



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EFEECTO DE LA DEXAMETASONA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES
ALFA-2,3 Y ALFA-2,6 DEL VIRUS DE LA INFLUENZA IN VITRO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

P R E S E N T A:

ONASIS VICENTE FERMÍN

TUTOR PRINCIPAL:

LEONOR HUERTA HERNÁNDEZ, IIB-UNAM.

COMITÉ TUTORAL:

JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT, FMVZ-UNAM.

LUIS VACA DOMÍNGUEZ, IFC-UNAM.



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.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres, Aquiles y Herlinda, por el amor y apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida. Tengo la fortuna de tenerlos a ambos y poder brindarles momentos de alegría a pesar de las dificultades de la vida misma.

A Sócrates y Perla, mi hermano y cuñada, con quienes hemos pasado muy buenos momentos y nos hemos convertido en un equipo en los últimos años, sacando adelante las diversas circunstancias que la vida nos presenta.

A mi compañera de vida, Brenda Vera Bautista, cuyo amor, compañía y buena influencia ha sido fundamental en los últimos tres años de mi vida y deseo que lo siga siendo en los años venideros.

Agradecimientos

A mi tutora, la Dra. Leonor Huerta Hernández, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por todo el tiempo invertido en mi formación, la confianza y la apertura a las propuestas que hicieron posible el presente trabajo.

A mi Comité Tutorial: Dr. José Iván Sánchez Betancourt, por ser un gran soporte académico y gran ser humano, lo cual fue fundamental para la realización de este trabajo. Al Dr. Luis Vaca Domínguez por sus excelentes observaciones y sugerencias durante la realización de éste mismo.

A los miembros del jurado: Dr. Edgar Zenteno, Dra. Leonor Huerta Hernández, Dr. José Iván Sánchez Betancourt, Dr. Francisco Ruiz Terán y Dr. René Segura Velázquez.

Al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo (LabNalCit), especialmente al QFB Carlos Castellanos Barba, por la capacitación para el adecuado uso del equipo de citometría de flujo.

Al Laboratorio de Alta Seguridad BSL-3, especialmente a la M. en C. Erika Segura Salinas, por la capacitación para el adecuado trabajo en el BSL-3 y cuyo apoyo fue fundamental para la replicación de los virus de influenza. Con tu apoyo y amistad el trabajo fluyó mucho mejor.

A mis compañeros de laboratorio en el IIB: Isabel Ruelas, David Martínez, Mirna Ruiz, Guillermo Gómez, Alejandra Silva y Karen Reyes. Contar con buenos compañeros y buenas personas es algo fundamental.

A mis compañeros en la FMVZ: Iván Ramos, Manuel Saavedra y María José Martínez, con quienes trabajé muy de cerca en este proyecto, además de ser muy buenos amigos.

'Como no estás experimentado en las cosas del mundo, todas las cosas que tienen algo de dificultad te parecen imposibles. Confía en el tiempo, que consigue dar dulces salidas a muchas amargas dificultades.'

DON QUIJOTE



Resumen

El ácido N-acetilneuramínico (Sia) es un monosacárido unido por enlace glicosídico α -2,3 o α -2,6 (Sia α -2,3 o Sia α -2,6) generalmente a la galactosa (Gal) el cual se expresa en glicoconjugados de tejidos animales y posee múltiples funciones biológicas, como por ejemplo ser una molécula receptora para la unión y entrada de virus de influenza. Por otro lado, la dexametasona (DEX) es un glucocorticoide (GC) ampliamente utilizado gracias a sus propiedades antiinflamatorias. Además, se ha demostrado en diversas líneas celulares que la DEX altera la sialilación α -2,3 y/o α -2,6 de éstas. Con el objeto de determinar alteraciones en la sialilación, en este trabajo se utilizaron lectinas específicas para Sia como *Sambucus nigra* y *Maackia amurensis*, y como control para Gal de estructuras desialidadas la lectina *Peanut agglutinin*, para la detección simultánea por citometría de flujo de residuos de Sia α -2,3, Sia α -2,6 y galactosil en células A549, línea celular de neomocitos tipo II humanos, así como en células MDCK y Vero, líneas celulares de origen animal las cuales son el modelo clásico para el estudio y replicación de los virus de influenza. Los resultados del presente trabajo confirman que la DEX inhibe aproximadamente en un 95%, 71% y 80% la expresión del Sia α -2,3 en las líneas celulares A549, MDCK y Vero, correspondientemente. Estas observaciones indican que la DEX puede ser utilizada para el estudio de mecanismos de sialilación de moléculas de la membrana celular. Además, la DEX podría cambiar el tropismo de los virus de influenza aviáres y humanos/cerdo y otros patógenos infecciosos de células epiteliales animales y humanos.

Abstract

N-acetylneuraminic acid (Sia) is a monosaccharide linked by α -2,3 or α -2,6 glycosidic bond (Sia α -2,3 or Sia α -2,6) generally to galactose (Gal) which it is expressed in glycoconjugates from animal tissues and has multiple biological functions, such as being a receptor molecule for the binding and entry of influenza viruses. On the other hand, dexamethasone (DEX) is a widely used glucocorticoid (GC) thanks to its anti-inflammatory properties. In addition, it has been shown in various cell lines that DEX alters their α -2,3 and/or α -2,6 sialylation. In order to determine alterations in sialylation, in this work specific lectins for Sia such as *Sambucus nigra* and *Maackia amurensis* were used, and as control for Gal of desialylated structures the lectin *Peanut agglutinin*, for the simultaneous detection by flow cytometry of residues of sialylation. Sia α -2,3, Sia α -2,6 and galactosyl in A549 cells, a human type II neomocyte cell line, as well as in MDCK and Vero cells, cell lines of animal origin which are the classic model for the study and replication of influenza viruses. The results of the present work confirm that DEX inhibits the expression of Sia α -2,3 in the cell lines A549, MDCK and Vero by approximately 95%, 71% and 80%, correspondingly. These observations indicate that DEX can be used to study sialylation mechanisms of cell membrane molecules. In addition, DEX could change the tropism of avian and human/swine influenza viruses and other infectious pathogens of animal and human epithelial cells.

Declaración

El autor de esta tesis otorga el consentimiento al Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que esta tesis se encuentre disponible para cualquier tipo de intercambio bibliotecario.

Onasis Vicente Fermín

Lista de cuadros y figuras

		Página
Figura 1	Tipos de enlace glicosídico en los ácidos siálicos	5
Figura 2	Interacción de los virus de influenza con diferentes conformaciones del ácido siálico	9
Figura 3	Células A549	19
Figura 4	Células MDCK.2	19
Figura 5	Células Vero	20
Tabla 1	Lectinas usadas en este estudio	21
Figura 6	Análisis por citometría de flujo de la expresión (A) Sia α -2,3 y Gal β 1-3NAc y (B) Sia α -2,6 y Gal β 1-3NAc en células A549 por unión de las lectinas MAAII, SNA y PNA.	24
Figura 7	Análisis por citometría de flujo de la expresión de Sia α -2,3 y Sia α -2,6 en células (A) A549, (B) Vero y (C) MDCK.	25
Figura 8	Efecto del tratamiento con dexametasona en la expresión de los Sia's α -2,3 y α -2,6 en células (A) A549, (B) Vero y (C) MDCK por unión de las lectinas MAAII y SNA.	26
Figura 9	Análisis bioinformático en la base de datos SugarBind Database mostrando la asociación entre patógenos y glicanos	27

Índice

CONTENIDO	Páginas
Dedicatoria.....	I
Agradecimientos.....	II
Resumen.....	V
Abstract.....	VI
Declaración.....	VI
Lista de figuras.....	VII
1. Introducción.....	1
1.1 Glicanos.....	1
1.2 Ácidos siálicos.....	2
1.3 Ácidos siálicos como receptores.....	8
1.4 La dexametasona induce la actividad de las glicosiltransferasas.....	10
2. Antecedentes.....	12
3. Justificación.....	15
4. Hipótesis.....	16
5. Objetivos general.....	17
5.1 Objetivos específicos.....	17
6. Materiales y Métodos.....	18
6.1 Líneas celulares.....	18
6.2 Lectinas.....	20
6.3 Tratamiento con dexametasona.....	21
6.4 Expresión de los ácidos siálicos α -2,3 y α -2,6 en la superficie celular por citometría de flujo.....	22
6.5 Análisis estadístico.....	23
7. Resultados.....	24
7.1 Determinación de la especificidad de las lectinas MAII y SNA en células A549.....	24
7.2 Determinación de la expresión de los ácidos siálicos α -2,3 y α -2,6 en células A549, Vero y MDCK.....	25
7.3 Efecto de la DEX en la expresión de los ácidos siálicos α -2,3 y α -2,6 en células A549, Vero y MDCK.....	26
7.4 Análisis bioinformático de adhesión de patógenos a los ácidos siálicos α -2,3 y α -2,6.....	27
8. Discusión.....	28
9. Conclusiones.....	32
10. Perspectivas.....	33
11. Referencias.....	34
12. Artículo publicado.....	38

1. *Introducción*

1.1 *Glicanos*

La glicobiología estudia la estructura, biosíntesis y biología de los glicanos, los cuales están ampliamente distribuidos en la naturaleza. La mayoría de los glicanos se encuentran en la superficie de las células, así como en macromoléculas secretadas de ellas y son notablemente diversas. Los glicanos también son abundantes en el núcleo celular y en el citoplasma, lugares donde ellos ejercen funciones reguladoras. De hecho, además de ser parte estructural importante de diversos glicoconjugados, los glicanos modulan una amplia variedad de funciones en condiciones fisiológicas y patofisiológicas. Además, las glicoproteínas y polisacáridos tienen funciones importantes en bacterias, así como en la biología de una amplia variedad de virus (Varki A, 2017).

Los glicoconjugados se forman por la adición de azúcares a proteínas y lípidos. Alrededor de 17 monosacáridos se han identificado en glicoconjugados de mamíferos, dentro de los cuales destaca el ácido siálico. Estos azúcares pueden estar combinados en los glicoconjugados creando una amplia variedad de estructuras únicas de glicanos modulando así la función de los glicoconjugados. Además, múltiples sitios enzimáticos, así como conjugaciones estereoquímicas α o β incrementan aún más la diversidad de los glicoconjugados. La glicosilación de proteínas incluye la adición de *N*-glicanos, *O*-glicanos, glicanos fosforilados, glicosaminoglicanos y glicosilfosfatidilinositol (GPI), anclados a residuos

de aminoácidos de proteínas. Por otro lado, los glicolípidos se forman por la adición de azúcares a los lípidos, un tipo de glicoconjugado que incluye a los glicoesfingolípidos (GLS). La glicosilación de proteínas y lípidos ocurre en el retículo endoplásmico (ER) y el aparato de Golgi, llevándose a cabo la mayor parte del procesamiento en los compartimentos *cis*, *medio* y *trans* del aparato de Golgi. En estos organelos, las glicosiltransferasas y glicosidasas forman estructuras de carbohidratos en una serie de pasos controlados por diversas condiciones como la accesibilidad de sustrato, actividad enzimática, transcripción de genes, así como la localización de las enzimas mencionadas en los organelos (Spiro RG, 2002; Gagneux P & Varki A, 1999).

1.2 Ácidos siálicos

La familia de los ácidos siálicos (Sia's) engloba un conjunto de monosacáridos de nueve carbonos que comprende alrededor de 40 miembros derivados del ácido neuramínico, los cuales pueden presentar diferentes sustituyentes en el grupo amino o hidroxilo (Schauer R & Kamerling JP, 1997; Schauer et al., 1995; Varki A. 1992). Dentro de las características estructurales de los Sia's es la presencia del grupo amino en el carbono 5 y el grupo carboxilo en la posición 1, los cuales le confieren una carga neta negativa a la molécula a pH fisiológico. Los Sia's se localizan en posición terminal o lateral de los oligosacáridos en glicoproteínas y glicolípidos. Debido a su posición terminal y a sus características fisicoquímicas, los Sia's participan en fenómenos de atracción y repulsión de cargas entre moléculas, desempeñan funciones como moduladores en el transporte de moléculas cargadas positivamente y

participan en interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular, así como también célula-patógenos tal como los virus de influenza, rubulavirus porcino, *Mycoplasma genitalium*, *Plasmodium falciparum* (Travig C & Schauer R, 1998).

Los Sia's pueden estar unidos en enlace α -2,3 o α -2,6 a residuos de galactosa (Gal), en enlace α -2,6 a residuos de N-acetil galactosamina (GalNAc) y en enlace α -2,8 a otro residuo de Sia. Los diferentes tipos de enlace que forman, así como la variabilidad que existe en la familia, da como resultado una gran diversidad de estructuras derivadas del Sia. La transferencia de Sia a los oligosacáridos se da a partir de un azúcar donador activado (CMP-NeuAc), y es catalizada por una familia de enzimas llamadas sialiltransferasas (ST's), estas enzimas se encuentran ancladas a la membrana de la red trans del aparato de Golgi. A la fecha, se conocen 20 ST's las cuales presentan diferencias en la afinidad por el sustrato que reconocen y se clasifican en función del tipo de enlace que forman (Harduin-Lepers A *et al.*, 2001; Schauer R & Kamerling JP, 2018).

La expresión de estructuras con Sia está regulada en espacio y tiempo, cambiando durante el desarrollo y la diferenciación. La presencia de una cierta estructura en un momento particular es el resultado del balance total entre las actividades de ST's y de sialidasas (neuraminidasas, Neu), así como de la competencia con otras glicosiltransferasas en el aparato de Golgi en donde se lleva a cabo este proceso (Harduin-Lepers A *et al.*, 2001).

Las estructuras sialiladas se expresan de manera específica para cada tejido y están regulados en diferentes fenómenos celulares como son la activación y la diferenciación celular. Por ejemplo, la presencia de Sia en enlace α -2,8 se restringe principalmente a ciertas etapas del desarrollo embrionario en donde las estructuras conocidas como ácido polisiálico (PSA) presentes en las moléculas de adhesión neural (N-CAM) funcionan como antígenos reguladores del desarrollo del sistema nervioso central (SNC). Durante la formación de moléculas de PSA, se adiciona inicialmente un residuo de ácido siálico en conformación α -2,3, posteriormente la molécula se alarga con la adición de Sia en conformación α -2,8. El PSA puede contener de 8 a 200 residuos de Sia (Haltiwanger RS, 2002).

El Sia en enlace α -2,3 se puede encontrar unido a residuos de Gal en cadenas tipo 1: Gal β -1,3-GlcNAc y tipo 2: Gal β -1,4-GlcNAc de los glicoconjugados, y está presente en muchos tipos celulares y quizá en todos los tejidos en vertebrados. En humanos la expresión de cadenas tipo 1 está restringida principalmente a los epitelios (López-Morales D & Vallejo V, 2007; Lowe JB, 1999).

El Sia en enlace α -2,6 se presenta sobre terminales de Gal o GalNAc, las estructuras formadas por la adición de Sia sobre GalNAc, incluyen a algunos de los antígenos Thomsen-Freidenreich como son: el sialil-Tn, y sialil-T, los cuales a menudo se han asociado con el grado de progresión tumoral. El Sia α -2,6 sobre Gal forma el antígeno α -2,6-sialil-lactosamina (Neu5Ac α -2,6-Gal β 1,4GlcNAc), el cual se observa frecuentemente en estructuras de N-glicanos ramificados, ya que son portadores del

disacárido Gal- β 1,4-GlcNAc (lactosamina o cadenas tipo 2) aunque también puede estar presente en *O*-glicanos y en glicolípidos (López-Morales D & Vallejo V, 2007).

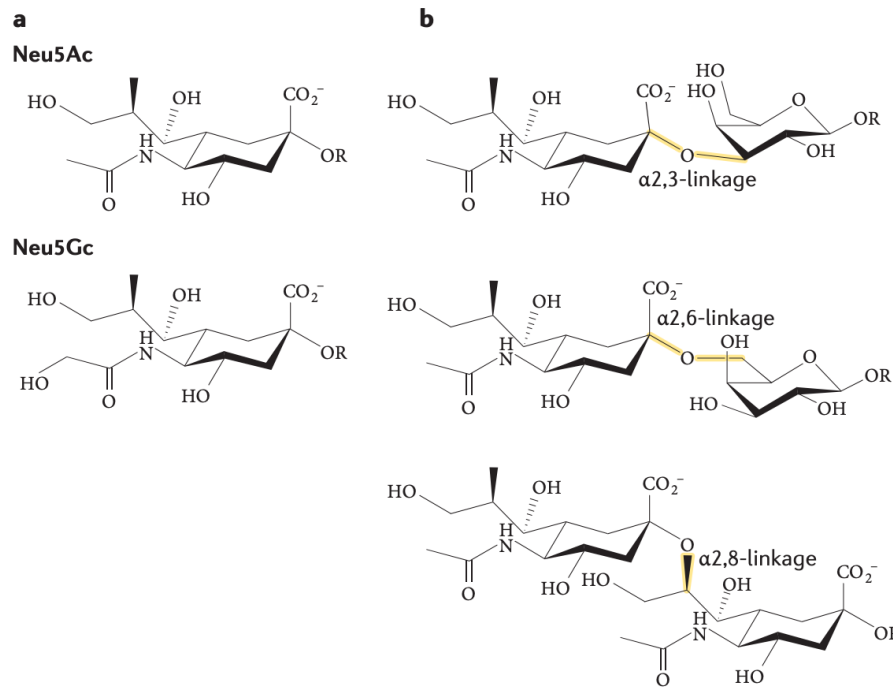


Figura 1. Tipos de enlace glicosídico en los ácidos siálicos (Sia's). (a) y (b) Los Sia's son parte de las cadenas de carbohidratos de glicoproteínas y glicolípidos vía diferentes tipos de enlaces glicosídicos. Los tipos de enlaces más comunes son el α -2,3 unido a un residuo de galactosa, el α -2,6 unido también a un residuo de galactosa (Gal) o de N-acetilgalactosamina (GalNAc) y el α -2,8 unido a otro Sia en un glicano. Modificado de Stencel-Baerenwald *et al.*, 2014.

Dentro de los fenómenos celulares en los que participa el Sia se encuentra la extravasación de leucocitos activados a sitios de inflamación o el reclutamiento de los mismos a órganos linfoides secundarios, en donde los antígenos sialil Lewis median el reconocimiento a través de moléculas de adhesión de la familia de las selectinas. El Sia también modula interacciones moleculares a través del enmascaramiento de la Gal, evitando así el reconocimiento por galectinas, las cuales son una familia de lectinas de unión a Gal que participan en una variedad de procesos que incluyen interacciones célula-célula y célula-

matriz extracelular (MEC). Se sabe que la galectina-1 y la galectina-9 inducen apoptosis en células T activadas y se ha propuesto a la galectina-1 como inmunosupresor en padecimientos autoinmunes (Leffler H, 2001). También se ha documentado la participación del antígeno α -2,6-sialil-lactosamina en fenómenos de regulación del sistema inmune, por ejemplo, el antígeno CDw75 el cual está formado por la estructura α -2,6-sialil-lactosamina, se expresa durante la maduración de las células B en etapa de Ig+ y su expresión cesa con la diferenciación terminal a células plasmáticas. Estos son algunos ejemplos de cómo los Sia's modulan diversos fenómenos celulares, de manera que la adición y la remoción de ácido siálico son fenómenos altamente regulados y la alteración en la síntesis de estructuras sialiladas está asociada con el desarrollo de enfermedades entre las que podemos mencionar al cáncer (López-Morales D & Vallejo V, 2007).

En humanos la ST6Gal I se transcribe a partir del gen SIAT1 el cual reside en el cromosoma 3 (q21-q28) y está compuesto por varios exones de los cuales se producen diferentes transcritos (isoformas de ARNm) resultado del uso de diferentes promotores y por empalme alternativo. La importancia de los ARNm's que se transcriben a partir del gen es que difieren solamente en la región 5' no traducible lo que permite un mecanismo de regulación complejo, ya que se expresan a diferentes niveles según el tipo celular o bien en función de procesos de diferenciación o activación celular (López-Morales D & Vallejo V, 2007).

De los diferentes transcritos que se producen a partir del gen SIAT1, los mejores caracterizados son: la forma denominada YZ que parece corresponder a la expresión constitutiva del gen, ya que se ha detectado a niveles basales en la mayoría de los tejidos, a diferencia de la forma X cuya expresión se ha reportado solamente en células B maduras y la forma H que se expresa abundantemente en hígado. La transcripción de estos mensajeros se lleva a cabo por el promotor P1 para la forma H, P2 para la forma YZ y P3 para la forma X (López-Morales D & Vallejo V, 2007).

Aunque el incremento en la expresión del ARNm de la ST6Gal I se ha reportado en diferentes tipos de cáncer, no se conocen los mecanismos moleculares que ocasionan el aumento en la expresión del gen SIAT1. Recientemente se ha reportado que en hepatocarcinoma y en cáncer cervicouterino se acumula la isoforma H del ARNm, lo que sugiere que algunas de las vías de señalización que regulan la expresión de esta isoforma están alteradas en cáncer (López-Morales D & Vallejo V, 2007).

En líneas celulares de hepatocarcinoma se ha demostrado que los factores de transcripción HNF-1 (del inglés, Hepatocyte Nuclear Factor-1), DBP (del inglés, D site binding protein) y LAP (del inglés, liver-enriched transcriptional activation protein), específicos de hígado regulan la transcripción de la forma H y recientemente se demostró en líneas celulares de adenocarcinoma de colon que la mutación del sitio HNF-1 ubicado entre -156 a -1 en el promotor P1, reduce la actividad del promotor en un 80%, por lo que se propone que este sitio es importante para la acumulación de la forma H (forma hepática) en cáncer

de colon. Sin embargo, no se ha estudiado la regulación de la expresión de la forma hepática en otros tipos de cáncer y no se sabe si está relacionada con alguna vía de señalización que se encuentre alterada en cáncer (López-Morales D & Vallejo V, 2007; Xu L *et al.*, 2003).

1.3 Ácidos siálicos como receptores

El receptor primario de los virus de influenza tipo A (VIA) es el Sia, y este receptor es reconocido y se une a la hemaglutinina (HA), proteína de la membrana viral (Palese & Shaw, 2007). El Sia es el residuo distal en las cadenas de *N*- u *O*-oligosacáridos de glicoproteínas y glicolípidos. Casi siempre el Sia está enlazado a la Gal en conformación α -2,3 o α -2,6. El tipo de enlace y las consecuencias estructurales resultantes definen qué tan bien el VIA se une a su receptor. La HA es una proteína multifuncional que media la adhesión y fusión de los VIA. Actualmente se reconocen 18 diferentes subtipos de HA, de los cuales 16 circulan en aves acuáticas y dos (H17 y H18) han sido aislados en murciélago (Tong *et al.*, 2012, 2013). Cabe señalar que las H17 y H18 no usan al Sia como receptor; el receptor de estos virus aún no se conoce (Sun *et al.*, 2013; Tong *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013). La HA se expresa en forma de homotrímero; la región de tallo se caracteriza por ser glicosilada y tener una corta secuencia hidrofóbica la cual permite su localización en la membrana viral (Skehel & Wiley, 2000). Por otro lado, la cabeza globular también es glicosilada pero el tipo y patrón de glicosilación es altamente variable en diferentes subtipos de HA. La cabeza globular de la HA posee la región de unión al receptor (RBP, por sus siglas en inglés, repector binding pocket) la cual está localizada en el extremo distal de este complejo proteínico y es altamente conservado entre

los diferentes subtipos de HA. Mutaciones en la región RBP o próximas a ésta pueden alterar drásticamente la especificidad de unión al receptor de la HA (Connor *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010). Ahora bien, el Sia ocupa completamente el RBP y es el principal punto de contacto entre el virus y la célula (Weis *et al.*, 1988). Se propone que la interacción entre el Sia y la HA es de baja afinidad por lo que múltiples moléculas de HA deben interactuar con moléculas de Sia, resultando en una interacción fuerte que permite la adhesión a la membrana celular de la célula (Sauter *et al.*, 1989).

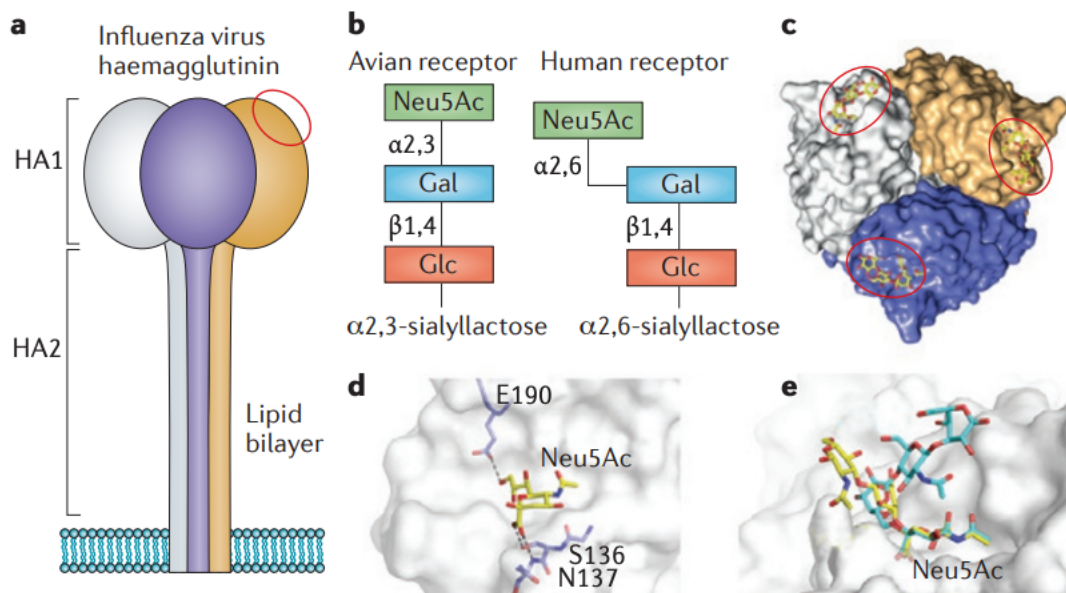


Figura 2. Interacción de los virus de influenza con diferentes conformaciones del ácido siálico (Sia). (a) Representación esquemática de la hemaglutinina (HA) trimérica del virus de la influenza, con los monómeros representados en gris, morado y anaranjado. La HA es una proteína transmembranal compuesta del dominio globular HA1 y el dominio de tallo HA2. Cada dominio HA1 en el trímero se une al Sia (Neu5Ac). El sitio de unión del HA1 al Sia está indicado por un círculo rojo. (b) Virus de influenza aviáres se unen preferencialmente al Sia α 2,3, mientras que los humanos/porcinos se unen preferencialmente al Sia α -2,6. (c) Representación de la interacción de la HA en complejo con el Sia. Los círculos rojos representan los sitios de unión al Sia. (d) Sitio de unión de la HA con el Sia. Los residuos S136, N137 y E190 son cruciales para la interacción con el Sia (amarillo). (e) Superposición de una HA de un virus de influenza aviar unido al Sia α -2,3 y Sia α -2,6. El Sia α -2,3 generalmente tiene conformación lineal, mientras que el Sia α -2,6 es más flexible y tiene una topología tipo sombrilla. Modificado de Stencel-Baerenwald *et al.*, 2014.

1.4 La dexametasona induce actividad de las glicosiltransferasas

Los glucocorticoides (GC's) son hormonas de la familia de los corticosteroides que pueden influenciar la estructura, así como la función de una amplia variedad de tipos celulares incluyendo células epiteliales del intestino delgado y grueso. Por ejemplo, estas hormonas han mostrado afectar el fluido intestinal, la absorción de electrolitos y nutrientes, la maduración de células epiteliales y la actividad de ciertas enzimas asociadas a la membrana plasmática. Los GC's atraviesan la membrana celular, por su composición lipofílica, y se unen al receptor de GC's en el citoplasma. Una vez activado, se reconocen dos vías en el mecanismo de acción: genómica y no genómica (Coutinho AE & Chapman KE, 2011; Rodríguez-González M & Espinosa-Rosales F, 2016).

En el mecanismo genómico, el receptor de GC's sufre un cambio conformacional, se activa y traslada al núcleo donde activa o inactiva la transcripción de genes por medio de factores de transcripción de respuesta al GC. Los efectos antiinflamatorios se deben a este mecanismo genómico de 'trans-represión', donde el represor de GC's unido a su ligando interfiere con la activación de factores de transcripción, producción de citocinas proinflamatorias y factores para producción leucocitaria. Este mecanismo tarda de horas a días en presentarse (Coutinho AE & Chapman KE, 2011; Rodríguez-González M & Espinosa-Rosales F, 2016).

Los mecanismos no genómicos son inmediatos (segundos a minutos), resultado de interacciones físico-químicas. Se deben a la activación de cascadas de señalización intracelular mediadas por cinasas con efecto antiinflamatorio. Dentro de los efectos reconocidos se encuentran la interferencia con el metabolismo del ácido araquidónico, la inducción de apoptosis y disminución de maduración leucocitaria. También se reconocen efectos directos evitando la activación del endotelio vascular (Coutinho AE & Chapman KE, 2011; Rodríguez-González M & Espinosa-Rosales F, 2016).

2. Antecedentes

Dudeja *et al.*, 1988, examinaron el efecto de la administración subcutánea de la DEX (100 $\mu\text{g}/\text{día}$) en la composición y fluidez lipídica, así como en la actividad de las glicosiltransferasas en la membrana del aparato de Golgi de células del intestino delgado. Los resultados de dicha investigación demostraron que en la membrana del aparato de Golgi de animales tratados con la DEX había una alta fluidez lipídica comparada con el control. La diferencia en fluidez lipídica parece ser, al menos en parte, al alto grado de insaturación de ácidos grasos en las membranas de los animales tratados con la DEX. Aunado a los cambios en la composición y fluidez de la membrana, la actividad de ciertas glicosiltransferasas del aparato de Golgi también fue alterada por el tratamiento con la DEX. Se desconoce el mecanismo a través del cual la DEX induce alteraciones en la actividad de las glicosiltransferasas (Dudeja *et al.*, 1988).

Posteriormente Matrosovich *et al.*, 2003, generaron una variante de células MDCK transfectadas de forma estable con la SIAT1, glicosiltransferasa que une el Sia α 2,6 a las cadenas de glicanos. Estas células expresaron una mayor cantidad de Sia α 2,6 e, inversamente, menor cantidad de Sia α 2,3 comparado con las células MDCK control. Posterior a la transfección, la unión de VI fue incrementada mientras que una variante adaptada a replicarse en embrión de pollo específica al Sia α 2,3 se decrementó (Matrosovich *et al.*, 2003).

Por otro lado, Mádi *et al.*, 2011, exploraron el efecto de la DEX en el fenotipo y función de macrófagos derivados de monocitos. Estas células son especialistas en rodear, destruir y fagocitar células muertas, así como estimular la función neutrofílica. Se sabe que glicoproteínas de membrana podrían participar en el reconocimiento y fagocitosis de células apoptóticas (Wyllie AH *et al.*, 1980); sin embargo, el conocimiento era limitado respecto a la función de las estructuras glicosídicas en este proceso. Este grupo de investigación reportó que el tratamiento con DEX altera la sialilación de las proteínas de membrana de macrófagos humanos, particularmente en las proteínas anexina-II y HLA-II, lo cual dejó en evidencia que este fenotipo, al menos en parte, podría ser responsable del incremento de la función fagocítica de neutrófilos apoptóticos por estimulación con DEX de macrófagos derivados de monocitos (Mádi A *et al.*, 2011).

Por otro lado, Takenouchi *et al.*, 2021, establecieron una línea celular de macrófagos porcinos derivados de riñón (IPKM, por sus siglas en inglés, immortalized porcine kidney-derived macrophages). Esta línea celular fue caracterizada y se determinó que el receptor para el complejo hemoglobina-haptoglobina, CD163, utilizado como marcador fenotípico de macrófagos M2 anti inflamatorios, mejora su expresión notablemente por la DEX. Además, CD163 es considerado el receptor canónico para virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés, porcine reproductive and respiratory syndrome virus). Se determinó además que la vía de señalización de la MAPK p38 está implicada en la señalización mediada por la DEX. Al evaluar la replicación del PRRSV en IPKM pretratadas con la DEX se determinó que ésta no afecta la propagación del virus, por lo que

la mejoría en la expresión de CD163 no es suficiente para facilitar la infección de PRRSV en IPKM (Takenouchi T *et al.*, 2021).

3. Justificación

La expresión de los ácidos siálicos en los diversos glicoconjugados de la membrana celular es un proceso de gran importancia en biología celular y altamente complejo y regulado tanto en espacio como en tiempo. La presencia de una determinada estructura sialidada en un momento determinado es el resultado del balance entre diversos factores como lo son las actividades de las sialiltransferasas y sialidasas, así como de la competencia con otras glicosiltransferasas en el aparato de Golgi en donde se lleva a cabo el proceso. Por tanto, conocer los mecanismos que regulan la expresión de estructuras sialidadas y su papel en las funciones celulares proporcionaría las bases para entender diversas patologías en donde dicha expresión está alterada.

4. Hipótesis

La dexametasona alterará la sialilación α -2,3 y α -2,6 en las líneas celulares de origen epitelial A549, MDCK y Vero.

5. Objetivo general

Evaluar el efecto de la dexametasona en la sialilación α -2,3 y α -2,6 en las líneas celulares epiteliales A549, MDCK y Vero.

5.1 Objetivos específicos

1. Estandarizar el método de detección de los ácidos siálicos α -2,3 y α -2,6 en la superficie celular por citometría de flujo.
2. Determinar la presencia de los ácidos siálicos α -2,3 y α -2,6 en células A549, MDCK y Vero.
3. Analizar la sialilación α -2,3 y α -2,6 post tratamiento con dexametasona.

6. Materiales y Métodos

6.1 Líneas celulares

Para llevar a cabo la identificación del Sia α 2,3 y Sia α 2,6 se utilizó como modelo experimental las líneas celulares A549 (CCL-185™), MDCK.2 (CRL-2936™) y Vero (CCL-81™) obtenida del ATCC (por sus siglas en inglés, American Type Culture Collection), para todos los experimentos. Las células A549 (Fig.3), provenientes de tejido epitelial pulmonar humano, y clasificadas comúnmente como células epiteliales escamosas del epitelio alveolar basal, fueron cultivadas en medio F12K (por sus siglas en inglés, F12 Ham Kaighn's modification) (ATCC, 30-2004) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (By Productos; Guadalajara, Jalisco, México). Por otro lado, las células MDCK.2 (fig.4) y Vero (fig.5), provenientes de tejido epitelial de riñón de perro (*Canis familiaris*) y tejido epitelial de riñón de mono verde (*Cercopithecus aethiops*), respectivamente, fueron cultivadas en medio EMEM (por sus siglas en inglés, Eagle's Minimum Essential Medium) (ATCC, 30-2003) suplementado con 10% de SFB. Todas las líneas celulares fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células Vero fueron donadas por la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM). Para llevar a cabo el subcultivo de las células éstas fueron lavadas dos veces con PBS (por sus siglas en inglés, Phosphate-Buffered Saline) y tratadas con 2 ml de tripsina-EDTA al 0.25% (Gibco, Gaithersburg, MD) por 10 min a 37°C. La tripsina fue inactivada adicionando 2 ml de medio de cultivo suplementado con 10% SFB. Enseguida las células fueron transferidas a tubos de

15 ml, lavadas con 2 ml de PBS, resuspendidas en su respectivo medio de cultivo, e incubadas a 37°C y CO₂ al 5%.

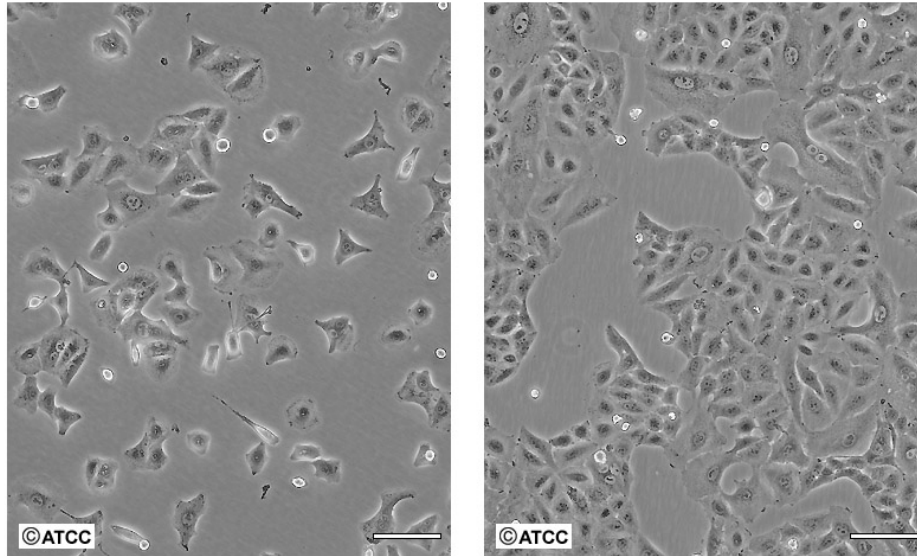


Fig.3. Células A549. Morfología de las células A549, provenientes de adenocarcinoma pulmonar humano, las cuales son epiteliales y adherentes. Se muestra un cultivo de baja (izquierda) y alta (derecha) densidad. Tomada de www.atcc.org.

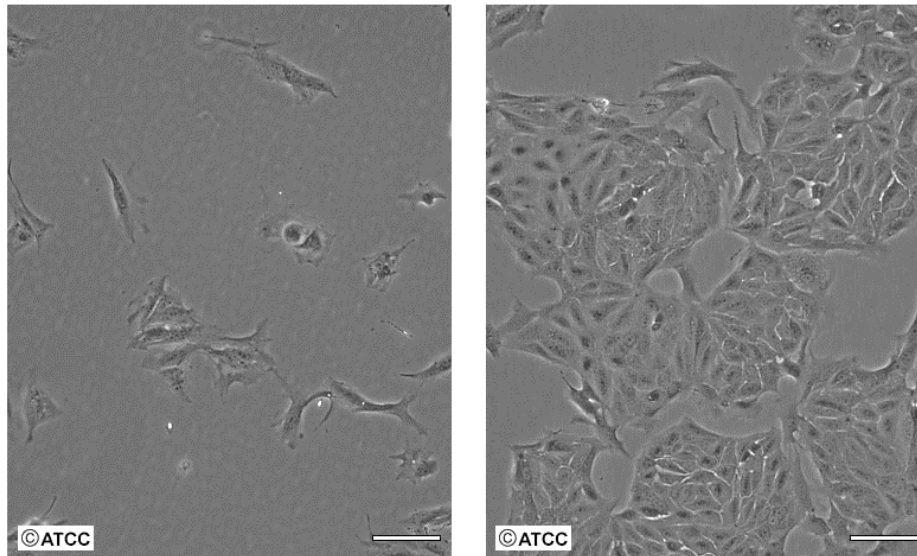


Fig.4. Células MDCK.2. Morfología de las células MDCK.2, provenientes de riñón canino, las cuales presentan morfología epitelial típica y son adherentes. Se muestra un cultivo de baja (izquierda) y alta (derecha) densidad. Tomada de www.atcc.org.

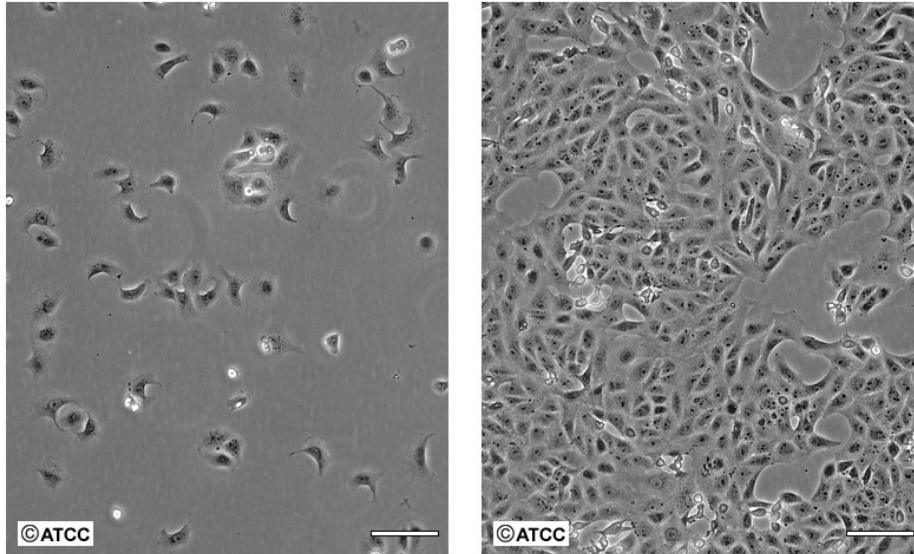


Fig.5. Células Vero. Morfología de las células Vero, provenientes de riñón de mono, las cuales presentan morfología epitelial típica y son adherentes. Se muestra un cultivo de baja (izquierda) y alta (derecha) densidad. Tomada de www.atcc.org.

6.2 Lectinas

Para evaluar la presencia del Sia α 2,3 y Sia α 2,6 en la superficie de las líneas celulares ya mencionadas se hizo uso de lectinas comerciales (Tabla 1), proteínas de origen vegetal que se unen a azúcares con una elevada especificidad para cada tipo distinto. Los marcajes fluorescentes se realizaron con la lectina *Maackia amurensis* (MAL II) (Vector, B-1265), la cual reconoce con alta especificidad el Sia α 2,3. Por otro lado, se utilizó la lectina *Sambucus nigra* (SNA) (Vector, FL-1301), la cual reconoce con alta especificidad el Sia α 2,6. Además, como controles de especificidad de unión de las lectinas ya mencionadas se hizo uso de una enzima con actividad de neuraminidasa (Neu) (sialidasa) de *Clostridium perfringens* (Sigma, N2876) la cual remueve ácido siálico α 2,3 \rightarrow α 2,6 \rightarrow α 2,8, así como del uso de la lectina *Arachis hypogaea* (PNA) (cacahuete) (Sigma, L7381; Vector, B-1075), la cual reconoce con alta

especificidad la galactosa, azúcar previo al ácido siálico presente en glicoproteínas y glicolípidos. Antes de llevar a cabo los experimentos para la identificación de Sia α 2,3 y Sia α 2,6 por citometría de flujo se realizó la titulación de cada una de las lectinas en todas líneas celulares, estandarizando el uso de éstas a una dilución 1:100, concentración suficiente para tener señal de emisión en el citómetro de flujo. Además, también se tituló la Neu de la cual se obtuvo su máxima actividad a una concentración de 6.1 U/ml.

Lectinas	Fluorocromo conjugado	Color de la señal	Residuo sialidado	Fabricante
<i>Maackia amurensis II</i>	Biotin/PE-estreptavidina	Rojo	Sia α 2,3	Vector
<i>Sambucus nigra</i>	FITC	Verde	Sia α 2,6	Vector
<i>Peanut agglutinin</i>	Biotin/PE-estreptavidina	Rojo	Gal β 1-3GalNAc	Vector
<i>Peanut agglutinin</i>	FITC	Verde	Gal β 1-3GalNAc	Sigma-Aldrich

Tabla 1. Lectinas usadas en este estudio.

6.3 Tratamiento con dexametasona

Las células A549, MDCK.2 y Vero cultivadas en fase logarítmica fueron despegadas con tripsina y colectadas para ser procesadas. Una vez realizada la inactivación de la tripsina y el lavado de las células, éstas fueron resuspendidas en PBS y distribuidas en microtubos de 1.6 ml a una concentración de $5 \times 10^6 / 50\mu\text{l}$. Posteriormente las células fueron tratadas con 20 μM de fosfato de dexametasona (DEX) (Alin; Chinoin, México) en su respectivo medio de cultivo, sin suero, e incubadas a 37°C con 5% de CO₂. Después de 12 h, las células fueron lavadas con PBS, teñidas, y procesadas para el análisis de la expresión de los Sia's por citometría de flujo.

6.4 Expresión de los ácidos siálicos α -2,3 y α -2,6 en la superficie celular por citometría de flujo.

Para llevar a cabo los experimentos en las líneas celulares, éstas fueron cultivadas en botellas de 25 cm² (Corning), las cuales se desprendieron por efecto enzimático con tripsina-EDTA (Gibco) – 0.05% para MDCK y 0.25% para A549 y Vero – por 10 y 5 minutos, respectivamente, en incubación a 37°C. Posteriormente las células se contaron en una cámara de Neubauer, y se utilizaron 1 X 10⁵ células en 50 μ l de PBS 1X en tubos de 1.6 ml. Después se lavaron las células en una ocasión con 1 ml de buffer PBS 1X y se centrifugaron a 130 g's por 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Se descartó el sobrenadante (sn) y se incubaron con la Neu por 1 hora a 37°C. Se les dio otro lavado a las células y se incubaron con 100 μ l de la primera lectina, SNA o MAL II según sea el caso, a una dilución 1:100 en PBS sin Mg²⁺/Ca²⁺ durante 30 min a 4°C protegidas de la exposición de la luz. Después se lavaron y centrifugaron las células y se incubaron con la lectina PNA en las mismas condiciones. En el caso de las lectinas biotiniladas éstas además se incubaron con estreptavidina acoplada a FITC o PE, según sea el caso, en las condiciones ya mencionadas. Se realizó otro lavado con PBS y se resuspendió el botón celular en 500 μ l de buffer PBS. Finalmente, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo y se utilizó el láser azul para detectar la expresión de los Sia's. Para llevar a cabo la inhibición de unión de las lectinas a las células por galactosa o fetuina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), la solución de trabajo fue preparada en galactosa 100 mM o fetuina 0.1 mM en PBS. Así, 35 μ l de solución de trabajo fue añadida a las células, se resuspendieron en ésta, y se incubaron 60 min a 4°C.

6.5 Análisis estadístico

El análisis de la expresión de los Sia's se llevó a cabo en la Unidad Nacional de Citometría de Flujo (LABNACIT, UNAM) utilizando el equipo Attune (Applied Biosystems) y el programa de análisis FlowJo (BD Biosciences) versión 10. Se capturaron 10,000 eventos para cada condición, se utilizaron células marcadas con un solo color para ajustar los parámetros iniciales del citómetro de flujo y se obtuvo la media geométrica de la intensidad media de fluorescencia para todos los casos. Los resultados fueron colectados y las diferencias entre grupos fueron analizadas por significancia por ANOVA ($p < 0.05$) o prueba T Student ($p < 0.05$) usando el programa Prism GraphPad versión 9.0 (GraphPad Software Inc.; San Diego, CA, USA).

7. Resultados

7.1 Determinación de la especificidad de las lectinas MAAII y SNA en células A549

La determinación de la especificidad de los Sia's se llevó a cabo en células A549 las cuales fueron teñidas con las lectinas MAAII, SNA y PNA, según se muestra en la Fig.6. Se realizaron experimentos de tinción por triplicado y se procesaron las muestras para ser analizadas por citometría de flujo. Los resultados muestran la detección de MAAII por Sia α -2,3, SNA por Sia α -2,6 y de PNA por Gal β 1-3GalNAc en las células A549.

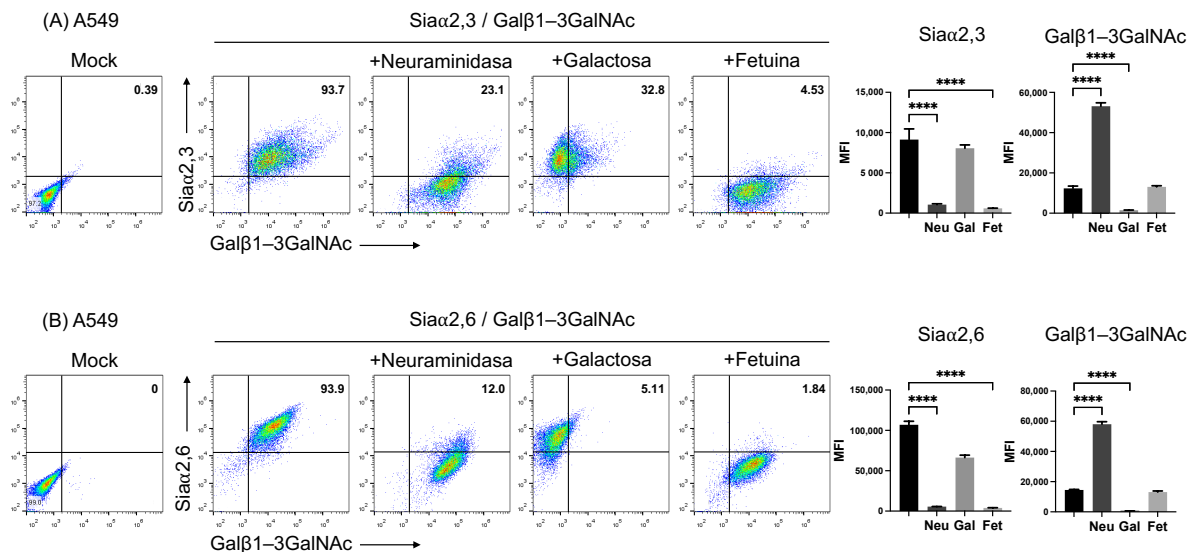


Fig.6. Análisis por citometría de flujo de la presencia de (A) Sia α -2,3 y Gal β 1-3GalNAc y (B) Sia α -2,6 y Gal β 1-3GalNAc en células A549 por unión de las lectinas MAAII, SNA y PNA. Se muestra el efecto del tratamiento de la superficie celular con neuraminidasa (Neu), la inhibición de la unión de la lectina PNA con galactosa (Gal), así como la absorción de las lectinas con la fetuina (Fet). El porcentaje de células positivas se muestra en el cuadrante superior derecho de cada dot plot. En el panel derecho se muestra la intensidad media de fluorescencia (MFI) de un experimento por triplicado representativo. Las diferencias significativas están representadas con asteriscos (**** p < 0.0001, por ANOVA de una vía).

7.2 Determinación de la expresión de los ácidos siálicos α -2,3 y α -2,6 en células A549, Vero y MDCK

Una vez determinada la especificidad de las lectinas se analizó la expresión de los Sia's en las tres líneas celulares. Se realizaron experimentos de tinción por triplicado y se procesaron las muestras para ser analizadas por citometría de flujo. El análisis de la MFI muestra que las células A549, Vero y MDCK son dobles positivas a la tinción con las lectinas MAAII y SNA, lo que indica que las tres líneas celulares expresan los Sia's α -2,3 y α -2,6 (Fig.7)

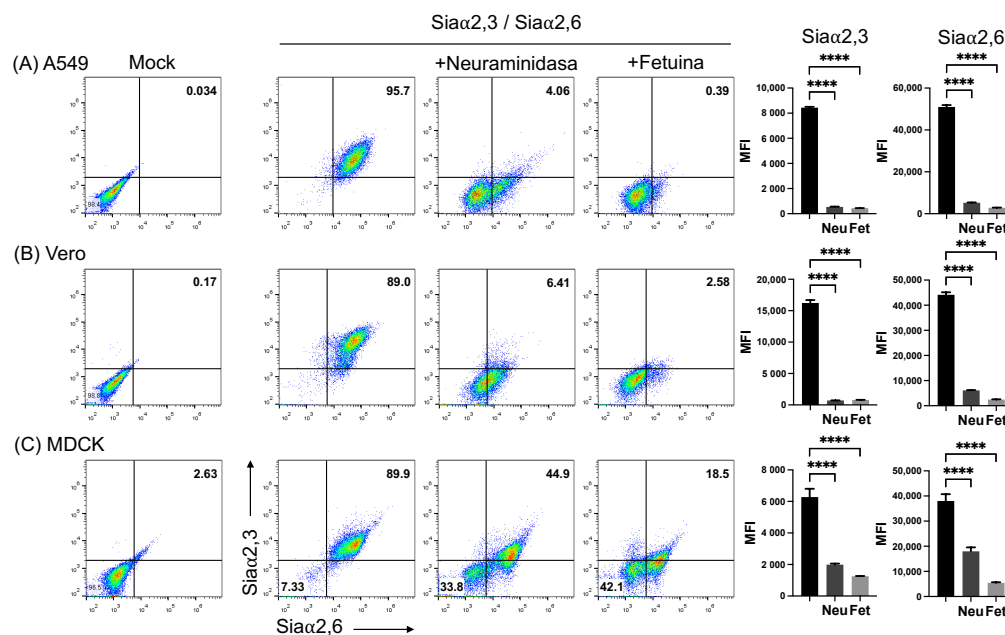


Fig.7. Análisis por citometría de flujo de la presencia de Sia α -2,3 y Sia α -2,6 en células (A) A549, (B) Vero y (C) MDCK por unión de las lectinas MAAII y SNA. Se muestra el efecto del tratamiento de la superficie celular con neuraminidasa (Neu) así como la absorción de las lectinas con la fetuina (Fet). El porcentaje de células positivas se muestra en el cuadrante superior derecho de cada dot plot. En el panel derecho se muestra la intensidad media de fluorescencia (MFI) de un experimento por triplicado representativo. Las diferencias significativas están representadas con asteriscos (**** $p < 0.0001$, por ANOVA de una vía).

7.3 Efecto de la DEX en la expresión de los ácidos siálicos α -2,3 y α -2,6 en células A549, Vero y MDCK

Una vez demostrada la expresión de los Sia's α -2,3 y α -2,6 en las tres líneas celulares se analizó el efecto de la dexametasona en la expresión de éstos. El análisis de la MFI muestra que la DEX reduce significativamente la expresión del Sia α -2,3 en un 95%, 80% y 71%, mientras que incrementa la expresión del Sia α -2,6 aproximadamente en un 1.25%, 20% y 155% en las líneas celulares A549, Vero y MDCK, correspondientemente (Fig.8).

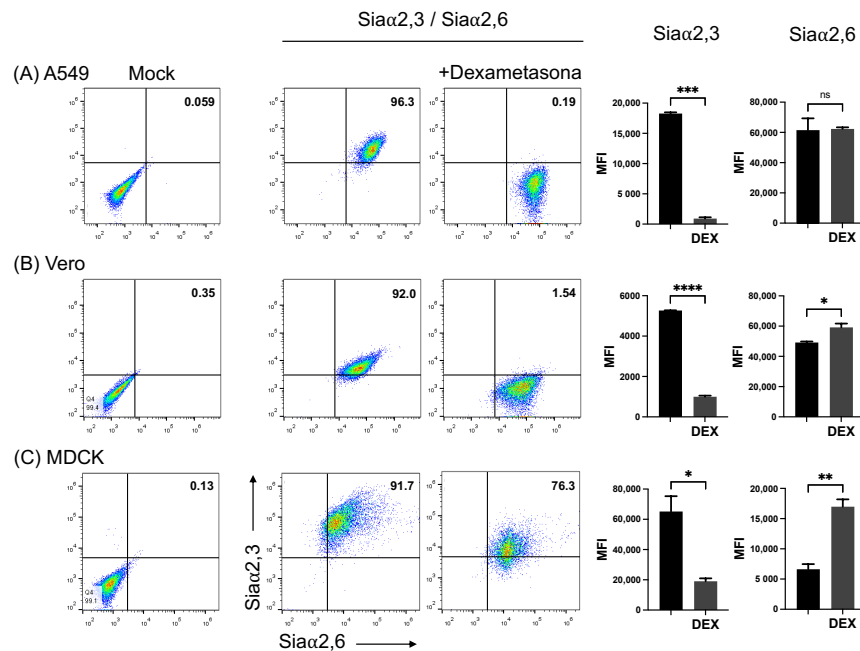


Fig.8. Efecto del tratamiento con dexametasona en la expresión de los Sia's α -2,3 y α -2,6 en células (A) A549, (B) Vero y (C) MDCK por unión de las lectinas MAAII y SNA. Se muestra el efecto del tratamiento de las células con dexametasona (DEX). El porcentaje de células positivas se muestra en el cuadrante superior derecho de cada dot plot. En el panel derecho se muestra la intensidad media de fluorescencia (MFI) de un experimento por triplicado representativo. Las diferencias significativas están representadas con asteriscos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, por ANOVA de una vía).

7.4 Análisis bioinformático de adhesión de patógenos a los ácidos siálicos α -2,3 y α -2,6

El análisis bioinformático de adhesión de patógenos a secuencias de carbohidratos se llevó a cabo en el SugarBind Database. El análisis muestra que el NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc, el trisacárido reconocido por MAAII, es reconocido principalmente por el subtipo H1 de VI. Por otro lado, el NeuAc(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc, el trisacárido reconocido por SNA, es reconocido por varios subtipos de VI como el H1, H3, H7 y H9, así como por *Toxoplasma gondii* (Fig.9)

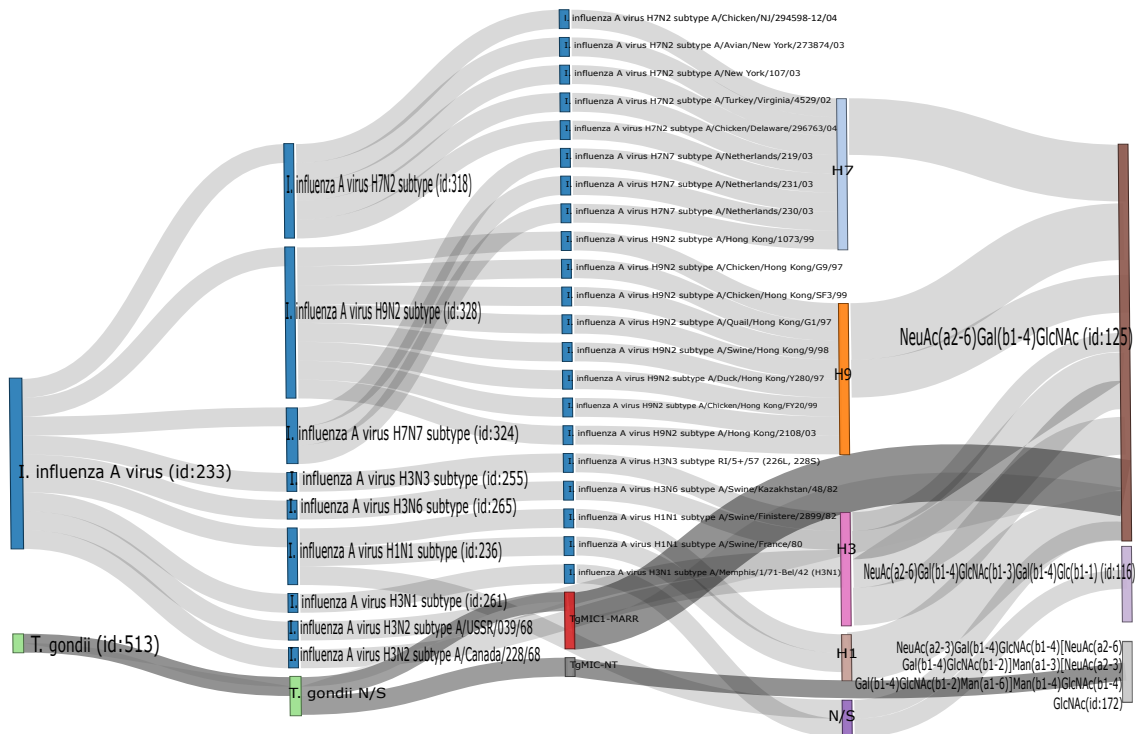


Fig.9. Análisis bioinformático en la base de datos SugarBind Database mostrando la asociación entre patógenos y glicanos.

8. *Discusión*

Los Sia's son una familia de monosacáridos la cual está comprendida por alrededor de 50 derivados del ácido neuramínico, lo cuales están ampliamente distribuidos en la naturaleza como azúcares terminales de oligosacáridos en diversas proteínas y lípidos. Los Sia's están unidos a la galactosa en una conformación α -2,3 o α -2,6 o unido a la galactosamina o a la *N*-acetilgalactosamina en enlace α -2,6 (Harduin L *et al.*, 2001). Existen algunos métodos para identificar los residuos de Sia's en células y tejidos, tales como la histoquímica, sin embargo, en el presente trabajo se muestra que la citometría de flujo el análisis simultáneo de la unión de las lectinas MAAII y SNA en tres de las líneas celulares más utilizadas para la investigación de virus tales como los virus de la influenza. Sumado a ello, la exposición de los residuos *O*-galactósidos después del tratamiento con la Neu también fue detectada en las mismas células, la cual redujo significativamente la unión de las lectinas MAAII y SNA. Los niveles de la MFI de fondo, después del tratamiento con la Neu y la Fet, son bajos, confirmando así la especificidad del método utilizado en el presente trabajo.

El análisis de expresión de Sia α -2,3 y Sia α -2,6 en las células MDCK.2 permitió observar la presencia de dos subpoblaciones las cuales difieren en sensibilidad al tratamiento con la Neu de *C. perfringens*. La heterogeneidad de las células MDCK parentales (CCL-34) fue descrita previamente, mostrando que clones de esta línea celular difieren en su capacidad para ser infectadas y replicar virus de influenza A y B y también en el requerimiento de tripsina para favorecer dichos procesos (Harduin L *et al.*, 2001). Las células usadas en el

presente trabajo pertenecen específicamente a la clona MDCK.2, y nuestros resultados indican que esta clona también es heterogénea en sí misma. Dicha heterogeneidad debe ser considerada para la interpretación de resultados obtenidos en investigación con virus de influenza y toxoplasmosis.

Previo a este trabajo se había reportado que la DEX modifica la expresión del Sia α -2,3 e incrementa la del Sia α -2,6 en timocitos, macrófagos y células CHO (Alvarez G *et al.*, 1999; Batisse C *et al.*, 2004; Jing Y *et al.*, 2010). Además, Reyes-Leyva *et al.*, demostraron que la DEX decreta la expresión del Sia α -2,3 en células Vero, reduciendo así la infección de esta línea celular con el rubulavirus porcino (Reyes-Leyva J *et al.*, 1997). El análisis simultáneo de las dos conformaciones del Sia confirma que la DEX abole completamente la expresión del Sia α -2,3 mientras que incrementa ligeramente la expresión de Sia α -2,6 en las células MDCK y Vero. Algunos estudios han mostrado la correlación entre la expresión de Sia α -2,3 y Sia α -2,6 y la susceptibilidad de las células huésped a ser infectadas por virus de influenza. Los resultados mostrados en el presente trabajo sugieren que el tratamiento con la DEX podría reducir la infectividad de virus de influenza aviares, cuyo receptor es el Sia α -2,3, mientras que podría mantener e incluso incrementar la infectividad de virus de influenza humanos y porcinos.

El efecto de la DEX de abolir la expresión del Sia α -2,3 pero no del Sia α -2,6 podría ser utilizado en estudios de especificidad por receptor de virus tales como los de influenza así como en ensayos de propagación de virus cuyo tropismo esté determinado por el receptor

Sia α -2,6 (Suzuki Y *et al.*, 2000). Por otro lado, los resultados del presente trabajo sugieren que la DEX podría ser utilizada para el análisis de los mecanismos moleculares que regulan la sialilación, el cual ha sido poco investigado y podría implicar la regulación de la actividad de sialiltransferasas específicas (Bork K *et al.*, 2017).

El análisis bioinformático de especificidad de la lectina SNA establece que el determinante mínimo de reconocimiento y unión de ésta es el trisacárido Neu5Ac α 2–6Gal β 1–4GlcNAc (Smith DF *et al.*, 2010). El desarrollo de bases de datos en el campo de la glicómica ha permitido comprender la interacción entre los patógenos y sus hospederos a través de los glicanos, tal es el caso de la base de datos SugarBind (Mariethoz J *et al.*, 2016). El análisis de patógenos que pueden potencialmente reconocer el trisacárido Neu5Ac α 2–6Gal β 1–4GlcNAc muestra que la hemaglutinina de algunos subtipos de virus de influenza A (H1, H3, H7 y H9), así como *Toxoplasma gondii*, pueden unirse al mismo glicano reconocido por SNA.

El análisis simultáneo de Sia α -2,3 y Sia α -2,6 así como de los residuos *O*-galactósilos por citometría de flujo puede ser aplicado al análisis de expresión de estos receptores así como al análisis de interacciones célula-célula y célula-sustrato en otros tipos celulares. Además, dada la sensibilidad, especificidad y restricción de detección de glicanos terminales de la superficie celular, la citometría de flujo podría ser utilizada para detectar glicanos que son expresados de forma aberrante en la superficie celular, tal como ocurre en ciertos tipos

de cáncer, y como una herramienta para diagnosis, prognosis y terapia (Poiroux G *et al.*, 2017).

9. Conclusión

Con base en los resultados mostrados en el presente trabajo podemos decir que la citometría de flujo es un método eficaz, reproducible y lo suficientemente sensible para analizar la sialilación de glicoconjugados en las membranas celulares así como determinar alteraciones en ésta. El tratamiento con dexametasona reduce significativamente la expresión del Sia α -2,3 mientras que, por el contrario, incrementa la expresión del Sia α -2,6 principalmente en la línea celular MDCK. El presente estudio sugiere que la dexametasona podría cambiar la susceptibilidad de infección de células epiteliales a ciertos patógenos como virus de influenza.

10. Perspectivas

1. Analizar la infectividad de virus de influenza en líneas celulares A549, MDCK y Vero pretratadas con dexametasona. *Estos experimentos son fundamentales para analizar si la alteración de la sialilación disminuye la infectividad de virus cuyo tropismo es el Sia α -2,3 e incrementa la infectividad de los virus con tropismo Sia α -2,6.*

2. Analizar la actividad transcripcional de las sialiltransferasas de Sia α -2,3 y Sia α -2,6 mediante la actividad de genes reporteros acoplados a luciferasa. *Estos experimentos permitirían obtener información importante sobre el efecto directo de la dexametasona sobre la expresión de las sialiltransferasas.*

3. Analizar la infectividad de virus de influenza en aves de corral pretratadas con dexametasona. *Estos experimentos son fundamentales para determinar si la dexametasona puede proteger in vivo contra la infectividad de virus de influenza aviáres y ser utilizado para contrarrestar la diseminación de estos virus.*

11. Referencias

Alvarez G, Lascurain R, Perez A, Degand P, Montano LF, Martinez-Cairo S & Zenteno E (1999) Relevance of sialoglycoconjugates in murine thymocytes during maturation and selection in the thymus. *Immunol Investig*, 28: 9-18.

Batisse C, Marquet J, Greffard A, Fleury-Feith J, Jaurand MC & Pilatte Y (2004) Lectin-based three-color flow cytometric approach for studying cell surface glycosylation changes that occur during apoptosis. *Cytom A*, 62: 81-88.

Bork K, Weidemann W, Berneck B, Kuchta M, Bennmann D, Thate A, Huber Otmar Gnanapragassam VS & Horstkorte R (2017) The expression of sialyltransferases is regulated by the bioavailability and biosynthesis of sialic acids. *Gene Expr Patterns*, 23-24: 52-58.

Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG & Paulson JC (1994) Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*, 205: 17-23.

Dudeja PK, Dahiya R, Brown MD & Brasitus TA (1988) Dexamethasone influences the lipid fluidity, lipid composition and glycosphingolipid glycosyltransferase activities of rat proximal-small-intestinal Golgi membranes. *Biochem J*, 253: 401-408.

Gagneux P & Varki A (1999) Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function. *Glycobiology*, 9: 747-755.

Haltiwanger RS (2002) Regulation of signal transduction pathways in development by glycosylation. *Curr Struct Biol*, 12: 593-598.

Harduin L (2001) The human sialyltransferases family. *Biochimie*, 83: 727-737.

Harduin L, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, Samyn-Petit B, Julien S & Delannoy P (2001) The human sialyltransferase family. *Biochimie*, 83: 727-737.

Jing Y, Qian Y & Li ZJ (2010) Sialylation enhancement of CTLA-Ig fusion protein in Chinese hamster ovary cells by dexamethasone. *Biotechnol Bioeng*, 107: 488-496.

Leffler H (2001) Galectins structure and function. *Results Probl Cell Differ*. 33: 57-83.

Liu J, Stevens DJ, Haire LF, Walker PA, Coombs PJ, Russell RJ, Gamblin SJ & Skehel JJ (2009) Structures of receptor complexes formed by hemagglutinins from the Asian influenza pandemic of 1957. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 17175-17180.

López Morales D & Vallejo V (2007) Expresión de ácido siálico y de la β -galactósido- α -2,6-sialiltransferasa en cáncer. *REB*, 26: 93-98.

Lowe JB (1999) Structures common to different types of glycans. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 211-252.

Màdi A, Majai G, Koy C, Vámosi G, Szántó A, Glocker MO & Fésüs L (2011) Altered sialylation on the cell-surface proteins of dexamethasone-treated human macrophages contributes to augmented uptake of apoptotic neutrophils. *Immunology Letters*, 135: 88-95.

Mariethoz J, Khatib K, Alocci D, Campbell MP, Karlsson NG, Packer NH, Mullen EH & Lisacek F (2016) SugarBindDB, a resource of glycan-mediated host-pathogen interactions. *Nuclei Acids Res*, 44: D1243-D1250.

Matrosovich M, Matrosovich T, Carr J, Roberts NA & Klenk HD (2003) Overexpression of the α -2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J Virol*, 77: 8418-8425.

Palese P & Shaw ML (2007) Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology*, 5th edn, pp. 1647-1689. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins.

Poiroux G, Barre A, van Damme EJM, Benoist H & Rouge P (2017) Plant lectins targeting O-glycans at the cell surface as tools for cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Int J Mol Sci*, 18: 1232.

Reyes-Leyva J, Espinoza B, Hernández J, Zenteno R, Vallejo V, Hernández-Jáuregui P & Zenteno E (1997) NeuAc α 2,3gal-glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 188: 327-332.

Rodríguez-González M & Espinosa-Rosales F (2016) Uso de glucocorticoides sistémicos en Pediatría: generalidades. *Acta Pediatr Mex*, 37: 349-354.

Sauter NK, Bednarski MD, Wurzburg BA, Hanson JE, Whitesides GM, Skehel JJ & Wiley DC (1989) Hemagglutinins from two influenza virus variants bind to sialic acid derivatives with millimolar dissociation constants: a 500-MHz proton nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry*, 28: 8388-8396.

Schauer R & Kamerling JP (1997) Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. Glycoproteins II, *Elsevier*, 241-400.

Schauer R & Kamerling JP (2018) Exploration of the sialic acid world. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 75: 1-213.

Schauer R, Kelm S, Reuter G, Roggentin P & Shaw L (1995) Biochemistry and role of sialic acids. *Biology of sialic acids*, chapter 2, 7-67.

Skehel JJ & Wiley DC (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 69: 531-569.

Smith DF, Song X & Cummings RD (2010) Use of glycan microarrays to explore specificity of glycan-binding proteins. *Methods Enzymol*, 480, 417-444.

Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12: 43-56.

Stencel-Baerenwald JE, Reiss K, Reiter DM, Sthele T & Dermody TS (2014) The sweet spot: defining virus-sialic acid interactions. *Nat Rev Microbiol*, 12: 739-749.

Sun X, Shi Y, Lu X, He J, Gao F, Yan J, Qi J & Gao GF (2013) Bat-derived influenza hemagglutinin H17 does not bind canonical avian or human receptors and most likely uses a unique entry mechanism. *Cell Rep*, 3: 769-778.

Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE, Chambers TM, Kiso M, Ishida H & Kawaoka Y (2000) Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol*, 74: 11825-11831.

Takenouchi T, Morozumi T, Wada E, Suzuki S, Nishiyama Y, Sukegawa S & Uenishi H (2021) Dexamethasone enhances CD163 expression in porcine IPKM immortalized macrophages. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 57: 10-16.

Tong S, Li Y, Rivallier P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA & Davis CT (2012) A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 4269-4274.

Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X & Recuenco S (2013) New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 9, e1003657.

Travig C & Schauer R (1998) Structure, function and metabolism of sialic acid. *Cell Mol Life Sci*, 54: 1330-1349.

Varki A (1992) Diversity in the sialic acids. *Glycobiology*, 2: 25-40.

Varki A (2017) Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 27: 3-49.

Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ & Wiley DC (1988) Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*, 333: 426-431.

Wyllie AH, Kerr JF & Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68: 251-306.




Xu L, Kurusu Y, Takizawa K, Tanaka J, Matsumoto K & Taniguchi A (2003) Transcriptional regulation of human beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase (hST6Gal I) gene in colon adenocarcinoma cell line. *Biochem Biophys Commun* 307: 1070-1074.

Xu R, McBride R, Paulson JC, Basler CF & Wilson IA (2010) Structure, receptor binding, and antigenicity of influenza virus hemagglutinins from the 1957 H2N2 pandemic. *J Virol*, 84: 1715-1721.

Zhu X, Yu W, McBride R, Li Y, Chen LM, Donis RO, Tong S, Paulson JC & Wilson IA (2013) Hemagglutinin homologue from H17N10 bat influenza virus exhibits divergent receptor-binding and pH-dependent fusion activities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 1458-1463.

Article

Effect of Dexamethasone on the Expression of the α 2,3 and α 2,6 Sialic Acids in Epithelial Cell Lines

Onasis Vicente-Fermín¹, Edgar Zenteno², Ivan Ramos-Martínez³ , Clara Espitia¹, José Ivan Sánchez-Betancourt³  and Leonor Huerta^{1,*} 

¹ Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico

² Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico

³ Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico

* Correspondence: leonorhh@iibiomedicas.unam.mx; Tel.: +52-(55)-56-22-38-83

Abstract: *N*-acetylneuraminic acid linked to galactose by α 2,6 and α 2,3 linkages (Sia α 2,6 and Sia α 2,3) is expressed on glycoconjugates of animal tissues, where it performs multiple biological functions. In addition, these types of sialic acid residues are the main targets for the binding and entry of influenza viruses. Here we used fluorochrome-conjugated *Sambucus nigra*, *Maackia amurensis*, and peanut lectins for the simultaneous detection of Sia α 2,3 and Sia α 2,6 and galactosyl residues by two-color flow cytometry on A549 cells, a human pneumocyte cell line used for in vitro studies of the infection by influenza viruses, as well as on Vero and MDCK cell lines. The dexamethasone (DEX) glucocorticoid (GC), a widely used anti-inflammatory compound, completely abrogated the expression of Sia α 2,3 in A549 cells and decreased its expression in Vero and MDCK cells; in contrast, the expression of Sia α 2,6 was increased in the three cell lines. These observations indicate that DEX can be used for the study of the mechanism of sialylation of cell membrane molecules. Importantly, DEX may change the tropism of avian and human/pig influenza viruses and other infectious agents to animal and human epithelial cells.

Keywords: sialic acid; A549; MDCK; Vero; dexamethasone; influenza receptors; zoonosis; sialylation



Citation: Vicente-Fermín, O.; Zenteno, E.; Ramos-Martínez, I.; Espitia, C.; Sánchez-Betancourt, J.I.; Huerta, L. Effect of Dexamethasone on the Expression of the α 2,3 and α 2,6 Sialic Acids in Epithelial Cell Lines. *Pathogens* **2022**, *11*, 1518. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121518>

Academic Editors: Jesús Hernández, Janice Reis Ciacci-Zanella and Lawrence S. Young

Received: 19 October 2022
Accepted: 25 November 2022
Published: 12 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Terminal *N*-acetylneuraminic acid (Neu5Ac, Sia) linked to β -galactose by α 2,3 or α 2,6 linkages (Sia α 2,3 and Sia α 2,6, respectively) and mucin-type *O*-glycans containing Gal and GalNAc (Gal- β (1-3)-GalNAc, Thomsen–Friedenreich antigen) are present on glycoproteins and glycolipids on cell membranes and are involved in cell–cell interaction [1], signaling processes [2], cell–substrate interactions, and differentiation [3–5]. Particularly, aberrant expression of terminal α 2,6 Neu5Ac and Gal- β (1-3)-GalNAc is found in a variety of tumors [6–9]. The biological relevance of Sia α 2,3 and Sia α 2,6 is increased by the fact that they are the main receptors for influenza viruses that infect epithelial cells from several animal species and humans [10,11].

Dexamethasone (DEX) is a potent synthetic glucocorticoid derived from hydrocortisone, and so it regulates carbohydrate and protein metabolism. Pharmacologically, DEX has anti-inflammatory, anti-allergic, and immunosuppressive effects, so it is widely used in the treatment of respiratory distress and other inflammatory conditions both in humans and farm animals. Mechanisms of action of DEX are highly diverse and are mediated by binding to both cytoplasmic and membrane receptors, forming complexes (GC-GCR) which directly suppress the expression of genes encoding for pro-inflammatory proteins, inactivate transcription factors, and induce modification of gene expression by epigenetic mechanisms. Other effects described are the skewing of the cell metabolism by reduction

of the intracellular ATP availability, promotion of the phagocytosis of apoptotic bodies, inhibition of the expression of adhesion molecules (thus inhibiting immune cell migration), and reduction of the production of prostaglandins reviewed in [12,13]. However, other effects of DEX are less studied. Particularly, there are several reports showing that it can modulate the expression of sialic acids on the cell surface in vitro [14] and increase the expression of sialyltransferases in fibroblasts [15]. Here, we report the effect of DEX on the expression of Sia α 2,3 and Sia α 2,6 on monkey and dog kidney epithelial cells and the A549 human pneumocyte cell line.

Binding of the fluorescent *Maackia amurensis* (MAAII) and *Sambucus nigra* (SNA) lectins is a widely used method for the detection of Sia α 2,3- and Sia α 2,6 on both primary tissues and cell lines. Most studies showing binding of these lectins are conducted using fluorescence microscopy [10,16,17]. Reports using these lectins in the analysis of the expression of terminal glycans by flow cytometry can be found in the literature, with most using single lectin labeling [18–23]. The simultaneous detection of lectin binding on the cell surface would further demonstrate binding specificity and provide an abbreviated assay for the analysis of the concurrent expression of glycans.

Here, we used a two-color flow cytometry assay for the specific and simultaneous detection of the effect of DEX on the binding of SNA and MAAII to the surface of three cell lines widely used for influenza research. A549 is a human alveolar type II epithelial cell line (type II pneumocytes) [24] and is the most used model for the in vitro study of the infection of human low respiratory tract cells by influenza viruses, which, along with an aberrant innate immune response, greatly relates to pathogenesis [25,26]. On the other hand, MDCK and Vero cells are widely used for the study of the virus mechanisms of entry, as well as for its growing in vitro, as an alternative to the allantoic cavity of embryonated chicken eggs [27–29]. The specificity of the binding of MAAII and SNA was demonstrated by the treatment of cells with neuraminidase, which exposes the non-sialylated terminal galactose moiety of O-glycans, which were detected by the use of the peanut lectin (PNA). Our results show that DEX exert a differential effect on the expression of Sia α 2,3- and Sia α 2,6.

2. Material and Methods

2.1. Cell Lines

Low-passage Madin–Darby canine kidney cells (MDCK.2; ATCC, Rockville, MD, USA) were cultivated in Eagle’s Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC) supplemented with 10% inactivated fetal calf serum (By Products; Guadalajara, Jalisco, México). A549 cells (ATCC) were kept in Kaighn’s modification of Ham’s F-12 medium (F12K, ATCC) including 10% FCS. Vero cells were obtained from Dr. Bertha Espinoza at Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, and cultured in EMEM. All cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. For passing, cell monolayers were washed twice with PBS and detached by digestion with 2 mL of 0.25% trypsin (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) for 10 min at 37 °C. Trypsin was then inactivated by addition of 2 mL of supplemented culture medium. Cells were transferred to 15 mL centrifuge tubes, washed with 2 mL of PBS, resuspended in their respective culture medium, and maintained at 37 °C with 5% CO₂.

2.2. Lectins

Biotin-conjugated *Maackia amurensis* agglutinin II, FITC-conjugated *Sambucus nigra* agglutinin, FITC-conjugated peanut agglutinin, and biotin-conjugated peanut agglutinin were used for flow cytometry analysis. Biotin-conjugated lectins were detected by using PE-conjugated streptavidin. Table 1 indicates the lectins, conjugated fluorochromes, produced color signal, specificity, and provider of these reagents.

Table 1. Lectins used in this study.

Lectins	Conjugated Fluorochrome	Color Signal	Sialydated Residue	Manufacturer
Sambucus nigra	FITC	Green	Sia α 2,6	Vector
Maackia amurensis II	Biotin/PE-streptavidin	Red	Sia α 2,3	Vector
Peanut agglutinin	Biotin/PE-streptavidin	Red	Gal β 1-3GalNAc	Vector
Peanut agglutinin	FITC	Green	Gal β 1-3GalNAc	Sigma-Aldrich

2.3. Dexamethasone Treatment

A549, Vero, and MDCK cells were collected from cultures in logarithmic growth phase by trypsin digestion. After trypsin inactivation and washing, cells were resuspended in PBS and distributed at 5×10^5 cells/50 μ L in 1.6 mL microtubes. Cells were treated with 20 μ M Dexamethasone phosphate, or DEX (Alin; Chinoin, CDMX, México) in the respective culture medium without serum and incubated at 37 °C with 5% CO₂. After 12 h, cells were washed with PBS, stained, and processed for flow cytometry for the analysis of sialic acid expression.

2.4. Flow Cytometric Analysis of Lectin Binding

Before addition to cells, pairs of lectins and PE-conjugated streptavidin (for detection of biotin-conjugated MAAII or PNA) were combined at 10 μ g/mL each in PBS (lectin working solution). For inhibition of lectin binding to cells by galactose and fetuin (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), lectin working solution was prepared in 100 mM galactose or 0.1 mM fetuin in PBS. Thirty-five microliters of lectin working solution was then added to cells and incubated for 60 min at 4 °C. Cells were washed once with 1 mL of PBS, resuspended in 0.5 mL of the same buffer, and analyzed immediately in an Attune™ flow cytometer (blue/red lasers) from Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, USA). For neuraminidase treatment, 30 μ L of neuraminidase type V from *Clostridium perfringens* (Sigma Aldrich) stock solution (6.1 U/mL) was added to the corresponding cells and incubated for 1.5 h at 37 °C, 5% CO₂. Cells were washed with 1 mL of PBS before staining.

Unlabeled cells, single-green and single-red labeled cells were used to set up voltage and compensation settings. Double-labeled cells were then analyzed under the same conditions. Regions of viable cells in FSC-H vs. SSC-H were depicted, and green and red fluorescence was determined.

2.5. Statistical Analysis

Geometric mean fluorescence intensity data were collected and differences between groups were analyzed for significance by ANOVA ($p < 0.05$) or Student's *t*-test ($p < 0.05$) using GraphPad Prism version 9.0 (GraphPad Software Inc.; San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Two-Color Flow Cytometry Analysis of the expression of Sia α 2,3, Sia α 2,6, and Gal β 1-3GalNAc Glycans on A549 Cells

Table 1 indicates the conjugated fluorochrome, produced color signal, specificity, and provider of the lectins used in these analyses.

Removal of Sia α 2,3 and Sia α 2,6 from the cell surface by incubation with neuraminidase uncovers terminal galactosyl (β -1,3) *N*-acetylgalactosamine (Gal β 1-3GalNAc) on glyco-conjugates. Thus, neuraminidase treatment reduces SNA and MAAII, whereas it increases PNA binding [30]. Figure 1 shows the two-color flow cytometry analysis of the expression of Gal β 1-3GalNAc and Sia α 2,3 (Figure 1A) and Gal β 1-3GalNAc and Sia α 2,6 (Figure 1B), along with the effect of treatment of the cell surface with neuraminidase on A549 cells. Cells were clearly stained with the three lectins. As expected, neuraminidase greatly reduced the fluorescence of SNA and MAAII, whereas it increased that of PNA. As expected, galactose completely blocked the binding of PNA, whereas fetuin reduced the binding of both lectins to similar levels, since it absorbed lectins from the labeling solution. Thus, the two-color assay allowed a ready detection of Sia α 2,3 and Sia α 2,6 and the exposure of *O*-galactosyl residues by neuraminidase treatment.

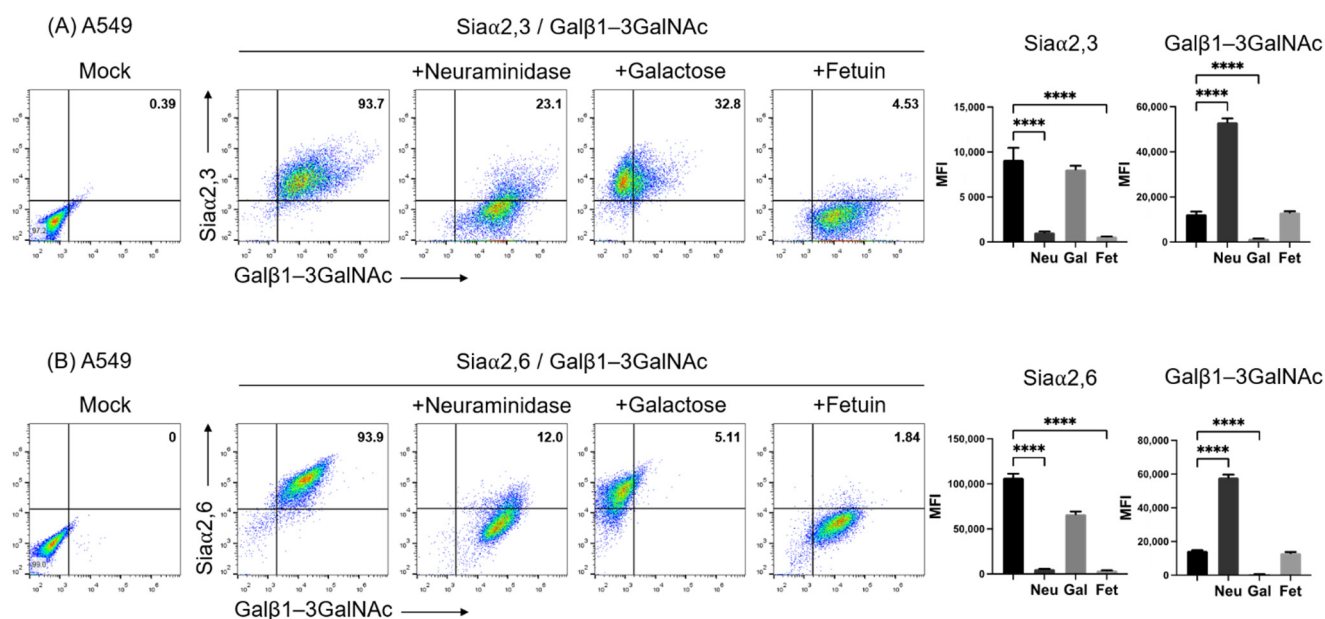


Figure 1. Two-color flow cytometry analysis of the expression of (A) Sia α 2,3 and Gal β 1-3GalNAc and (B) Sia α 2,6 and Gal β 1-3GalNAc on A549 cells by means of binding of SNA, MAAII, and PNA lectins. The effect of treatment of the cell surface with neuraminidase, blocking of PNA binding with galactose, and lectin adsorption with fetuin is shown. The percentage of positive cells in the upper right quadrants is shown. The mean fluorescence intensity of triplicates in a representative experiment is shown on the right. MFI, mean fluorescence intensity; Gal, galactose; Neu, neuraminidase; Fet, fetuin. Significant differences are marked with asterisks (**** $p < 0.0001$, one-way ANOVA).

3.2. Two-Color Flow Cytometry Analysis of the Expression of Sia α 2,3 and Sia α 2,6 Glycans on A549, Vero, and MDCK Cells

Figure 2 shows the simultaneous analysis of the expression of Sia α 2,3 and Sia α 2,6 on A549, Vero, and MDCK cells. As before, the neuraminidase treatment completely abrogated MAAII and greatly reduced SNA binding to A549 and Vero cells (third panels in Figure 2A,B). The remnant SNA fluorescence observed in a subpopulation after neuraminidase treatment (lower right quadrant) may be explained by the more efficient cleavage of Sia α 2,3 than Sia α 2,6 by *Clostridium perfringens* neuraminidase [31]. Instead, the adsorption of lectins by fetuin in the incubation medium completely inhibited binding in A549 and Vero cells (fourth panels in Figure 2A,B).

Simultaneous staining of MDCK.2 cells with SNA and MAAII revealed two cell populations with slightly different levels of expression of Sia α 2,3 and Sia α 2,6 (second panel in Figure 2C), which became clearly resolved after neuraminidase treatment (third panel of Figure 2C). Thus, the same concentration of neuraminidase that effectively removed lectin binding in A549 and Vero cells, completely abrogated SNA and MAAII fluorescence in only one subpopulation of MDCK cells, whereas another subpopulation was more resistant to the enzyme activity, with only a marginal reduction in total fluorescence for Sia α 2,3. Heterogeneity of MDCK.2 cells was also indicated by the observation that fetuin, although inhibited binding of both lectins to a greater degree than neuraminidase, also generated two populations differing in the degree of inhibition of SNA fluorescence, with one of them being more resistant to fetuin competition for Sia α 2,6 (fourth panel of Figure 2C).

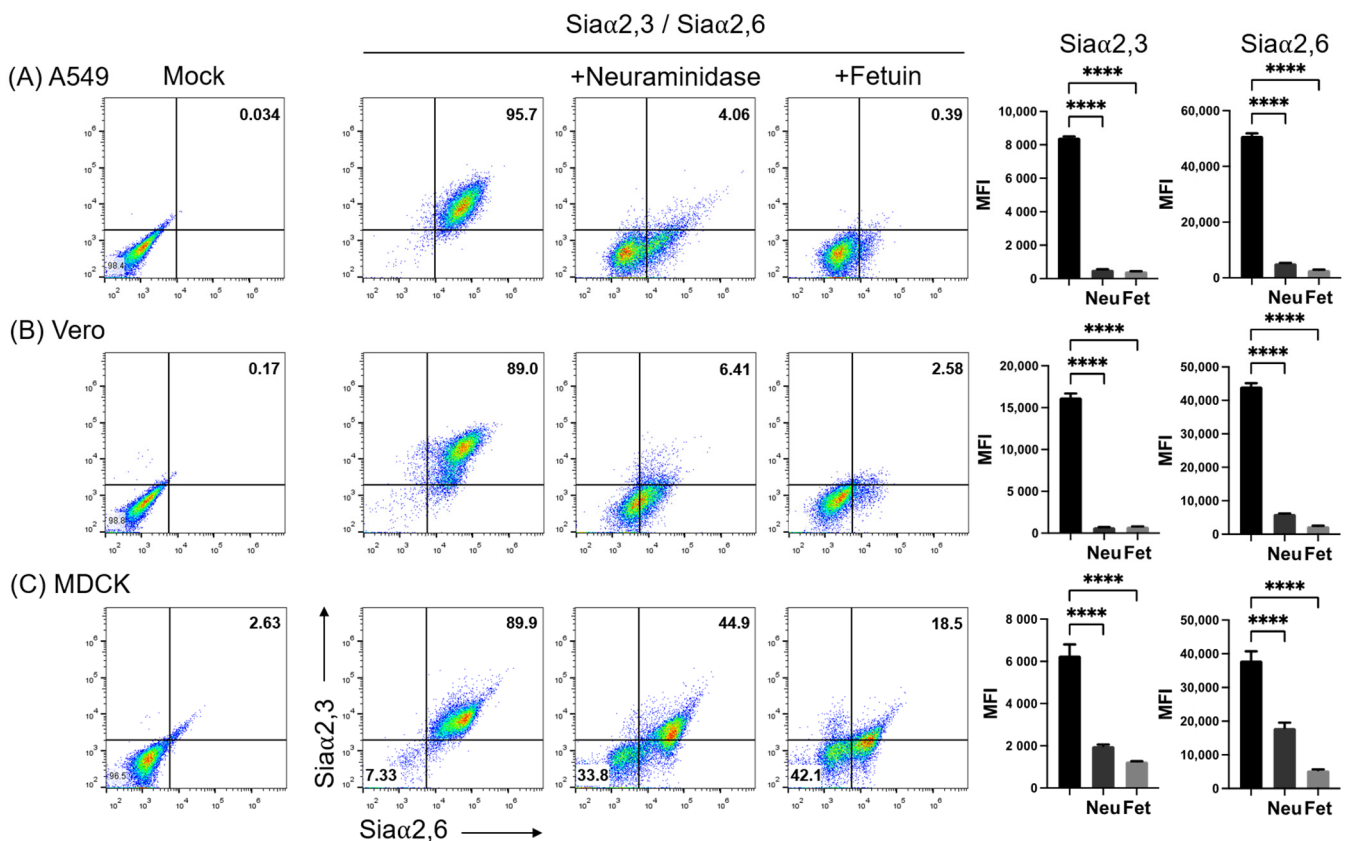


Figure 2. Effect of neuraminidase on the expression of Sia α 2,3 and Sia α 2,6 on (A) A549, (B) Vero, and (C) MDCK cells. The effect of treatment of the cell surface with neuraminidase and lectin absorption with fetuin is shown. The mean fluorescence intensity of triplicates in a representative experiment is shown on the right. FMI, mean fluorescence intensity; Neu, neuraminidase; Fet, fetuin. Significant differences are marked with asterisks ($p < 0.0001$, one-way ANOVA).

Thus, double staining evidenced that MDCK.2 cells contained subpopulations harboring slightly different levels of expression of Sia α 2,3 and Sia α 2,6, which, however, showed marked different sensitivities to neuraminidase and fetuin activities.

3.3. Effect of Dexamethasone on the Expression of Sia α 2,6 and Sia α 2,3 Glycans on A549, Vero, and MDCK Cells

It has been previously shown that DEX decreases the expression of Sia α 2,3 in Vero cells and that consequently the susceptibility of this cell line to infection with the porcine rubulavirus is greatly reduced [32]. We compared the effect of DEX on the expression of sialyl residues in A549, Vero, and MDCK.2 cells. DEX completely abolished the expression of Sia α 2,3 in A549 cells and greatly reduced it in Vero and MDCK cells; in contrast, DEX increased the expression of Sia α 2,6 in the three cell lines (Figure 3B). A request to the SugarBind Database from ExPASy.org for the sequence of glycans recognized by SNA that were overexpressed by the effect of DEX was made. Several influenza A virus subtypes (H1, H3, H7, H9), as well as *Toxoplasma gondii*, an intracellular parasite, could potentially bind to glycans detected by SNA (Figure 4).

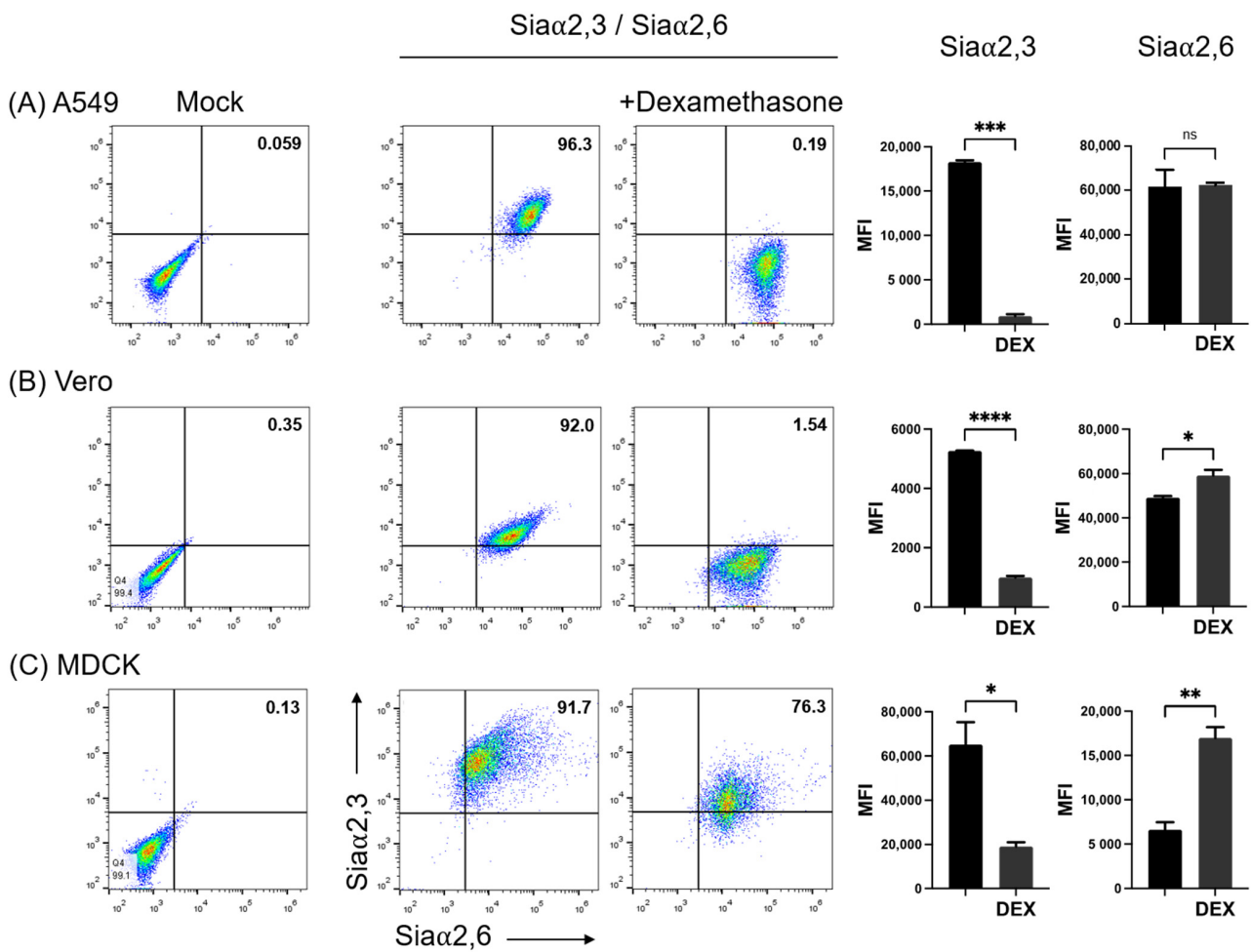


Figure 3. Effect of treatment of cells with dexamethasone (DEX) on the expression of Sia α 2,3 and Sia α 2,6 on (A) A549, (B) Vero, and (C) MDCK cells. FMI, mean fluorescence intensity; DEX, dexamethasone; ns, non-significant difference. Significant differences are marked with asterisks (*, $p < 0.05$, ** , $p < 0.01$, *** , $p < 0.001$, **** , $p < 0.0001$; Student's t -test).

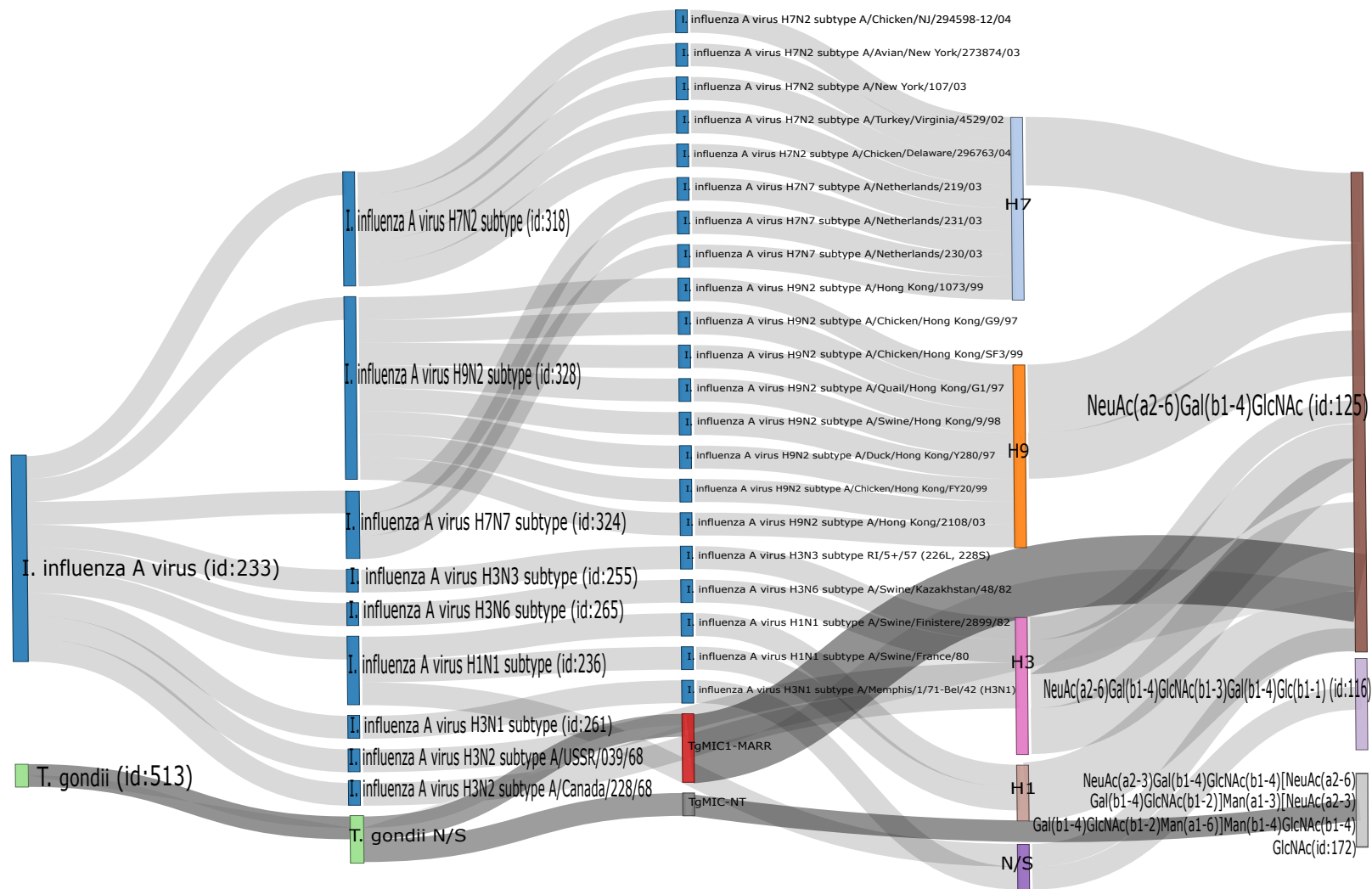


Figure 4. Output of the search in the SugarBind Database showing associations between pathogens and glycans. The query NeuAc(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc, the trisaccharide recognized by SNA, returned all pathogens matching these criteria. Influenza A H1, H3, H7, and H9 and *Toxoplasma gondii* recognize this glycan.

4. Discussion

Sialic acids are a family of monosaccharides comprising about 50 derivatives of neuraminic acid; they are widely distributed in nature as terminal sugars of oligosaccharides attached to proteins or lipids. Sialic acids are linked to galactose via α 2,3 or α 2,6-linkage or linked via α 2,6-linkage to galactosamine or *N*-acetylgalactosamine [33]. Tools for the identification of Sia residues on cells and tissues comprise different methodologies such as histochemistry. Here we show that flow cytometry allows the simultaneous accurate analysis of the binding of SNA and MAAII lectins on three cell lines widely used for influenza studies. The concurrent exposure of additional *O*-galactosyl residues after neuraminidase treatment was also detected on the same cells along with reduced SNA or MAAII binding. Levels of fluorescence after treatment with neuraminidase and fetuin show that background fluorescence is minimal, confirming the specificity of the test.

It has been reported that dexamethasone modifies the expression of Sia α 2,3 and increases that of Sia α 2,6 in thymocytes, macrophages, and CHO cells [1,18,34]. An early report showed that dexamethasone decreases the expression of Sia α 2,3 in Vero cells, limiting the infection of this cell line with the porcine rubulavirus [32]. By the simultaneous analysis of the two forms of sialic acid linkage, we confirmed that dexamethasone completely abolished the expression of Sia α 2,3, whereas it slightly increased the expression of Sia α 2,6 in Vero, MDCK, and A549 cells. Several studies have shown the correlation between the expression of Sia α 2,3 and Sia α 2,6 and the susceptibility to influenza viruses. Our observations show that treatment with dexamethasone may reduce the cell's susceptibility to avian influenza viruses while maintaining or increasing their susceptibility to human and porcine influenza viruses.

The capacity of dexamethasone to abrogate the expression of Sia α 2,3 but not of Sia α 2,6 in A549 cells can be used in studies on the receptor specificity of influenza viruses and in the selective propagation of human viruses, which preferentially use Sia α 2,6 for entry [11]. On the other hand, our observations show that dexamethasone can be used for the analysis of mechanisms controlling sialylation, which are scarcely investigated and may involve the regulation of the activity of particular sialyltransferases [35].

Further analysis of the specificity of the SNA lectin establishes that the minimal determinant it recognizes is Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc, the presence of this trisaccharide being necessary for binding [36]. The development of glycomics databases has provided a valuable tool to understand the interaction between pathogens and hosts through glycans, as is the case with the SugarBind database [37]. Searching for pathogens that could potentially recognize the trisaccharide Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc showed that hemagglutinin from several influenza A virus subtypes (H3, H7, and H9), as well as *Toxoplasma gondii*, could potentially bind to glycans detected by SNA.

The simultaneous determination of Sia α 2,3 and Sia α 2,6 along with *O*-galactosyl residues by flow cytometry can be applied to the analysis of influenza receptors as well as to cell–cell and cell–substrate interactions in other cell types. In addition, given its sensitivity and specificity, and restriction of detection of terminal glycan molecules at the cell surface, flow cytometry analysis can be used to detect glycan molecules that are expressed aberrantly on the surface of cancer cells, as a tool for diagnosis, prognosis, and therapy [7].

Two populations differing in sensitivity to *Clostridium perfringens* neuraminidase were observed in the MDCK.2 cell line. Heterogeneity of the original MDCK parental cells (CCL-34) was described before, showing that single-cell clones established from this cell line differed in their capacities to support replication of influenza A and B viruses and also in the requirement of trypsin for infection [23]. Cells used here specifically pertain to the MDCK.2 clone, which originates from CCL-34, and our analysis indicates that this clone may still contain significant heterogeneity. Awareness of the heterogeneity of MDCK cell lines is important for the interpretation of results obtained in influenza and toxoplasmosis research.

5. Conclusions

In summary, we demonstrated that dexamethasone treatment greatly reduces the expression of Sia α 2,3 and conversely increases the expression of Sia α 2,6 in animal and human epithelial cell lines; however, the mechanisms by which it regulates sialylation are scarcely investigated although may involve the regulation of the activity of specific sialyltransferases. Further studies are required to analyze its mechanisms of action. The present study suggests that dexamethasone may change the susceptibility of epithelial cells to zoonotic diseases such as influenza and toxoplasmosis. These observations support the need for in vivo studies on the effect of dexamethasone on sialic acid expression, given its potential implications in the susceptibility to infectious diseases.

Author Contributions: Conceptualization, L.H. and O.V.-F.; methodology, L.H., O.V.-F., I.R.-M., C.E., J.I.S.-B.; validation, E.Z.; formal analysis, O.V.-F., I.R.-M.; investigation, L.H., O.V.-F.; data curation, O.V.-F., I.R.-M.; writing—original draft preparation, O.V.-F.; writing—review and editing, L.H.; supervision, C.E. and J.I.S.-B.; project administration, L.H.; funding acquisition, L.H. and E.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT, UNAM), through the IN223514, IN211716, and IN215820 grants, and the Nuevas Alternativas para el Tratamiento de Enfermedades Infecciosas (NUATEI) program of Instituto de Investigaciones Biomédicas. Onasis Vicente-Fermín is a doctoral student in Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, UNAM, and received fellowship 407749 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT, ID 335713).

Acknowledgments: We thank the LABNALCIT-UNAM (CONACYT) for technical support in the acquisition of flow cytometry samples. We thank Bertha Espinoza Gutiérrez, Ignacio Martínez Martínez, Edgar Gustavo Ramos Martínez, and Erika Segura Salinas for technical support and Antonio Rivera Tapia from Centro de Investigaciones Microbiológicas del Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México, for mycoplasma testing. Iván Ramos-Martínez thanks Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) from Universidad Nacional Autónoma de México for the postdoctoral fellowship.

Conflicts of Interest: The authors declare that there are no conflict of interest.

References

1. Alvarez, G.; Lascrain, R.; Perez, A.; Degand, P.; Montano, L.F.; Martinez-Cairo, S.; Zenteno, E. Relevance of sialoglycoconjugates in murine thymocytes during maturation and selection in the thymus. *Immunol. Investig.* **1999**, *28*, 9–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Woronowicz, A.; Amith, S.R.; De Vusser, K.; Laroy, W.; Contreras, R.; Basta, S.; Szewczuk, M.R. Dependence of neurotrophic factor activation of Trk tyrosine kinase receptors on cellular sialidase. *Glycobiology* **2007**, *17*, 10–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kang, J.; Park, H.M.; Kim, Y.W.; Kim, Y.H.; Varghese, S.; Seok, H.K.; Kim, Y.G.; Kim, S.H. Control of mesenchymal stem cell phenotype and differentiation depending on cell adhesion mechanism. *Eur. Cell Mater.* **2014**, *28*, 387–403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Nightingale, T.D.; Frayne, M.E.; Clasper, S.; Banerji, S.; Jackson, D.G. A mechanism of sialylation functionally silences the hyaluronan receptor LYVE-1 in lymphatic endothelium. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 3935–3945. [[CrossRef](#)]
5. Takeuchi, T.; Sugimoto, A.; Imazato, N.; Tamura, M.; Nakatani, S.; Kobata, K.; Arata, Y. Glucosamine Suppresses Osteoclast Differentiation through the Modulation of Glycosylation Including O-GlcNAcylation. *Biol. Pharm. Bull.* **2017**, *40*, 352–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lu, J.; Gu, J. Significance of β -Galactoside α 2,6 Sialyltransferase 1 in Cancers. *Molecules* **2015**, *20*, 7509–7527. [[CrossRef](#)]
7. Poiroux, G.; Barre, A.; van Damme, E.J.M.; Benoist, H.; Rouge, P. Plant Lectins Targeting O-Glycans at the Cell Surface as Tools for Cancer Diagnosis, Prognosis and Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1232. [[CrossRef](#)]
8. Singh, R.; Campbell, B.J.; Yu, L.G.; Fernig, D.G.; Milton, J.D.; Goodlad, R.A.; FitzGerald, A.J.; Rhodes, J.M. Cell surface-expressed Thomsen-Friedenreich antigen in colon cancer is predominantly carried on high molecular weight splice variants of CD44. *Glycobiology* **2001**, *11*, 587–592. [[CrossRef](#)]
9. Zhuo, Y.; Chammas, R.; Bellis, S.L. Sialylation of beta1 integrins blocks cell adhesion to galectin-3 and protects cells against galectin-3-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 22177–22185. [[CrossRef](#)]
10. Franca, M.; Stallknecht, D.E.; Howerth, E.W. Expression and distribution of sialic acid influenza virus receptors in wild birds. *Avian Pathol.* **2013**, *42*, 60–71. [[CrossRef](#)]
11. Suzuki, Y.; Ito, T.; Suzuki, T.; Holland, R.E., Jr.; Chambers, T.M.; Kiso, M.; Ishida, H.; Kawaoka, Y. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J. Virol.* **2000**, *74*, 11825–11831. [[CrossRef](#)]

12. Dubashynskaya, N.V.; Bokaty, A.N.; Skorik, Y.A. Dexamethasone conjugates: Synthetic approaches and medical prospects. *Biomedicines* **2021**, *9*, 341. [[CrossRef](#)]
13. Zen, M.; Canova, M.; Campana, C.; Bettio, S.; Nalotto, L.; Rampudda, M.; Ramonda, R.; Laccarino, L.; Doria, A. The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmun. Rev.* **2011**, *6*, 305–310. [[CrossRef](#)]
14. Mádi, A.; Majai, G.; Koy, C.; Vámosi, G.; Szántó, A.; Glocker, M.O.; Fésüs, L. Altered sialylation on the cell-surface proteins of dexamethasone-treated human macrophages contributes to augmented uptake of apoptotic neutrophils. *Immunol. Lett.* **2011**, *135*, 88–95. [[CrossRef](#)]
15. Vandamme, V.; Pierce, A.; Verbert, A.; Delannoy, P. Transcriptional induction of β -galactoside α -2,6-sialyltransferase in rat fibroblast by dexamethasone. *Eur. J. Chem.* **1993**, *211*, 135–140. [[CrossRef](#)]
16. Ito, T.; Couceiro, J.N.; Kelm, S.; Baum, L.G.; Krauss, S.; Castrucci, M.R.; Donatelli, I.; Kida, H.; Paulson, J.C.; Webster, R.G.; et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol.* **1998**, *72*, 7367–7373. [[CrossRef](#)]
17. Sauer, A.K.; Liang, C.H.; Stech, J.; Peeters, B.; Quere, P.; Schwegmann-Wessels, C.; Wu, C.Y.; Wong, C.H.; Herrler, G. Characterization of the sialic acid binding activity of influenza A viruses using soluble variants of the H7 and H9 hemagglutinins. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e89529. [[CrossRef](#)]
18. Batisse, C.; Marquet, J.; Greffard, A.; Fleury-Feith, J.; Jaurand, M.C.; Pilatte, Y. Lectin-based three-color flow cytometric approach for studying cell surface glycosylation changes that occur during apoptosis. *Cytom. A* **2004**, *62*, 81–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Chatterjee, M.; Chava, A.K.; Kohla, G.; Pal, S.; Merling, A.; Hinderlich, S.; Unger, U.; Strasser, P.; Gerwig, G.J.; Kamerling, J.P.; et al. Identification and characterization of adsorbed serum sialoglycans on *Leishmania donovani* promastigotes. *Glycobiology* **2003**, *13*, 351–361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Ko, H.K.; Song, K.H.; Jin, U.H.; Seong, H.H.; Chang, Y.C.; Kim, N.H.; Kim, D.S.; Lee, Y.C.; Kim, C.H. Molecular characterization of pig α 2,3-Gal- β 1,3-GalNAc- α 2,6-sialyltransferase (pST6GalNAc IV) gene specific for Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc trisaccharide structure. *Glycoconj. J.* **2010**, *27*, 367–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Kogure, T.; Suzuki, T.; Takahashi, T.; Miyamoto, D.; Hidari, K.I.; Guo, C.T.; Ito, T.; Kawaoka, Y.; Suzuki, Y. Human trachea primary epithelial cells express both sialyl(α 2-3)Gal receptor for human parainfluenza virus type 1 and avian influenza viruses, and sialyl(α 2-6)Gal receptor for human influenza viruses. *Glycoconj. J.* **2006**, *23*, 101–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kubota, M.; Takeuchi, K.; Watanabe, S.; Ohno, S.; Matsuoka, R.; Kohda, D.; Nakakita, S.I.; Hiramatsu, H.; Suzuki, Y.; Nakayama, T.; et al. Trisaccharide containing alpha2,3-linked sialic acid is a receptor for mumps virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 11579–11584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lugovtsev, V.Y.; Melnyk, D.; Weir, J.P. Heterogeneity of the MDCK cell line and its applicability for influenza virus research. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e75014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lieber, M.; Smith, B.; Szakal, A.; Nelson-Rees, W.; Todaro, G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* **1976**, *17*, 62–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kobasa, D.; Jones, S.M.; Shinya, K.; Kash, J.C.; Copps, J.; Ebihara, H.; Hatta, Y.; Kim, J.H.; Halfmann, P.; Hatta, M.; et al. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* **2007**, *445*, 319–323. [[CrossRef](#)]
26. Weinheimer, V.K.; Becher, A.; Tonnie, M.; Holland, G.; Knepper, J.; Bauer, T.T.; Schneider, P.; Neudecker, J.; Ruckert, J.C.; Szymanski, K.; et al. Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung. *J. Infect. Dis.* **2012**, *206*, 1685–1694. [[CrossRef](#)]
27. Gambaryan, A.S.; Robertson, J.S.; Matrosovich, M.N. Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses. *Virology* **1999**, *258*, 232–239. [[CrossRef](#)]
28. Genzel, Y.; Dietzsch, C.; Rapp, E.; Schwarzer, J.; Reichl, U. MDCK and Vero cells for influenza virus vaccine production: A one-to-one comparison up to lab-scale bioreactor cultivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *88*, 461–475. [[CrossRef](#)]
29. Murakami, S.; Horimoto, T.; Ito, M.; Takano, R.; Katsura, H.; Shimojima, M.; Kawaoka, Y. Enhanced growth of influenza vaccine seed viruses in Vero cells mediated by broadening the optimal pH range for virus membrane fusion. *J. Virol.* **2012**, *86*, 1405–1410. [[CrossRef](#)]
30. Rogerieux, F.; Belaise, M.; Terzidis-Trabelsi, H.; Greffard, A.; Pilatte, Y.; Lambre, C.R. Determination of the sialic acid linkage specificity of sialidases using lectins in a solid phase assay. *Anal. Biochem.* **1993**, *211*, 200–204. [[CrossRef](#)]
31. Corfield, A.P.; Higa, H.; Paulson, J.C.; Schauer, R. The specificity of viral and bacterial sialidases for α (2–3)- and α (2–6)-linked sialic acids in glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1983**, *744*, 121–126. [[CrossRef](#)]
32. Reyes-Leyva, J.; Espinosa, B.; Hernandez, J.; Zenteno, R.; Vallejo, V.; Hernandez-Jauregui, P.; Zenteno, E. NeuAc α 2,3gal-glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **1997**, *118*, 327–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Harduin-Lepers, A.; Vallejo-Ruiz, V.; Krzewinski-Recchi, M.A.; Samyn-Petit, B.; Julien, S.; Delannoy, P. The human sialyltransferase family. *Biochimie* **2001**, *83*, 727–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Jing, Y.; Qian, Y.; Li, Z.J. Sialylation enhancement of CTLA4-Ig fusion protein in Chinese hamster ovary cells by dexamethasone. *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *107*, 488–496. [[CrossRef](#)]
35. Bork, K.; Weidemann, W.; Berneck, B.; Kuchta, M.; Bennmann, D.; Thate, A.; Huber Otmar Gnanapragassam, V.S.; Horstkorte, R. The expression of sialyltransferases is regulated by the bioavailability and biosynthesis of sialic acids. *Gene Expr. Patterns* **2017**, *23–24*, 52–58. [[CrossRef](#)]

36. Smith, D.F.; Song, X.; Cummings, R.D. Use of glycan microarrays to explore specificity of glycan-binding proteins. *Methods Enzymol.* **2010**, *480*, 417–444.
37. Mariethoz, J.; Khatib, K.; Alocci, D.; Campbell, M.P.; Karlsson, N.G.; Packer, N.H.; Mullen, E.H.; Lisacek, F. SugarBindDB, a resource of glycan-mediated host-pathogen interactions. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D1243–D1250. [[CrossRef](#)]