, se muestra la expresión de Ki-67 en linfocitos T CD4+ALL+ y T CD4+ALL-. Tanto los linfocitos T CD4+ALL+ del individuo sano como del paciente con TB mostraron positividad al antígeno Ki-67, sin embargo en estos últimos observamos que el número de células que se encontraban en proliferación es mayor en respuesta al estímulo antigénico ($p=0.005$) (Figura 2A y 2B). En la figura 2B se resumen los resultados obtenidos para el total de la muestra, en donde se observa que las células que estaban en proliferación eran los linfocitos T CD4+ALL+ ($p>0.001$) ($83.2\% \pm 9$ en sanos, $96.1\% \pm 2.3$ en pacientes), mientras que los linfocitos T CD4+ALL- casi no proliferaron ($5.7\% \pm 3.1$ en sanos, $7\% \pm 2.4$ en pacientes).

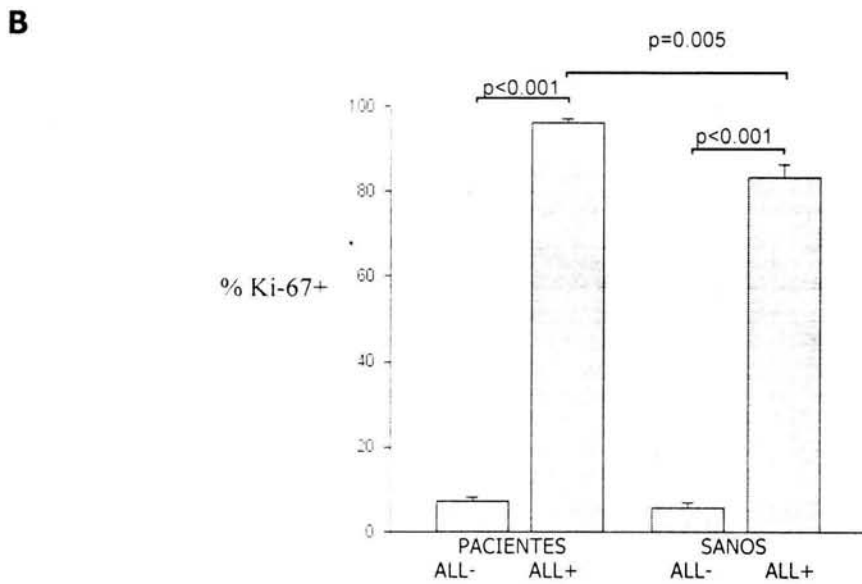
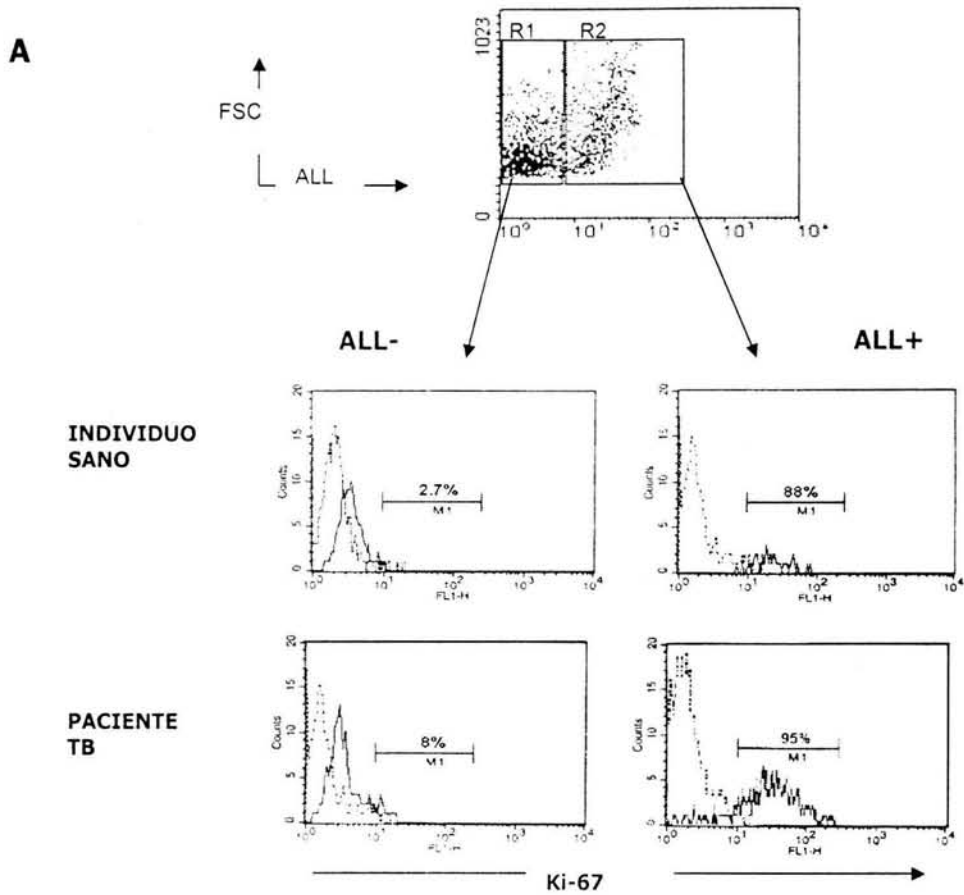


Figura 2. Expresión de Ki-67 en linfocitos T CD4+ALL+ y T CD4+ALL- antígeno-estimulados. En **A** se observan los histogramas obtenidos al estimular los linfocitos T CD4+ con el antígeno H37Rv, la línea gruesa denota las poblaciones celulares estimuladas. R1 corresponde a células ALL-, R2 a células ALL+. Se muestra un experimento típico de 8 realizados por cada grupo. En **B** se muestra la media del porcentaje + SD en los linfocitos T CD4+ Ki-67+ ALL+ y ALL-.

Determinación de citocinas intracelulares en los linfocitos T CD4+ALL+.

Con la finalidad de determinar el perfil de citocinas de esta población se estimularon linfocitos T CD4+ de pacientes con tuberculosis en presencia de antígeno-micobacteriano, la medición de citocinas se determinó a las 48 h para coincidir con la máxima expresión de la estructura reconocida por ALL.

En la Figura 3, se muestran las citocinas producidas por la subpoblación de linfocitos T CD4+ ALL+ posterior a la estimulación antigénica. En 3B, se analizan únicamente la producción detectada para la población de linfocitos T CD4+ ALL+, que corresponde a un perfil Th1, cuando fueron estimuladas con H37Rv, siendo el $12.1\% \pm 1.7$ productoras de IFN- γ y $6.5\% \pm 1.3$ productoras de IL-4 ($p=0.01$), al ser estimuladas con Con A se observó un perfil Th0, siendo el $32.2\% \pm 4.8$ productoras de IFN- γ y el $25.6\% \pm 6.7$ productoras de IL-4.

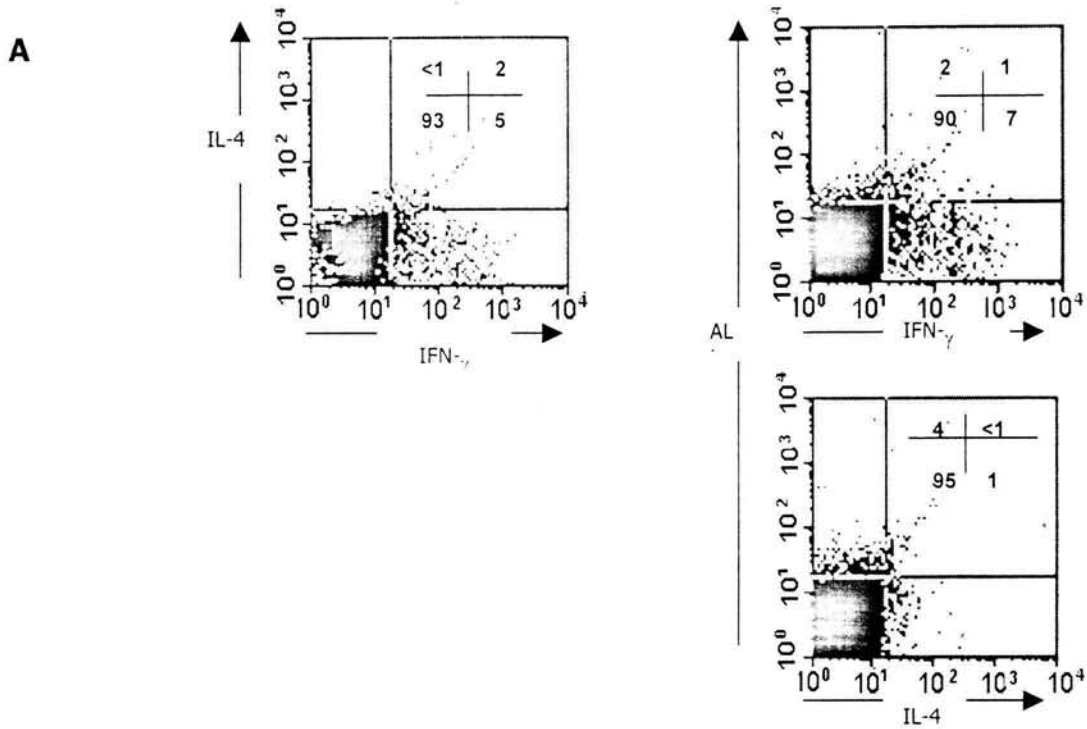


Figura 3. Citocinas intracelulares en linfocitos T CD4+ ALL+. En A, se observa la producción de citocinas en los linfocitos T CD4+ antígeno estimulados, así como la expresión de la estructura sacarídica detectada con ALL. Se muestra un experimento típico de 10 realizados en células provenientes de pacientes con TB. En B, se resume la producción de citocinas exclusivamente para subpoblación de linfocitos T CD4+ ALL+ donde se observa un predominio Th1, el cual no se observa cuando las células son estimuladas con Con A

Evaluación de la participación de IL-2 en la inducción de la O-glicoproteína reconocida por ALL.

Con la finalidad de esclarecer los mecanismos por los cuales se induce en superficie la proteína O-glicosilada reconocida por ALL se realizaron ensayos de neutralización de la bioactividad de IL-2, ya que se ha propuesto que esta citocina regula el "crecimiento" de estructuras O-glicánicas en linfocitos T activados⁵. Para contestar esta pregunta se cultivaron CMN, en presencia de Con A, se decidió utilizar este mitógeno, ya que de acuerdo con los datos obtenidos en la figura 1, se observa un mayor porcentaje de linfocitos T CD4+ALL+ que cuando se utiliza el estímulo antigénico. Al mismo tiempo se agregaron en diferentes pozos diferentes concentraciones de anticuerpos de captura anti-IL-2 y anticuerpos neutralizantes anti-IL2R, comenzando de las dosis recomendadas por el fabricante. Las células se recuperaron a las 48 h y fueron incubadas con anticuerpos anti CD4 y ALL.

En la figura 4 se observa una disminución en el porcentaje de células CD4+ reconocidas por ALL a medida que se incrementa la concentración de anti-IL-2 y de anti-IL-2R. Estos datos sugieren que la expresión de la O-glicoproteína depende de la cantidad de IL-2 del microambiente.

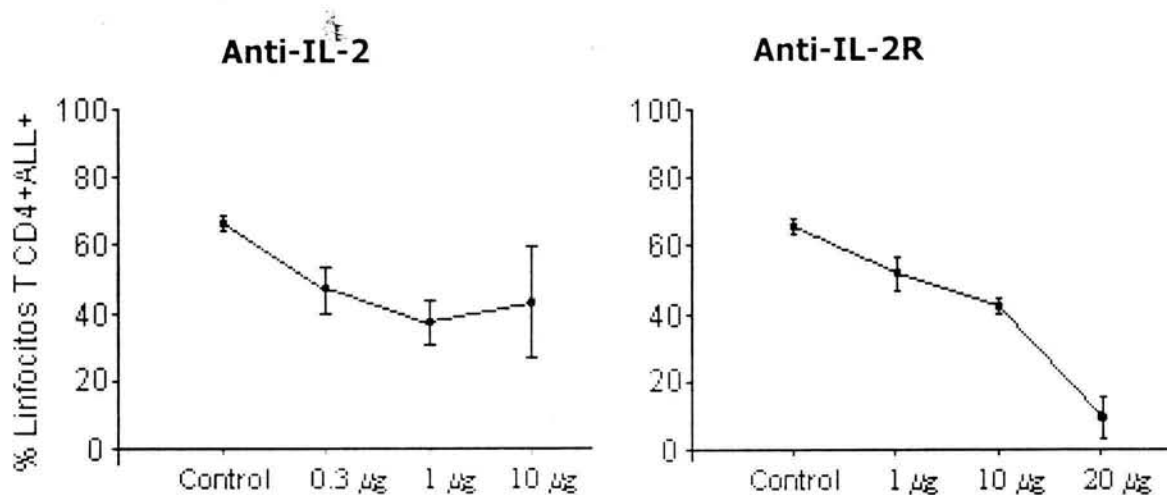


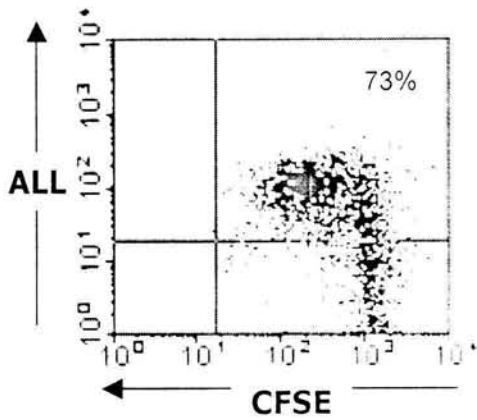
Figura 4. Porcentaje de linfocitos T CD4+ALL+ cuando es neutralizada la bioactividad de IL-2. Las CMN fueron activadas durante 48h con Con A y evaluada la expresión de la O-glicoproteína reconocida por ALL a concentraciones crecientes de anticuerpos de captura y neutralizante. Las gráficas mostradas son el resultado de 3 experimentos, los puntos denotan la media \pm SD.

Sin embargo al bloquear la acción de IL-2, es probable que los datos anteriores fueran consecuencia de la disminución en la proliferación celular, más que en la regulación negativa de la O-glicosilación, para responder a esta pregunta se evaluó la proliferación celular en ausencia y presencia de anti-IL-2 (10 μ g) o anti-IL-2R (20 μ g) con la disminución progresiva en la fluorescencia de CFSE, ya que datos previos (Fig. 2) nos indicaban que esta molécula se expresa también durante la proliferación celular.

En la Figura 5A, se muestra el porcentaje de CMN estimuladas con Con A sin anticuerpos neutralizantes, en 5B se muestra el comportamiento en la expresión de la O-glicoproteína reconocida por ALL cuando se agrega anti-IL-2 o cuando se agrega anti IL-2R. Claramente se observa una disminución en el número de células

en proliferación, pero también se observa una disminución en el porcentaje de células ALL+

A



B

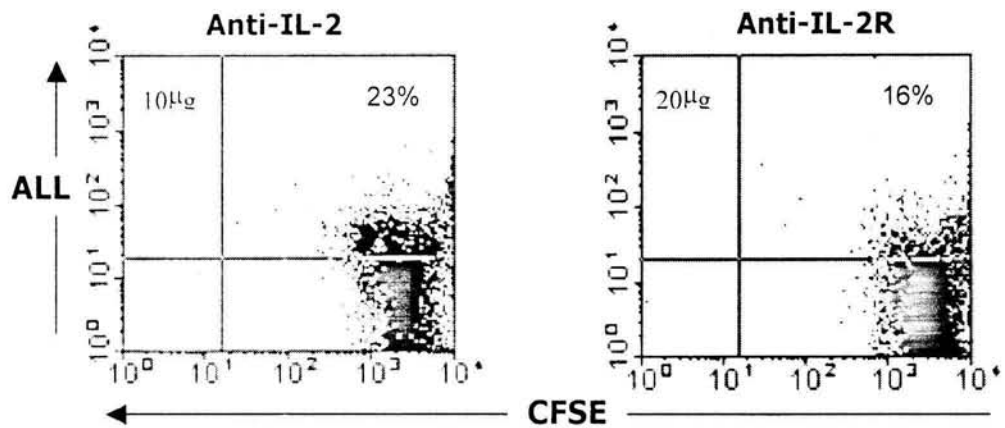


Figura 5. Evaluación de proliferación celular en presencia de anti-IL-2 o anti-IL-2R en células estimuladas con Con A. En A, se observa que las células en proliferación son en su mayoría ALL+. En B, se observa que cuando se bloquea la actividad de IL-2, además de disminuir la proliferación celular, disminuye la expresión de la estructura sacarídica reconocida por ALL.

DISCUSIÓN

En este capítulo se evaluaron características relacionadas con la subpoblación de linfocitos T CD4+ALL+. La lectina de ALL es específica por GalNAc⁶, reconociendo subpoblaciones de linfocitos en el modelo murino⁷ y en humanos⁸. Esta característica hizo posible que fuera utilizada para el estudio de una subpoblación de linfocitos T CD4+ incrementada en sujetos con tuberculosis. En el capítulo anterior se observó que los linfocitos T CD4+ALL+ aislados de sangre periférica de pacientes con TB tenían una expresión considerable de marcadores relacionados con activación celular, este hecho y el antecedente de que esta lectina era capaz de reconocer linfocitos T murinos en etapas tempranas de activación² propusieron la evaluación *in vitro* de esta subpoblación celular en presencia de antígeno micobacteriano. Los resultados obtenidos mostraron un incremento en el número de linfocitos T CD4+ALL+, lo que permite sugerir que la O-glicosilación de la proteína reconocida por ALL es un fenómeno normal durante el proceso de activación, más que una alteración como originalmente se proponía al inicio de este trabajo, ya que no observamos alteraciones en la respuesta celular y más bien el incremento en la O-glicosilación puede ser comparable a lo que ocurre en linfocitos T activados con las proteínas CD43⁹ ó CD8¹⁰, en las cuales se incrementa el número de estructuras O-glicosídicas. La activación celular puede generar dos consecuencias en el funcionamiento de la célula: proliferación¹¹ o apoptosis¹², es por eso que se evaluó la proliferación celular de los linfocitos T CD4+ALL+ y T CD4+ALL- con la expresión de Ki-67 y CFSE, demostrándose que las células reconocidas por la lectina de ALL se encuentran en proliferación celular. Aunque no se hicieron estudios sobre apoptosis en las células ALL+, se tienen antecedentes en los que timocitos murinos que expresan la estructura sacarídica reconocida por ALL están protegidos contra apoptosis¹³, por lo que sería conveniente evaluar esta posibilidad en tuberculosis. La funcionalidad de estas células también se determinó al estimularlas con el antígeno micobacteriano y tipificar las citocinas características de las poblaciones Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-4), encontrando que la subpoblación T CD4+ALL+ tiene un patrón Th1, esperado en una respuesta a microorganismos intracelulares^{14, 15}, esto es

interesante debido a que se había demostrado que en sujetos sanos los linfocitos T CD4+ALL+ tenían un perfil de citocinas tipo Th2¹⁶, el no haber encontrado esta asociación tal vez pudo ser consecuencia del microambiente, pues durante la activación con *M. tuberculosis* los macrófagos empiezan a secretar grandes cantidades de IL-12 lo que dirige la respuesta a Th1¹⁷. Estos datos sugieren que más que tratarse de un fenotipo celular estable diferenciado a Th2, se trata más bien de diversas etapas de activación celular, así con la finalidad de entender los mecanismos por los cuales esta molécula se induce en superficie, se estudió la función de IL-2 en la generación de estructuras O-glicosídicas, ya que se tenía el antecedente de que los linfocitos T CD4+ALL+ tenían el receptor para esta citocinas en su superficie. Se observó que al bloquear la actividad de IL-2 disminuyó el número de linfocitos T CD4+ALL+, esto fue interesante porque sugiere que la expresión de la estructura reconocida por ALL se modifica de acuerdo al microambiente, como ocurre para otros O-glicanos en linfocitos T activados en presencia de citocinas¹⁸.

Referencias

1. Tsuboi S, Fukuda M. Branched O-linked oligosaccharides ectopically expressed in transgenic mice reduce primary T-cell immune responses. *EMBO J* 1997;16:6364-73.
2. Tsuboi S, Fukuda M. Overexpression of branched O-linked oligosaccharides on T cell surface glycoproteins impairs humoral immune responses in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1998;273:30680-7.
3. Ortiz B, Porrás F, Jiménez-Martínez MC, Montaña LF, Martínez-Cairo S, Lascurain R and Zenteno E. Differential expression of a 70 kDa O-glycoprotein on T cells: a possible marker for naive and early activated murine T cells. *Cellular Immunol* 2002, 218: 34-45.
4. Danova M, Riccardi A, Mazzini G. Cell cycle-related proteins and flow cytometry. *Haematologica* 1990;75:252-64.

5. Carlow D, Corbel SY, Williams MJ, Ziltener HJ. IL-2, -4, and -15 Differentially Regulate O-Glycan Branching and P-Selectin Ligand Formation in Activated CD8 T Cells. *J Immunol* 2001, 167: 6841–48.
6. Zenteno E, Lascurain R, Montañó LF, Vazquez L, Debray H, Montreuil J. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj J* 1992, 9: 204-208.
7. Lascurain R, Chávez R, Gorocica P, Pérez A, Montañó LF, Zenteno E. Recognition of a CD4⁺ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Immunology* 1994, 83: 410-413
8. Lascurain R, Porrás F, Báez R, Chávez R, Martínez-Cairo S, Alvarez G, Zenteno E. *Amaranthus leucocarpus* lectin recognize human naive T cell subpopulation. *Immunol Invest* 1997, 26:579-587.
9. Piller F, Piller V, Fox RI, Fukuda M. Human T lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J Biol Chem* 1988, 263: 15146-15150.
10. Priatel JJ, Chui D, Hiraoka N, Simmons CJ, Richardson KB, Page DM, Fukuda M, Varki NM, Marth JD The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8⁺ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity* 2000;12:273-83.
11. Sotiropoulou G, Kono M, Anisowicz A, Stenman G, Tsuji S, Sager R Identification and functional characterization of a human GalNAc [alpha]2,6-sialyltransferase with altered expression in breast cancer. *Mol Med* 2002;8:42-55.
12. Carlow DA, Williams MJ, Ziltener HJ. Modulation of O-glycans and N-glycans on murine CD8 T cells fails to alter annexin v ligand induction by galectin 1. *J Immunol* 2003;171:5100-6.
13. Alvarez G, Lascurain R, Perez A, Degand P, Montano LF, Martinez-Cairo S, Zenteno E. Relevance of sialoglycoconjugates in murine thymocytes during maturation and selection in the thymus. *Immunol Invest* 1999; 28:9-18.
14. Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer J M, Madrid V D. Correlation between the kinetic of Th1/Th2

- cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996, 86: 26-33.
15. Jiménez-Martínez MC, Baez Saldaña R, Linares Cañas M, Chávez Sánchez R, Lascurain Ledesma R y Zenteno Galindo E. Avances recientes en el estudio de los mecanismos celulares de supresión de la respuesta inmunitaria durante la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2001,14:8-11.
 16. Chávez R Purificación de una subpoblación de linfocitos Th2, empleando la lectina de *Amaranthus leucocarpus*. IPN, 2000.
 17. Siamon Gordon Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003, 3; 23-35.
 18. Carlow D, Corbel S, Williams M, Ziltener H. IL-2,-4, and -15 differentially regulate O-glycan branching and P-selectin ligand formation in activated CD8 T cells. *J Immunol* 2001, 167: 6841-48.

CAPITULO 3. Intracellular Expression of IL-4 and IFN- γ by *M. tuberculosis* Antigen-Stimulated CD4⁺CD57⁺ T Cell Subpopulation with Memory Phenotype in Tuberculosis Patients

En este capítulo se analizan exclusivamente los linfocitos T CD4⁺ CD57⁺. Se ha sugerido que las subpoblaciones celulares que expresan este trisacárido sulfatado (HNK-1) se encuentran expandidas en estados de estimulación antigénica crónica como artritis reumatoide o malaria. Nuestros resultados demuestran que esta subpoblación celular también se encuentra incrementada en sujetos con tuberculosis ($p < 0.001$) y que el fenotipo encontrado en sangre periférica corresponde con células de memoria/efectoras CD28⁺CD45RO⁺CD62L⁻. Asimismo, esta subpoblación de linfocitos T CD4⁺CD57⁺ tiene la capacidad para producir citocinas (IL-4 e IFN- γ) en mayor proporción que los linfocitos T CD4⁺CD57⁻ ($p < 0.001$).

Nota: Se anexa artículo y carta de aceptación del mismo

ABSTRACT

In some chronic pathological conditions, antigen persistence activates and expands CD4⁺CD57⁺ T cells. Host immune response against tuberculosis infection is maintained through continuous antigen-stimulated effector/memory helper T cells. To determine if the CD4⁺CD57⁺ T cells were also expanded in human tuberculosis (TB), we analysed the phenotype of peripheral blood CD4⁺ T cells from 30 TB patients and 30 healthy controls by flow cytometry. We observed a significant increase in the CD4⁺CD57⁺ T cell subset in TB patients in comparison to healthy controls ($p < 0.001$). Most CD4⁺CD57⁺ T cells exhibited a CD28⁻CD45RO⁺CD62L⁻ phenotype, which is associated with memory cells. *In vitro* antigen-stimulated CD4⁺CD57⁺ T cells showed a higher number of positive cells to intracellular IFN- γ and IL-4, than CD4⁺CD57⁻ T cells ($p < 0.001$). These findings suggest that the majority of CD4⁺CD57⁺ T cells correspond to a phenotype of activated memory T cells.

Running title: CD4⁺CD57⁺ T cells in tuberculosis

Key words: CD57⁺T helper cells, HNK-1, human tuberculosis, cytokines

INTRODUCTION

The resurgence of tuberculosis has led to a reexamination of the host T cells immune response in the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection [1-3]. In animal experimental models, recognition of infected macrophages by a subset of memory T cells is an event of crucial importance in acquired-resistance towards a secondary tuberculosis infection [4,5]. In these models, the protective immune response against tuberculosis is carried out by effector/memory CD4⁺ T cells with the CD44^{hi} CD45RB^o CD62L⁻ phenotype, which produce significant quantities of cytokines [4-6]. Shift to the memory T cell phenotype depends on the persistent and repetitive exposure to mycobacterial antigen [7,8]. There are some pathologic conditions in which antigen persistence is associated with the expansion of a CD4⁺ T cell subset bearing the CD57 marker, *i.e.*, human immunodeficiency virus infection [9], renal or bone marrow allograft transplant [10,11], chronic lymphocytic leukemia [12,13], colorectal cancer [14,15], rheumatoid arthritis [16,17],

and malarial infection [18]. CD57 is the sulfated polysaccharide SO₄-3GlcAβ1,3Galβ1,4 GlcNAc, also known as HNK-1 or Leu-7, present on several cell surface glycoproteins and glycolipids [19,20], and on unconventional T cells [10,18]. It has been reported that CD57 bearing glycolipids are ligands for L-selectin and P-selectin [21], IL-6 [22], and nervous system proteoglycans [23]. The expression of CD57 on T cells has been suggested as a marker of late memory T cell [24,25], but the true functional significance of this cell subpopulation is uncertain. The aim of this work was to determine the frequency and characteristics, in a typical antigen persistent pathological condition such as active pulmonary tuberculosis, of the CD4⁺CD57⁺T cells and their cytokine profile.

MATERIALS AND METHODS

Patients.

Thirty adult individuals, all of them native and residents of Mexico City, with active pulmonary tuberculosis (TB) and reactors to intradermal

tuberculin purified protein derivative (induration greater than 10 mm), 72 h later, were studied. Pulmonary TB diagnosis was based on clinical history, physical examination, chest X-rays, positive detection of acid-fast bacilli in sputum as well as isolation and typification of mycobacteria in sputum cultures. According to the diagnostics standards of the American Thoracic Society, all patients were classified as having TB class 3 category I disease [26]. Blood and stools cultures were performed in all patients in order to eliminate possible bacterial or parasitic co-infections. After informed consent and before treatment, a peripheral blood sample was obtained from each individual. Thirty clinically age-matched healthy volunteers were used as controls. All patients gave informed consent for blood sampling and tuberculin skin testing after written information was provided. The Medical Ethics Committee of the National Institute of Respiratory Diseases, Mexico City, approved the study protocol.

Monoclonal Antibodies and Reagents.

Phycoerythrin (PE) labelled-mouse IgG monoclonal antibodies (mAbs) to human CD28, TCR $\gamma\delta$, CD44, as well as FITC-labelled antibodies to human CD62L, CD69 and TCR $\alpha\beta$, and CyChrome-labelled streptavidin were from PharMingen (San Diego, CA, USA). Mouse IgM mAbs to human CD57 and Cy3-labelled goat anti-mouse IgM antibody were from Zymed Lab. (San Francisco, CA, USA). FITC-labelled goat anti-mouse IgM, FITC-labelled mouse anti-human CD4 and CD45RA, PE-labelled mouse anti-human CD4 and CD45RO antibodies were from Southern Biotech Inc. (Birmingham, AL, USA). PE-labelled antibodies to human IL-4 were from Becton and Dickinson (San Jose, CA, USA). Biotin-labelled rat anti-mouse IgM antibody, FITC-labelled antibodies to human CD14, CD19 and IFN- γ were from Serotec Inc (Raleigh, NC, USA). CD4⁺ T cell negative isolation Kit and magnetic microbeads coated with antibodies to mouse IgM to the magnetic cell sorting system (MACS) was from Miltenyi-Biotech (Bergisch Gladbach, Germany). Lymphoprep (Ficoll 1.077 density) was from

Nycomed Pharma As. (Nyegaard, Oslo, Norway). Concanavalin-A (Con-A), saponin, brefeldin-A, RPMI-1640 culture medium, and salts were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA). Sodium pyruvate, L-glutamine, and 2-mercaptoethanol were from Gibco BRL. (Rockville, MD, USA). Fetal calf serum was from HyClone Labs. (Logan, TU, USA). Soluble culture filtrate protein extracts were obtained from *M. tuberculosis* H37Rv strain (ATCC 27294) according to Parra *et al.* [27].

Peripheral blood mononuclear cells.

Whole heparinized peripheral blood was diluted 1:2 (vol/vol) in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated on a ficoll density gradient by centrifugation for 30 min at 1700 rpm at 16°C [28]. After centrifugation, the interface cells were collected, washed twice, and counted in a hemocytometer assessing its viability by trypan blue dye exclusion. Then, cells were re-suspended in PBS at a concentration of 10^7 cells per ml.

Purification of monocytes and T cell subsets.

Monocytes were isolated from PBMC by adhesion for 2 h in 6-well flat-bottomed tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA, USA) in RPMI-1640 medium at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. After incubation, non-adhered cells were removed and adhered cells were recovered from the culture plate by washing with cold PBS/0.05 mM EDTA [29]. Then, the cells were washed, suspended in culture medium, and counted in a hemocytometer determining their viability by trypan blue dye exclusion. The phenotype of the adherent cells was analysed by flow cytometry using FITC-labelled anti-CD14 and anti-CD19 mAbs; the percentage of CD14⁺ adherent cells was always greater than 85.

CD4⁺ T cells were isolated from the non-adherent cells supernatants or from PBMC by negative magnetic selection using microbeads coated with antibodies to human CD8⁺, CD11b⁺, CD16⁺, CD19⁺, CD36⁺ and CD56⁺ in a magnetic activated cell sorting system (MACS) according the

manufacturer's instructions; the magnetically-labelled CD4⁺ T cells were retained in the column while unlabelled CD4⁺ T cells ran through. CD57⁺ T cells were isolated from purified CD4⁺ T cells using mouse IgM antibodies to human CD57 followed by magnetic microbeads coated with antibodies against mouse IgM. Isolated T cell subsets were counted in a hemocytometer and total cell viability was determined by trypan blue dye exclusion. T cell subsets were re-suspended in RPMI-1640 medium at a final concentration of 10⁷ cells/ml of medium without fetal calf serum. The purity of the CD4⁺CD57⁻ and CD4⁺CD57⁺ preparations was greater than 90%, as assessed by flow cytometry with a FITC-labelled anti-human CD4 antibody or with a FITC-labelled goat anti-mouse IgM antibody after incubation with mouse IgM anti-human CD57 antibody.

Cell co-cultures.

CD4⁺ T cells were co-cultured with their autologous monocytes (CD14⁺ adherent cells) at a 5:1 ratio (2 x 10⁵ cells/well), into 96-well flat bottomed

cell culture plates (Costar, Cambridge, MA, USA) in RPMI-1640 medium supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 50 µg/ml gentamicin and 0.5% heat-inactivated fetal calf serum, at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. After 24 h the culture medium was removed and fresh culture medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and mycobacterial antigen was added. In order to establish the optimal dose of antigen, cell activation kinetic experiments were carried out using different protein concentrations of H37Rv *M. tuberculosis* culture supernatant for 4 days. Con-A mitogen (2 µg/ml) was used as cell stimulation positive control. Cell stimulation was monitored at 24 h intervals, by immunofluorescence determination of CD69 expression on CD4⁺ T cells.

Immunofluorescent staining of cell surface markers and flow cytometry.

Two-colour staining was performed on both PBMC and purified CD4⁺ T cells by direct and indirect immunofluorescence, with a mouse IgM anti-human CD57 antibody and

either FITC- or PE-labelled mAbs to human CD4, CD28, CD44, CD45RA, CD45RO, CD62L, TCR α/β or TCR γ/δ . Briefly, 2×10^5 cells were suspended in 20 μ l of PBS-0.2% bovine serum albumin-0.2% sodium azide (Buffer 1), and incubated with the first step mAb reagent for 30 min at room temperature. After incubation, the cells were washed twice with Buffer 1, and a second step staining was performed with FITC- or Cy3-labelled anti-IgM antibodies. After 30 min of incubation, the cells were washed twice, fixed with 1% *p*-formaldehyde and analysed by flow cytometry.

All cells were analysed for the expression of markers on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, CA, USA) using the CellQuest software and 10,000 events were counted. To analyse cell surface markers staining, the lymphocytes were first gated by their physical properties (forward and side scatters), then a second gate was drawn based on immunofluorescence characteristics of the gated cells assessing fluorescence intensity by histograms. To analyse the intracellular cytokines staining, the

gates for positive and negative fluorescence of CD4⁺ T cells (forward scatter and fluorescence) were set manually based on the distribution of cells stained with isotypic controls alone. Data are presented as two-dimensional dot plots, contour maps or histograms. Intensity of fluorescence staining is expressed as the mean fluorescence intensity (MFI). Control stains were performed using isotype-matched mAb of unrelated specificity labelled with FITC-, Cy3- or PE. Background staining was <1% and was subtracted from experimental values.

Flow-cytometry analysis of intracellular cytokines.

Four hours before mycobacterial protein antigen-activated CD4⁺ T cells co-cultures ended, brefeldin-A was added (10 μ g/ml); at the end of the incubation period CD4⁺ T cells were harvested, washed with Buffer 1 and stained with murine IgM anti-human CD57 antibody for 30 min, after washing, the cells were incubated with biotin-labelled rat anti-murine IgM antibody, for 30 min, after washing the

cells were incubated with CyChrome-labelled streptavidin for 30 min and washed with Buffer 1. After that T cells were fixed with 4% *p*-formaldehyde in PBS for 10 min at 4°C. Subsequently, the cells were washed twice with PBS and permeabilized with saponin buffer (0.1% saponin, 0.01% pig IgG, 10 mM HEPES, 10% BSA in PBS) shaking gently for 10 min at room temperature. Afterwards, the cells were incubated with PE-labelled mAbs against human IL-4, and FITC-labelled mAbs anti-human IFN- γ , using both isotype-matched Ig/FITC and Ig/PE controls [30]. After 30 min the cells were washed with PBS, fixed again with 1% *p*-formaldehyde and analysed immediately by flow cytometry as mentioned above

Statistical analysis.

Median values were compared using "U" Mann Whitney rank sum test by the Sigma-Plot8™ and Sigma-Stat2.03™ software. Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

RESULTS

CD4⁺CD57⁺ T cells.

We first determined the proportion of CD4⁺CD57⁺ T cells in peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects and tuberculosis-patients; the percentage of CD4⁺ cells was similar, there was a two-fold increase in CD57⁺ cells in TB patients (Fig 1a), but the frequency of CD4⁺CD57⁺ T cells was 3.8 times higher in tuberculosis patients than in healthy control individuals ($p < 0.001$) (Fig.1b).

The surface phenotype of freshly isolated CD4⁺CD57⁺ or CD4⁺CD57⁻ T cells from patients and healthy individuals was analysed. The vast majority of CD4⁺CD57⁺ T cells exhibited high levels of CD45RO expression, suggesting the memory phenotype; TB-patient cells showed a 2.5 fold increased expression of CD45RO on CD4⁺CD57⁺ T cells than on CD4⁺CD57⁻ T cells. Similar results were obtained in cells from healthy control individuals; in both cases there was a statistical difference of $p < 0.003$ (Table 1).

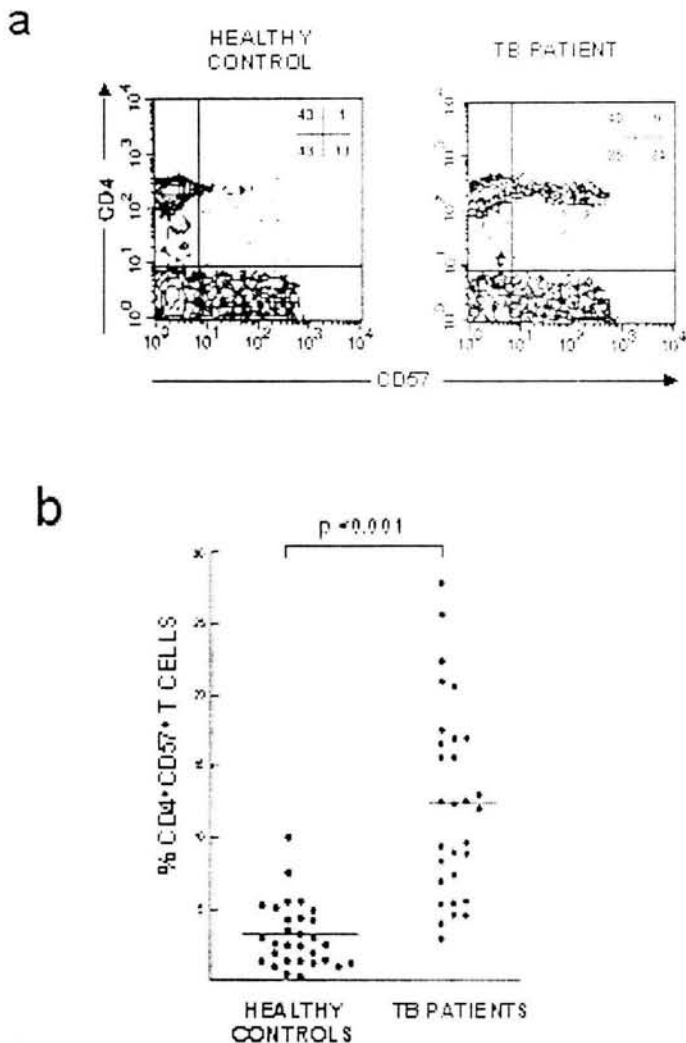


Figure 1. Expression of cell surface molecules in fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) analysed by flow cytometry on the FACScan gated to include lymphocytes. Cells were stained with fluorescence-conjugated antibodies to CD4 and CD57 in a double immunofluorescence assay as described in Materials and Methods. **(a)** This figure is representative of one of thirty healthy controls and thirty TB-patients studied; numbers in the upper right corner represent the percentage of lymphocytes to each quadrant. **(b)** Frequency of CD4⁺CD57⁺ cells on PBMC from healthy controls and TB-patients; the percentage of double positive cells was plotted and the bars denote the median in each group. A *p* value

The percentage of CD4⁺CD57⁺ T cells expressing CD62L showed a two-fold decrease in healthy and TB-patients in comparison to their CD4⁺CD57⁻ T cells; the difference was not statistically significant (Table 1), a similar observation was made when CD62L fluorescence intensity was measured

on CD4⁺CD57⁺ T cells (Fig.2). There were no differences in CD44 expression on CD4⁺ T cells from patients or healthy controls, independently of their CD57 status (Table 1). CD28 expression showed a remarkable decrease on CD4⁺CD57⁺ T

cells in comparison with CD4⁺CD57⁻ T

cells (p<0.001)(Table 1).

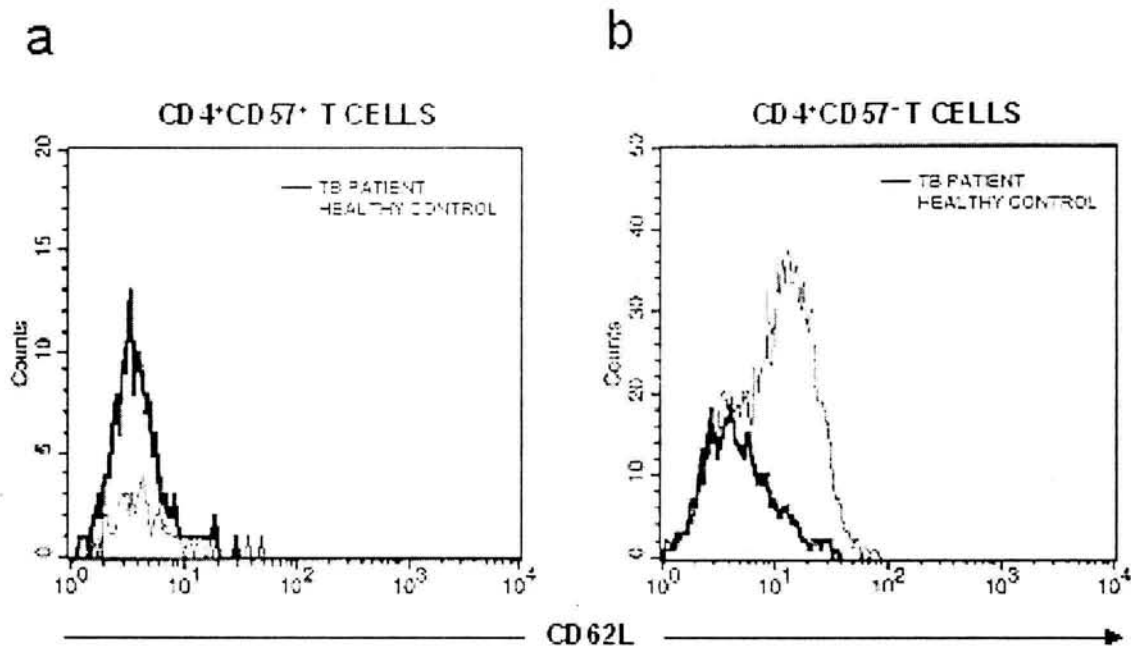


Figure 2. Comparative histogram analysis of the CD62L fluorescence intensity on CD4⁺CD57⁺ T cells (a) and CD4⁺CD57⁻ T cells (b). Purified CD4⁺ T cells were freshly isolated from peripheral blood mononuclear cells by negative magnetic selection, and stained immediately with anti-CD57 and anti-CD62L fluorescent antibodies as described in Materials and Methods. Lymphocytes were first gated by their physical properties (side scatter and forward angle scatter parameters), then only CD62L fluorescence was analysed on a second gate to include CD57⁺ T cells or CD57⁻ T cells. The x-axis denotes the CD62L fluorescence intensity in TB-patients (thick line) and in healthy control (thin line), the y-axis indicates cell numbers. Data are representative of five assays for each group

The percentage of TCR $\alpha\beta$ ⁺ cells in TB patients was 0.7 times lower than in healthy control cells independently from their CD57 expression. Nevertheless, in cells from TB patients,

TCR $\gamma\delta$ expression on CD4⁺CD57⁺ T cells was four-times higher than on CD4⁺CD57⁻ T cells (p<0.01)(Table 1).

Table 1. Percentage of purified CD4+ T cells expressing surface markers

	CD57+ cells		CD57- cells	
	Controls	Patients	Controls	Patients
CD45RA	19.9 ± 5.6	20.8 ± 7.1	29.2 ± 6.6	38.6 ± 8.2
CD45RO	79.0 ± 5.3 ^a	81.1 ± 6.8 ^b	40.9 ± 4.8 ^a	31.6 ± 3.9 ^b
CD62L	23.0 ± 5.2 ^c	11.1 ± 3.3	50.7 ± 1.3 ^c	27.1 ± 10.6
CD44	97.0 ± 1.1	94.6 ± 2.4	98.8 ± 0.7	91.8 ± 3.6
CD28	1.9 ± 0.4 ^d	8.0 ± 2.5 ^e	97.8 ± 0.6 ^d	89.9 ± 3.4 ^e
TCR ^{αβ}	92.8 ± 3.1	66.8 ± 10	94.6 ± 0.4	67.3 ± 11.0
TCR ^{γδ}	4.6 ± 0.4	12.4 ± 2.5 ^f	5.0 ± 1.6	3.0 ± 1.5 ^f

Flow cytometry analysis was performed on freshly isolated CD4⁺ T cells from peripheral blood mononuclear cells by negative magnetic selection. Immediately, the cells were incubated with antibodies to CD57 and to other cell surface markers by double immunofluorescence assay as described in Materials and Methods. Results are expressed as the percentage of positive cells within the CD57⁺ or CD57⁻ cell subpopulation. Numbers indicate mean values ± standard error, of at least five experimental samples, performed by triplicate, for each group. Significant differences were found in the comparison between CD57⁺ and CD57⁻ cells from control or patient group (^{a,b} p<0.003; ^c p <0.007; ^{d,e} p<0.001; ^f p<0.01).

In vitro stimulation of CD4+ T cells and their intracellular cytokine profile. Dose-response *in vitro* assays using mycobacterial protein showed that the maximal expression of CD69, an activation marker [31], in co-cultured CD4⁺ T cells was induced by 3 μg of

antigen (Fig. 3a). Under these culture conditions we determined the percentage of TB-patients cells expressing intracellularly IL-4 or IFN-γ (Fig 3b). As shown in Table 2, there was 21-fold more IL-4⁺ cells in the CD57⁺ cell subpopulation, similarly

there was an increase in the percentage of IFN- γ ⁺ cells within the CD57⁺ cell subpopulation, although it

was not as substantial as the IL-4⁺ cells.

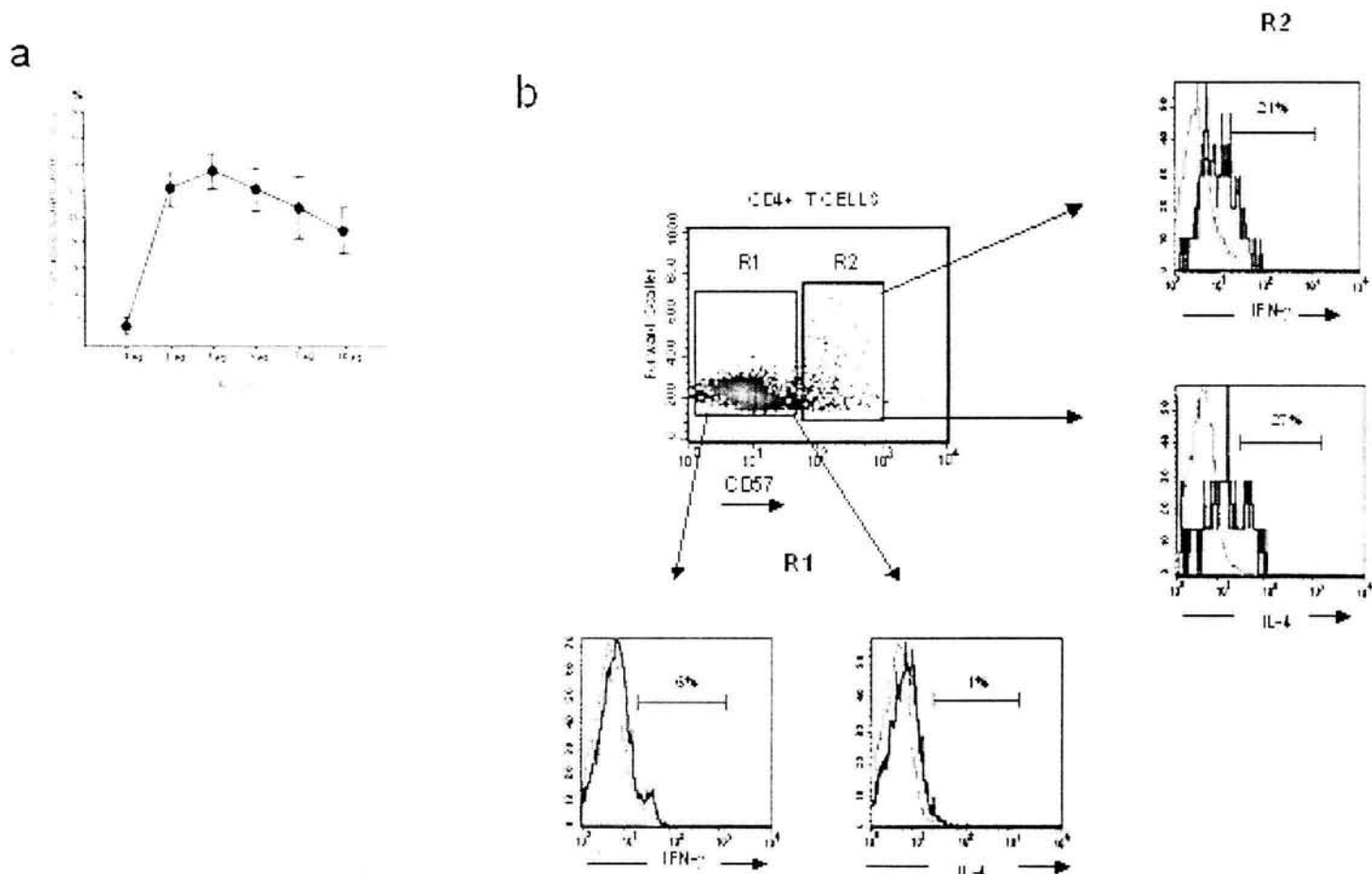


Figure 3. Mycobacterial antigen-stimulated CD4⁺ T cells from TB-patients. CD4⁺ T cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells by negative magnetic selection, and co-cultured with monocytes (CD14⁺ adherent cells). **(a)** The cells were stimulated by distinct soluble protein concentrations of Mycobacterial antigen (H37Rv strain), after that the cells were harvested and stained with anti-CD69 fluorescent antibody. Dots denote the mean value and bars indicate the standard error from three independent experiments. **(b)** Intracellular cytokines in antigen-stimulated CD4⁺ T cells from TB-patients. Representative plot of two regions identified by positive or negative fluorescence to CD57 staining versus forward angle scatter. Region 1 (R1) includes CD4⁺CD57⁻ T cells whereas region 2 (R2) includes CD4⁺CD57⁺ T cells. Arrows in histograms indicate the immunofluorescence of interferon gamma (IFN- γ) and interleukin-4 (IL-4) on the gated cells. Data are representative of five independent experiments.

Table 2. Percentage of CD4+ T cells positive to intracellular cytokines

	CD57+ cells		CD57- cells	
	Mycobacterial antigen	Con A mitogen	Mycobacterial antigen	Con A mitogen
IL-4+	19.7 ± 3.2 ^a	69.7 ± 4.5	0.9 ± 0.2 ^a	22.5 ± 2.6
IFN- γ +	24.7 ± 2.5 ^b	75.2 ± 4.4	5.8 ± 0.8 ^b	21.4 ± 3.6

Flow cytometry analysis for CD4+ T cells co-cultured with autologous monocytes for 72 hours in the presence of mycobacterial antigen (3 μ g/ml). Concanavalin-A (Con-A) mitogen (2 μ g/ml) was used as cell activation control. At the end of the co-culture, CD4+ T cells were incubated with antibodies to CD57, IL-4 and IFN- γ for three-colour immunofluorescence assays as described in Materials and Methods. The percentage of positive cells was obtained from at least five samples for each group and data are expressed as mean values \pm standard error. Statistically significant differences were found in the comparison between CD57+ cells and CD57- cells from patients group (^{a,b} p<0.001).

DISCUSSION

The protective immune response to tuberculosis infection is maintained by effector/memory CD4+ T cells that are stimulated by the persistence of mycobacterial antigen [4-7]. The presence of CD57+ T cells is associated with chronic antigenic stimulation [9-17]. This is the first study that demonstrates a significant increase of the CD4+CD57+ T cell subset in the peripheral blood of patients infected with *M. tuberculosis*;

we also found, similarly to d'Angeac *et al* [24] that analysed healthy individuals, that the vast majority of these CD4+CD57+ T cells show a memory phenotype as determined by their CD45RO expression [32]. It is known that peripheral blood memory T cells from TB-patients are activated during infection [33]; recently, Hengel *et al* [34] reported in PBMC from non-treated TB/HIV patients an increase in IFN- γ +CD45RA-CD62L- T cells after mycobacterial antigen stimulation as opposed to our observation which

showed the CD45RA⁻CD45RO⁺CD62L⁻ phenotype in the great majority of non-antigen stimulated CD4⁺CD57⁺ T cells.

Interestingly, we observed a four-fold increase in $\gamma\delta$ expression in CD57⁺ T cells. It has been long recognized that some $\gamma\delta$ T cells have cytotoxic effector cell properties [35] and that some of them recognize nonpeptide mycobacterial antigens [36]. De Rosa, *et al.* [37] found two human $\gamma\delta$ T cell subsets, one with the CD28⁺CD57⁻ phenotype and the other with CD28⁻CD57⁺ phenotype; this author suggest that the latter correspond to effector/memory cells. We do not know whether the $\gamma\delta$ T cells isolated from our patients have recognition or cytotoxic properties, but the majority of them have the CD57⁺ phenotype.

Other interesting aspect is the diminution of the $\alpha\beta$ TCR expression on the T cells isolated from our TB-patients, which we believe is secondary to activation due to chronic antigen exposure. Various authors have reported $\alpha\beta$ TCR down-regulation during T cell activation [38-40].

It has been reported that the interaction of CD28 with its natural ligands B7 (CD80/CD86) is critical for the normal T cell activation process [41]. Our results showed that the majority of CD4⁺ CD57⁺ T cells were negative to CD28, in accordance to results reported by other authors [42,43].

Since the protective immune response to *M. tuberculosis* is maintained predominantly by Th1 cells [6,34], we determined the presence of intracellular cytokines in the CD4⁺CD57⁺ T cells after stimulation with the mycobacterial antigen because under conventional and non-antigen stimulated conditions the detection range of current cytofluorometry antibodies is below range. Our stimulation experiments demonstrated a significant increase in the frequency of CD4⁺CD57⁺ T cells positive to IFN- γ or IL-4. It would be important to study other regulatory cytokines to better define the real function of this cell subpopulation, nevertheless, it has been recently shown that IL-4 induces the

expression of CD1 on monocytes thus enhancing the immune response to non-peptidic antigens [44, 45].

CD57 is a carbohydrate epitope [19] with multiple functions: one of the proposed ligands for P- and L-selectin [21], ligand for IL-6 [22], and ligand for nervous system proteoglycans [23]. It is possible that the interaction of CD57 with P-selectin, expressed on

activated endothelial cells, and with IL-6, a result of chronic inflammation, favours the selective adhesion of certain, although unknown, CD4⁺ T cell subpopulation with activated memory phenotype and drives the immune response cells to the area of tisular lesion. Altogether, these results suggest that the CD4⁺CD57⁺ T cells could play a significant role in the immune response in TB-patients.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to Rosa Nieto (INER) and Gisela Martínez (UNAM) for their technical assistance. Financial support: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, 34814-M) and Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) proyecto PAPIIT (IN224598).

REFERENCES

1. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA 1999;**282**:677-86.
2. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol 2001;**19**:93-129.
3. Kaufmann SHE. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible?. Nat Med, 2000; **6**:955-60.
4. Andersen P, Heron I. Specificity of a protective memory immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 1993; **61**:844-51.

5. Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, Nagai S. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 1995;**154**:3359-72.
6. Feng CG, Bean AGD, Hooi H, Briscoe H, Britton W. Increase in gamma interferon-secreting CD8+, as well as CD4+, T cells in lungs following aerosol infection with *M. Tuberculosis*. *Infect Immunol*, 1999;**67**:3242-7.
7. Britton WJ, Roche PW, Winter N. Mechanisms of persistence of mycobacteria. *Trends Microbiol*, 1994;**2**:284-8.
8. Bell EB, Sparshott SM, Bunce C. CD4+ T-cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen-a unifying concept. *Immunol Today* 1998;**19**:60-4.
9. Legac E, Autran B, Merle-Beral H, Katlama C, Debre PA. CD4+CD7-CD57+ T cells: a new T-lymphocyte subset expanded during human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1992;**79**:1746-53.
10. Legendre CM, Forbes RD, Loertscher R, Guttman RD. CD4+/Leu-7+ large granular lymphocytes in long-term renal allograft recipients. A subset of atypical T cells. *Transplantation* 1989;**47**:964-71.
11. Moller J, Dickmeiss E, Ryder LP, Jacobsen N, Svejgaard A. Increased frequencies of the CD29 and CD57 markers and decreased frequency of CD45RA within CD4+ and CD8+ subsets after allogeneic bone marrow transplantation in man. *Scand J Immunol* 1991;**33**:499-504.
12. Serrano D, Monteiro J, Allen SL, *et al*. Clonal expansion within the CD4+CD57+ and CD8+CD57+ T cell subsets in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol* 1997;**158**:1482-9.
13. Porakishvili N, Roschupkina T, Kalber T, Jewell AP, Patterson K, Yong K, Lydyard PM. Expansion of CD4+ T cells with a cytotoxic phenotype in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Clin Exp Immunol* 2001;**126**:29-36.
14. Okada T, Iiai T, Kawachi Y, Moroda T, Takii Y, Hatakeyama K, Abo T. Origin of CD57+ T cells which increase at tumor sites in patients with colorectal cancer. *Clin Exp Immunol* 1995;**102**:159-66.
15. Golby SJ, Chinyama C, Spencer J. Proliferation of T-cell subsets that contact tumor cells in colorectal cancer. *Clin Exp Immunol* 2002;**127**:85-91.
16. Imberti L, Sottini A, Signorini S, Gorla R, Primi D. Oligoclonal CD4+ CD57+ T-cell expansions contribute to the imbalanced T-cell receptor repertoire of rheumatoid arthritis patients. *Blood* 1997;**89**:2822-32.
17. Maeda T, Yamada H, Nagamine R, Shuto T, Nakashima Y, Hirata G, Iwamoto Y. Involvement of CD4+,CD57+ T cells in

the disease activity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;**46**:379-84.

18. Watanabe H, Weerasinghe A, Miyaji C, *et al*. Expansion of unconventional T cells with natural killer markers in malaria patients. *Parasitol Int* 2003;**52**:61-70.

19. Warren HS. CD57. *J Biol Regul Homeost Agents* 2000;**14**:322-3.

20. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*, 5th edn. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2003.

21. Needham LK, Schnaar RL. The HNK-1 reactive sulfoglucuronyl glycolipids are ligands for L-selectin and P-selectin but not E-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 **90**: 1359-1363.

22. Cebo C, Dambrouck T, Maes E, Laden C, Strecker G, Michalski JC, Zanetta JP. Recombinant human interleukins IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, and IL-7 show different and specific calcium-independent carbohydrate-binding properties. *J Biol Chem* 2001;**276**:5685-91.

23. Miura R, Aspberg A, Ethell IM, Hagihara K, Schnaar R, Ruoslahti E, Yamaguchi Y. The proteoglycan lectin domain binds sulfated cell surface glycolipids and promotes cell adhesion. *J Biol Chem* 1999;**274**:11431-8.

24. d'Angeac AD, Monier S, Pilling D, Travaglio-Encinoza A, Reme T, Salmon

M. CD57+ T lymphocytes are derived from CD57- precursors by differentiation occurring in late immune responses. *Eur J Immunol* 1994;**24**:1503-11.

25. Kern F, Khatamzas E, Sural I, Frommel C, Reinke P, Waldrop SL, Piker LJ, Volk HD. Distribution of human CMV-specific memory T cells among CD8^{pos} subset defined by CD57, CD27, and CD45 isoforms. *Eur J Immunol* 1999;**29**:2908-15.

26. American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;**161**(4 Pt 1):1376-95.

27. Parra C, Montañó LF, Huesca M, Rayon I, Willms K, Goodsaid F. Inhibition of mitogenesis induced by phytohemagglutinin and *Lens culinaris* lectin in adherent-cell supernatants treated with protein extract of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1986;**52**:309-13.

28. Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol* 1976;**Suppl 5**:9-15.

29. Kumagai K, Itoh K, Hinuma S, Tada M. Pretreatment of plastic Petri dishes with fetal calf serum. A simple method for macrophage isolation. *J Immunol Methods* 1979;**29**:17-25.

30. Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods* 1995;**188**:117-28.
31. Santis AG, Lopez-Cabrera M, Hamann J, Strauss M, Sanchez-Madrid F. Structure of the gene coding for the human early lymphocyte activation antigen CD69: a C-type lectin receptor evolutionarily related with the gene families of natural killer cell-specific receptors. *Eur J Immunol* 1994;**24**:1692-7.
32. Akbar AN, Terry L, Timms A, Beverley PC, Janosy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol* 1988;**140**:2171-8.
33. Rodrigues DS, Medeiros EA, Weckx LY, Bonnez W, Salomao R, Kallas EG. Immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes in *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease. *Clin Exp Immunol* 2002;**128**:149-54.
34. Hengel RL, Allende MC, Dewar RL, Metcalf JA, Mican JM, Lane HC. Increasing CD4+ T cells specific for tuberculosis correlate with improved clinical immunity after highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;**18**:969-75.
35. Hayday AC. $\gamma\delta$ T cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 2000;**18**:975-1026.
36. Pfeffer K, Schoel B, Gulle H, Kaufmann SHE, Wagner H. Primary responses of human T cells to mycobacteria: a frequent set of $\gamma\delta$ T cells are stimulated by protease resistant ligands. *Eur J Immunol* 1990;**20**: 1175-80.
37. De Rosa SC, Mitra DK, Watanabe N, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Roederer M. Vdelta1 and Vdelta2 gammadelta T cells express distinct surface markers and might be developmentally distinct lineages. *J Leukoc Biol* 2001;**70**: 518-26.
38. von Essen M, Menne C, Nielsen BL, *et al*. The CD3 γ leucine-based receptor-sorting motif is required for efficient ligand-mediated TCR down-regulation. *J Immunol* 2002;**168**:4519–23.
39. Legendre V, Guimezanes A, Buferne M, Barad M, Schmitt-Verhulst AM, Boyer C. Antigen-induced TCR-CD3 down-modulation does not require CD3 δ or CD3 γ cytoplasmic domains, necessary in response to anti-CD3 Ab. *Int Immunol* 1999;**11**:1731-8.
40. Kastrup J, Lauritsen JP, Menne C, Dietrich J, Geisler C. The phosphatase domains of CD45 are required for ligand induced T-cell receptor downregulation. *Scand J Immunol* 2000; **51**:491-6.
41. Ward SG. CD28: a signalling perspective. *Biochem J* 1996;**318**: 361-77.

42. Kern F, Ode-Hakim S, Vogt K, Höflich C, Reinke P, Volk D. The enigma of CD57⁺ CD28⁻ T cell expansion-anergy or activation?. *Clin Exp Immunol* 1996;**104**:180-4.

43. Komocsi A, Lamprecht P, Csernok E, *et al*. Peripheral blood and granuloma CD4(+)CD28(-) T cells are a major source of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in Wegener's granulomatosis. *Am J Pathol* 2002;**160**:1717-24.

44. Thomssen H, Kahan M, Londei M. IL-3 in combination with IL-4, induces the expression of functional CD1 molecules on monocytes. *Cytokine* 1996;**8**:476-81.

45. Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol* 1997;**27**:431-41.

Carta de aceptación del manuscrito.

Re: Intracellular _expression of IL-4 and IFN-g by m. tuberculosis antigen-specific CD4+CD57+ T cell subpopulation with memory phenotype in tuberculosis patients

Authors: MC Jimenez-Martinez et al
Manuscript ID: IMM/2003/002315

We are pleased to say that the above manuscript has now been accepted for publication in *Immunology*. Electronic proofs should follow from the publisher within 6-8 weeks.

If any of the correspondent's contact details should change please inform the Editorial office as soon as possible, to prevent production delays.

Many thanks for your interest in the journal.

With best wishes
Rubina Begum

on behalf of Professor FY Liew

Rubina Begum, *Immunology* Editorial, British Society for Immunology, Triangle House, Broomhill Road, London SW18 4HX

Tel: +44 (0)208 875 2441 Fax: +44 (0)208 875 2422
email: rubina@immunology.org internet: www.immunology.org

Advancing the Science of Immunology for the benefit of the public.

Company 3005933, registered in England and Wales. limited by guarantee and registered as charity 1043255

Capítulo 4. Expresión de moléculas coestimuladoras en la subpoblación de linfocitos T CD4+ CD57+ y células adherentes CD14+.

INTRODUCCION

En el capítulo anterior se demostró que los linfocitos T CD4+ CD57+ se encuentran incrementados durante la tuberculosis pulmonar activa, un dato relevante en la subpoblación CD57+ fue el bajo porcentaje de células CD28+ (aproximadamente 8%), mientras que en la subpoblación CD57- el porcentaje de células CD28+ fue cercano a 90%. Esta característica fenotípica de los linfocitos T CD4+ CD57+ (CD28-) se ha reportado en individuos sanos¹ y en otras condiciones patológicas como VIH² o cáncer.³

La interacción CD28-CD80/CD86 es una de las señales coestimuladoras más estudiadas, se ha demostrado que durante la activación celular es necesaria la participación de dos señales, la primera es la interacción de TCR/CD3-MHC y la segunda es la cooperación a través de moléculas coestimuladoras presentes en las células presentadoras de antígeno (CPA);⁴ en ausencia de estas señales coestimuladoras, los linfocitos son conducidos a un estado de anergia celular^{5,6}. La señal coestimuladora no sólo es en dirección al linfocito T, también hay señales dirigidas a la CPA, así la interacción CD40 en la CPA y CD40L en el linfocito T, induce e incrementa la expresión de moléculas de la familia B7 en las CPA.⁷ Estas señales bi-direccionales, primero CD40-CD40L y después B7-CD28, favorecen la activación del linfocito T y el incremento en el número de moléculas de la familia B7 en la CPA⁸. En este sentido, se ha demostrado por RT-PCR que los linfocitos T CD4+CD57+ no expresan mRNA para CD40L ni antes, ni después de la estimulación policlonal¹⁻⁹, por lo que la interacción molecular descrita, estaría interrumpida. Con estos antecedentes y considerando que los resultados del capítulo anterior indican que los linfocitos T CD4+ CD57+ si se activan con el estímulo antigénico (H37Rv), produciendo citocinas, la pregunta planteada fue si la

ausencia de CD28 en los linfocitos T CD4+ CD57+, tendría alguna repercusión en la expresión de CD80/CD86 en la CPA.

RESULTADOS.

Expresión de CD80 y CD86 en células adherentes CD14+

Para resolver este planteamiento se aislaron las células CD57+ y CD57- por magneto selección, a partir de linfocitos T CD4+ previamente purificados; así como a las células adherentes CD14+ (Ver material y métodos); a continuación se hicieron los siguientes co-cultivos: Células adherentes CD14+ y linfocitos T CD4+ CD57+ , Células adherentes CD14+ y linfocitos T CD4+ CD57-, siguiendo el mismo procedimiento para cultivos celulares descrito en material-métodos y utilizando el estímulo antigénico H37Rv a la dosis previamente establecida.

En la figura 1 observamos la Intensidad de fluorescencia para CD80 y CD86 en células adherentes CD14+ en co-cultivo con linfocitos T CD4+CD57+ o linfocitos T CD4+CD57- estimulados con H37Rv (3 μ g) durante varios días. Como se observa en las gráficas, la intensidad de fluorescencia media para las moléculas estudiadas aumenta a medida que transcurren los días posteriores al estímulo antigénico, independientemente del tipo de subpoblación celular.

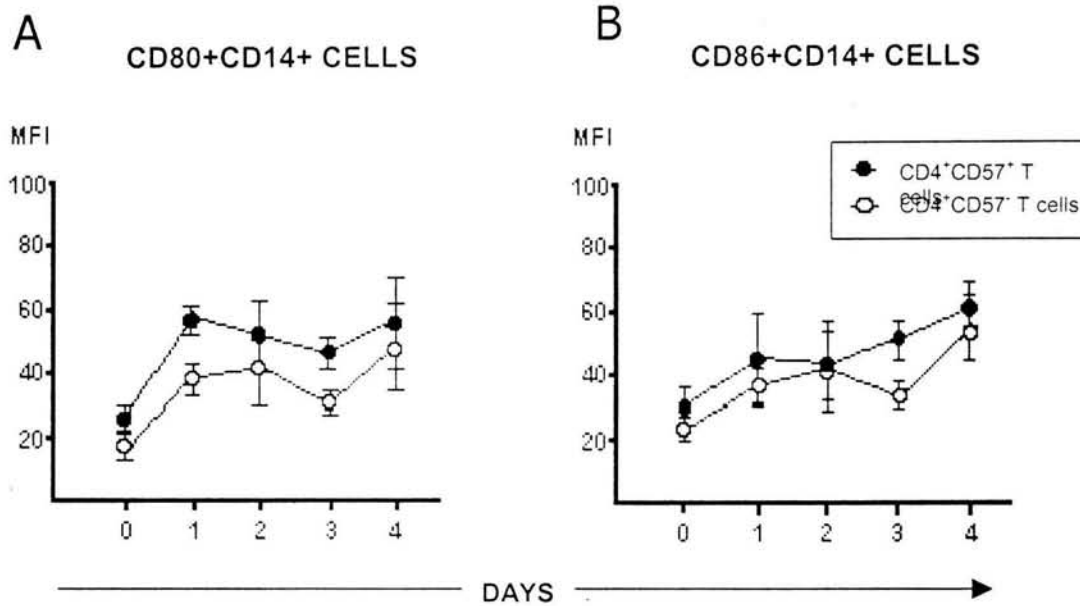


Figura 1. Cinética de expresión de CD80 (A) y CD86 (B) en células adherentes CD14+. El número 0 corresponde a 24 h de cultivo en ausencia de estímulo con RPM1-1640 y SFB al 0.5% (Ver material y métodos). Los números 1-4 corresponden a los días posteriores al estímulo con antígeno micobacteriano H37Rv. La expresión de CD80 y CD86 fue medida en intensidad de fluorescencia media (MFI). Los datos presentados aquí son representativos de cuatro experimentos. Los puntos corresponden a la media \pm SEM.

Los resultados obtenidos con las células adherentes CD14+ co-cultivadas con los linfocitos T CD4+ CD57+ sugieren que la ausencia de CD28 no modifica la inducción de CD80 o CD86 en la CPA.

La siguiente propuesta fue determinar la expresión de otra molécula coestimuladora con funciones similares a CD28 en los linfocitos T CD4+ CD57+ antígeno-estimulados. Una señal coestimuladora equivalente a CD28 es ICOS¹², se trata de una molécula que se induce posterior a la activación celular¹⁵ con ligandos similares a CD28¹², por lo que la pregunta planteada fue si las CMN estimuladas con antígeno micobacteriano podrían estar utilizando a ICOS como señal coestimuladora en lugar de CD28. Para contestar esta pregunta se hicieron cultivos celulares durante 72h en presencia de H37RV a la dosis previamente establecida y posteriormente las células se recuperaron e incubaron con anticuerpos monoclonales contra CD4, CD57 e ICOS conjugados a un fluorocromo, analizándose los resultados por citometría de flujo.

En la figura 2, se observa que ICOS es inducido después de un estímulo antigénico con un predominio en la subpoblación de linfocitos T CD4+ CD57+.

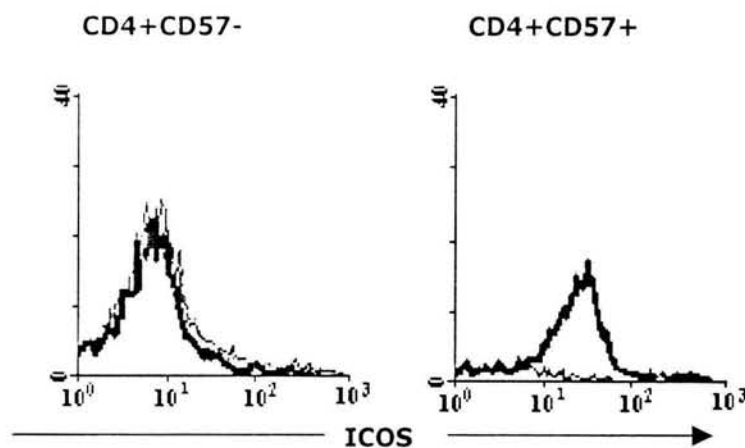


Figura 2. Expresión de ICOS en linfocitos T CD4+CD57- y linfocitos T CD4+CD57+. Se cultivaron CMN en presencia del antígeno micobacteriano, la línea delgada muestra la expresión de ICOS en las células no estimuladas para ambas poblaciones celulares, la línea gruesa muestra la expresión de ICOS en células antígeno-estimuladas en ambas poblaciones celulares. Las gráficas mostradas aquí son representativas de tres experimentos.

DISCUSION

Una de las características de los linfocitos T CD4+CD57+ es la carencia de CD28 en su superficie^{2,3}. CD28 es una señal coestimuladora esencial en la activación celular⁵, en cuya ausencia las células se vuelven anérgicas^{4, 6, 10}. En este capítulo se evaluó la inducción de los ligandos de CD28 en las células adherentes CD14+ en co-cultivos con linfocitos T CD4+ CD57+, ya que previamente Li y cols. habían demostrado que linfocitos T citotóxicos CD28- en co-cultivo con linfocitos B inhibían la expresión de CD86 en las CPA, sugiriendo una función reguladora para las células CD28-¹⁴. Nuestros resultados mostraron que las moléculas B7 fueron no sólo eficientemente inducidas, sino que también el número de células adherentes CD14+ que expresaban estos ligandos fue ligeramente superior que en las co-cultivadas con la subpoblación de linfocitos T CD4+ CD57-, es decir, no encontramos que la ausencia de CD28 tuviera algún efecto en la inducción de CD80 o CD86 en las células adherentes CD14+. Con estos datos, la pregunta que se planteó fue ¿qué tipo de molécula coestimuladora sería la utilizada por los linfocitos T CD4+CD57+ que tuviera un papel similar a CD28?. En los últimos años se ha reconocido que los requerimientos coestimuladores necesarios para la activación de los linfocitos T son diferentes para linfocitos vírgenes que para linfocitos de memoria, estos últimos no necesariamente dependen de la coestimulación a través de CD28¹¹. De esta forma las células con fenotipo de memoria expresan una molécula de la familia de CD28, la cual es inducible durante la activación celular (ICOS)¹². Los resultados del capítulo anterior nos sirvieron como antecedentes para suponer que si la subpoblación de linfocitos T CD4+ CD57+ tenía predominantemente un fenotipo de memoria y capacidad de producir citocinas posterior al estímulo antigénico, además de inducir moléculas B7 en las células adherentes CD14+, es decir, no se trataba de clones anérgicos, lo más probable era que estuvieran utilizando a la molécula coestimuladora ICOS. Así que antes de evaluar algún efecto de ICOS en la inducción de B7 en CPA, primero era necesario demostrar que los linfocitos T CD4+CD57+ expresaran esa molécula. A pesar de

que no se demostró la independencia de CD28 o la dependencia de ICOS en la inducción de B7 en las CPA, es posible que la presencia de CD80/CD86 en las células adherentes haya sido consecuencia del microambiente¹³ o de algún otro mecanismo de activación independiente de moléculas coestimuladoras como TLR¹⁵, todo lo anterior tendrá que ser evaluado posteriormente. Por otra parte el hecho de haber observado expresión de ICOS en los linfocitos T CD4+CD57+ abre otra perspectiva interesante en este estudio, ya que este dato sugiere aún más de que los linfocitos T CD4+CD57+ son células de memoria-efectoras que podrían estar protegidas contra apoptosis¹⁶, lo que también sería necesario evaluar en un futuro.

Referencias

1. Andersson E, Ohlin M, Borrebaeck CA, Carlsson R. CD4+CD57+ T cells derived from peripheral blood do not support immunoglobulin production by B cells. *Cell Immunol.* 1995 Jul;163(2):245-53.
2. Kern F, Ode-Hakim S, Vogt K, Höflich C, Reinke P, Volk D. The enigma of CD57+ CD28- T cell expansion-anergy or activation?. *Clin Exp Immunol* 1996;104:180-4.
3. Van den Hove LE, Van Gool SW, Vandenberghe P, Boogaerts MA, Ceuppens JL CD57+/CD28- T cells in untreated hemato-oncological patients are expanded and display a Th1-type cytokine secretion profile, ex vivo cytolytic activity and enhanced tendency to apoptosis *Leukemia.* 1998 Oct;12(10):1573-82.
4. Ward S. CD28: a signalling perspective . *Biochem J* 1996; 318: 361-7
5. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. An accessory cell-derived costimulatory signal acts independently of protein kinase C activation to allow T cell proliferation and prevent the induction of unresponsiveness. *J Immunol.* 1989 142:2617-28.

6. Schwartz, R. H. T cell clonal anergy. *Curr. Opin Immunol* 1997; 9: 351-7.
7. Klaus SJ, Pinchuk LM, Ochs HD, Law CL, Fanslow WC, Armitage RJ, Clark EA. Costimulation through CD28 enhances T cell-dependent B cell activation via CD40-CD40L interaction. *J Immunol* 1994;152:5643-52.
8. Paul W. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers. 4th ed. Philadelphia 1999.
9. Andersson E, Dahlenborg K, Ohlin M, Borrebaeck CA, Carlsson R. Immunoglobulin production induced by CD57+ GC-derived helper T cells in vitro requires addition of exogenous IL-2. *Cell Immunol* 1996;169:166-73.
10. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immun* 2001, 1: 220-228.
11. Garcia S, DiSanto J, and Stockinger B. Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation. *Immunity* 1999, 11:163–71.
12. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999, 397: 263-6.
13. Sharpe A, Freeman GJ. The B7–CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002, 2:116-26.
14. Li J, Liu Z, Jiang S, Cortesini R, Lederman S, Suci-Foca N. T supresor lymphocytes inhibit NF-kB-mediated transcription of CD86 gene in APC. *J Immunol* 1999, 163:6386-92.
15. Reiling N, Holscher C, Fehrenbach A, Kroger S, Kirschning CJ, Goyert S, Ehlers S. Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2002, 169:3480-4.

16. Beier KC, Hutloff A, Dittrich AM, Heuck C, Rauch A, Buchner K, Ludewig B, Ochs HD, Mages HW, Kroczeck RA. Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur J Immunol* 2000; 30:3707-17.

DISCUSIÓN GENERAL

Se ha sugerido que el incremento de las estructuras O-glicosídicas podría tener repercusiones negativas en la respuesta inmunitaria, debido a que estas estructuras impiden la interacción celular y por lo tanto la activación celular, como se observa en el síndrome de Wiskott-Aldrich donde hay un exceso en la O-glicosilación de CD43⁴⁷ y en modelos murinos en los que células linfoides tienen un exceso en el número de estructuras O-glicosídicas⁴⁸, esa fue la intención por la que se inició este proyecto, ya que se contaba con una lectina (ALL)³⁶ con la capacidad para reconocer una O-glicoproteína expresada en linfocitos T CD4+³⁹. En nuestro modelo de estudio, la tuberculosis pulmonar, los linfocitos CD4+ son la población que dirige y modula la respuesta protectora contra la micobacteria⁴⁹, así que se decidió evaluar la expresión de la estructura sacarídica reconocida por ALL en estos pacientes. Nuestros resultados demostraron que durante la respuesta inmunológica a la tuberculosis, aumentaba el número de linfocitos CD4+ reconocidos por ALL, de tal forma que era indispensable determinar si la expresión de esta estructura impedía la respuesta inmunitaria o era parte normal de algún proceso celular. En este trabajo primero se estableció el perfil fenotípico de los linfocitos T CD4+ALL+, donde se demostró que expresaban CD25 y CD124 en su superficie, los cuales son marcadores de activación y funcionan como receptores para IL-2 y para IL-4, respectivamente^{31, 50}. El receptor de IL-2, está constituido por 3 subunidades: la cadena α (CD25), β (CD122) y γ (CD132), cuando estas 3 subunidades están activadas, se unen formando un receptor de alta afinidad^{50, 51}. Mientras que el receptor para IL-4 está formado por IL-4R α (CD124) y la cadena común γ , la que se encuentra compartida con otros receptores de citocinas como IL-2, IL-7, IL-9 e IL-15. 10.^{50, 52} En ambos casos, cuando el receptor se encuentra completamente formado se pueden llevar a cabo eventos celulares críticos como la expansión de clonas antígeno-específicas, producción de factores citotóxicos o activación de funciones microbicidas⁵⁰⁻⁵². Ambos receptores se incrementan en la superficie celular, cuando existen estas dos citocinas en el microambiente, interesantemente las células CD4+ ALL- no expresaban estas moléculas de activación, sugiriendo los

linfocitos T CD4+ ALL+ podrían ser linfocitos activados en circulación periférica. Para contestar esta pregunta se realizaron cultivos celulares, donde se observó que al igual que en el modelo murino los linfocitos T CD4+ ALL+ incrementan su número celular⁴¹, teniendo un máximo de expresión a las 48 h después de la activación tanto con mitógenos como con el antígeno; es decir, la expresión de la estructura sacarídica reconocida por ALL es comparable con otras proteínas relacionadas con activación celular como CD69, la cual se induce en superficie 4 h después de la activación celular, teniendo un máximo de expresión a las 48 h⁵³. Estos datos de alguna manera explican que en pacientes con tuberculosis hayamos observado un incremento en la subpoblación CD4+ALL+ en circulación periférica, pues podrían tratarse de células activadas como consecuencia de la infección crónica, como ocurre en las proteínas CD43¹⁷ y CD8⁵⁴, en las que se ha demostrado un incremento en las estructuras O-glicosídicas durante la activación celular. Para determinar la funcionalidad de los linfocitos T CD4+ALL+ se realizaron estudios *in vitro* evaluando la proliferación celular y la producción de citocinas. Estos ensayos revelaron que la mayoría de los linfocitos que proliferaron expresaban la estructura GalNAc. Los cambios en la glicosilación durante la activación celular son fenómenos que han sido ampliamente estudiados^{16, 17, 41, 48, 54, 55}, sin embargo su relación con la proliferación celular no se ha establecido, asociando únicamente el incremento en la O-glicosilación con células neoplásicas en constante estado proliferativo⁵⁶⁻⁵⁸. En cuanto al tipo de citocinas que encontramos en la subpoblación CD4+ALL+ fue predominantemente IFN- γ +, previamente se había demostrado que la subpoblación celular ALL+ tenía un perfil de citocinas Th2⁴⁰, ¿cómo se explican los resultados?, probablemente el microambiente tuvo un papel determinante pues durante la activación con el antígeno micobacteriano, los macrófagos activados producen citocinas, como IL-12, capaces de dirigir la respuesta a Th1⁵⁹, aunque en este trabajo no se evaluó la producción de citocinas en macrófagos la posibilidad queda abierta. De cualquier forma, estos datos sugieren que los linfocitos T CD4+ALL+ no son un fenotipo celular estable comprometido a Th2, sino que el tipo de citocinas producidas por esta subpoblación celular depende del microambiente;

en este sentido se sabe que la estimulación con Con A induce eficientemente la síntesis de IL-2 teniendo un pico máximo de producción a las 48 h posteriores al estímulo y declinando posteriormente⁶⁰, además de que esta citocina ha sido involucrada con cambios en las estructuras O-glicánicas en linfocitos T CD8 activados⁶¹. Con estos antecedentes y los resultados en la expresión de la O-glicoproteína reconocida por ALL en cultivo, se decidió explorar la participación de IL-2 en la generación de estructuras O-glicosídicas en linfocitos T CD4+ activados con Con A. Los resultados mostraron una disminución importante en la proliferación celular, debido a que esta citocina tiene un papel determinante en la expansión clonal^{62,63}, pero también mostraron una disminución en el número de células ALL+ sugiriendo su participación en los fenómenos de glicosilación observados. ¿Qué función proponemos para la estructura O-glicosídica reconocida por ALL+?, hay que analizar las evidencias: 1. Se incrementa durante la activación celular, 2. Es una molécula presente casi exclusivamente en linfocitos en proliferación celular, ¿podía inducir más proliferación a través de su interacción?, esta pregunta surge a partir de que PNA que es una lectina que reconoce GalNAc puede inducir la proliferación en células neoplásicas que sobreexpresan la estructura Tn^{64,65}, aunque en este estudio no se hicieron ensayos al respecto, recientemente Linares M⁶⁶ realizó cultivos celulares estimulando a células de pacientes con TB con diferentes concentraciones de ALL, sin observar proliferación celular evaluada en cpm y ki-67, así que la otra alternativa sería si a través de su interacción se inhibe la proliferación celular, esta posibilidad ha sido demostrada para otra lectina también específica de GalNAc (*Agaricus bisporus*), observándose que células neoplásicas que expresan el antígeno de Thomsen Friedenreich disminuyen su proliferación celular^{65,67} en cultivos en presencia de *Agaricus*, esta posibilidad deberá ser estudiada ya que le atribuiría una función reguladora de la proliferación celular a la estructura sacarídica reconocida por ALL. Otra consecuencia de la activación es la apoptosis, por lo que otra pregunta es si la interacción con esta estructura sacarídica es capaz de inducirla, en relación a esta pregunta, Alvarez G⁶⁸ ha demostrado que al inducir apoptosis en timocitos murinos, los linfocitos que sobreviven son aquellos

reconocidos por ALL, lo que refuerza los datos en los que las células ALL+ son las que están en proceso de vida y no de muerte. Otra posibilidad a evaluar, es que tal vez esta molécula sea utilizada como ligando en los procesos de migración celular, pues una de las funciones más reconocidas en los O-glicanos es su participación en el homing leucocitario a través de la interacción de selectinas y sus ligandos en leucocitos o células endoteliales y esta interacción solamente ocurre después de un proceso de activación celular en donde la estructura O-glicosídica es modificada por una serie de transferasas inducidas en respuesta a la activación celular^{12, 16, 50, 61}.

Otra estructura sacarídica estudiada en este trabajo fue CD57, este epítopo carbohidrato se encuentra presente en proteínas de adhesión del SNC como NCAM⁶⁹ o proteoglicanos⁷⁰ por lo que en células neurales se le ha atribuido una función relacionada al contacto célula-célula y célula-substrato^{69, 70}, además se ha observado que esta estructura puede ser ligando de P o L-selectinas³³ e IL-6³⁴. En el sistema inmunitario su expresión es primordialmente en células NK y algunas subpoblaciones de linfocitos T llamadas "no convencionales"^{28, 31, 50}. Aunque no se conoce la función de estas células, Legac y cols²⁵, han sugerido que los linfocitos T que la expresan corresponden a células que se encuentran bajo estados de estimulación crónica o persistencia del antígeno, esta sugerencia se reafirma al haber cada vez más reportes en los que linfocitos T CD4+CD57+ se expanden en enfermedades crónicas como artritis reumatoide²⁶, sarcoidosis⁷¹, malaria²⁷, trasplante renal^{72, 73}, VIH²⁵, entre otras. Además de estos antecedentes, se decidió buscar la expresión de esta molécula en linfocitos T CD4+ de pacientes con TB porque inicialmente las subpoblaciones CD57+ se pensaba que eran productoras de citocinas TH2³², característica que era compartida por linfocitos T CD4+ALL+ de sujetos sanos⁴⁰, nuestros resultados mostraron que en sanos estas subpoblaciones eran independientes y en pacientes menos del 5% de los linfocitos T CD4+ fue ALL+CD57+, este dato abrió la posibilidad de estudiar funcionalmente a los linfocitos T CD4+CD57+ de manera independiente que los linfocitos T CD4+ALL+. Así, observamos que el fenotipo de los linfocitos CD4+CD57+ es

predominantemente de memoria/efector al ser CD45RO+CD62L-CD28-, esto es muy importante si se tiene en cuenta que la eficiencia de la respuesta inmunológica a la tuberculosis depende del reconocimiento antigénico el cual es llevado a cabo primordialmente por células de memoria y que el éxito de la respuesta depende también de la capacidad efectora de las poblaciones celulares involucradas, a través de la producción de citocinas^{4, 7, 74}. Por estas características será importante demostrar que estas células tienen la capacidad de migrar al sitio de lesión, por la capacidad que tiene CD57 de ser ligando de selectinas³³.

En el modelo murino se ha demostrado que la respuesta inmunitaria a la tuberculosis depende del balance Th1-Th2, siendo al principio de la infección predominantemente Th1 y en estados crónicos Th2^{5, 75}. Los estudios *in vitro* demostraron que los linfocitos T CD4+CD57+ producen grandes cantidades de IFN- γ , necesario en la respuesta celular⁴ e IL-4. Esta citocina podría contribuir con la expresión de moléculas CD1 en macrófagos activados^{76, 77} y con esto favorecer el reconocimiento de antígenos lipídicos⁷⁸, esta posibilidad también tendrá que ser explorada posteriormente. Por otra parte, una característica fenotípica de los linfocitos T CD57+ es la carencia de CD28⁷⁹. Desde hace varios años, es conocido que la ausencia de la señal de CD28 induce a anergia celular^{80, 81}. En este estudio se evaluó la repercusión que tendría la ausencia de CD28 en la inducción de B7 en las CPA, ya que Li y cols. demostraron que linfocitos T citotóxicos CD28- en co-cultivo con linfocitos B inhiben la expresión de CD86, sugiriendo una función reguladora para las células CD28-⁸². Aunque es conocido que la inducción de B7 depende de la interacción CD40-CD40L⁵⁰, se ha reportado que los linfocitos T CD4+CD57+ no expresan CD40L^{83, 84}, por lo que supusimos que las células CD14+ en co-cultivo con linfocitos T CD4+CD57+ no expresarían CD80 o CD86 en su superficie, los resultados mostraron que la ausencia de CD28 no tuvo ninguna repercusión en la expresión de B7 en las células co-cultivadas. Estos datos pueden explicarse ya que la inducción de estas moléculas no depende exclusivamente de las interacciones moleculares descritas (CD40-CD40L, CD28-B7)^{31, 50}, si no que también participa el microambiente a través de citocinas como IL-6 y TNF- α ⁸⁵,

también participa el microambiente a través de citocinas como IL-6 y TNF- α ⁸⁵, ambas producidas en grandes cantidades después del estímulo micobacteriano⁸⁶, existiendo otras moléculas involucradas sobre la superficie de las células CD14+ o de los linfocitos T. En el caso de las células CD14+, es posible que hayan participado los receptores específicos de patógenos como TLR⁸⁷, pues se ha demostrado que juegan un papel importante en la respuesta inmunitaria a tuberculosis⁸⁷. En el caso de los linfocitos T, una molécula coestimuladora equivalente a CD28 es ICOS⁸⁸, esta molécula se induce después de la activación celular, así que antes de evaluar si ICOS tenía alguna función relacionada a la inducción de B7 en células CD14+ co-cultivadas con linfocitos T CD4+CD57+ primero fue necesario demostrar que estos últimos la podían expresar en su superficie. Aunque en este estudio no se definió si la ausencia de CD28 o la presencia de ICOS tuvieron alguna repercusión en la inducción de moléculas B7 en las CPA, los datos obtenidos mostraron que los linfocitos T CD4+CD57+ expresaron ICOS posterior al estímulo. Con este resultado, se generó una nueva pregunta en este trabajo, ya que se ha sugerido que las células que utilizan ICOS como molécula coestimuladora se encuentran protegidas contra apoptosis^{85, 89}, haciendo necesario evaluar esta posibilidad más adelante. Tomando en cuenta todas las características encontradas para la subpoblación CD4+CD57+ es posible que estemos frente a "la célula ideal" (memoria/efectora y posiblemente protegida contra apoptosis) en respuesta a TB, claro si es que su patrón de citocinas es Th1.

En suma nuestros resultados sugieren que los cambios en la glicosilación permiten discriminar diversas etapas en la diferenciación celular, así la expresión de Gal, GalNAc en linfocitos T CD4+ indica que son células en proliferación, mientras que la expresión de SO₄-3GlcA β 1,3Gal β 1,4 GlcNAc está relacionada con células que ya se han comprometido con una función efectora.

Referencias Introducción-Discusión general

1. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997; 18: 263-266
2. Bonecini-Almeida MG, Chitale S, Boutsikakis I, Geng J, Doo H, He S, Ho JL. Induction of *in vitro* human macrophage anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity: requirements of IFN-gamma and prime lymphocytes. *J Immunol* 1998; 160: 4490-4499
3. Sallusto F, Lanzaveccia A, Mackay C. Chemokines and chemokines response in T cell priming an Th1/Th2 mediated response. *Immunology Today* 1998; 19: 568-574
4. Orme IM, Cooper AM. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunol Today* 1999; 20: 307-312.
5. Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer J M, Madrid V D..Correlation between the kinetic of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996, 86: 26-33
6. Somoskovi A, Zissel G, Zipfel PF, Ziegenhagen MW, Klaucke J, Haas H, et al. Different cytokine patterns correlate with the extension of disease in pulmonary tuberculosis. *Eur Cytokine Netw* 1999; 10: 135-142
7. Zhang M, Lin Y, Iyer D, Gong J, Abrams J, Barnes P. T-Cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63: 3231-3234
8. Hirsch C, Yoneda T, Averill L, Ellner J, Tootssi Z. Enhancement of intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes by transforming growth factor beta 1. *J Infect Dis* 1994; 170: 1229-1237
9. Hirsch C, Hussain R, Tosì Z, Dawood G, Shahid F, Ellner J. Cross-modulation by transforming growth factor beta in human tuberculosis: suppression of antigen-driven blastogenesis and interferon gamma production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 3193-3198.

10. Sugawara I, Yamada H, Kaneko H, Mizuno S, Takeda K, Akira C, Crevel R, Karyadi E, Preyers F, Leenders M, Kullberg BJ, Nelwan R, et al. Increased production of interleukin 4 by CD4⁺ and CD8⁺ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *JID* 2000; 181: 1194-1197.
11. Tsai E, Yunis E, Thim S, Delgado J, Goldfeld A, et al. IL-10 producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest* 2000; 105: 1317-1325.
12. Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. Protein-Glycan interactions. En *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994.
13. Lis H, Sharon N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* 1993, 218: 1-27.
14. Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1998, 33:151-208.
15. Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993, 3:97-130.
16. Tsuboi S, Fukuda M. Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. *BioEssays* 2001, 23: 46-53.
17. Piller F, Piller V, Fox RI, Fukuda M. Human T lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J Biol Chem* 1988, 263: 15146-15150.
18. Jiménez-Martínez MC, Trejo Márquez H, Herrera Sánchez A, Romero Ibarra JL, Chávez Sánchez R, Lascurain Ledesma R, Zenteno Galindo E. Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2002, 15: 39-47.
19. Hakomori S. Aberrant glycosylation in cancer cell membrane focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res* 1985, 45:2405-2414.

20. Copin MC, Devisme L, Buisine MP, Marquette CH, Wurtz A, Aubert JP. From normal respiratory mucosa to epidermoid carcinoma: expression of human mucin genes. *Int J Cancer* 2000;86:162-168.
21. Meichenin M, Rocher J, Galanina O, Bovin N, Nifantev N, Sherman A, et al. Tk, a new colon tumor-associated antigen resulting from altered O-glycosylation. *Cancer Res* 2000;60:5499-5507.
22. Babino A, Oppezzo P, Bianco S, Barrios E, Berois N, Navarrete H, et al. Tn antigen is a pre-cancerous biomarker in breast tissue and serum in n-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinogenesis. *Int J Cancer* 2000 15;86:753-759
23. Gum JR. Mucin genes and the proteins they encode: structure, diversity, and regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7:557-564.
24. d'Angeac AD, Monier S, Pilling D, Travaglio-Encinoza A, Reme T, Salmon M. CD57+ T lymphocytes are derived from CD57- precursors by differentiation occurring in late immune responses. *Eur J Immunol* 1994;24:1503-11.
25. Legac E, Autran B, Merle-Beral H, Katlama C, Debre PA. CD4+CD7-CD57+ T cells: a new T-lymphocyte subset expanded during human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1992;79:1746-53.
26. Maeda T, Yamada H, Nagamine R, Shuto T, Nakashima Y, Hirata G, Iwamoto Y. Involvement of CD4+,CD57+ T cells in the disease activity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:379-84.
27. Watanabe H, Weerasinghe A, Miyaji C, et al. Expansion of unconventional T cells with natural killer markers in malaria patients. *Parasitol Int* 2003;52:61-70.
28. Warren HS. CD57. *J Biol Regul Homeost Agents* 2000;14:322-3.
29. Terayama K, Oka S, Seiki T, Miki Y, Nakamura A, Kozutsumi Y, Takio K, Kawasaki T. Cloning and functional expression of a novel glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the carbohydrate epitope HNK-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6093-98.

30. Yamamoto S, Oka S. Glucuronyltransferases involved in the HNK-1 carbohydrate epitope biosynthesis. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 2001; 13:193-208.
31. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*, 5th edn. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2003.
32. Brinkmann V, Kristofic C. Massive production of Th2 cytokines by human CD4⁺ effector T cells transiently expressing the natural killer cell marker CD57/HNK1. *Immunology* 1997;91:541-7.
33. Needham LK, Schnaar RL. The HNK-1 reactive sulfoglucuronyl glycolipids are ligands for L-selectin and P-selectin but not E-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 90: 1359-1363.
34. Cebo C, Dambrouck T, Maes E, Laden C, Strecker G, Michalski JC, Zanetta JP. Recombinant human interleukins IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, and IL-7 show different and specific calcium-independent carbohydrate-binding properties. *J Biol Chem* 2001;276:5685-91.
35. Pusztai A. *Plant lectins*. Cambridge University Press. Great Britain. 1991. p.p.1-2
36. Zenteno E, Lascurain R, Montaña LF, Vazquez L, Debray H, Montreuil J. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj J* 1992, 9: 204-208.
37. Lascurain R, Chávez R, Gorocica P, Pérez A, Montaña LF, Zenteno E. Recognition of a CD4⁺ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Immunology* 1994, 83: 410-413.
38. Porras F, Lascurain R, Chavez R, Ortiz B, Hernández P, Debray H, Zenteno. Isolation of the receptor for *Amaranthus leucocarpus* lectin from murine naive thymocytes. *Glycobiology* 2000, 10: 459-465.
39. Lascurain R, Porras F, Báez R, Chávez R, Martínez-Cairo S, Alvarez G, Zenteno E. *Amaranthus leucocarpus* lectin recognize human naive T cell subpopulation. *Immunol Invest* 1997, 26:579-587.
40. Chávez R Purificación de una subpoblación de linfocitos Th2, empleando la lectina de *Amaranthus leucocarpus*. IPN, 2000.

41. Ortiz B, Porras F, Jiménez-Martínez MC, Montaña LF, Martínez-Cairo S, Lascrain R and Zenteno E. Differential expression of a 70 kDa O-glycoprotein on T cells: a possible marker for naive and early activated murine T cells. *Cellular Immunol* 2002, 218: 34-45.
42. American Thoracic Society. *Am J Resp Crit Care Med* 2000; 161: 1376-1395.
43. Zenteno E, Ochoa JL. Isolation and purification of *Amaranthus leucocarpus* lectin on stroma column. *Phytochemistry* 1988, 27: 313-317
44. Parra C, Montaña LF, Huesca M, Rayon I, Willms K, Goodsaid F. Inhibition of mitogenesis induced by phytohemagglutinin and *Lens culinaris* lectin in adherent-cell supernatants treated with protein extract of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1986;52:309-13.
45. Kumagai K, Itoh K, Hinuma S, Tada M. Pretreatment of plastic Petri dishes with fetal calf serum. A simple method for macrophage isolation. *J Immunol Methods* 1979;29:17-25.
46. Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods* 1995;188:117-28.
47. Piller F, Le Deist F, Weinberg KI, Parkman R, Fukuda M. Altered O-glycan synthesis in lymphocytes from patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *J Exp Med* 1991;173:1501-10.
48. Tsuboi S, Fukuda M. Overexpression of branched O-linked oligosaccharides on T cell surface glycoproteins impairs humoral immune responses in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1998;273:30680-7.
49. Kaufmann S. How can immunology contribute to the control of tuberculosis?. *Nat Rev Immunol* 2001, 1: 20–30.
50. Paul W. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers. 4th ed. Philadelphia 1999.
51. Nelson BH, Lord JD, Greenberg PD: Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor beta and gamma chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nat* 1994; 369:333-336

52. Hong J, Miera BH, Rothman P. Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2000 ; 105.
53. Santis AG, Lopez-Cabrera M, Hamann J, Strauss M, Sanchez-Madrid F. Structure of the gene coding for the human early lymphocyte activation antigen CD69: a C-type lectin receptor evolutionarily related with the gene families of natural killer cell-specific receptors. *Eur J Immunol* 1994, 24:1692-1697.
54. Priatel JJ, Chui D, Hiraoka N, Simmons CJ, Richardson KB, Page DM, Fukuda M, Varki NM, Marth JD The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity* 2000;12:273-83.
55. Galvan M, Murali-Krishna K, Ming LL, Baum L, Ahmed R. Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from virally infected mice can distinguish effector/memory CD8+ T cells from naive cells. *J Immunol* 1998;161:641-8.
56. Nomoto M, Yonezawa S, Tokunaga M, Kim YS, Sato E. Mucin antigens expression and Ki-67 labeling in breast cancer: the peculiarity in scirrhous carcinoma. *Pathol Int.* 1995;45:233-9.
57. Imada T, Rino Y, Hatori S, Takahashi M, Amano T, Kondo J, Suda T Sialyl Tn antigen expression is associated with the prognosis of patients with advanced colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 1999;46:208-14.
58. Bleesing JJ, Janik JE, Fleisher TA. Common expression of an unusual CD45 isoform on T cells from patients with large granular lymphocyte leukaemia and autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Br J Haematol* 2003;120:93-6.
59. Siamon Gordon Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003, 3; 23-35.
60. Gillis S, Ferm MM, Ou W, Smith KA. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol*, 1978;120:202-32.

61. Carlow D, Corbel SY, Williams MJ, Ziltener HJ. IL-2, -4, and -15 Differentially Regulate O-Glycan Branching and P-Selectin Ligand Formation in Activated CD8 T Cells. *J Immunol* 2001, 167: 6841–48.
62. Gillis S, Mertelsmann R, Moore MA. T-cell growth factor (interleukin 2) control of T-lymphocyte proliferation: possible involvement in leukemogenesis. *Transplant Proc.* 1981;13:1884-90.
63. Gillis S, Watson J. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med*, 1980;152:1709-19.
64. Ryder SD, Smith JA, Rhodes JM. Peanut lectin: a mitogen for normal human colonic epithelium and human HT29 colorectal cancer cells. *J Natl Cancer Inst*, 1992;84:1410-6.
65. Irazoqui FJ, Jansson B, Lopez PH, Nores GA. Correlative fine specificity of several Thomsen-Friedenreich disaccharide-binding proteins with an effect on tumor cell proliferation. *J Biochem*, 2001;130:33-7.
66. Linares M. Cambios en la glicosilación de proteínas de membrana de linfocitos relacionadas con la activación celular. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UNAM 2003.
67. Yu L, Fernig DG, Smith JA, Milton JD, Rhodes JM. Reversible inhibition of proliferation of epithelial cell lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin. *Cancer Res*, 1993;53:4627-32.
68. Alvarez G. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. UNAM.
69. Ong E, Yeh J, Ding Y, Hindsgaul O, Fukuda M. Expression Cloning of a Human Sulfotransferase That Directs the Synthesis of the HNK-1 Glycan on the Neural Cell Adhesion Molecule and Glycolipids. *J Bio Chem*, 1998; 273; 5190–95.
70. Miura R, Aspberg A, Ethell IM, Hagihara K, Schnaar R, Ruoslahti E, Yamaguchi Y. The proteoglycan lectin domain binds sulfated cell surface glycolipids and promotes cell adhesion. *J Biol Chem* 1999;274:11431-8.

71. Kurumagawa T, Seki S, Kobayashi H, Koike Y, Kanoh S, Hiraide H, Motoyoshi K. Characterization of bronchoalveolar lavage T cell subsets in sarcoidosis on the basis of CD57, CD4 and CD8. *Clin Exp Immunol* 2003;133:438-47.
72. Legendre CM, Forbes RD, Loertscher R, Guttman RD. CD4+/Leu-7+ large granular lymphocytes in long-term renal allograft recipients. A subset of atypical T cells. *Transplantation* 1989;47:964-71.
73. Hebib C, Rouleau M, Hirsch F, Durrbach A, Legendre C, Senik A, Charpentier B. Cytokine expression in peripheral CD57(+) T cells from tolerant renal allograft recipients. *Transplant Proc* 2000 ;32:386-7.
74. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93-129.
75. Jiao X, Lo-Man R, Winter N, Deriaud E, Gicquel B, Leclerc C. The shift of Th1 to Th2 immunodominance associated with the chronicity of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection does not affect the memory response. *J Immunol* 2003;170:1392-8.
76. Thomssen H, Kahan M, Londei M. IL-3 in combination with IL-4, induces the expression of functional CD1 molecules on monocytes. *Cytokine* 1996;8:476-81.
77. Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol* 1997;27:431-41.
78. Ulrichs T, Moody DB, Grant E, Kaufmann SH, Porcelli SA. T-cell responses to CD1-presented lipid antigens in humans with *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun* 2003;71:3076-87.
79. Kern F, Ode-Hakim S, Vogt K, Höflich C, Reinke P, Volk D. The enigma of CD57⁺ CD28⁻ T cell expansion-nergy or activation?. *Clin Exp Immunol* 1996;104:180-4.
80. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. An accessory cell-derived costimulatory signal acts independently of protein kinase C activation to allow

- T cell proliferation and prevent the induction of unresponsiveness. *J Immunol* 1989 142:2617-28.
81. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immun* 2001, 1: 220-228.
 82. Li J, Liu Z, Jiang S, Cortesini R, Lederman S, Suci-Foca N. T supresor lymphocytes inhibit NF-kB-mediated transcription of CD86 gene in APC. *J Immunol* 1999, 163:6386-92.
 83. Andersson E, Ohlin M, Borrebaeck CA, Carlsson R. CD4+CD57+ T cells derived from peripheral blood do not support immunoglobulin production by B cells. *Cell Immunol* 1995;163:245-53.
 84. Andersson E, Dahlenborg K, Ohlin M, Borrebaeck CA, Carlsson R. Immunoglobulin production induced by CD57+ GC-derived helper T cells in vitro requires addition of exogenous IL-2. *Cell Immunol* 1996;169:166-73.
 85. Sharpe A, Freeman GJ. The B7–CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002, 2:116-26.
 86. Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G, Julkunen I, Coccia EM. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immunol* 2001;166:7033-41.
 87. Reiling N, Holscher C, Fehrenbach A, Kroger S, Kirschning CJ, Goyert S, Ehlers S. Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2002, 169:3480-4.
 88. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 1999, 397: 263-6
 89. Beier KC, Hutloff A, Dittrich AM, Heuck C, Rauch A, Buchner K, Ludewig B, Ochs HD, Mages HW, Kroczeck RA. Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur J Immunol* 2000; 30:3707-17.