



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

# ANÁLISIS DEL TRANSPORTADOR DE CMP-ÁCIDO SIÁLICO DE MAMÍFEROS

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN  
QUÍMICO INDUSTRIAL

PRESENTA

ALIN MISHÉL HERNÁNDEZ BUSTOS

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ROBERTA SALINAS MARÍN

CUERNAVACA, MORELOS, NOVIEMBRE 2021.



## **DEDICATORIA**

A mis padres por apoyarme incondicionalmente en cada etapa de mi vida. Gracias por el amor y fortaleza que me regalan día a día.

A mis hermanas por alentarme a seguir adelante con mis metas y apoyarme siempre.

A mis tíos y tías por ser como unos segundos padres.

Al químico industrial Carlos García por siempre haber creído en mí y brindarme apoyo incondicional a lo largo de mi formación profesional. Este logro es nuestro.

A mis amigos por escucharme y darme ánimos en todo momento.

A todos aquellos que de alguna forma me apoyaron durante mi formación académica.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto por el concepto de beca de licenciatura No. 30030.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) y el Centro de Investigación en Dinámica Celular (CIDC) por brindarme herramientas invaluableles en mi formación profesional.

A mi tutora la Dra. Roberta Salinas Marín, por sus consejos, paciencia y apoyo para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Iván Martínez-Duncker Ramírez por proporcionarme un espacio dentro de su laboratorio.

A los miembros de mí jurado revisor la Dra. Blanca Eda Domínguez Mendoza, Dra. Constanza Machín Ramírez, Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama y Dr. Marcos Amed Salazar Blas por el tiempo dedicado para la revisión del presente trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular por el conocimiento y consejos que me otorgaron.

## **AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS**

Al Biól. Felipe Olvera Rodríguez por la revisión experimental y ayuda técnica en el desarrollo del proyecto.

A la Biól. Maricela Olvera Rodríguez por la gestión administrativa y técnica en el uso de citómetro de Flujo del LAMMB.



El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular del Centro de Investigación y Dinámica Molecular de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la dirección de la Dra. Roberta Salinas Marín con soporte económico del proyecto C.B. CONACYT A1-S-27518 y con la beca CONACYT de licenciatura el No. 30030.

## RESUMEN

La glicosilación es una modificación co- y post-traducciona indispensable para el correcto funcionamiento celular. En dicho proceso, participan proteínas transportadoras de nucleótidos-carbohidratos, como el transportador de CMP-ácido siálico (CST) codificado en el ser humano por el gen SLC35A1.

El CST permite el paso de CMP-ácido siálico al lumen del aparato de Golgi (Golgi) soportando la cantidad de sustrato necesaria para el proceso de sialilación celular. El suplemento incrementado o disminuido de residuos de ácido siálico en glicoproteínas y glicolípidos está relacionado con enfermedades como el cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, neurodegenerativas y neuromusculares (Hadley et al., 2019). Las mutaciones en el gen SLC35A1 generan además enfermedades congénitas de la glicosilación como el SLC35A1-CDG, resaltando la importancia de conocer la dinámica estructura-función de esta proteína.

El *SLC35A1* presenta 4 isoformas de *splicing* alternativo, donde la isoforma del177 es funcional al igual que la isoforma silvestre a pesar que pierde 59 aa correspondientes a 177 pb codificados por el exón 6 (Martinez-Duncker et al., 2005; Salinas-Marín et al., 2016). Esta isoforma de *splicing* también ha sido reportada en hámster y se determinó que en este mamífero no es funcional (Eckhardt et al., 1998).

No existen más reportes experimentales de la presencia de isoformas de *splicing* alternativo en otras especies, por ello con el objetivo de comprobar nuestra hipótesis acerca de la expresión de isoformas presentes en otros mamíferos se realizó la amplificación del transportador de CMP-ácido siálico (*slc35a1*) de *Canis lupus familiaris* (perro) y *Mus musculus* (ratón) mediante PCR convencional.

Una vez amplificado el gen SLC35A1 en ambos mamíferos, se lograron clonar y subclonar las isoformas de perro y ratón en vectores de expresión procarionte y eucarionte. Posteriormente, las construcciones obtenidas se transfectaron utilizando un modelo de complementación genética CHO-Lec2, donde se verificó la restauración del perfil de sialilación mediante la unión de las lectinas biotiniladas WGA, PNA y MAL I a la superficie celular.

Las aportaciones que generó este trabajo al conocimiento de las proteínas transportadoras fueron principalmente: la clonación de la isoforma silvestre funcional del *slc35a1* de perro (1014 pb) y la isoforma de *splicing* del 130 de 884 pb de la cual no se contaba con reportes en mamíferos diferente de humano. Mientras que en la clonación del *slc35a1* de ratón (1011 pb) se identificó a la isoforma *wt* que es funcional.

# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	I
LISTA DE FIGURAS .....	II
LISTA DE TABLAS.....	IV
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	4
2.1 El Transportador de CMP-ácido siálico.....	4
2.2 Isoformas del Transportador de CMP-ácido siálico.....	7
2.2.1 Isoforma del130 del <i>SLC35A1</i> .....	8
2.2.2 Isoforma del177 del <i>SLC35A1</i> .....	10
2.2.3 Isoformas reportadas en mamíferos. ....	12
3. MARCO TEÓRICO .....	14
3.1 Ácido siálico .....	14
3.2 El proceso de sialilación celular.....	15
4. OBJETIVOS .....	18
4.1 Objetivo general: .....	18
4.2 Objetivos específicos:.....	18
5. HIPÓTESIS .....	19
6. JUSTIFICACIÓN .....	20
7. METODOLOGÍA.....	21
7.1 Cultivo Celular .....	22
7.2 Extracción de ARN de perro y ratón .....	23
7.3 Síntesis de ADNc de perro y ratón .....	24
7.4 Diseño de oligonucleótidos y pruebas de gradiente de temperatura.....	25
7.5 PCR convencional del gen <i>slc35a1</i> de los mamíferos estudiados .....	26
7.6 Purificación de los productos de PCR para clonación mediante el kit GeneJET Gel Extraction .....	28
7.7 Obtención de células quimiocompetentes Mach One .....	29
7.8 Clonación del gen <i>slc35a1</i> de los mamíferos estudiados en el vector pJET1.2/blunt.	30
7.9 Subclonación de <i>wt</i> de perro en vector pVAX-EGFP .....	32
7.10 Clonación del <i>slc35a1</i> de mamíferos en el vector de expresión pcDNA3.1D/V5-His- TOPO .....	34
7.11 PCR de clonas positivas.....	36
7.12 Purificación por lisis alcalina para verificación de clonas positivas y transfección....	36
7.13 Purificación por GeneJET Plasmid Miniprep para secuenciación de Sanger .....	37
7.14 Digestión de isoformas obtenidas con AVAI, Kpn I y HindIII .....	38

7.15 Complementación genética en el modelo CHO-Lec2 .....	39
7.16 Tinción con lectinas WGA, PNA y MAL I .....	40
7.17 Análisis de secuencia de aminoácidos de las isoformas clonadas.....	42
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	43
8.1 Análisis por microscopía óptica de los cultivos celulares utilizados .....	43
8.2 Verificación de la integridad del ARN extraído y ADNc sintetizado .....	43
8.3 Análisis por PCR del gen <i>slc35a1</i> de mamíferos .....	45
8.4 Análisis de colonias transformadas con el vector recombinante pJET Blunt1.2/ <i>slc35a1</i> .....	46
8.4.1 Análisis de la clonación del <i>slc35a1</i> de perro en el vector pJET Blunt 1.2.....	46
8.4.2 Análisis de la clonación del <i>slc35a1</i> de ratón en el vector pJET Blunt 1.2.....	47
8.5 Análisis de colonias transformadas con el vector de expresión eucariota vector pVAX-EGFP/ <i>slc35a1</i> .....	48
8.6 Análisis de colonias transformadas con el vector recombinante pcDNA 3.1 D-V5 His/ <i>slc35a1</i> .....	49
8.6.1 Análisis de la clonación de <i>slc35a1</i> de perro en el vector pcDNA 3.1 D/V5 His...49	
8.6.2 Análisis de la clonación del <i>slc35a1</i> de ratón en el vector pcDNA 3.1 D/V5 His..53	
8.7 Verificación de la direccionalidad de las clonas a transfectar .....	56
8.8 Análisis de células Lec2 complementadas con construcciones de perro y ratón mediante citometría de flujo.....	57
9. CONCLUSIONES .....	65
10. PERSPECTIVAS.....	66
11. ANEXOS. Preparación de soluciones.....	67
11.1 Preparación de soluciones para obtener células Mach One .....	67
11.2 Preparación del marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA.....	67
11.3 Preparación de buffer TAE 50 X.....	67
11.4 Preparación de Medio LB sólido con antibiótico.....	67
11.5 Preparación de Medio LB líquido con antibiótico .....	68
11.6 Preparación de Medio SOC .....	68
11.7 Preparación de glicerol de las clonas positivas .....	68
11.8 Preparación de soluciones para purificación de plásmido por lisis alcalina.....	68
12. REFERENCIAS.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
CDG	Defecto congénito de la glicosilación
CHO	Células de ovario de hámster chino
CMP	Citidin monofosfato
CMP-sia	CMP-ácido siálico
CST	Transportador de CMP-ácido siálico
CMV	Citomegalovirus
D.O.	Densidad óptica
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GalNAc,	N-acetilgalactosamina
GDP	Guanosín difosfato
Glc	Glucosa
GlcA	Ácido glucurónico.
GlcNac	N-acetilglucosamina
Golgi	Aparato de Golgi
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HA	Hemaglutinina
haCST	Transportador de CMP-ácido siálico de hámster
hCST	Transportador de CMP-ácido siálico humano
hUGT1	Isoforma del transportador humano de UDP-galactosa
IMF	Intensidad media de fluorescencia
LB	Medio Luria Bertani
Lec2	Células mutantes derivadas de CHO deficientes de ácido siálico
Man	Manosa
ManNAc	N-acetilmanosamina
mCST	Transportador de CMP-ácido siálico de ratón ( <i>Mus musculus</i> )
MDCK	Células de riñón canino Madin-Darby
Neu5Ac	Ácido N-acetilneuramínico
Neu5Gc	Ácido N-glicolilneuramínico
NSTs	Transportadores Nucleótido-Carbohidrato del inglés <i>Nucleotide sugar transporters</i>
PBS	Buffer de sales de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pCST	Transportador de CMP-ácido siálico de perro ( <i>Canis lupus familiaris</i> )
PSA	Ácido polisíálico
RE	Retículo endoplasmático
SFB	Suero fetal bovino
Sia	Ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico
SLC35A1	Gen del transportador de CMP-ácido siálico humano
slc35a1	Gen del transportador de CMP-ácido siálico en otros mamíferos
STs	Enzimas sialiltransferasas
STV	Estreptavidina
TA	Temperatura ambiente
TMD	Dominio transmembranal
UDP	Uridina difosfato
UDP-GlcA	Ácido glucurónico
wt	Tipo silvestre del inglés <i>wild type</i>
Xyl	Xilosa

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Procesos de glicosilación y sialilación celular en Golgi. ....	2
<b>Figura 2.</b> Modelo del transportador murino de CMP-ácido siálico propuesto por Eckhardt. ....	4
<b>Figura 3.</b> El <i>splicing</i> alternativo del pre-ARNm en los sitios GT...AG genera las isoformas del <i>SLC35A1</i> . ....	8
<b>Figura 4.</b> Alelos del primer paciente con <i>SLC35A1</i> -CDG. ....	9
<b>Figura 5.</b> Isoformas <i>wt</i> y del177 del <i>SLC35A1</i> . ....	10
<b>Figura 6.</b> Modelos de la isoforma del177. ....	12
<b>Figura 7.</b> Isoformas teóricas reportadas en mamíferos no estudiados. ....	13
<b>Figura 8.</b> Ácidos siálicos presentes en la superficie celular de los mamíferos. ....	14
<b>Figura 9.</b> Biosíntesis del ácido siálico y proceso de sialilación celular. ....	17
<b>Figura 10.</b> Esquema general de la metodología experimental seguida. ....	21
<b>Figura 11.</b> Representación de la metodología del cultivo de las líneas celulares (MDCK, CHO, Lec2 y fibroblastos de ratón). ....	22
<b>Figura 12.</b> Representación metodológica de extracción de ARN. ....	24
<b>Figura 13.</b> Representación metodológica de síntesis de ADNc. ....	25
<b>Figura 14.</b> Termociclaje para la amplificación del pCST por PCR. ....	27
<b>Figura 15.</b> Termociclaje para la amplificación del <i>slc35a1</i> de ratón por PCR. ....	28
<b>Figura 16.</b> Representación metodológica de la clonación del pCST y mCST en el vector pJET1.2/blunt. ....	31
<b>Figura 17.</b> Representación metodológica de la subclonación de la isoforma pCST-pJET en el vector pVAX-EGFP. ....	33
<b>Figura 18.</b> Clonación del <i>slc35a1</i> de mamíferos en el vector pcDNA3.1D / V5-His-TOPO. ....	35
<b>Figura 19.</b> Representación de la estrategia de subclonación de mCST-pJET en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO. ....	35
<b>Figura 20.</b> Mapa de tinción para análisis de unión de lectinas. ....	41
<b>Figura 21.</b> Representación de la metodología de la tinción con lectinas bionitiladas. ....	42
<b>Figura 22.</b> Cultivos de células de MDCK, CHO, Lec2 y fibroblastos de ratón. ....	43
<b>Figura 23.</b> Gel de electroforesis representativo de muestras de ARN extraído. ....	44
<b>Figura 24.</b> Amplificación de fragmentos de genes constitutivos de mamíferos mediante PCR convencional. ....	44
<b>Figura 25.</b> PCR convencional del <i>slc35a1</i> de perro. ....	45
<b>Figura 26.</b> PCR convencional del <i>slc35a1</i> de ratón. ....	45
<b>Figura 27.</b> PCR del <i>slc35a1</i> de perro clonado en el vector pJET Blunt 1.2. ....	46
<b>Figura 28.</b> PCR de plásmidos recombinantes con el vector pJET Blunt 1.2/ <i>slc35a1</i> de ratón. ....	47
<b>Figura 29.</b> Clonación del gen <i>slc35a1</i> de perro en el vector de expresión eucarionte PVAX-EGFP. ....	48
<b>Figura 30.</b> Ensayo de restricción pCST-pVAX con <i>Ava</i> I, <i>Kpn</i> I y <i>Hind</i> III. ....	49
<b>Figura 31.</b> Colonias positivas <i>slc35a1</i> / pcDNA3.1 D/V5 His de perro. ....	49
<b>Figura 32.</b> Secuenciación por exones de la isoforma <i>wt</i> del <i>slc35a1</i> de perro. ....	50

<b>Figura 33.</b> Cromatogramas de la secuenciación de Sanger analizada por exones de la isoforma del130 del <i>slc35a1</i> de perro (del130-pCST) .....	51
<b>Figura 34.</b> Isoformas del <i>slc35a1</i> identificadas en perro.....	52
<b>Figura 35.</b> Análisis de la isoforma del130 del <i>slc35a1</i> de perro.....	52
<b>Figura 36.</b> Colonias obtenidas de la clonación del <i>slc35a1</i> de ratón a partir de producto de PCR en el vector pcDNA 3.1 D/V5 His .....	54
<b>Figura 37.</b> PCR de colonias transformadas con el vector pcDNA 3.1 D/V5 His/ <i>slc35a1</i> de ratón .....	54
<b>Figura 38.</b> Secuenciación de Sanger de la isoforma <i>wt</i> del <i>slc35a1</i> de ratón.....	55
<b>Figura 39.</b> Isoformas del <i>slc35a1</i> de perro y ratón clonadas en el vector pCDNA 3.1 .....	55
<b>Figura 40.</b> Ensayo de restricción/linealización de las construcciones del <i>slc35a1</i> de ratón y perro utilizando la enzima KpnI .....	56
<b>Figura 41.</b> Ensayo de restricción de la construcción del130-pCST/pcDNA3.1 D-V5His con la enzima PstI .....	57
<b>Figura 42.</b> Monitoreo de la proliferación de las células utilizadas en los experimentos de complementación genética por microscopio binocular invertido.....	59
<b>Figura 43.</b> Dot plots de las poblaciones celulares analizadas a los 15 días post-selección con geneticina. ....	60
<b>Figura 44.</b> Intensidad media de fluorescencia (IMF) observada en células teñidas con la lectina WGA.....	62
<b>Figura 45 .</b> Intensidad media de fluorescencia (IMF) observada en células teñidas con la lectina MAL I .....	62
<b>Figura 46.</b> Intensidad media de fluorescencia (IMF) observada en células teñidas con la lectina PNA.....	63
<b>Figura 47.</b> Aumento de la IMF de las construcciones transfectadas con respecto al plásmido vacío. ....	63
<b>Figura 48.</b> Análisis del fenotipo de las poblaciones celulares analizadas.....	64

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Mutaciones del CST y quimeras <i>SLC35A1/hUGT1</i> que alteran el transporte o reconocimiento del CMP-sia.....	5
<b>Tabla 2.</b> Isoformas de <i>splicing</i> del <i>SLC35A1</i> . .....	8
<b>Tabla 3.</b> Isoformas de <i>splicing</i> teóricas reportadas en ratón y perro.....	13
<b>Tabla 4.</b> Matriz de identidad de mamíferos respecto al <i>SLC35A1</i> . .....	20
<b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del <i>slc35a1</i> de los mamíferos estudiados. ....	26
<b>Tabla 6.</b> Mezclas de reacción para amplificar el <i>slc35a1</i> de perro.....	27
<b>Tabla 7.</b> Condiciones para la amplificación del gen <i>slc35a1</i> del ratón. ....	27
<b>Tabla 8.</b> Condiciones para la clonación del <i>slc35a1</i> de los mamíferos estudiados en el vector pJET1.2/blunt. ....	30
<b>Tabla 9.</b> Condiciones para la amplificación de la isoforma pCST-pJET.....	32
<b>Tabla 10.</b> Digestión del vector pVAX-EGFP con enzimas HindIII y KpnI. ....	32
<b>Tabla 11.</b> Mezcla para la reacción de subclonación de la construcción pCST-pJET en vector pVAX-EGFP.....	33
<b>Tabla 12.</b> Condiciones para la clonación de perro y ratón en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO.....	34
<b>Tabla 13.</b> Condiciones de ensayos de restricción.....	39
<b>Tabla 14.</b> Lectinas utilizadas en citometría de flujo.....	40

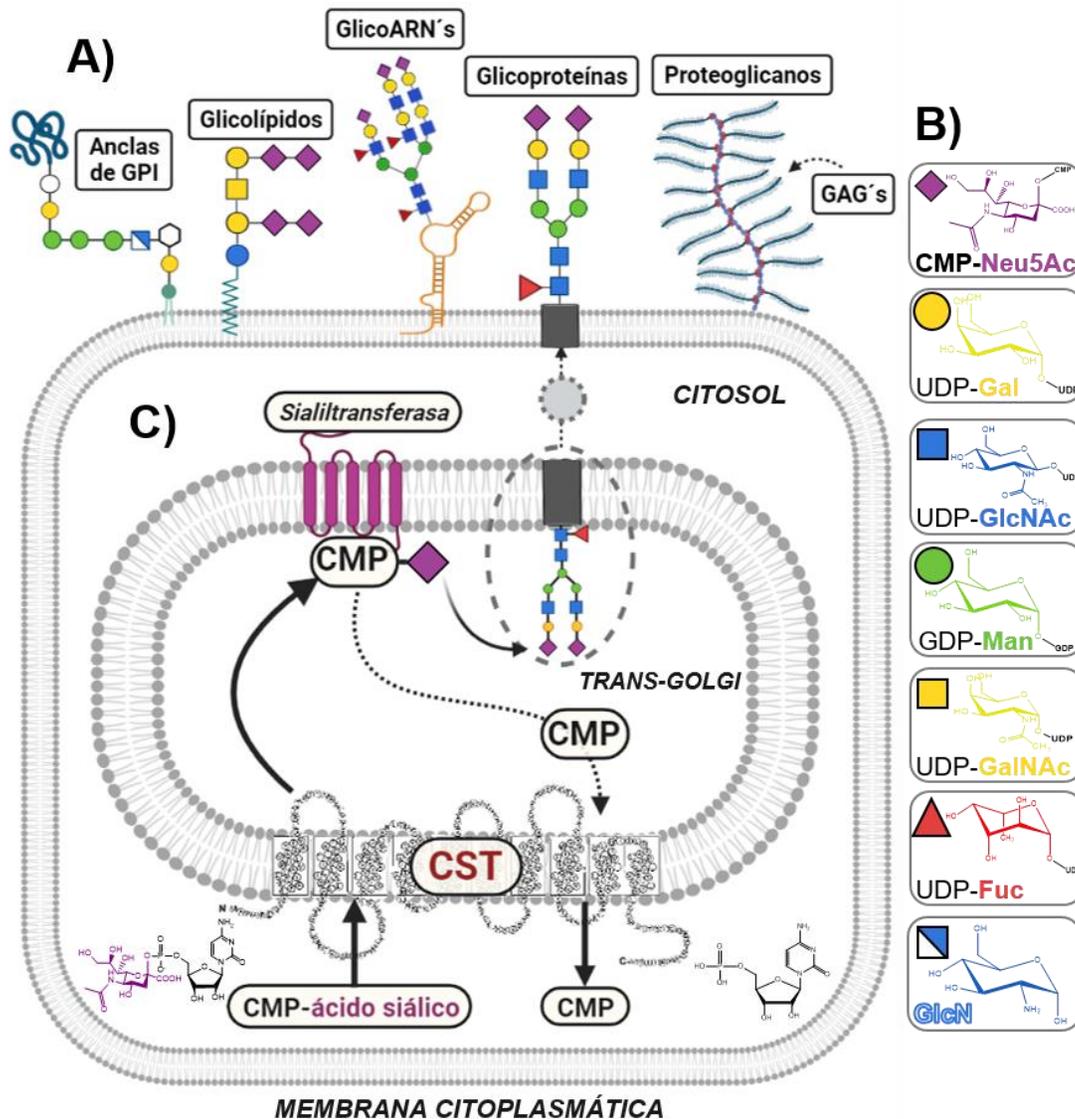
## 1. INTRODUCCIÓN

La glicosilación es la unión covalente de glicanos o carbohidratos a biomoléculas como proteínas, lípidos y polinucleótidos que permiten la síntesis de glicoconjugados, *figura 1A*. Es una modificación co- y post-traducciona que ocurre en el lumen del retículo endoplasmático (RE) o del aparato de Golgi (Golgi) y está mediada por enzimas denominadas glicosiltransferasas, que adicionan secuencialmente a los nucleótidos-carbohidrato activados tales como CMP-ácido siálico, UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, UDP-GlcA, UDP-Glc, GDP-Fuc, GDP-Man y UDP-Xyl para generar cadenas de glicanos en crecimiento, *figura 1B* (Broussard & Boyce, 2019).

Los nucleótidos-carbohidrato se sintetizan en el citosol y son transportados hacia el lumen de Golgi o del RE por una familia de proteínas acarreadoras de solutos (NSTs). Los NSTs son proteínas de membrana tipo III que tienen de seis a diez dominios transmembranales que transportan activamente nucleótidos-carbohidrato (Gerardy-Schahn et al., 2001).

Uno de los NSTs más estudiados y con mayor número de reportes de análisis estructural es el transportador de CMP-ácido siálico (CST). El CST es una proteína de 337 aminoácidos (aa) codificada por el gen SLC35A1. El CST se expresa exclusivamente en *medial-* y *trans-*Golgi y transloca CMP-ácido siálico/CMP desde el citosol hasta el lumen de Golgi mediante un mecanismo antiportador (Hadley et al., 2014). El transporte de CMP-ácido siálico al lumen de Golgi permite que las enzimas sialiltransferasas catalicen la transferencia de ácido siálico a los glicoconjugados (Wickramasinghe & Medrano, 2011).

El ácido siálico (sia) es un monosacárido de 9 carbonos que se adicionan en el extremo terminal en residuos de galactosa (Gal) mediante enlaces glicosídicos  $\alpha$ 2,3- y  $\alpha$ 2,6-, también se adiciona a N-acetilgalactosamina (GalNAc) mediante un enlace  $\alpha$ 2,6- y a otros residuos de ácido siálico mediante enlaces  $\alpha$ 2,8-, formando el polímero conocido de ácido polisiálico (PSA) durante el proceso de sialilación celular como se muestra en la *figura 1C* (Ma et al., 2021).



**Figura 1. Procesos de glicosilación y sialilación celular en Golgi.** A) Glicoconjugados presentes en mamíferos: anclas de GPI, glicolípidos, glicoproteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos (GAGs). Recientemente se comprobó que existen moléculas de ARN no codificantes glicosiladas (glicoARN's)<sup>1</sup>. B) Ejemplos de glicanos y nucleótidos-carbohidratos activados con nomenclatura SNFG<sup>2</sup>. Los glicanos deben ser activados al acoplarse a nucleótidos como UDP, GDP o CMP para ingresar al RE o Golgi donde se realiza la reacción de glicosilación. C) Proceso de sialilación celular. El mecanismo molecular que ejerce el CST en el lumen de Golgi ocurre cuando las sialiltransferasas transfieren el ácido siálico a partir del sustrato CMP-ácido siálico a los glicoconjugados y liberan el CMP. El CMP es transportado fuera del Golgi por el CST a cambio de la incorporación de CMP-siálico al Golgi. La función antiportadora del CST es esencial para mantener el proceso de sialilación celular.<sup>3</sup> Fuentes: (Flynn, R. A., Pedram, K., Malaker, S. A., Batista, P. J., Smith, B. A., Johnson, A. G., & Bertozzi, 2021)<sup>1</sup>, (Neelamegham et al., 2019; Varki et al., 2015)<sup>2</sup>, (Maggioni et al., 2013)<sup>3</sup>.

La posición terminal del sia en la cadena de glicanos permite interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, así como participación en procesos de adhesión, migración celular y respuesta inmune (Büll et al., 2014).

El CST de humano (hCST) presenta 4 isoformas adicionales a la isoforma tipo silvestre (*wt*) que se generan por mecanismos de empalmes alternativos (*splicing*). El gen SLC35A1 humano es el único donde se han caracterizado isoformas de *splicing* alternativo. La isoforma del177 es una de estas variantes que presenta una pérdida de 177 pb correspondientes al exón 6 que codifican para 59 aa (Martinez-Duncker et al., 2005). Esta isoforma es la única que conserva el motivo carboxilo terminal IIGV indispensable para la translocación funcional de la proteína a Golgi (Zhao et al., 2006).

Mediante estudios de complementación genética en células Lec2 (células mutantes de ovario de hámster chino) deficientes de transporte de CMP-ácido siálico se determinó que la isoforma del177 humana es funcional (Salinas-Marín et al., 2016). En contraste, la misma isoforma del177 de expresión endógena por células Lec2 no es capaz de restaurar el proceso de sialilación (Eckhardt et al., 1998). La explicación del mecanismo por el cual la isoforma del177 humana es funcional, y la misma isoforma de células de ovario de hámster chino no lo es, aún permanece sin explicación.

Determinar la topología de la isoforma *wt*, y del177 brindaría información relevante para elucidar el mecanismo de transporte de esta proteína, así como para el desarrollo de terapias relacionadas con mutaciones en el CST que generan enfermedades conocidas como defectos congénitos de la glicosilación como el denominado SLC35A1-CDG (Salinas-Marín et al., 2016). Recientemente, se reportó la estructura cristalina del CST de ratón (*Mus musculus*, mCST), que presenta un 91% de homología con la secuencia del hCST. Este reporte representó un enorme avance en la elucidación de la estructura-función del transportador de CMP-ácido siálico, puesto que permitió la propuesta de un mecanismo de transporte para el mCST y la obtención de un modelo por homología del hCST (Ahuja & Whorton, 2019; Ury et al., 2021).

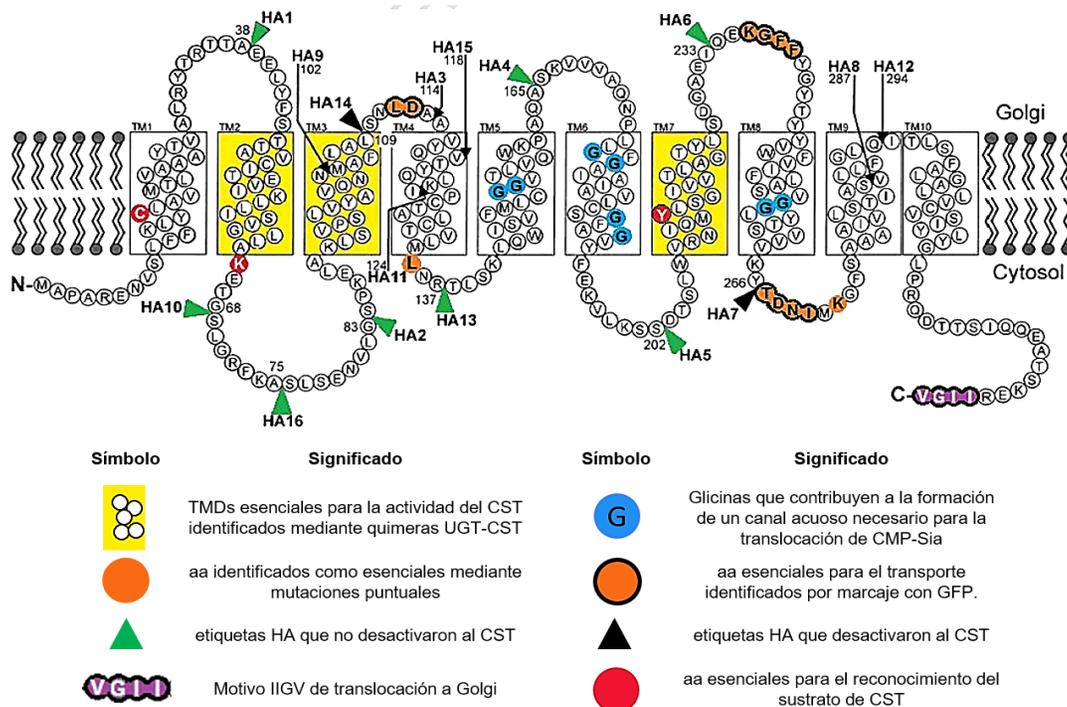
En el presente proyecto se realizó la caracterización de isoformas de *splicing* alternativo del CST de mamíferos, realizando la clonación del *slc35a1* del mCST y de perro (*Canis lupus familiaris*, pCST) en diferentes vectores de clonación y posteriormente las construcciones se expresaron en un modelo de complementación genética CHO-Lec2 para determinar su funcionalidad.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 El Transportador de CMP-ácido siálico

El transportador de CMP-ácido siálico o CST es una proteína transmembranal que cuenta con 10 dominios transmembranales (TMDs) codificados por 337 aa cuyos extremos -NH<sub>2</sub> y -CO<sub>2</sub>H terminal se encuentran orientados hacia el citosol (Eckhardt et al., 1999). El CST es uno de los miembros mejor descritos de la familia acarreadora de solutos (SLC35), se expresa exclusivamente en *medial-* y *trans-*Golgi, donde el tetrapéptido IIGV presente en su extremo carboxilo terminal permite su exportación y translocación del RE al Golgi (Zhao et al., 2006).

La topología exacta del CST no ha sido reportada, la predicción más aceptada hasta 2019 fue el modelo propuesto por Eckhardt (*figura 2*), basado en inserciones de hemaglutinina, mutagénesis de sitio directo y plots de hidrofobicidad realizado en el mCST y en células de ovario de hámster chino (CHO).



**Figura 2. Modelo del transportador murino de CMP-ácido siálico propuesto por Eckhardt.** Este modelo propone la existencia de 10 TMDs, a partir de los resultados obtenidos por el marcaje con etiquetas de hemagutinina (HA), así como la orientación de los extremos -NH<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>H terminal hacia el citosol. Adicionalmente se describen hallazgos acerca de su estructura-función obtenidos por diferentes estudios. *Modificado de:* Hadley, B., Maggioni, A., Ashikov, A., Day, C. J., Haselhorst, T., & Tiralongo, J. (2014). Structure and function of nucleotide sugar transporters: current progress. *Computational and structural biotechnology journal*, 10(16), 23-32.

Este transportador de nucleótido-carbohidrato es responsable de translocar CMP-ácido siálico (CMP-sia) desde el citosol hasta el lumen de Golgi mediante un mecanismo antiportador donde se intercambia el CMP (Hadley et al., 2014). La regulación del transporte del CMP-sia está sujeta a su microambiente, es decir es afectado por factores como la temperatura y el gradiente de concentración del sustrato (Abeijon et al., 1997).

Lo que se conoce acerca de la estructura-función del CST está basado en predicciones computacionales, experimentos de mutagénesis, estudios de marcado de epítomos, quimeras con el hUGT1 (isoforma de *splicing* del transportador humano de UDP-galactosa), mutaciones sitio-puntual, análisis de hidrofobicidad, marcaje con hemaglutininas, estudios *in vivo* y análisis filogenéticos; utilizando como modelos de estudio a levaduras, células de ratón y de hámster. Estos reportes experimentales o cambios realizados/analizados en el CST y los efectos observados en el transporte y reconocimiento del CMP-ácido siálico se resumen en la *tabla 1*.

**Tabla 1.** Mutaciones del CST y quimeras *SLC35A1/hUGT1* que alteran el transporte o reconocimiento del CMP-sia.

Residuos	Región	Modelo	Experimento	Efecto	Referencias
G189Q	TMD6	CHO- <i>wt</i> , Lec2	Mutagénesis sitio dirigido	Reducción de la actividad	(Eckhardt et al., 1998)
G189I	TMD6	CHO- <i>wt</i> , Lec2	Mutagénesis sitio dirigido	Reducción de la actividad	(Eckhardt et al., 1998)
Y214A	TMD7	Mouse CST y <i>P. Pastoris</i>	Mutagénesis sitio dirigido	Efecto en el reconocimiento CMP-sia	(Eckhardt et al., 1998)
Residuos del TMD 2 y 3	TMD 2 y 3	Quimera hUGT1/ <i>SLC35A1</i>	Complementación génica	Afecta eficiencia del <i>SLC35A1</i>	(Aoki et al., 2003)
Y214G	TMD7	<i>S. Cerevisiae</i>	Quimera hUGT1/ <i>SLC35A1</i>	Pérdida de la actividad <i>SLC35A1</i>	(Aoki et al., 2003)
Pérdida de los últimos 4aa (IIGV)	C-terminal	HeLa	Mutagénesis	Bloquea intercambio RE/Golgi	(Zhao et al., 2006)
G153A, G154I (doble mutante)	TMD5	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Ligera reducción de la actividad	(Lim et al., 2008)
G153I, G154I (doble mutante)	TMD5	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Ligera reducción de la actividad	(Lim et al., 2008)

G189A, G192A (doble mutante)	TMD6	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Reducción de la actividad	(Lim et al., 2008)
G256I, G257I (doble mutante)	TMD8	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Reducción de la actividad	(Lim et al., 2008)
G256A, G257A	TMD8	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Reducción de la actividad	(Lim et al., 2008)
G177A, G179A (doble mutante)	TMD8	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Ligera reducción de la actividad	(Lim et al., 2008)
G177I, G179I (doble mutante)	TMD8	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Reducción de la actividad	(Lim et al., 2008)
L112G, D113G (doble mutante)	3° Loop	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Inactivación total del <i>SLC35A1</i>	(Chan et al., 2010)
CST-GFP4	3° Loop	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Inactivación total del <i>SLC35A1</i>	(Chan et al., 2010; Eckhardt et al., 1999)
CST-GFP8	7° Loop	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Inactivación total del <i>SLC35A1</i>	(Chan et al., 2010; Eckhardt et al., 1999)
CST-GFP10	8° Loop	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Inactivación total del <i>SLC35A1</i>	(Chan et al., 2010; Eckhardt et al., 1999)
<sup>236</sup> KGFF <sup>239</sup> a <sup>236</sup> GGG <sup>239</sup>	8° Loop	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Inactivación total del <i>SLC35A1</i>	(Chan et al., 2010)
L136G	4° Loop	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Esencial en la actividad del <i>SLC35A1</i>	(Chan et al., 2010)
<sup>267</sup> TDNI <sup>270</sup> a <sup>267</sup> GGGG <sup>270</sup>	8° Loop	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Inactivación total del <i>SLC35A1</i>	(Chan et al., 2010)
I270G	8° Loop	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Actividad del transporte parcialmente reducida	(Chan et al., 2010)
I270W	8° Loop	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Actividad del transporte parcialmente reducida	(Chan et al., 2010)
K272A	8° Loop	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Inactivación completa del transporte	(Chan et al., 2010)
K272G	8° Loop	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Inactivación completa del transporte	(Chan et al., 2010)

K272H	8° Loop	Células CHO MAR-11	Co-transfección	Inactivación completa del transporte	(Chan et al., 2010)
S216F	TMD7	Quimera hUGT1/ SLC35A1	Complementación génica	Pérdida de la actividad SLC35A1	(Takeshima-Futagami et al., 2012)
Residuos del TMD7	TMD7	Quimera hUGT1/ SLC35A1	Complementación génica	Pierde especificidad de sustrato	(Takeshima-Futagami et al., 2012)
K65A	2° Loop	<i>P. Pastoris</i>	Mutagénesis sitio dirigido	Reconocimiento CMP-sia	(Maggioni et al., 2013)
C16A	TMD1	<i>P. Pastoris</i>	Mutagénesis sitio dirigido	Especificidad del reconocimiento del sustrato	(Maggioni et al., 2013)
H101Q	TMD3	Paciente con discapacidad intelectual	Mutación natural	Reducción de un 50% de la actividad del SLC35A1	(Mohamed et al., 2013)

Modificado de: Hadley, B., Maggioni, A., Ashikov, A., Day, C. J., Haselhorst, T., & Tiralongo, J. (2014). Structure and function of nucleotide sugar transporters: current progress. *Computational and structural biotechnology journal*, 10(16), 23-32.

En el año 2019, se reportó la primer estructura de cristal de un NST perteneciente al CST de *Mus musculus* (mCST), permitiendo proponer un mecanismo general de transporte, así como la explicación de su funcionalidad como un sistema antiportador y el fenómeno de trans-estimulación por parte del sustrato CMP-ácido siálico (Ahuja & Whorton, 2019). El mCST conserva un porcentaje de homología del 91% respecto al hCST y la resolución del cristal ha sido de gran utilidad para obtener modelos por homología del hCST (Ury et al., 2021).

El estudio del CST es de gran relevancia debido a la importancia del residuo de ácido siálico en diversos procesos celulares como se explica con más detalle en la sección 3.1, así como al estudio de enfermedades relacionadas con mutaciones del SLC35A1 como el SLC35A1-CDG.

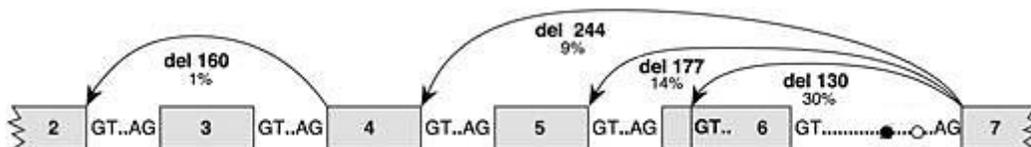
## 2.2 Isoformas del Transportador de CMP-ácido siálico

El gen SLC35A1 presenta 4 isoformas de *splicing* alternativo adicionales a la isoforma *wt*, *tabla 2*. La caracterización y porcentaje de expresión de cada una se obtuvo mediante clonación de los transcritos partiendo de muestras de ADNc (Martinez-Duncker et al., 2005).

**Tabla 2.** Isoformas de *splicing* del *SLC35A1*.

Isoforma	Aparición	Empalmes alternativos
Isoforma <i>wt</i>	47%	8 exones.
del130	29%	Eliminación parcial de 130 pb del exón 6.
del177	14%	Eliminación de 177 pb correspondientes al exón 6.
del244	9%	Eliminación parcial de 244 pb correspondiente a los exones 5 y 6.
del290	1%	Eliminación parcial de 130 pb y 160 pb correspondientes a los exones 3 y 6.

La expresión endógena de las isoformas de *splicing* del *SLC35A1* se debe a la presencia de sitios de *splicing* donadores GT y aceptores AG (figura 3), los cuales se presentan en la mayoría de los genes eucariotas (Burset et al., 2000).



**Figura 3.** El *splicing* alternativo del pre-ARNm en los sitios GT...AG genera las isoformas del *SLC35A1*. Modificado de: Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP–sialic acid transporter, Martinez-Duncker et al., 2005.

Los mecanismos de *splicing* alternativo ocurren en la célula de manera natural como un mecanismo de regulación de la expresión. Más del 90% de los genes eucariotes presentan este tipo de *splicing*, donde se producen múltiples isoformas de una proteína a partir de una sola hebra de ARNm. Las isoformas que se generan pueden cumplir diferentes funciones dentro de la célula, entre ellas, reducir la expresión de un transcrito a través de codones de paro prematuros (Petasny et al., 2021).

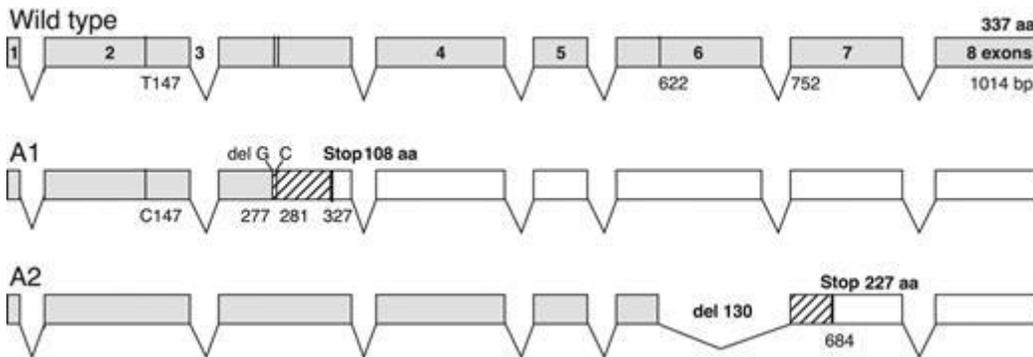
### 2.2.1 Isoforma del130 del *SLC35A1*

La caracterización de las isoformas de *splicing* del *SLC35A1* fue reportada durante el análisis molecular de las muestras del primer paciente con *SLC35A1*-CDG, un trastorno congénito de la glicosilación (CDG) provocado por mutaciones en el gen *SLC35A1*. El primer paciente reportado en el mundo con este CDG fue un niño de 3 meses que presentaba un cuadro clínico caracterizado por macrotrombocitopenia,

neutropenia y falta completa del antígeno sialil-Le<sup>x</sup> en células polimorfonucleares, debido a la inactivación total de ambos alelos del gen SLC35A1.

En el alelo A1 se presentó una mutación heterocigota que provocaba una sustitución de una timina por una citosina en la posición 147 (147T>C). Dicha mutación no provocaba cambio en la traducción de la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, en este mismo alelo se presentaron también 2 microdeleciones de G277 y C281 que generaron un desplazamiento del marco de lectura en la posición 227 y la aparición de un codón de paro prematuro en la posición 327 ([AJ810302](#)).

En el alelo A2, se presentó la eliminación parcial de 130 pb del exón 6, generando un desplazamiento del marco de lectura y un codón de paro prematuro en la posición 684, *figura 4*. Este alelo codifica la isoforma del130 del SLC35A1 ([AJ810303](#)), la cual se presenta en un 29% de forma natural en personas sanas y es generada por la presencia de un sitio de *splicing* donador GT a un sitio aceptor AG (Martinez-Duncker et al., 2005).



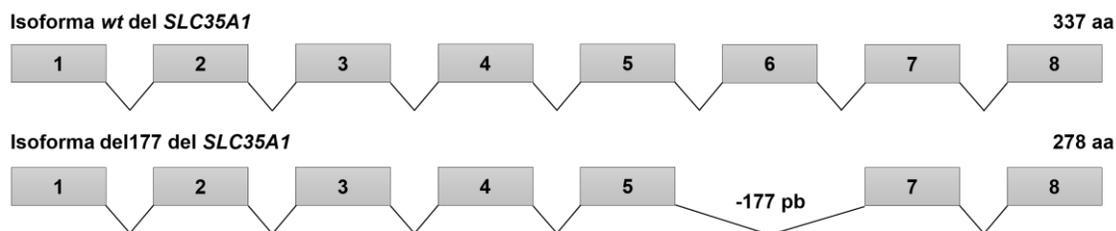
**Figura 4. Alelos del primer paciente con SLC35A1-CDG.** El alelo A1 presentó una sustitución de 147T>C y 2 microdeleciones (G277 y C281) que generaron un cambio en el marco de lectura y la aparición de un codón de parada prematuro en la posición 327. El alelo A2 presentó eliminación de 130 pb que incluye dos tercios del exón 6 y genera desplazamiento del marco de lectura abierto y un codón de paro prematuro en la posición 684. Este transcrito codifica para una proteína trunca sin extremo carboxilo terminal, región esencial para la localización de la proteína CST en Golgi. Modificado de: Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP–sialic acid transporter, (Martinez-Duncker et al., 2005).

El codón de paro prematuro de la isoforma del130 genera un polipéptido trunco, de aproximadamente dos terceras partes de la longitud de la isoforma *wt*, que no cuenta con el tetrapéptido IIGV para su translocación al Golgi donde debería realizar su función (Zhao et al., 2006).

Por lo anterior, y con base en lo observado en la deficiencia de transporte que se observó en el primer paciente del SLC35A1-CDG, así como estudios de complementación genética en el modelo CHO-Lec2 (Martinez-Duncker et al., 2005) se determinó que la isoforma del130 no es funcional.

### 2.2.2 Isoforma del177 del SLC35A1

Las isoformas del130, del244 y del290 presentan codones de paro prematuro en los exones 6, 7 y 4 respectivamente. En cambio, la isoforma del177 no presenta codones de paro prematuro, a pesar de la eliminación de 177 pb que codifican para 59 aa que corresponden al total del exón 6. Esta isoforma es la mayor interés porque es la única que conserva los últimos 4 aa (IIVG) presentes en el extremo carboxilo terminal reportados como indispensables para la retención de la proteína en el Golgi, *figura 5* (Salinas-Marín et al., 2016; Zhao et al., 2006).



**Figura 5. Isoformas wt y del177 del SLC35A1.** La isoforma wt del SLC35A1 presenta 8 exones que codifican para 337 aa, mientras que la isoforma del177 presenta eliminación total del exón 6 que codifican para 59 aa generando una proteína de 278 aa. Modificado de: A functional splice variant of the human Golgi CMP-sialic acid transporter, Salinas et. al., 2016.

La funcionalidad de la isoforma del177 humana (hdel177) se analizó mediante su expresión la línea celular Lec2 (células mutantes de hámster con un fenotipo asialo o sin transporte de CMP-ácido siálico) donde se observó la incorporación *de novo* de ácido siálico.

La funcionalidad de la isoforma quedó también corroborada por citometría de flujo utilizando lectinas bionitiladas como WGA (*wheat germ agglutinin*) que reconoce residuos de ácido siálico y PNA (*peanut agglutinin*) que reconoce residuos de galactosa. En este reporte se observó que las células transfectadas con construcciones de la isoforma hdel177 presentaban un patrón de unión similar a las

células CHO (células de ovario de hámster chino) y a las células transfectadas con la isoforma *wt* del *SLC35A1* (Salinas-Marín et al., 2016).

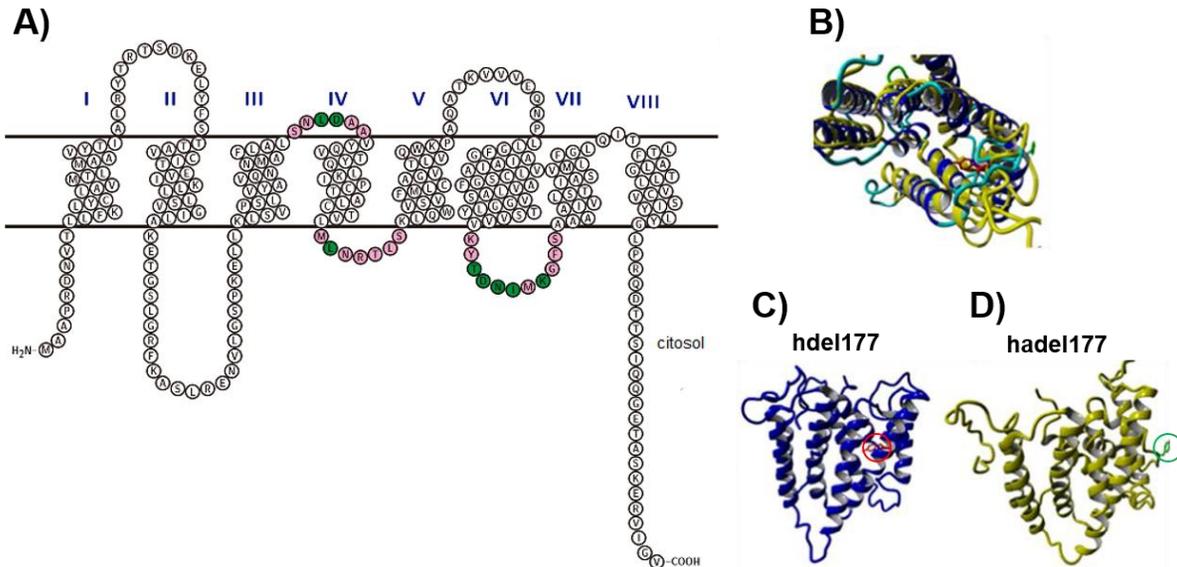
Investigaciones previas realizadas por Eckhardt y colaboradores identificaron la expresión de la isoforma del177 en la línea celular mutante de hámster denominada Lec2 y la reportaron como la causante del fenotipo asialo de estas células. La expresión de la isoforma del177 de hámster (*hadel177*) en células mutantes denominadas CHO 8G8 (deficiente en el transporte de CMP-sia), no generó la expresión superficial de ácido siálico o polímeros de ácido siálico denominados ácido polisálico (PSA), indicando que dicha isoforma presente en hámster no es funcional (Eckhardt et al., 1998).

Existen dos modelos para explicar la funcionalidad de la isoforma *hdel177* (278 aa) y la no funcionalidad de la isoforma *hadel177* (277aa). La propuesta del equipo de Salinas-Marín explica que la diferencia en la funcionalidad podría residir en un cambio de configuración de 10 a 8 TMDs, como resultado de la pérdida de 59 aa en la posición 192-251aa.

La pérdida de 59 aa genera una proteína fusionada entre los aminoácidos restantes del TMD6 y TMD8 formando un nuevo TMD6 con 31 aminoácidos, *figura 6A*. Dentro de los residuos de aa que se pierden se encuentran los aminoácidos Tyr214, Ser216 y 236KGFF239 reportados como indispensables para llevar a cabo el transporte. Esta teoría propone que entre los 23 aminoácidos que diferencian a las isoformas del177 de hámster y humano ocurre un reemplazo entre ellos para satisfacer la función crítica de estos aminoácidos (Salinas-Marín et al., 2016).

Una segunda teoría, fue propuesta por B. Hadley y colaboradores en el año 2019 basados en los hallazgos del equipo de Salinas-Marín. Mediante el software SPARKS-X realizaron alineamientos de las isoformas *hadel177* y *hdel177* utilizando como templado el cristal Vrg-4 (estructura cristalina del transportador de GDP-manosa de *Saccharomyces cerevisiae* y generando un modelo que resulta en una proteína con 10 TMD típicos del *SLC35A1*, con una topología similar a la isoforma *wt* pero con el dominio TMD7 y 9  $\alpha$  hélices mucho más cortas.

Además, se proponen que el residuo Tyr207 reemplaza a la Tyr214 en la isoforma hdel177, residuo que se ha reportado esencial en el transporte. Por otra parte, estos autores reportan que en el modelo de la isoforma hadel177, el residuo Tyr207 no se orienta hacia el sitio activo (*figura 6D*), por lo que la orientación Tyr207 sería responsable de la funcionalidad de la hdel177 (*figura 6C*) y de la no funcionalidad de la hadel177, *figura 6B-D*.



**Figura 6. Modelos de la isoforma del177.** A) Modelo topológico de la isoforma del177 humana propuesta por Salinas-Marín y colaboradores. B-D) Modelos cristalográficos basados en el cristal Vgr4 propuesto por Hadley y colaboradores. Se señala con un círculo la posición de 207 en los modelos propuestos. B) Alineamientos de los modelos de las isoformas del177 de humano y hámster. C) Modelo de la isoforma del177 de humana, se muestra la tirosina 207 orientada hacia el interior (sitio activo) de la proteína D) Modelo de la isoforma del177 de hámster, se muestra la tirosina 207 orientada hacia el exterior de la proteína.

### 2.2.3 Isoformas reportadas en mamíferos.

Los CST de humano, *Crisetulus griseus* (hámster), *Canis lupus familiaris* (perro) y *Mus musculus* (ratón) han sido clonados y expresados en diferentes modelos (Ahuja & Whorton, 2019; Eckhardt et al., 1996; Ishida et al., 1996; Olczak & Guillen, 2006) sin embargo, no existe evidencia experimental de la presencia de isoformas de *splicing* alternativo del CST de perro y ratón.

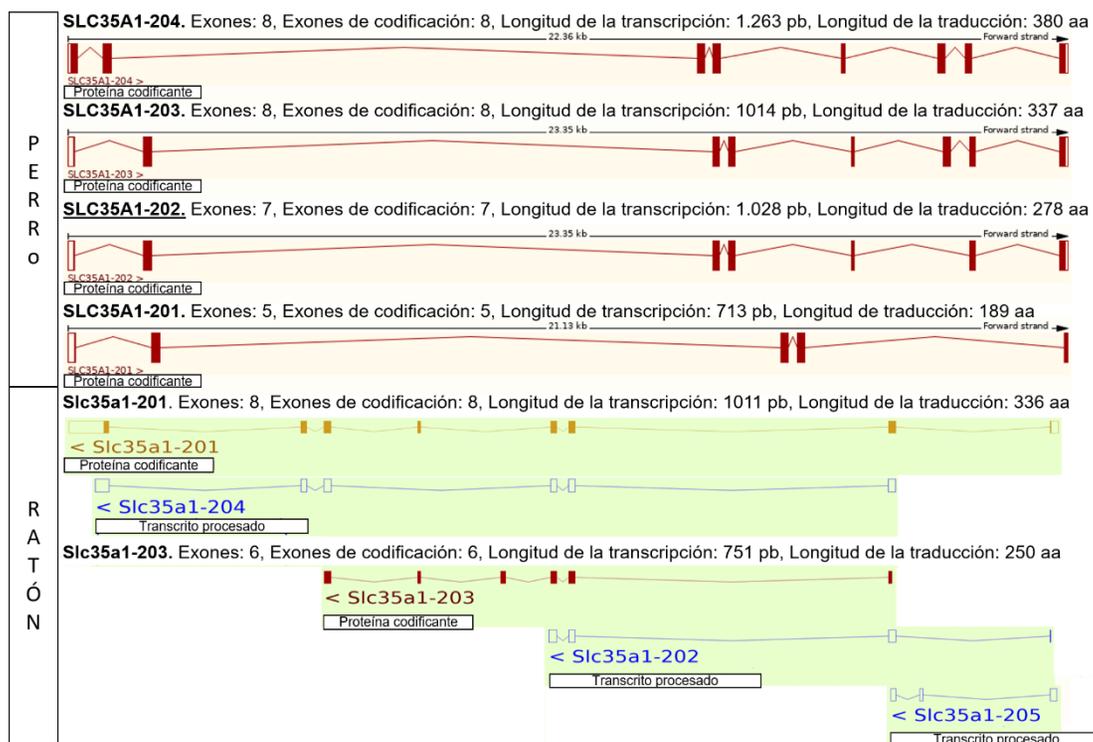
La anotación genómica es un método para predecir teóricamente las isoformas de *splicing* alternativo de un gen con sus regiones UTR, así como regiones de ARN no

codificante, utilizado para generar bases de datos (Yandell & Ence, 2012). En la *tabla 3* se describen las isoformas teóricas calculadas para perro y ratón mediante este método, *figura 7*.

**Tabla 3.** Isoformas de *splicing* teóricas reportadas en ratón y perro.

Nombre	Referencia	Especie	Transcrito	aa
SLC35A1-204	<a href="#">ENSCAFT00000085546.1</a>	Perro	1263 pb	380
SLC35A1-203	<a href="#">ENSCAFT00000004925.4</a>		1014 pb	337
SLC35A1-202	<a href="#">ENSCAFT00000092526.1</a>		1028 pb	278
SLC35A1-201	<a href="#">ENSCAFT00000085668.1</a>		713 pb	189
Slc35a1-201	<a href="#">ENSMUST00000029970.14</a>	Ratón	2039 pb	336
Slc35a1-202	<a href="#">ENSMUST00000126033.2</a>		751 pb	250
Slc35a1-203	<a href="#">ENSMUST00000151549.8</a>		1141 pb	-
Slc35a1-204	<a href="#">ENSMUST00000124456.2</a>		554 pb	-
Slc35a1-205	<a href="#">ENSMUST00000154020.2</a>		358 pb	-

Las 4 isoformas teóricas del *slc35a1* de perro codifican para proteínas de diferentes longitudes, mientras que en el caso de ratón sólo 2 de las 5 isoformas teóricas codificarían para una proteína, el resto de corresponden a transcritos de ARN no codificante, *figura 7*.



**Figura 7.** Isoformas teóricas reportadas en mamíferos no estudiados.

### 3. MARCO TEÓRICO

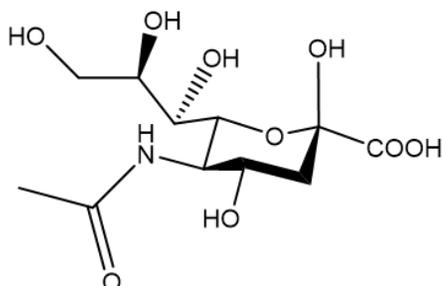
#### 3.1 Ácido siálico

Los ácidos siálicos (sias) son una familia de azúcares  $\alpha$ -ceto amino con un esqueleto glucídico de 9 carbonos de la cual se conocen más de 50 derivados, cuya abundancia varía según la especie. La mayor variación estructural de los ácidos siálicos se encuentra en el carbono 5, que puede sustituirse con un grupo acetamido, hidroxiacetamido o hidroxilo.

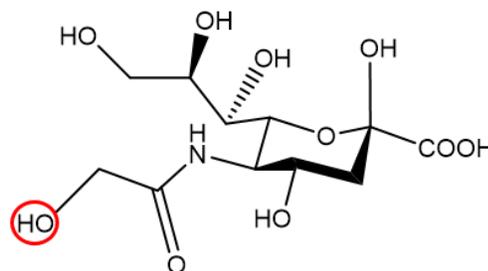
Existen 3 derivados de ácido siálico que se consideran como los más representativos, en los seres humanos el más expresado es el ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), en otros mamíferos, hongos y protozoarios se encuentra el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), mientras que en organismos acuáticos y bacterias se expresa ácido desaminoneuramínico o Kdn (Münster-Kühnel et al., 2004)

La diferencia estructural entre el ácido siálico (sia) expresado fisiológicamente por los humanos Neu5Ac y el expresado por otros mamíferos Neu5Gc, reside en la hidroxilación del grupo acetilo del carbono 5 del Neu5Gc, *figura 8*. La adición del grupo hidroxilo es catalizada por la enzima citidina ácido monofosfo-N-acetilneuramínico hidroxilasa codificada por el gen CMAH. Dicha enzima se encuentra inactiva en humanos debido a la eliminación de un exón crítico de 92 pares de bases en dicho gen (Varki, 2001).

**Ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac)**



**Ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc)**



**Figura 8. Ácidos siálicos presentes en la superficie celular de los mamíferos.** El Neu5Ac tiene grupo N- acetilo en el quinto átomo de carbono (C5), la diferencia estructural que mantiene con el Neu5Gc radica en el grupo hidroxilo ubicado en el C2 del grupo N-acetilo y esta se debe a que en el ser humano se ha perdido la capacidad de codificar a la enzima CMAH, encargada de adicionar el grupo hidróxilo en dicha posición.

Los humanos no biosintetizan las estructuras que contienen Neu5Gc, sin embargo este derivado se ha detectado en tejidos humanos proveniente principalmente de la ingesta de carne roja. Se ha propuesto que la incorporación de este derivado activa anticuerpos anti-Neu5Gc que provocan una inflamación crónica, promoviendo el desarrollo de enfermedades como cáncer, aterosclerosis y diabetes tipo 2, (Varki, 2010).

Los sias se sitúan en la posición terminal de las cadenas de glicanos, y debido a su carácter hidrofílico y carga negativa proporcionada por el grupo  $-\text{CO}_2\text{H}$ , interactúa fuertemente con otras moléculas (Ghosh, 2020). El sia está involucrado en procesos como la interacción célula-célula, célula-matriz extracelular, la embriogénesis, la progresión de tumores, la adhesión neural, infecciones por virus, así como la regulación de la estabilidad biológica de las glicoproteínas (Schwarzkopf et al., 2002).

Una expresión aberrante del ácido se ha relacionado con enfermedades metabólicas, cardiovasculares, trastornos inmunológicos y enfermedades neurodegenerativas (Zhang et al., 2018). Por lo que su regulación es vital para el correcto funcionamiento de la célula.

### **3.2 El proceso de sialilación celular**

La biosíntesis del sia es precursora del proceso de sialilación celular, que es el proceso mediante el cual el sia se adiciona a las cadenas de glicanos en diferentes enlaces. La biosíntesis del sia comienza con la obtención de N-acetilmanosamina (ManNAc), la cual puede provenir de la conversión de la UDP-GlcNAc por la acción de la enzima UDP-GlcNAc-2-epimerasa o de la epimerización de GlcNAc por acción de la enzima GlcNAc-2-epimerasa, siendo este el primero de los pasos comprometidos de la biosíntesis.

El segundo paso comprometido de la biosíntesis ocurre con la obtención de ManNAc-6-P a través de la fosforilación de la ManNAc por la enzima bifuncional UDP-GlcNAc 2-epimerasa/ManNAc-6-quinasa (GNE). Posteriormente la ManNAc-6-P se condensa con una molécula de fosfoenolpiruvato mediante una enzima Neu5Ac 9-fosfato sintasa

(NAPS) para producir Neu5Ac-9-P, que finalmente se desfosforila para formar Neu5Ac por Neu5Ac-9-fosfato fosfatasa (NANP) (Jacobs et al., 2001; Kooner et al., 2019).

El Neu5Ac sintetizado en el citosol se transfiere al núcleo y se usa para formar CMP-Neu5Ac, la forma activada de Neu5Ac, por la CMP-ácido siálico sintetasa (CSS). El CMP-Neu5Gc es formado en el citosol a partir de CMP-Neu5Ac, mediante la enzima hidroxilasa CMAH. Finalmente el CMP-sia se transfiere a Golgi y donde se llevará a cabo su transferencia (Cotton et al., 2014).

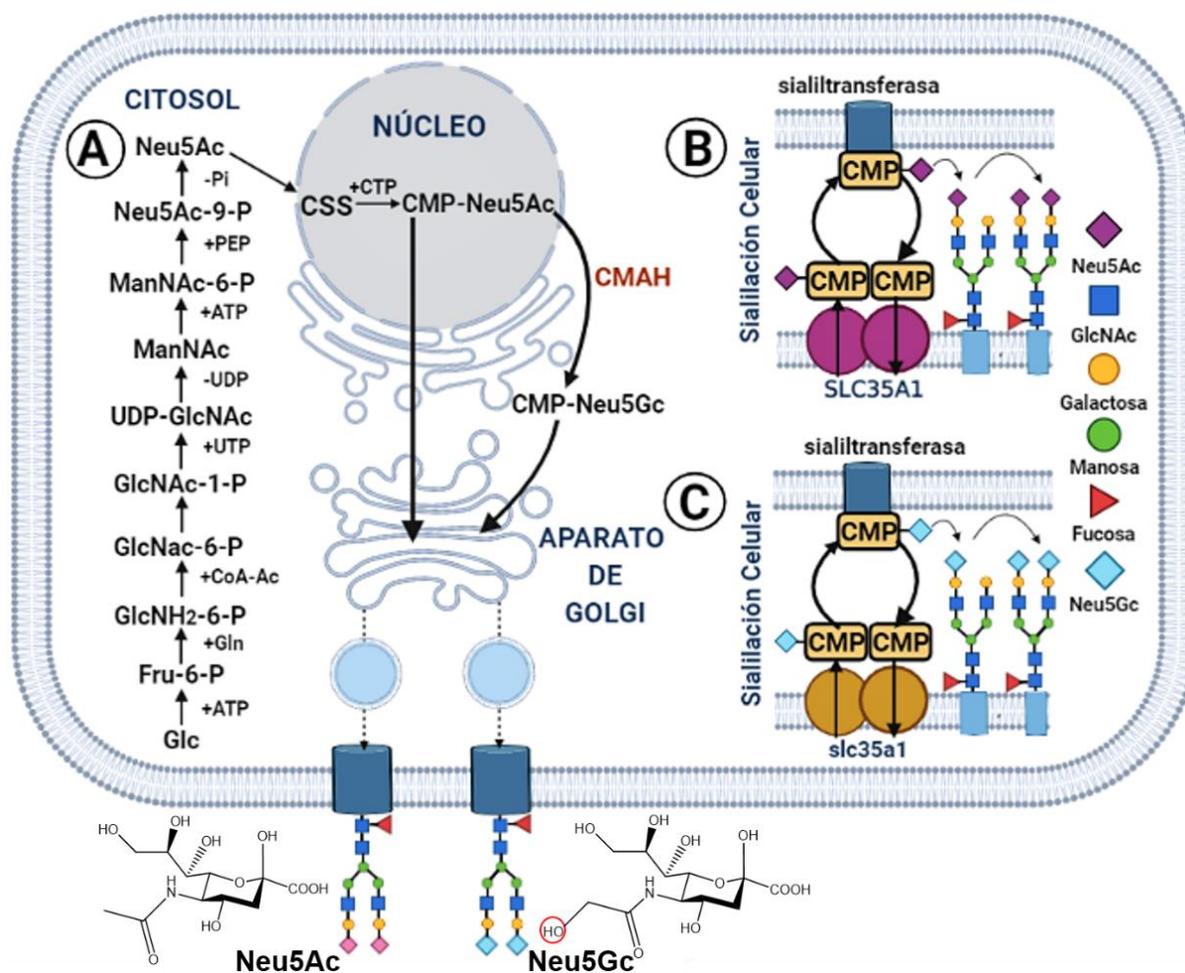
Una vez que se ha completado la biosíntesis del CMP-sia se da inicio al proceso de sialilación celular. La maquinaria de sialilación celular está compuesta por 3 elementos: el CMP-sia, el transportador de CMP-ácido siálico (CST) y las sialiltransferasas.

En un primer paso el CST es el encargado de translocar el CMP-ácido siálico hacia el lumen de la cisterna *trans*-Golgi a través de un mecanismo antiportador, donde una familia de enzimas conocidas como sialiltransferasas transfieren el sia a los glicoconjugados en enlaces que varían según el tipo de sialiltransferasa encargada y el tipo de sustrato aceptor (Martinez-Duncker et al., 2011).

Este proceso enzimático es llevado a cabo por más de 20 sialiltransferasas residentes en Golgi que unen ácido siálico mediante su C-2 a residuos de glicanos. Si la unión del sia ocurre en un residuo de galactosa terminal (Gal) se genera un enlace  $\alpha$ 2,6 (ST6Gal I, II) o  $\alpha$ 2,3 (ST3Gal I-VI). También puede unirse a residuos de N-acetilgalactosamina mediante el C-6 a través de un enlace  $\alpha$ 2,6 (ST6GalNAc I-VI), o a otro residuo de sia como un homopolímero mediante un enlace  $\alpha$ 2,8 (Büll et al., 2014). En este proceso se transfiere el ácido siálico al glicoconjugado. Finalmente el CMP liberado es transportado fuera del Golgi por el mismo transportador de CMP-sia, *figura 9*.

La ausencia o presencia de ácido siálico, así como el tipo de enlace formado en los glicoconjugados ha permitido a la maquinaria celular realizar entre otras funciones el reconocimiento que permiten la unión u obstaculización de un ligando en el glicoconjugado, además de otros comportamientos moleculares interesantes como

como el comportamiento célula-célula y célula-matriz, que pueden ser el caso de estudio para algunas patologías (Martinez-Duncker et al., 2011).



**Figura 9. Biosíntesis del ácido siálico y proceso de sialilación celular.** En A se observa la biosíntesis del Neu5Ac y del Neu5Gc. La biosíntesis se deriva de la condensación de ManNAc-6-P con fosfoenolpiruvato (PEP) que produce Neu5Ac-9-P. Este último se desfosforila mediante una fosfatasa específica para liberar Neu5Ac libre en el citoplasma. El Neu5Ac es transferido al núcleo y se usa para formar CMP-Neu5Ac, reacción catalizada por la enzima CMP-ácido siáico sintetasa (CSS). Adicionalmente, se muestran los pasos adicionales para la biosíntesis de Neu5Gc que implican modificaciones como la hidroxilación efectuada por la enzima CMAH en el grupo N-acetilo de CMP-Neu5Ac para generar CMP-Neu5Gc, lo cual ocurre en el citosol. El gen que codifica para la enzima CMAH está inactivo en humanos y esta es la razón de que las células humanas no biosintetizan Neu5Gc como otros mamíferos. En B y C se observa los mecanismos de sialilación llevados a cabo en medial *trans*-Golgi del Neu5Ac y en el de Neu5Gc respectivamente. Adicionalmente se observa el transporte vesicular hacia la superficie celular del Neu5Ac y Neu5Gc. Fuentes: (Jacobs et al., 2001; Kooner et al., 2019).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general:

Caracterizar molecularmente el transportador de CMP-ácido siálico de *Canis lupus familiaris* y *Mus musculus*.

### 4.2 Objetivos específicos:

1. Identificar la presencia de isoformas de *splicing* alternativo del transportador de CMP-ácido siálico de *Canis lupus familiaris* y *Mus musculus*.
2. Clonar la isoforma silvestre y otras isoformas de *splicing* del transportador de CMP-ácido siálico de *Canis lupus familiaris* y *Mus musculus*.
3. Expresar las isoformas del *slc35a1* de *Canis lupus familiaris* y *Mus musculus* en el modelo de complementación genética CHO-Lec2 y analizar su expresión mediante citometría de flujo.

## **5. HIPÓTESIS**

El transportador de CMP-ácido siálico expresado en *Canis lupus familiaris* y *Mus musculus* presenta isoformas de *splicing* alternativo como el transportador de CMP-ácido siálico humano.

## 6. JUSTIFICACIÓN

La topología del transportador de CMP-ácido siálico humano no ha sido descrita; comprender la estructura-función de esta proteína, así como el mecanismo de regulación de *splicing* alterno permitiría evaluar el uso de bioterapéuticos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el transporte deficiente mediado por el CST. La identificación y caracterización de la funcionalidad de isoformas expresada en mamíferos que aún no han sido estudiados aportaría información acerca del funcionamiento del mismo.

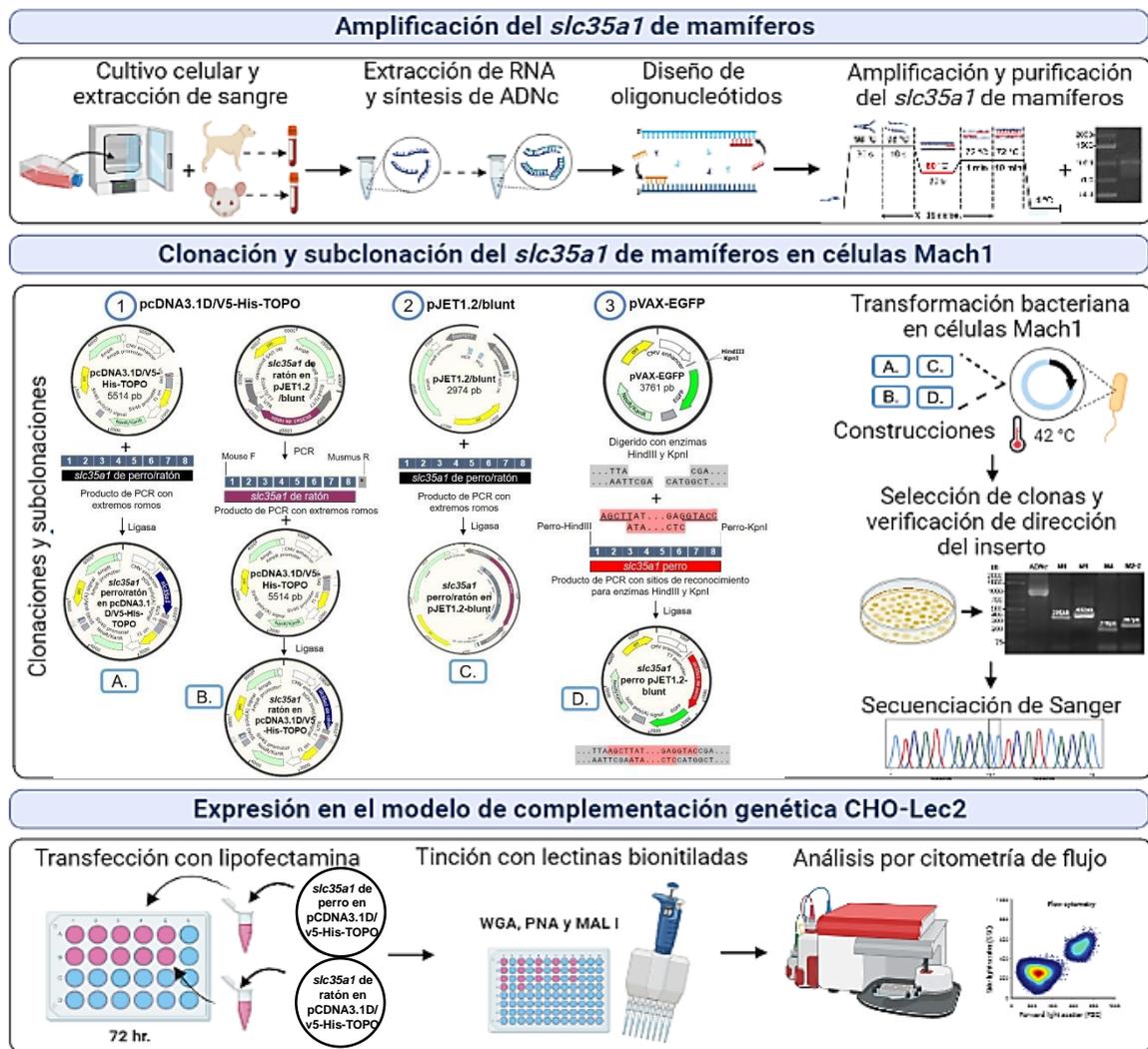
El CST de los mamíferos analizados en este trabajo *Canis lupus familiaris* y *Mus musculus* presentan un alto porcentaje de 94% y 91% de homología con respecto al CST humano (*tabla 4*). Lo anterior, posiciona al CST de ambos mamíferos de interés para estudiar el proceso de *splicing* alternativo y proponer líneas celulares de los mismos como posibles modelos en la producción de bioterapéuticos glicosilados y futuras terapias relacionadas al incorrecto funcionamiento de esta proteína.

**Tabla 4.** Matriz de identidad de mamíferos respecto al *SLC35A1*.

Especie	Aminoácidos				Homología
	Conservados	Muy Similares	Poco Similares	No conservados	
<b><i>Canis lupus familiaris</i></b>	319	12	3	3	<b>94%</b>
<b><i>Mus musculus</i></b>	307	18	3	9	<b>91%</b>

## 7. METODOLOGÍA

El análisis molecular de los transportadores de CMP-ácido siálico de *Canis lupus familiaris* (perro) y *Mus musculus* (ratón) fue realizado mediante la clonación de ambos genes en células *E. coli* Mach One, y su posterior expresión en el modelo de complementación genética CHO-Lec2. El fenotipo celular fue analizado por citometría de flujo utilizando lectinas biotinizadas y su posterior marcaje con estreptavidina acoplada al fluorocromo Alexa-Flúor 647, figura 10.



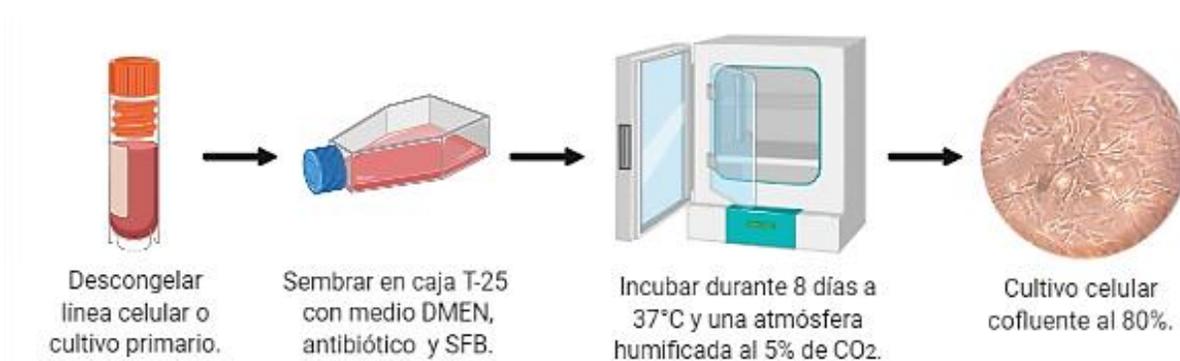
**Figura 10. Esquema general de la metodología experimental seguida.** El ADNc de perro y ratón se obtuvo a partir de ARN extraído de cultivos celulares y sangre de los mamíferos. A partir de ADNc se realizó la amplificación por PCR del *slc35a1* de ambos mamíferos y se purificaron los fragmentos. El inserto *slc35a1* de los mamíferos fue clonado por diferentes estrategias en los vectores 1-4. Las clonas positivas fueron analizadas y secuenciadas. Finalmente, las construcciones *slc35a1*/pcDNA3.1D/V5-His-TOPO fueron transfectadas en células Lec2 y se analizaron por citometría de flujo.

## 7.1 Cultivo Celular

En este trabajo se realizó el cultivo de tres líneas celulares y un cultivo primario de fibroblastos de ratón. La línea celular MDCK (células de riñón canino Madin-Darby) fue donada por la Dra. Vanesa López Guerrero de la Facultad de Medicina y Nutrición de la UAEM. La línea celular CHO (células de ovario de hámster chino) se adquirió mediante la donación de la Dra. Laura Palomares Aguilera del Instituto de Biotecnología de la UNAM. La línea celular Lec2 (mutantes derivadas de CHO) (ATCC® CRL-1736™, Manassas, VA) fue adquirida de la American Type Culture Collection. El cultivo primario de fibroblastos de ratón fue donado por el Laboratorio Nacional para la Producción y Análisis de Moléculas y Medicamentos Biotecnológicos (LAMMB) del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM.

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en cajas T-25 con 5 mL de medio DMEM (12100046, Gibco™) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina (15140148, Gibco™) y 10% de SFB (16000044, Gibco™). El cultivo primario de fibroblastos de ratón fue cultivado en cajas T-25 con 5 mL de medio DMEM suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina y 20% de SFB, *figura 11*.

Las condiciones de crecimiento óptimo de las líneas celulares se realizaron en una incubadora (Thermo Fisher Scientific) a 37 °C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. El crecimiento celular fue monitoreado con un microscopio invertido binocular (11722298, AE 2000 Motic™).



**Figura 11.** Representación de la metodología del cultivo de las líneas celulares (MDCK, CHO, Lec2 y fibroblastos de ratón).

## 7.2 Extracción de ARN de perro y ratón

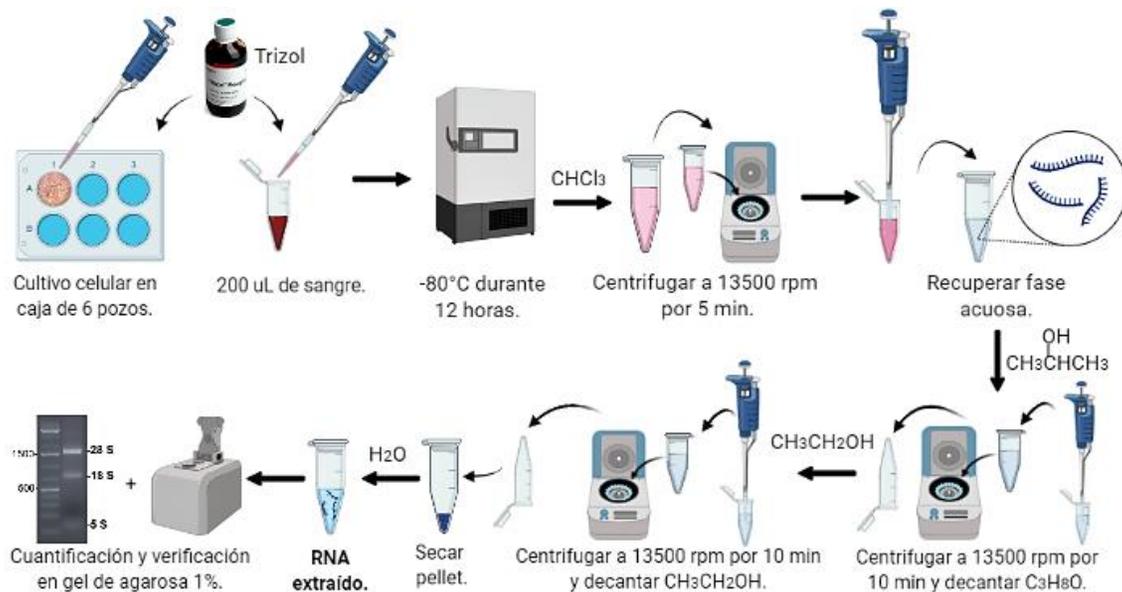
El ARN de los mamíferos se obtuvo a partir de muestras de 200 µL de sangre extraída de un espécimen común de *Canis lupus familiaris* y de la cepa CD1 wt de *Mus musculus* respectivamente, así como de los cultivos de células previamente mencionados. La línea celular MDCK y el cultivo primario de fibroblastos de ratón se cultivaron en cajas de 6 pozos hasta obtener una confluencia aproximada del 80%.

El ARN de ambas especies fue obtenido añadiendo 1 mL de Trizol (15596018, Thermo Fisher Scientific) a cada pozo de células cultivadas o volumen de sangre mencionado anteriormente. El volumen total se transfirió a un microtubo de 1.5 mL para inmediatamente ser congelado a -80 °C por 12 h. Una vez transcurrido el tiempo indicado, las muestras se descongelaron a TA, se les adicionaron 200 µL de cloroformo (9180-02, J.T.Baker™) frío y se agitaron vigorosamente durante 15 s.

Las muestras se incubaron durante 2 min a TA y luego se centrifugaron en una microcentrífuga (Z300, Labnet Hermle) a 13500 rpm durante 15 min, a 4 °C. La fase acuosa fue recuperada en microtubos de 1.5 mL y se les adicionó 500 µL de isopropanol (9084-03, J.T.Baker™) frío. Las muestras se incubaron 10 min a TA y se centrifugaron a 13500 rpm durante 10 min, a 4 °C. El isopropanol fue decantado y se agregó al pellet 1 mL de etanol al 75% (107, Vetec Química Fina LTDA) frío y se mezcló brevemente con un vortex hasta levantar el pellet. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13500 rpm durante 10 min a 4 °C.

Finalmente el etanol fue decantado y se agregó agua libre de ARNasas (W4502, Sigma-Aldrich). Las muestras fueron cuantificadas haciendo uso de un espectrofotómetro Nanodrop (N50 NanoPhotometer, Implement) para la posterior síntesis de ADNc.

Adicionalmente para verificar la integridad del RNA extraído se utilizó un gel de agarosa (MB14402, nzytech) al 1% donde se colocó ARN diluido 1:5 con agua libre de nucleasas (E476-500ML, VWR) el cual se dejó migrar a 70 Volts durante 40 min, *figura 12*.



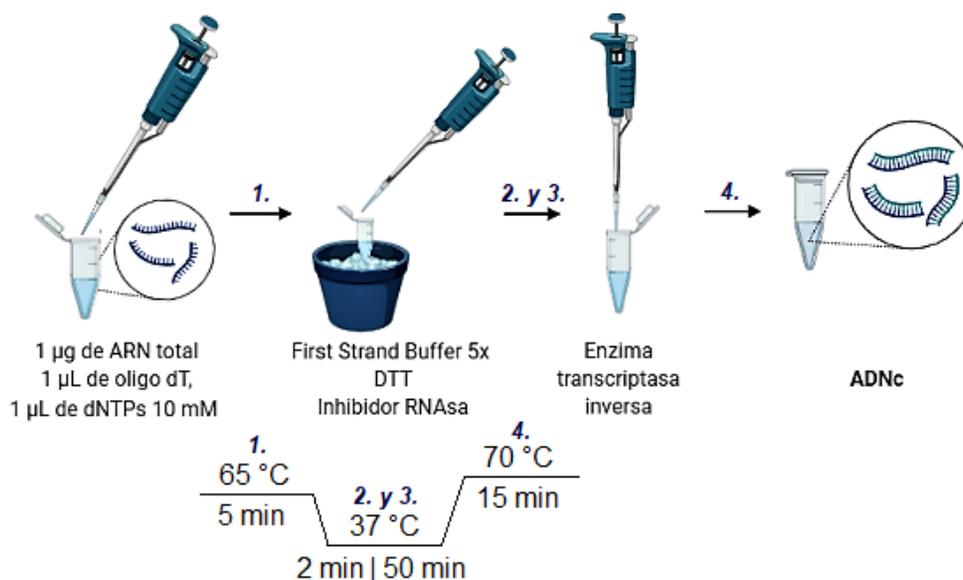
**Figura 12. Representación metodológica de extracción de ARN.** La obtención del ARN de perro y ratón se realizó mediante la adición de trizol a cultivos celulares y muestras de sangre de ambos mamíferos. Una vez añadido, se procedió a congelar las muestras -80 °C por 12 h. Posteriormente, se procedió a la precipitación del ARN total mediante el uso de disolventes como cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), isopropanol (CH<sub>3</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>) y etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH). Finalmente el ARN fue resuspendido en agua libre de RNAsas y se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1%.

### 7.3 Síntesis de ADNc de perro y ratón

La síntesis de ADN complementario (ADNc) de los mamíferos fue realizada a partir de 2 µg de ARN total, 1 µL de oligo dT, (SO131, Thermo Fisher Scientific) 1 µL de dNTPs 10 mM (00342481, Thermo Fisher Scientific) y agua grado biología molecular (W4502, Sigma Aldrich), que se colocaron en tubos para PCR 0.2 mL.

Las reacciones que se describen a continuación se realizaron en una termocicladora (THERM-1001, Axygen). Los tubos fueron incubados a 65 °C durante 5 min y después en hielo durante 5 min. Al finalizar la incubación se añadió 4 µL de Buffer de primera cadena 5X (proporcionado por el kit 28025013 M-MLV RT, Invitrogen™), 2 µL de DTT 0.1M (incluido en el kit 28025013 M-MLV RT, Invitrogen™) y 1 µL de inhibidor de RNAasa (EO0381, Thermo Fisher Scientific) a cada tubo y se incubaron durante 2 min a 37 °C.

Al terminar la incubación se añadió 1  $\mu$ L de la enzima transcriptasa inversa (28025013 M-MLV RT, Invitrogen™) y se procedió a incubar durante 50 min a 37 °C. Finalmente para inactivar la reacción los tubos fueron incubados 15 min a 75 °C, *figura 13*. El ADNc sintetizado se conservó a -20 °C.



**Figura 13. Representación metodológica de síntesis de ADNc.** El gradiente de temperatura utilizado en la síntesis del ADNc se encuentra descrito en el esquema con la numeración del 1 al 4.

#### 7.4 Diseño de oligonucleótidos y pruebas de gradiente de temperatura

El diseño de oligonucleótidos para amplificar el gen *slc35a1* de perro ([NM\\_001003058.1](#)) y ratón ([NM\\_011895.3](#)) se realizó utilizando secuencias descargadas del National Center of Biotechnology Information (NCBI) con ayuda de la herramienta para diseño de primers SnapGene Viewer.

Los oligos diseñados para amplificar el *slc35a1* (*tabla 5*) de cada especie fueron probados en un gradiente de temperaturas de 55-68 °C, a fin de obtener la temperatura experimental ideal ( $T_m$ ) para la hibridación en la reacción PCR. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en la unidad de Síntesis y Secuenciación del (IBT) de la UNAM, Cuernavaca, Morelos, México.

**Tabla 5.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del *slc35a1* de los mamíferos estudiados.

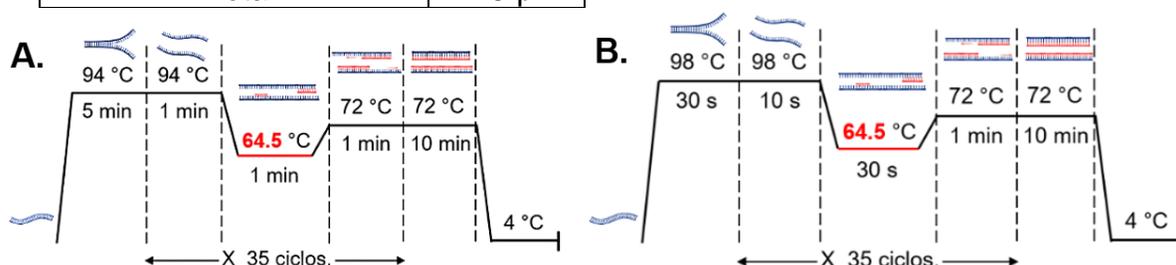
Mamífero	Orientación 5'-3'	Secuencia	Clave	Tm
Perro	Sentido	5'ATGGCTGCCCCAAGAGAAAATG TC 3'	P1-CST-F 2020-4525	64.5 °C
	Antisentido	5'TCATACACCACCAACTCTCTCTT TTG 3'	P1-CST-R 2020-4526	
	Sentido	5'CACCATGGCTGCCCCAAGAG 3'	Canis-CACCF 2021-1557	
	Sentido	5'AAGCTTATGGCTGCCCCAAGAG AAAATGTC 3'	Perro-HindIII 2021-150	
	Antisentido	5'CAAAGAGAGAGTTGGTGGTGT ATGAGGTACC 3'	Perro-KpnI 2021-151	60 °C
	Sentido	5'CCATCTTCCAGGAGCGAGATCC 3'	mGAPDH-S 2011-1301	
	Antisentido	5'GTGAAGACGCCAGTGGACTCC 3'	mGAPDH-AS 2011-1302	
Ratón	Sentido	5'CACCATGGCTCCGGCGAGA 3'	Mouse F 2021-1556	60 °C
	Antisentido	5'ACCATCTGGGGTTGACTTAAGG C 3'	Musmus R 2019-8796	
	Sentido	5'CAGTCCCAGCGTCGTGATTA 3'	mHPRT-sen 2015-2208	
	Antisentido	5'GGCCTCCCATCTCCTTCATG 3'	mHPRT- antisen 2015-2209	

### 7.5 PCR convencional del gen *slc35a1* de los mamíferos estudiados

La amplificación del *slc35a1* de los mamíferos estudiados se realizó como se describe a continuación. La amplificación del gen que codifica para el transportador de CMP-ácido siálico de perro (pCST) se logró a partir de ADNc mediante la enzima Taq Polimerasa (P0404, Thermo Fisher Scientific) y la ADN polimerasa de alta fidelidad *Phusion* (F530S, Thermo Fisher Scientific) utilizando los reactivos y gradientes de temperatura que se describen en la *tabla 6* y *figura 14* respectivamente.

**Tabla 6.** Mezclas de reacción para amplificar el *slc35a1* de perro.

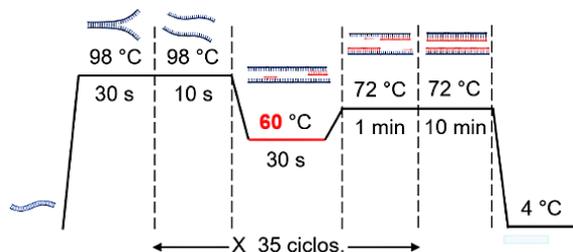
Reactivos	Volumen	Reactivos	Volumen
Agua grado biología molecular.	17.25 $\mu$ L	Agua grado biología molecular.	17.75 $\mu$ L
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> 10x	2.5 $\mu$ L	Buffer HF 10x	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3 $\mu$ L	Canis-CACC F	0.5 $\mu$ L
dNTP's 10 mM	0.5 $\mu$ L	Oligo P1-CST R	0.5 $\mu$ L
Oligo P1-CST-F	0.5 $\mu$ L	dNTP's	0.5 $\mu$ L
Oligo P1-CST R	0.5 $\mu$ L	Taq <i>Phusion</i>	0.25 $\mu$ L
Taq Polimerasa	0.25 $\mu$ L	ADNc perro.	0.5 $\mu$ L
ADNc de perro.	0.5 $\mu$ L	Total	25 $\mu$ L
Total	25 $\mu$ L		

**Figura 14.** Termociclaje para la amplificación del pCST por PCR. A) Gradiente de temperatura utilizado utilizando la enzima Taq Polimerasa y B) la enzima Taq *Phusion*.

La amplificación del gen que codifica para el *slc35a1* de ratón (mCST) se logró a partir de ADNc con la enzima ADN polimerasa de alta fidelidad *Phusion* utilizando los reactivos que se describen en la *tabla 7* y el gradiente de temperaturas indicado en la *figura 15*.

**Tabla 7.** Condiciones para la amplificación del gen *slc35a1* del ratón.

Reactivos	Volumen
Agua grado biología molecular.	17.25 $\mu$ L
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> 10x	2.5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3 $\mu$ L
dNTP's 10 mM	0.5 $\mu$ L
Oligo Mouse F	0.5 $\mu$ L
Oligo Musmus R	0.5 $\mu$ L
Taq Polimerasa	0.25 $\mu$ L
ADNc ratón.	0.5 $\mu$ L
Total	25 $\mu$ L



**Figura 15.** Termociclaje para la amplificación del *s/c35a1* de ratón por PCR.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel al 1.5% de en buffer TAE 1X (ANEXO 11.3) utilizando como marcador de peso molecular la escalera Gene Ruler 1 kb plus (SM1333, Thermo Fisher Scientific). Los geles de agarosa fueron visualizados con un transiluminador de luz UV (UV-Transilumintador, Model E3000, Accuris Instruments).

## 7.6 Purificación de los productos de PCR para clonación mediante el kit GeneJET Gel Extraction

La purificación de los productos de PCR obtenidos con la enzima ADN polimerasa de alta fidelidad *Phusion* se realizó mediante PCR bajo las condiciones que descritas en las *tablas 6 y 7*, utilizando como templado para la reacción 1  $\mu$ L de los productos previamente amplificados. Una vez obtenidos los nuevos productos de PCR se verificó su integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa (MB14402, nzytech) al 1.5%.

Posteriormente, se procedió a purificar mediante una columna de afinidad con el kit comercial GeneJET Gel Extraction Kit (K0691, Thermo Fisher Scientific). Los productos obtenidos fueron corridos en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.8% (50081, NuSieve™ Lonza™) durante 25 min a 70 volts. Se procedió a cortar el fragmento de agarosa con ADN y se colocó en un microtubo de 1.5 mL. Posteriormente, por diferencia de peso se determinaron los mg totales del fragmento de agarosa de bajo punto de fusión recuperados. Se añadió un volumen 1:1 de buffer de unión al tubo y se incubó 10 min a 60 °C hasta su total disolución. A continuación se mezcló brevemente por vortex y el contenido se transfirió a una columna.

Las centrifugaciones necesarias para la realización de este protocolo se realizaron a 13500 rpm y TA. Se procedió a centrifugar la columna durante 1 min y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 700 µL de buffer de lavado, se centrifugaron por 1 min y se descartó el sobrenadante. Se centrifugó la columna durante 1 min más y se transfirió la columna a un microtubo de 1.5 mL. Finalmente se añadieron 30 µL de agua para PCR, se centrifugaron 1 min e inmediatamente se utilizaron los productos obtenidos.

### **7.7 Obtención de células quimiocompetentes Mach One**

La obtención de células bacterianas quimio competentes se realizó mediante la adición de una solución salina a una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) MachOne, la cual se inoculó en una caja Petri con medio LB sin antibiótico y se incubó a 37 °C durante 12 h, hasta obtener colonias pequeñas y aisladas. Una vez que se obtienen las colonias, se procede a inocular una colonia en 50 mL de medio LB sin antibiótico y se incuba a 37 °C con agitación de 250 rpm hasta obtener una D.O. de 0.4-0.6 a 600 nm.

Cuando se obtuvo la D.O. esperada se traspasó el cultivo a un tubo Falcon estéril (Corning Costal™) de 50 mL y se incubó en hielo durante 10 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a centrifugar el cultivo a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C. Una vez que concluida la centrifugación se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 600 µL de buffer TB (ANEXO 11.1) frío por cada 2 mL de cultivo y se incubó 20 min en hielo. El pellet se recuperó por centrifugación durante 10 min a 3500 rpm a 4 °C.

Finalmente se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 150 µL de buffer TB frío y 10 µL de DMSO por cada 2 mL de medio de cultivo. Se realizaron alícuotas 150 µL de la mezcla anterior en un microtubo de 1.5 mL, las cuales se incubaron durante 10 min en hielo y posteriormente fueron congeladas en N<sub>2</sub> (l). Finalmente, las bacterias quimio competentes se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

### 7.8 Clonación del gen *slc35a1* de los mamíferos estudiados en el vector pJET1.2/blunt

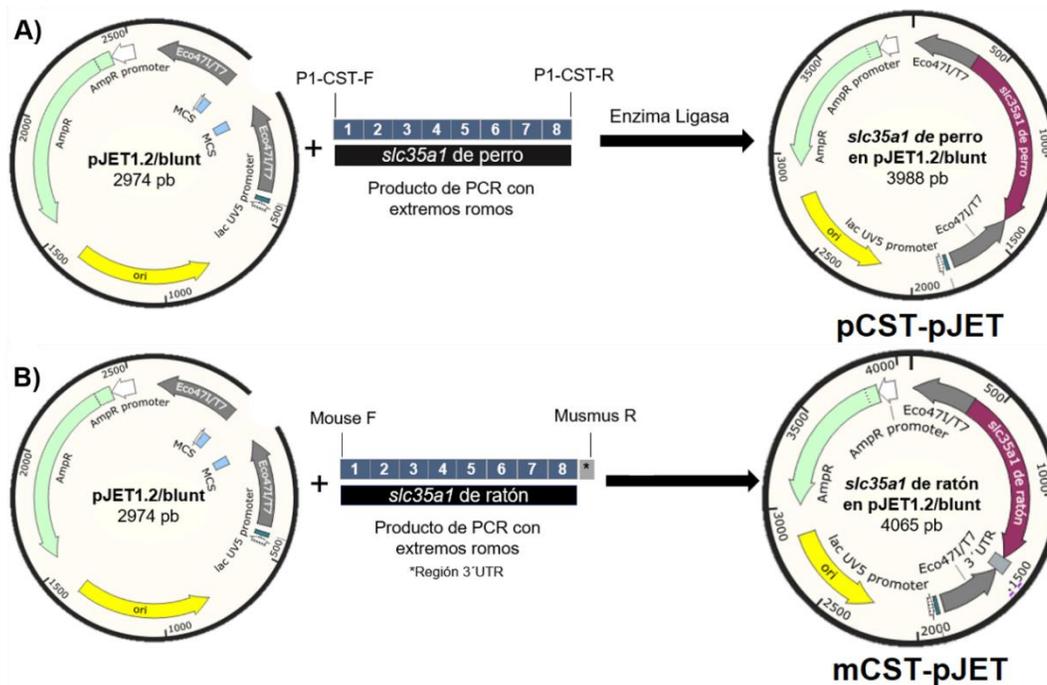
Las clonación realizada en el vector pJET1.2/blunt (K1231, Thermo Fisher Scientific™) del pCST se realizaron utilizando como templado el producto de PCR obtenido de la amplificación de ADNc con la enzima Taq Polimerasa, mientras que para la clonación del mCST se utilizó el producto de PCR purificado de acuerdo con la sección 7.6. La mezcla para la reacción de clonación se realizó utilizando la relación 3:1 inserto:vector, como se describe en la siguiente *tabla 8*.

**Tabla 8.** Condiciones para la clonación del *slc35a1* de los mamíferos estudiados en el vector pJET1.2/blunt.

Mamífero	(K1231, Thermo Fisher Scientific™)	Volumen	
<b>Perro</b>	Buffer 2X	10 $\mu$ L	
	Agua libre de nucleasas	6 $\mu$ L	
	Producto de PCR	1 $\mu$ L	
	Enzima Blunting	1 $\mu$ L	
	Incubación		
	Enzima Ligasa	1 $\mu$ L	
	Vector	(50 ng/ $\mu$ L) 1 $\mu$ L	
	<b>Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>L</b>	
<b>Ratón</b>	Producto de PCR	(150 ng/ $\mu$ L) (13 $\mu$ L)	
	Buffer 2X	10 $\mu$ L	
	Enzima Ligasa	1 $\mu$ L	
	Vector pJET1.2/blunt	(50 ng/ $\mu$ L) 1 $\mu$ L	
	<b>Total</b>	<b>25 <math>\mu</math>L</b>	

La mezcla para la clonación del pCST requirió una incubación inicial de 5 min con la enzima blunting (K1231, Thermo Fisher Scientific) a 70 °C antes de agregar el vector y la enzima T4 ligasa (K1231, Thermo Fisher Scientific). Lo anterior debido a que el amplicón fue generado con la enzima Taq Polimerasa (P0404, Thermo Fisher Scientific) que genera extremos adhesivos 3' y para la correcta ligación del inserto se requieren extremos romos cuando se utiliza este vector de clonación, *figura 16*.

Una vez realizadas las mezclas de reacción para el proceso de clonación se procedió a incubar a 22 °C durante 30 min. Después, las reacciones fueron colocadas en hielo durante 15 min. Al término de esta incubación se procedió a realizar la transformación bacteriana.



**Figura 16. Representación metodológica de la clonación del pCST y mCST en el vector pJET1.2/blunt.** (A.) pCST (B.) mCST. El vector pJET1.2/blunt contiene dos secuencias de reconocimiento de BglIII que flanquean el sitio de inserción, un sitio de clonación múltiple (MCS, región azul), un promotor T7 (ECO471/T7, región gris) de expresión bacteriana para la transcripción *in vitro* e *in vivo* y un gen de resistencia a ampicilina (AmpR, región verde).

La transformación bacteriana se realizó añadiendo 7  $\mu$ L de la mezcla de clonación a 150  $\mu$ L de bacterias quimiocompetentes MachOne. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min y una vez transcurrido el tiempo indicado se procedió a dar un golpe de calor a las bacterias a 42  $^{\circ}$ C durante 1 min. Inmediatamente se traspasaron las bacterias transformadas a hielo durante 30 min.

Posteriormente se adicionaron 250  $\mu$ L de medio SOC suplementado (235  $\mu$ L de medio SOC suplementado con 10 mM de  $MgCl_2$ , 10 mM de  $MgSO_4$ , 20 mM de glucosa). Se procedió entonces a incubar las bacterias transformadas a 37  $^{\circ}$ C a 200rpm durante 1 h. Del volumen total de las bacterias MachOne transformadas, se tomaron 50  $\mu$ L y 100  $\mu$ L para inocular dos volúmenes distintos en cajas Petri con medio LB con ampicilina 0.1mg/mL, respectivamente, las cuales se incubaron durante 16 h a 37  $^{\circ}$ C.

### 7.9 Subclonación de *wt* de perro en vector pVAX-EGFP

La subclonación de la construcción pCST-pJET (isoforma *wt* obtenida de la clonación del pCST en el vector pJET1.2/blunt) en el vector de expresión eucarionte pVAX-EGFP se realizó mediante la amplificación de dicha isoforma con los oligonucleótidos Perro HindIII y Perro KpnI (*tabla 5*), los cuales contienen sitios de reconocimiento para las enzimas HindIII y KpnI, utilizando el gradiente de temperaturas especificado en la *figura 14A* y las condiciones descritas en la *tabla 9*.

**Tabla 9.** Condiciones para la amplificación de la isoforma pCST-pJET.

Reactivos	Volumen
Agua grado biología molecular	17.25 $\mu$ L
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> 10x	2.5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3 $\mu$ L
dNTP's 10 mM	0.5 $\mu$ L
Oligo Perro HindIII	0.5 $\mu$ L
Oligo Perro KpnI	0.5 $\mu$ L
Taq Polimerasa	0.25 $\mu$ L
Plásmido pCST-pJET	0.5 $\mu$ L
Total	25 $\mu$ L

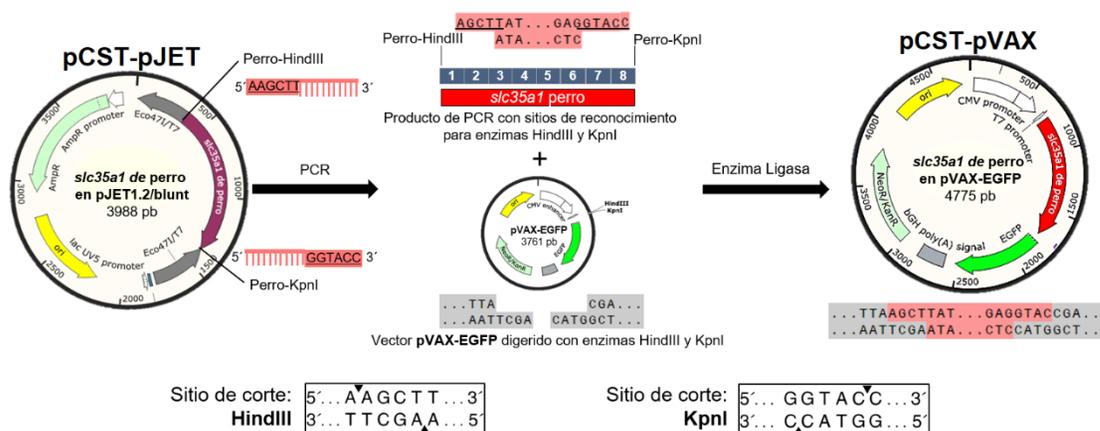
Posteriormente se realizó una digestión para linealizar al vector pVAX-EGFP durante 3 h a 37 °C con las enzimas de restricción KpnI, (ER0521, Thermo scientific) y HindIII (ER0501, Thermo scientific) como se describe en la *tabla 10*, y finalmente se realizó la ligación del inserto al vector pVAX-EGFP linealizado bajo las condiciones descritas en la *tabla 11*. La estrategia molecular seguida se describe en la *figura 17*.

**Tabla 10.** Digestión del vector pVAX-EGFP con enzimas HindIII y KpnI.

Reactivos	Volumen	Digestión	Inactivación
Agua grado biología molecular	14 $\mu$ L	3 h a 37 °C	20 min a 80 °C
Buffer Tango	2 $\mu$ L		
Enzima HindIII	0.5 $\mu$ L		
Enzima KpnI	0.5 $\mu$ L		
Vector pVAX-EGFP	3 $\mu$ L		
Total	20 $\mu$ L		

**Tabla 11.** Mezcla para la reacción de subclonación de la construcción pCST-pJET en vector pVAX-EGFP.

Reactivos	Volumen
Agua grado biología molecular	11.5 µL
Buffer enzima T4 ligasa	2 µL
Producto de PCR con oligos Perro HindIII y Perro KpnI	4 µL
Vector pVAX-EGFP digerido	2 µL
Enzima T4 ligasa	0.5 µL
<b>Total</b>	<b>20 µL</b>



**Figura 17.** Representación metodológica de la subclonación de la isoforma pCST-pJET en el vector pVAX-EGFP. En la parte inferior se especifican los sitios de reconocimiento de las enzimas HindIII y KpnI. El vector pVAX-EGFP contiene un promotor de citomegalovirus (CMV, blanco) de expresión eucarionte, un gen de resistencia a kanamicina (NeoR/KanR, verde agua) y un gen que codifica para la proteína verde fluorescente (EGFP, verde fluorescente).

La mezcla de clonación descrita en la *tabla 11* se incubó 1 h a 22 °C y luego 15 min en hielo. Al terminar la incubación se añadieron 8 µL de la reacción de clonación a 150 µL de células Mach One y se procedió a incubar las bacterias 30 min en hielo del mismo modo como se describe en la sección 7.8. Del volumen total de las bacterias MachOne transformadas, se tomaron 50 µL y 100 µL para inocular dos volúmenes distintos en cajas Petri con medio LB con kanamicina 0.05 mg/mL (ANEXO 11.4), respectivamente, las cuales se incubaron durante 16 h a 37 °C.

Finalmente se realizó un ensayo de restricción como se describe en la sección 7.14 con las enzimas Aval, Hind III y Kpn I, con la finalidad de determinar la direccionalidad del inserto clonado.

### 7.10 Clonación del *slc35a1* de mamíferos en el vector de expresión pcDNA3.1D/V5-His-TOPO

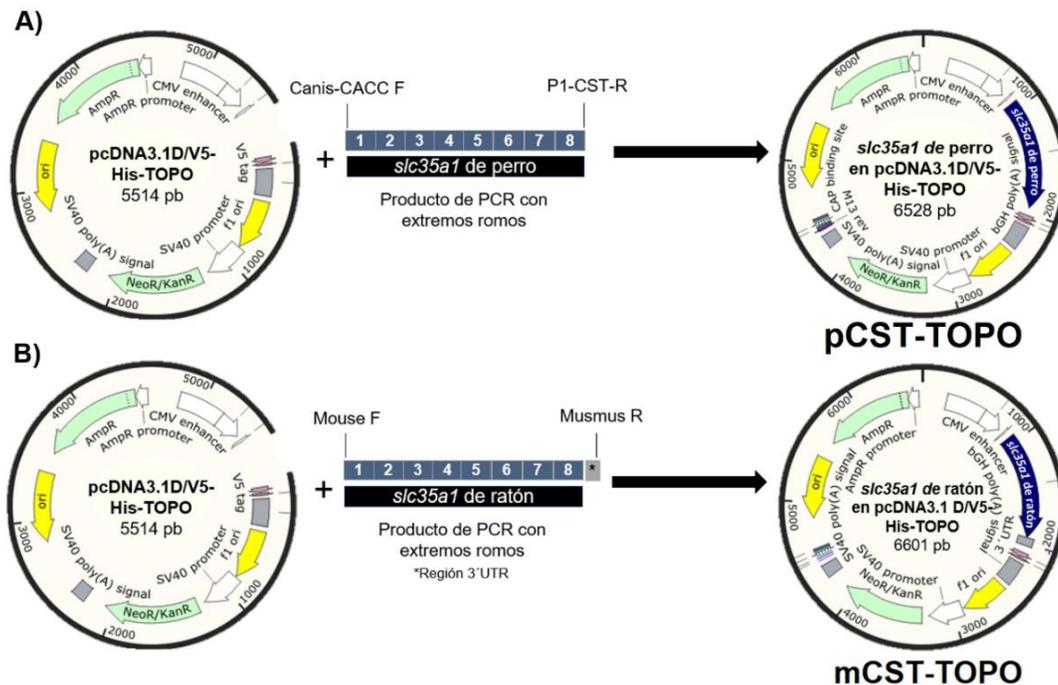
El gen *slc35a1* de los mamíferos estudiados se clonó en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO (K4900-01, Invitrogen™). Partiendo de producto de PCR purificado por corte de banda como se describe en la sección 7.6. La reacción de clonación se calculó con una relación 2:1 inserto: vector y se preparó como se indica en la *tabla 12*. La estrategia para la clonación a partir de ADNc del *slc35a1* de perro y ratón en se realizó como se describe en la *figura 18*.

**Tabla 12.** Condiciones para la clonación de perro y ratón en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO.

Espece	Reactivos	Volumen y concentración
<b>Perro</b>	Agua estéril	3.5 µL
	Solución salina	1 µL
	Producto de PCR purificado por kit	0.5 µL (45 ng/µL)
	Vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO	1 µL (20 ng/µL)
	<b>Total</b>	<b>6 µL</b>
<b>Ratón</b>	Agua estéril	2 µL
	Solución salina	1 µL
	Producto de PCR purificado por kit	2 µL (40 ng/µL)
	Vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO	1 µL (20 ng/µL)
	<b>Total</b>	<b>6 µL</b>

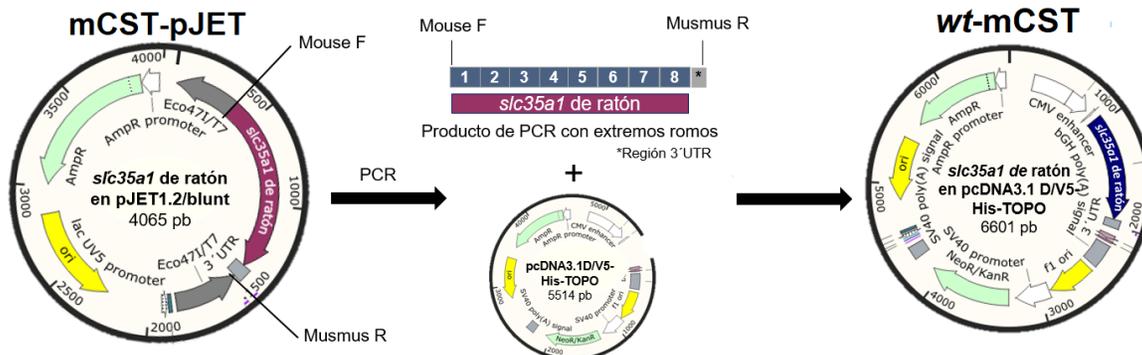
La reacción de clonación se mezcló 3 veces por pipeteo y se incubó 5 min a 22 °C. Se añadieron 2 µL de la reacción de clonación a 150 µL de bacterias MachOne descongeladas y se mezcló gentilmente. Posteriormente, se incubaron en hielo durante 30 min. Se procedió a dar un golpe de calor a 42 °C durante 60 s. Los tubos fueron transferidos a hielo y se añadieron 250 µL de medio SOC proporcionado por el kit. Se procedió a incubar a las bacterias transformadas durante 1 h a 200 rpm a 37 °C.

Finalmente fueron inoculados 100 µL y 200 µL de las bacterias transformadas en cajas Petri con medio LB sólido con 0.1 mg/mL de ampicilina. Las cajas Petri se incubaron durante 16 h a 37 °C en una incubadora.



**Figura 18. Clonación del *slc35a1* de mamíferos en el vector pcDNA3.1D / V5-His-TOPO.** A) pCST-TOPO y B) mCS-TOPO. La clonación en este vector no requiere de una enzima ligasa, procedimientos post-PCR o enzimas de restricción. Contiene un sitio de clonación TOPO para la clonación direccional rápida y eficiente de productos de PCR de extremos romos, genes de resistencia a kanamicina y ampicilina (NeoR/KanR y AmpR, verde agua), así como un promotor CMV (blanco) para la expresión heteróloga de alto nivel del gen de interés en una amplia gama de células de mamíferos.

La subclonación de la isoforma mCST-pJET (que corresponde a la forma *wt* del *slc35a1* de ratón) en el vector de expresión eucarionte pcDNA3.1D/V5-His-TOPO se realizó como se describe en la *figura 19* con las condiciones descritas en la *tabla 12* y la metodología previamente descrita.



**Figura 19. Representación de la estrategia de subclonación de mCST-pJET en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO.** La isoforma *wt* del *slc35a1* de ratón se obtuvo mediante la subclonación de la isoforma mCST-pJET.

### **7.11 PCR de clonas positivas**

Las colonias de *E. coli* que crecieron en el medio LB con antibiótico fueron seleccionadas y se realizó una PCR con los oligonucleótidos utilizados en la amplificación del inserto a clonar, manteniendo las condiciones descritas para cada mamífero y utilizando como templado una muestra de la colonia a verificar.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel al 1.5% de agarosa (MB14402, nzytech) en buffer TAE 1X (ANEXO 11.3) utilizando como marcador de peso molecular la escalera Gene Ruler 1 kb plus (SM1333, Thermo Scientific™).

### **7.12 Purificación por lisis alcalina para verificación de clonas positivas y transfección**

La purificación de los plásmidos utilizados en las transfecciones se realizó a través de lisis alcalina. Previo a la purificación por lisis alcalina se inocularon 10 µL de una dilución 2:80 de glicerol en una caja Petri con medio LB con 0.1 mg/mL de ampicilina (ANEXO 11.4), y se incubó durante 12 h a 37 °C, hasta obtener colonias pequeñas y aisladas. Se realizó la selección de una colonia, la cual fue inoculada en 5 mL de medio líquido con ampicilina con 0.1 mg/mL y se dejó crecer a 200 rpm durante 12 h a 37 °C.

Una vez obtenidos los cultivos en medio líquido se centrifugaron mL/mL a 5000 rpm en un microtubo de 1.5 mL durante 1 min. Se procedió a resuspender por pipeteo y vortex el pellet en 100 µL de solución de lisis I (ANEXO 11.8). A continuación se agregaron 200 µL de solución de lisis II (ANEXO 11.8) y se mezcló el tubo por inversión 5 veces, hasta que la solución se volvió nublosa. Inmediatamente se agregaron 150 µL de solución de lisis III (ANEXO 11.8), se mezclaron por inversión 5 veces y se incubó durante 4 min hasta observarse la formación de un precipitado blanco. Al terminar la incubación las muestras se centrifugaron a TA durante 5 min a 13500 rpm en una microcentrifuga.

A partir de este paso, todas las centrifugaciones se realizaron a TA y 13500 rpm. Se recuperó la fase acuosa de las muestras en un tubo nuevo, se añadió un volumen equivalente de fenol:clorformo, y se centrifugaron durante 2 min. Una vez que las muestras fueron centrifugadas se procedió a recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo y se añadieron 300 µL de isopropanol frío. Las muestras fueron brevemente mezcladas por vortex y se incubaron a TA durante 2 min. Al concluir el tiempo de incubación las muestras se centrifugaron durante 5 min. Después de la incubación, se decantó el isopropanol y se añadió 1 mL de etanol (107, Vetec Química Fina LTDA) al 75% frío.

Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas durante 2 min y se decantó el etanol. Finalmente se dejaron reposar las muestras a TA hasta que se evaporaron los residuos de etanol, se añadieron 50 µL de agua libre de RNAsas a cada muestra y se almacenaron a -20 °C.

### **7.13 Purificación por GeneJET Plasmid Miniprep para secuenciación de Sanger**

La purificación de los plásmidos obtenidos para la secuenciación de Sanger se realizó a través de un kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep (K0502, Thermo Fisher Scientific). Previo a la purificación de los plásmidos se realizó el cultivo de las clonas positivas en medio sólido con antibiótico durante 12 h a 37 °C; posteriormente se seleccionó una colonia y se inoculó en 5 mL de medio líquido con antibiótico manteniéndose en agitación a 200 rpm durante 12 h 37 °C.

Una vez obtenido el cultivo en medio líquido se traspasó mL a mL a microtubos de 1.5 mL, y se centrifugó a 8000 rpm durante 2 min, a TA para obtener el pellet. A partir de este paso el resto de centrifugaciones se realizaron a TA y 13500 rpm.

El pellet obtenido de cada clona positiva se resuspendió en 250 µL de solución de resuspensión y mezcló vigorosamente por vortex y pipeteo. A continuación se añadieron 250 µL de solución de lisis y se mezclaron las muestras por inversión 5 veces, observándose que la solución se tornó viscosa y clara.

Se incubaron las muestras durante 4 min y se añadieron 350  $\mu\text{L}$  de solución de neutralización, se mezcló por inversión 5 veces, observándose la aparición de un precipitado blanco. Inmediatamente se centrifugaron las muestras durante 5 min.

La fase acuosa de las muestras se transfirió mediante pipeteo a columnas GeneJET y se centrifugaron durante 1 min. Se descartó el sobrenadante, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de solución de lavado a las columnas y se centrifugaron durante 1 min. De nuevo, se descartó el sobrenadante, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de solución de lavado a las muestras y se centrifugaron. Se descartó el sobrenadante y se centrifugó la columna por 1 min. Las columnas fueron transferidas a microtubos nuevos de 1.5 mL, se les añadió 50  $\mu\text{L}$  de buffer de elución y se procedió a incubar durante 2 min a TA. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 2 min y se guardaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La secuenciación de Sanger de los plásmidos purificados se preparó según las indicaciones de la Unidad de Síntesis y Secuenciación, del IBT de la UNAM, para ello se agregó en un tubo de 0.2 mL, 1  $\mu\text{L}$  de oligonucleótido (10  $\mu\text{M}$ ), 400-500 ng de plásmido y se aforó a 16  $\mu\text{L}$  con agua libre de nucleasas. El análisis de los plásmidos secuenciados se realizó mediante los servidores web Clustal Omega y Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

#### **7.14 Digestión de isoformas obtenidas con AVA I, Kpn I y HindIII**

Para verificar la direccionalidad del inserto se realizó un ensayo de restricción de las construcciones pCST-TOPO, *wt*-mCST y del130-pCST utilizando la enzima Eco 881 (AVA I) (ER0381, Thermo Fisher Scientific), KpnI (ER0521, Thermo scientific), HindIII (ER0501, Thermo scientific) y PstI (NEB #R3140, New England Biolabs Inc) utilizando las condiciones que se describen en la *tabla 13*.

Los plásmidos digeridos fueron analizados por electroforesis en un gel al 1% de agarosa (MB14402, nzytech) en buffer TAE 1X (ANEXO 11.3) utilizando como marcador de peso molecular la escalera Gene Ruler 1 kb plus (SM1333, Thermo Scientific™).

**Tabla 13.** Condiciones de ensayos de restricción.

Enzima	Mezcla de digestión	Volumen	Digestión	Inactivación
AVA I	Agua grado biología molecular Buffer Tango Plásmido Enzima AVA I Total	16 $\mu$ L 2 $\mu$ L 1.5 $\mu$ L 0.5 $\mu$ L 20 $\mu$ L	3 h a 37 °C	20 min a 65 °C
Hind III	Agua grado biología molecular Buffer Tango Plásmido Enzima Hind III Total	16 $\mu$ L 2 $\mu$ L 1.5 $\mu$ L 0.5 $\mu$ L 20 $\mu$ L	3 h a 37 °C	20 min a 80 °C
Kpn I	Agua grado biología molecular Buffer Tango Plásmido Enzima KpnI Total	16 $\mu$ L 2 $\mu$ L 1.5 $\mu$ L 0.5 $\mu$ L 20 $\mu$ L	3 h a 37 °C	20 min a 80 °C
Pst I	Agua grado biología molecular Buffer 3.1 Plásmido Enzima Total	12.5 $\mu$ L 2 $\mu$ L 4.5 $\mu$ L 1 $\mu$ L 20 $\mu$ L	3 h a 37 °C	20 min a 80 °C

### 7.15 Complementación genética en el modelo CHO-Lec2

Los experimentos de complementación genética fueron llevados a cabo en células CHO y Lec2. Para ello, ambas líneas celulares se cultivaron en una caja de 24 pozos durante 24 h a 37 °C, con medio DMEM suplementado con 5% de SFB en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>, hasta alcanzar una densidad de 2.5x10<sup>5</sup> células/mL.

Una vez alcanzada la densidad deseada el medio DMEM fue removido y las construcciones pCST-TOPO y *wt*-mCST fueron transfectadas en las células Lec2 con lipofectamina 2000 (11668019, Thermo Fisher Scientific), utilizando como volumen final 200  $\mu$ L de medio DMEM sin SFB, ni antibiótico; suplementado con 4  $\mu$ L lipofectamina por cada 2 $\mu$ g de plásmido de construcción por pozo. Antes de adicionar el medio a las células, la mezcla fue incubada 15 min a TA. Posterior a la adición del medio, las células fueron incubadas durante 1 h a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, y finalmente se adicionaron 300  $\mu$ L de medio DMEM con 10 % de SFB por cada pozo.

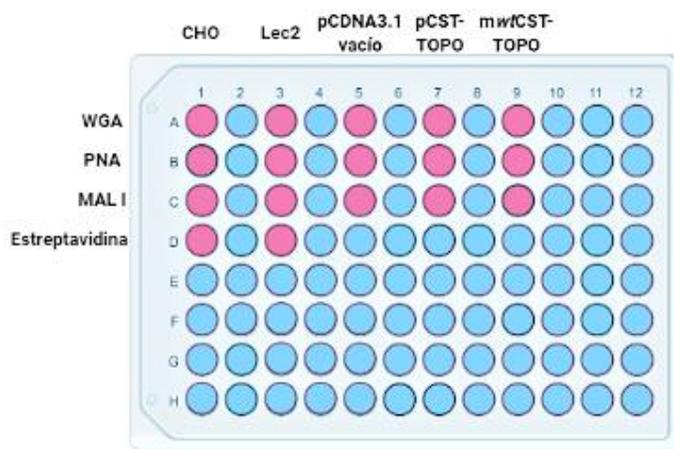
Transcurridas 72 h post-transfección se realizó una tinción con lectinas bionitiladas como se describe en la sección 7.16 y se comenzó la selección de las clonas. Para realizar la selección, se retiró el medio de las células y se añadieron 500  $\mu$ L de medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1 mg/mL de geneticina G418 (10131027, Gibco™). Se mantuvieron estas condiciones durante 2 semanas, manteniendo estable el volumen de medio, y una vez transcurrido este periodo, se realizó una segunda inmunotinción.

### 7.16 Tinción con lectinas WGA, PNA y MAL I

Las células CHO, Lec2 y las células transfectadas pCST-TOPO y *wt*-mCST con 72 h post transfección, fueron teñidas a una densidad celular de  $1 \times 10^5$  con 50  $\mu$ L de las lectinas biotiniladas WGA (B-1025-5, Vector Labs), PNA (B-1075-5, Vector Labs) y MAL I (B-1315-2, Vector Labs) diluidas como se indica en la *tabla 14* y posteriormente fueron acopladas a estreptavidina (S21374, Thermo Fisher Scientific). La estreptavidina (STV) es una proteína de unión a biotina que en este caso adicionalmente está acoplada al fluorocromo Alexa Flúor 647. Las células teñidas fueron analizadas por citometría de flujo.

**Tabla 14.** Lectinas utilizadas en citometría de flujo.

Lectina	Epítipo de reconocimiento	Dilución y concentración utilizadas
Aglutinina de maní, <i>Arachis hypogaea</i> (PNA).	Gal $\beta$ 1–3GalNAc.	1:4,000 (1.25 $\mu$ g/mL).
Aglutinina de germen de trigo (WGA).	Residuos de ácido siálico y quitobiosa.	1:4,000 (0.5 $\mu$ g /mL).
<i>Maackia amurensis</i> (MAL I)	Residuos de ácido siálico ligados en un enlace $\alpha$ -2,3.	1:1,000 (2 $\mu$ g/mL).



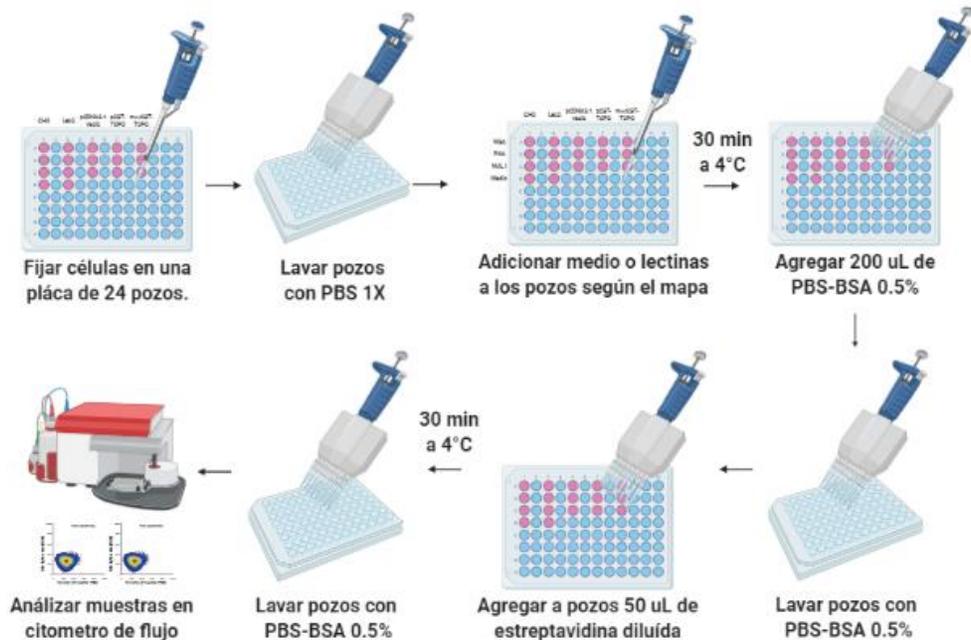
**Figura 20. Mapa de tinción para análisis de unión de lectinas.**

Las células fueron fijadas en una placa de 96 pozos, distribuidas como se muestra en la *figura 20* y se lavaron con 200  $\mu$ L de PBS 1X. Después, se añadieron 50  $\mu$ L de lectina diluida según el mapa de tinción y medio DMEM a los pozos sin teñir y con estreptavidina. Se procedió a resuspender los pozos con una micropipeta multicanal e incubar durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con 200  $\mu$ L de PBS 1X/0.5% albúmina de bovino humano (BSA), se resuspendieron los pozos con una pipeta multicanal (en los lavados 2 y 3), la placa se centrifugó durante 3 min a 1500 rpm, 4 °C y finalmente se decantó el sobrenadante.

Una vez realizados los lavados, se añadieron 50  $\mu$ L de STV diluida con medio DMEM 1:1500 (0.66  $\mu$ g/mL) a todos los pozos con excepción de los controles sin teñir a los que se les añadió únicamente medio DMEM. Los pozos se resuspendieron con una micropipeta multicanal y se incubaron durante 30 min, a 4 °C, sin exponer a las células teñidas a la luz.

Una vez incubada la placa, se procedió a lavar 3 veces con PBS 1X/ 0.5% BSA como se describió anteriormente. Finalmente, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (Accuri C6 Plus, Beckton and Dickinson) adquiriendo 10,000 eventos por lectina analizada y posteriormente se realizó un análisis de los datos obtenidos utilizando el software FlowJo (*figura 21*).

El análisis de los datos obtenidos se realizó graficando la media geométrica de la intensidad media de fluorescencia observada de cada una de las muestras analizadas.



**Figura 21. Representación de la metodología de la tinción con lectinas bionitiladas.** La inmunotinción se realizó a las células transfectadas, así como a células control CHO y Lec2. Para ello las células se fijaron en una placa de 96 pozos y se les añadieron las lectinas según el mapa de tinción. Posteriormente, se realizó una segunda incubación con estreptavidina acoplada al colorante Alexa Flúor 647. Las células teñidas fueron analizadas por citometría de flujo.

### 7.17 Análisis de secuencia de aminoácidos de las isoformas clonadas

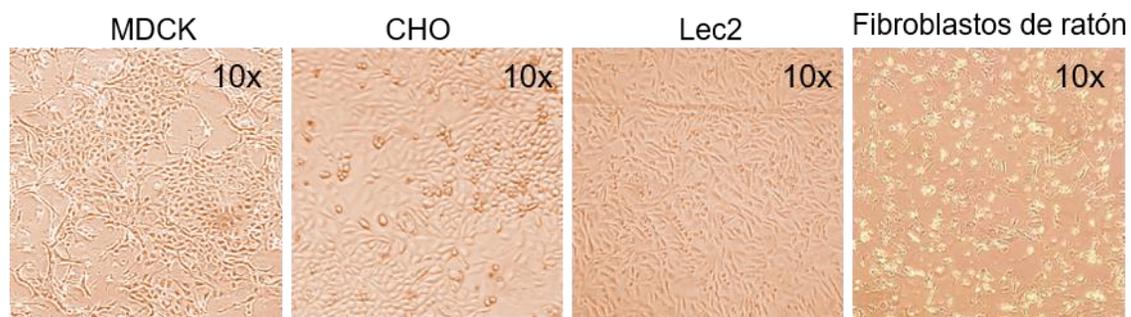
La secuencia de aminoácidos de las isoformas clonadas pCST-TOPO y *wt*-mCST se obtuvo del NCBI. La traducción de la secuencia de nucleótidos de la isoforma del130-pCST se realizó mediante el servidor en línea EMBOSS Transeq y el software Snapgene. Una vez obtenidas las secuencias se realizaron alineamientos de las secuencias de aminoácidos mediante el servidor en línea Clustal Omega.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Análisis por microscopía óptica de los cultivos celulares utilizados

Las líneas celulares MDCK, CHO y Lec2, así como los fibroblastos de ratón fueron cultivados bajo las condiciones descritas en la metodología obteniéndose una confluencia del 80 % a los 10 días de cultivo (*figura 22*). Bajo las condiciones establecidas el cultivo primario de fibroblastos de ratón no proliferó como se esperaba, por lo que se procedió a la extracción de ARN, después de 7 días de cultivo.

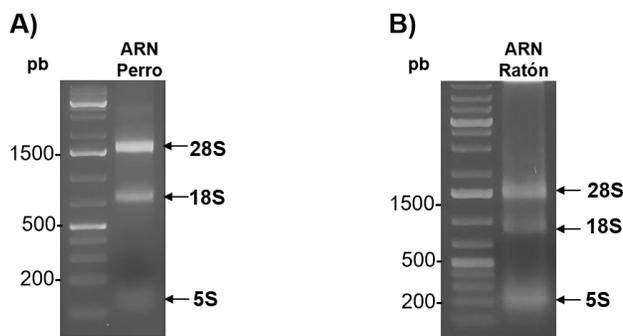
La deficiente proliferación de los fibroblastos de ratón se debió probablemente al número de pases de las células donadas, puesto se sabe que los cultivos primarios tienen un número límite de 60-70 pases antes de perder su viabilidad (Tavira Montalván et al., 2009).



**Figura 22. Cultivos de células de MDCK, CHO, Lec2 y fibroblastos de ratón.** MDCK: células de riñón canino Madin-Darby. CHO: células de ovario de hámster chino y Lec2: células deficientes en el transporte de CMP-sia derivadas de CHO.

### 8.2 Verificación de la integridad del ARN extraído y ADNc sintetizado

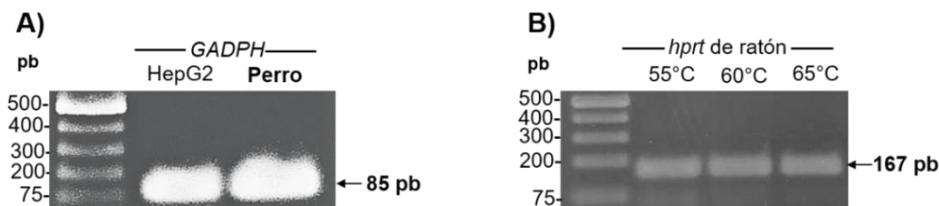
La integridad del ARN extraído de los mamíferos estudiados se verificó en un gel de agarosa al 1%, observándose en el mismo, bandas que corresponden en peso a las subunidades con mayor abundancia de ARN ribosomal eucariota 28S, 18S y 5S, *figura 23*. Como se observa en el gel, no se presentó degradación del ARN y se obtuvo un valor de 2.0 en la relación de pureza 260/280, evidencia de bajas concentraciones de impurezas proteicas, de acuerdo con lo especificado en la literatura (O'Neill et al., 2011).



**Figura 23. Gel de electroforesis representativo de muestras de ARN extraído.** A) ARN extraído de la línea celular MDCK (perro) y B) ARN extraído de muestras de sangre de ratón y fibroblastos de ratón.

El ADNc sintetizado a partir del ARN extraído fue verificado mediante la amplificación de segmentos de genes constitutivos para ambas especies. El fragmento del gen constitutivo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GADPH*, 85 pb) fue amplificado mediante PCR convencional, utilizando los oligonucleótidos diseñados para *GADPH* humano, *GADPH5q* y *GADPH3q* (tabla 5). Se utilizó como templado el ADNc de perro y de la línea celular de hepatocarcinoma humano (HepG2) como control positivo. El amplicón de 85 pb para el fragmento de *GADPH* de perro y HepG2 se observó para ambas muestras, figura 24A.

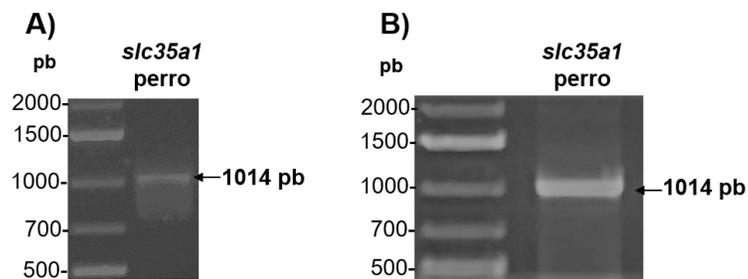
La correcta síntesis del ADNc de ratón fue verificada mediante la amplificación de un fragmento del gen que codifica para la enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (*hprt*), utilizando los oligonucleótidos mHPRT-sen y mHPRT-antisen (tabla 5). En la figura 24B se muestran amplicones obtenidos a 3 temperaturas diferentes que corresponde a segmentos de ADN con un tamaño de 167 pb que coincide con el tamaño esperado.



**Figura 24. Amplificación de fragmentos de genes constitutivos de mamíferos mediante PCR convencional.** A) Amplicones de 85 pb del gen *GADPH* obtenidos utilizando como templado el ADNc de perro y de HepG2. B) La amplificación del fragmento del gen *hprt* de ratón se realizó utilizando el ADNc de ratón y un gradiente de temperatura en el rango 55-65 °C observando 167 pb en todas las temperaturas analizadas.

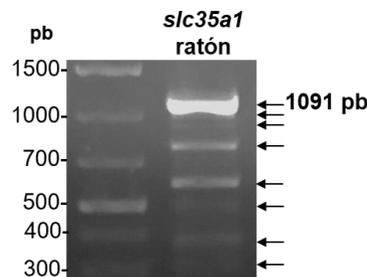
### 8.3 Análisis por PCR del gen *slc35a1* de mamíferos

La amplificación del *slc35a1* de los mamíferos estudiados se realizó mediante PCR convencional bajo las condiciones descritas en la metodología. El *slc35a1* de perro (pCST) se amplificó a 64.5 °C partiendo de ADNc como templado. Se utilizaron 2 enzimas polimerasas, una taq polimerasa y una polimerasa de alta fidelidad (taq *phusion*). En ambos casos se observó un amplicón de aproximadamente 1014 pb, *figura 25*. El producto de PCR obtenido utilizando como templado ADNc de perro coincide con los tamaños del gen del CST reportados previamente en humano, ratón y hámster (Eckhardt et al., 1996; Ishida et al., 1996).



**Figura 25. PCR convencional del *slc35a1* de perro.** A) Amplificado a partir de ADNc utilizando la enzima Taq Polimerasa B) Amplificado a partir de ADNc utilizando la enzima polimerasa de alta fidelidad *Phusion*. En ambas imágenes se observa una flecha que señala la banda observada de aproximadamente 1014 pb, siendo esta de mayor intensidad en B.

En la amplificación del *slc35a1* de mCST se observó una banda de aproximadamente 1091 pb que corresponde a la secuencia codificante más un fragmento de la región 3'UTR para la isoforma *wt* reportada en el NCBI ([NM\\_011895.3](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_011895.3)). Adicionalmente, se observaron otras bandas de menor tamaño (*figura 26*) que de acuerdo con la longitud de los fragmentos no se asociaron con algún reporte previo.



**Figura 26. PCR convencional del *slc35a1* de ratón.** La amplificación se realizó a partir de ADNc con la enzima la *Taq Phusion*. En el gel se observa una banda de 1091 pb que corresponde al amplicón esperado para la isoforma *wt* del transportador del gen *slc35a1* de este mamífero. Se observan otras bandas cuyo tamaño no se asoció a los reportes teóricos o previos de otras isoformas.

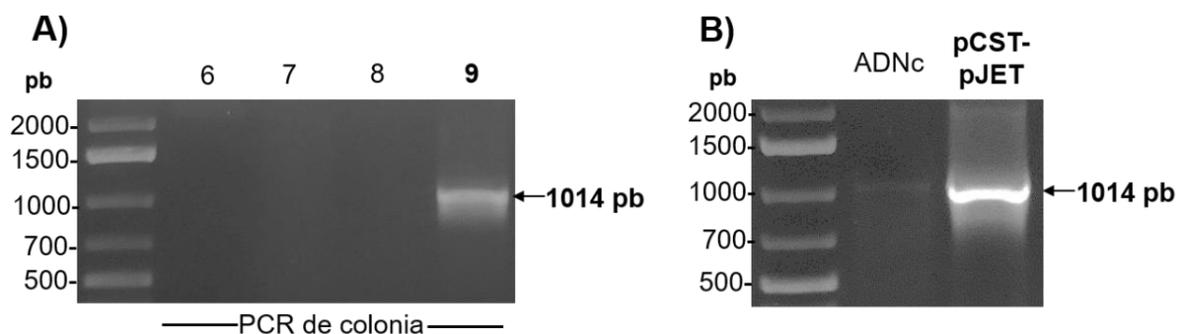
## 8.4 Análisis de colonias transformadas con el vector recombinante pJET Blunt 1.2/*slc35a1*

### 8.4.1 Análisis de la clonación del *slc35a1* de perro en el vector pJET Blunt 1.2

En la transformación bacteriana utilizando el vector pJET Blunt 1.2 con el inserto *slc35a1* del pCST se obtuvieron 34 colonias. De cada colonia obtenida se realizó una PCR utilizando los oligos P1-CST-F y P1-CST-R, donde se identificó a la colonia numerada como 9 como una clona positiva (pCST-pJET) para el gen *slc35a1* del pCST, *figura 27A*.

La eficiencia de clonación fue de 3%, resultado que contrasta notablemente con el 99% de eficiencia esperado según lo especificado en el manual del vector. La baja eficiencia se puede deber a factores como la baja expresión endógena del gen, posibles impurezas procedentes de la reacción de PCR o una incorrecta elección de la relación inserto:vector.

El plásmido de la colonia pCST-pJET fue purificado y se utilizó como templado para una segunda PCR con la finalidad de confirmar el tamaño del inserto al compararlo con ADNc de perro, *figura 27B*, observándose similitud entre los tamaños de los amplicones obtenidos. El plásmido obtenido fue secuenciado (datos no mostrados), y una vez realizado el análisis de los datos se confirmó experimentalmente la secuencia teórica reportada para la isoforma *wt* del *slc35a1* de perro ([NM\\_001003058.1](#)) y [AY064407](#).

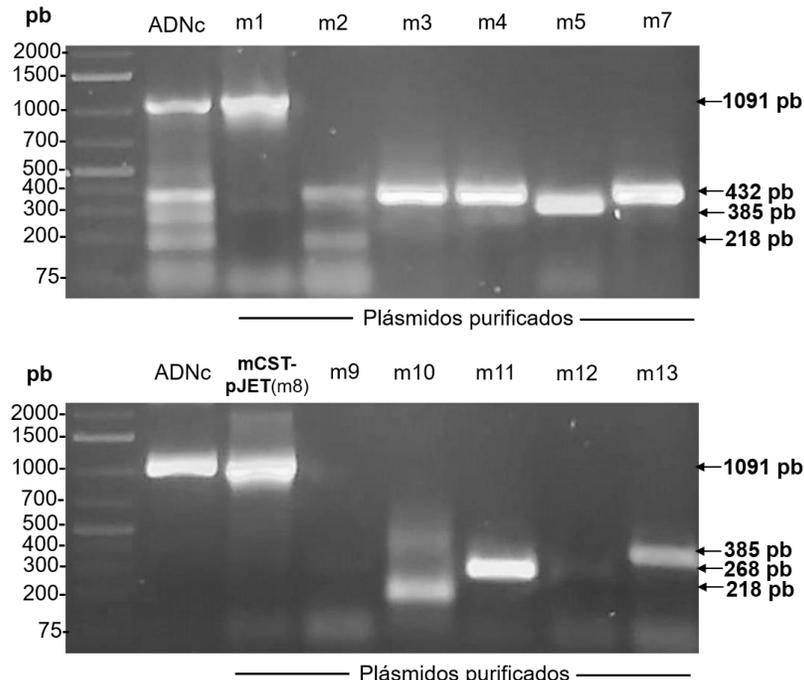


**Figura 27. PCR del *slc35a1* de perro clonado en el vector pJET Blunt 1.2.** A) PCR de colonias obtenidas en la transformación bacteriana con oligos P1-CST-F y P1-CST-R. Se observó un amplicón de 1014 pb en la colonia rotulada con el número 9 (pCST-pJET). B) PCR utilizando como templado plásmido purificado de la colonia pCST-pJET. Se utilizó como templado control positivo ADNc de perro.

#### 8.4.2 Análisis de la clonación del *slc35a1* de ratón en el vector pJET Blunt 1.2

En la transformación bacteriana con el vector recombinante pJET/*slc35a1* de ratón se obtuvieron 13 colonias, de las cuales se realizó la purificación de plásmidos por lisis alcalina y se procedió a realizar reacciones de PCR utilizando los plásmidos como templado. La eficiencia de clonación fue del 100% ya que todas las colonias fueron positivas para el inserto *slc35a1*. Los productos de PCR de las colonias bacterianas denominadas m2-m7 y m9-m13 correspondían a fragmentos ya caracterizados durante la clonación del *slc35a1* de ratón en el vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO, por lo que no fueron enviados a secuenciar.

El objetivo de la clonación del *slc35a1* de ratón en el vector pJET fue el de obtener la isoforma *wt* para posteriormente realizar una subclonación en un vector pcDNA3.1D/V5-His-TOPO, que contiene un promotor CMV de expresión fuerte en eucariontes. La colonia m8 (mCST-pJET) se seleccionó para realizar la subclonación porque el peso del amplicón correspondía a 1091 pb para la isoforma *wt* del mCST, *figura 28*. Ninguna de las construcciones obtenidas fue secuenciada.



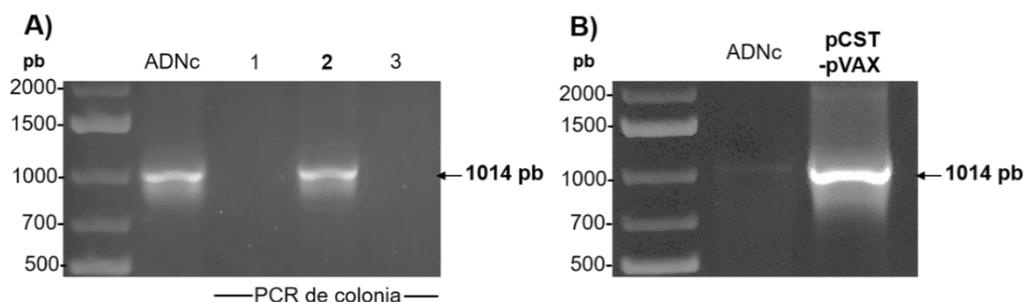
**Figura 28. PCR de plásmidos recombinantes con el vector pJET Blunt 1.2/*slc35a1* de ratón.** Se utilizaron los oligos utilizados fueron Mouse F y Musmus R. La construcción mCST-pJET (m8) corresponde en peso a la isoforma silvestre del *slc35a1* amplificada a partir de ADNc de ratón, por lo que se utilizó como templado para realizar una subclonación en el vector pcDNA 3.1 D/V5 His. Las isoformas m1-m7 y m9-m13 no fueron analizadas en este vector recombinante.

### 8.5 Análisis de colonias transformadas con el vector de expresión eucariota vector pVAX-EGFP/*slc35a1*

Las clonaciones realizadas con el vector de expresión heteróloga donado a nuestro laboratorio pVAX-EGFP se realizaron de manera provisional porque no se contaba con el vector pcDNA 3.1 D/V5 His. En la transformación bacteriana del plásmido pVAX-EGFP/*slc35a1* de perro se obtuvieron 10 colonias, de las cuales se realizó PCR utilizando los oligonucleótidos Perro Hind III y Perro KpnI.

La eficiencia de clonación fue del 10% al obtenerse una colonia positiva en la colonia numerada como 2 (pCST-pVAX), *figura 29A*. La baja eficiencia de clonación pudo deberse a la falta de un tratamiento con fosfatasas alcalinas para evitar la autoligación del vector, a que el producto de PCR no fue digerido previo a la clonación con las enzimas HindIII y KpnI o una mala elección de la relación inserto:vector.

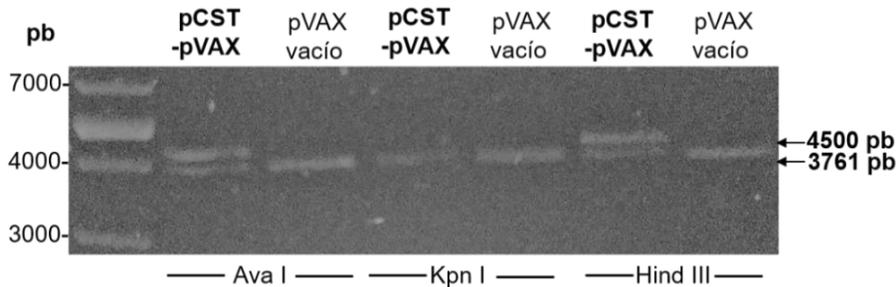
El plásmido de la colonia pCST-pVAX fue purificado y se utilizó como templado en una segunda PCR para confirmar su integridad, *figura 29B*. El pCST-pVAX fue secuenciado (datos no mostrados). Tras realizar el análisis de la secuencia, se asoció su identidad a la secuencia codificante calculada teóricamente para la isoforma *wt* del *slc35a1* de perro ([NM\\_001003058.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001003058.1)).



**Figura 29. Clonación del gen *slc35a1* de perro en el vector de expresión eucariote PVAX-EGFP.** A) PCR de colonia donde se observa una clona positiva con un peso aproximado de 1014 pb marcada como colonia número 2. B) PCR del plásmido de la clona 2 (pCST-pVAX) purificada para analizar por secuenciación de Sanger.

Se realizó un ensayo de restricción con las enzimas Ava I, Hind III y KpnI, donde no se observó el fragmento único esperado de 4761 pb de la linealización del pCST-pVAX. En su lugar se observaron 2 fragmentos en el ensayo con Ava I y Hind III, y una banda de con el peso que corresponde para el vector vacío en el ensayo con Kpn I. Se plantea que lo anterior, se debió posiblemente a cambios desconocidos en la

secuencia del vector pVAX-EGFP donado, *figura 30*. Por esta razón, la construcción pCST-pVAX no fue expresada en el modelo CHO-Lec2.



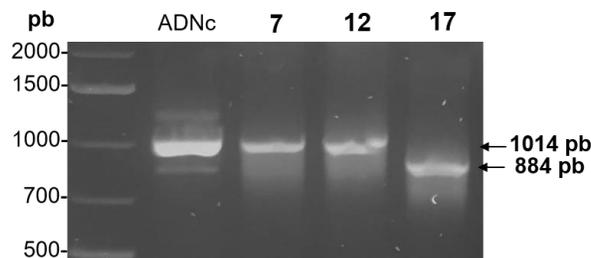
**Figura 30.** Ensayo de restricción pCST-pVAX con Ava I, Kpn I y Hind III

## 8.6 Análisis de colonias transformadas con el vector recombinante pcDNA 3.1 D-V5 His/*slc35a1*

### 8.6.1 Análisis de la clonación de *slc35a1* de perro en el vector pcDNA 3.1 D/V5 His

En la transformación bacteriana utilizando el vector con el inserto *slc35a1* del pCST se obtuvieron 20 colonias, de las cuales se purificaron plásmidos y se procedió a realizar PCR convencional utilizando los oligos P1-CST-F y P1-CST-R. Se identificaron 3 colonias positivas, numeradas como 7, 12 y 17 para el gen *slc35a1* de perro, *figura 31*.

Los plásmidos purificados de las colonias bacterianas se utilizaron como plantillas para una segunda PCR, con la finalidad de confirmar el tamaño del inserto al compararlo con ADNc de perro. Se observó similitud entre los tamaños de los amplicones obtenidos en las colonias 7 y 12, así como una banda de un menor peso molecular para el amplicón de la colonia 17.

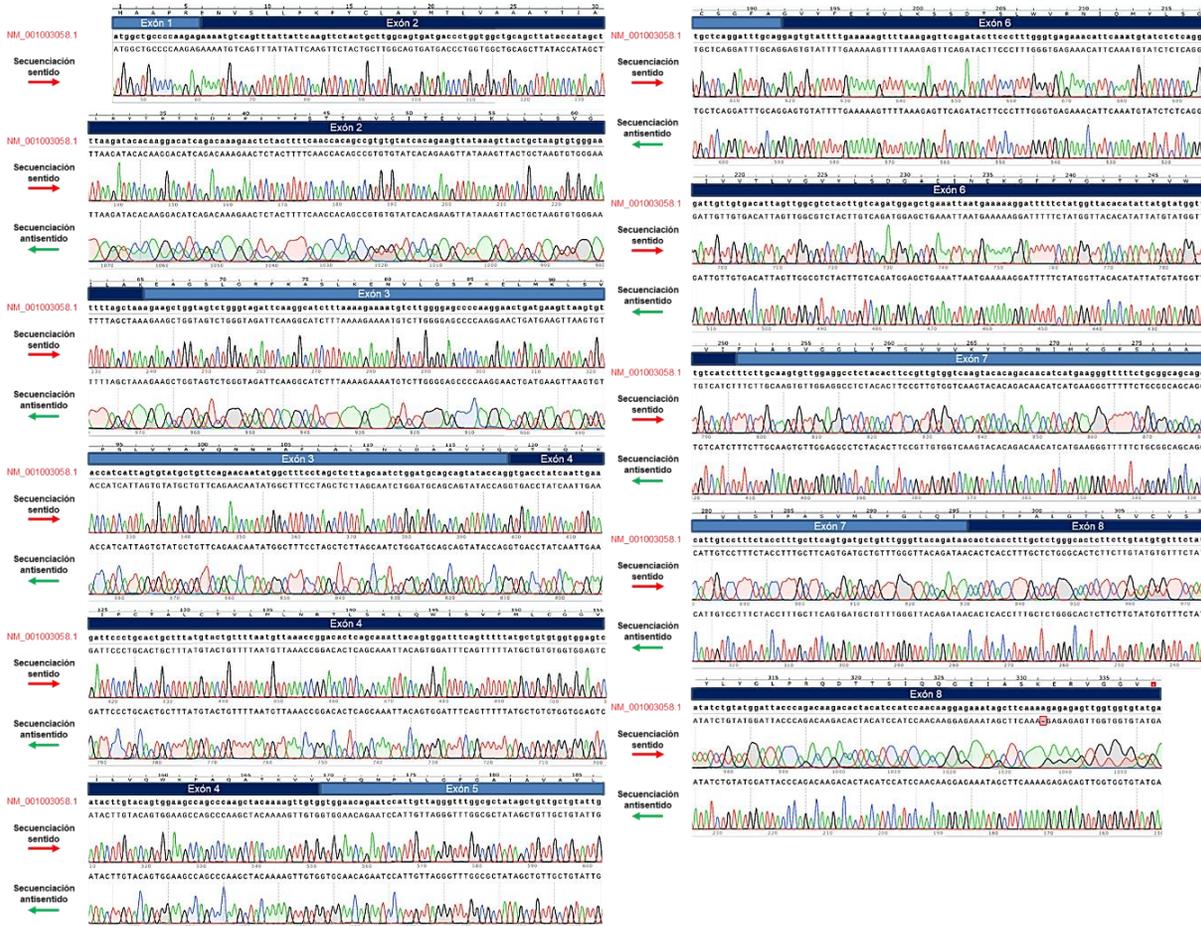


**Figura 31.** Colonias positivas *slc35a1*/ pcDNA3.1 D/V5 His de perro.

La eficiencia de clonación fue del 15%, en comparación con el 90% de eficiencia esperado según lo especificado en el manual del vector. La baja eficiencia se puede

deber a factores explicados previamente. Los plásmidos recombinantes obtenidos de las colonias positivas fueron enviados a secuenciar. Una vez analizados los cromatogramas se determinó que los plásmidos recombinantes 7 y 12 correspondían a la isoforma *wt* del *slc35a1* de perro ([NM\\_001003058.1](#)). En la *figura 32* se muestra la secuenciación de Sanger obtenida del inserto del plásmido pCST-TOPO (colonia 12).

**Transportador de CMP-ácido siálico de Canis lupus familiaris (pCST). Referencia NM\_001003058.1**

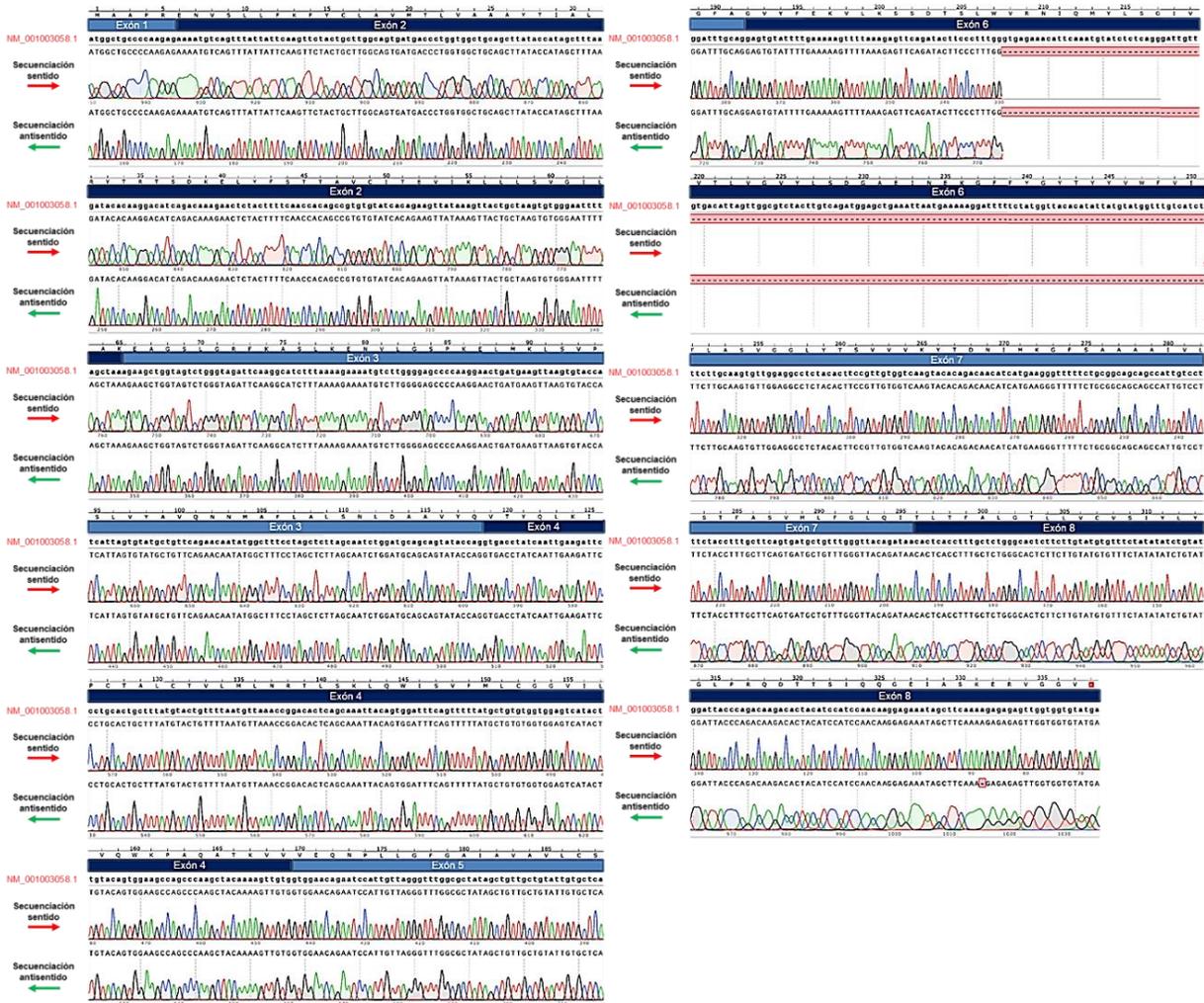


**Figura 32. Secuenciación por exones de la isoforma *wt* del *slc35a1* de perro.** La secuencia experimental de la isoforma *wt* del *slc35a1* de perro cuenta con 8 exones que codifican para una proteína de 337 aa. En la posición 992 (exón 8) de la secuenciación se observa un gap (hueco) provocado por la ausencia de una adenina en la secuenciación sentido. Considerando la calidad de ambas secuenciaciones (sentido y antisentido) se atribuye este gap a un error de lectura en esta región en la secuenciación sentido. El número [NM\\_001003058.1](#) corresponde a la secuencia de perro reportada en la plataforma de NCBI.

La secuenciación del plásmido recombinante de la colonia 17 (*figura 33*) reveló la existencia de una isoforma no reportada del pCST de 884 pb no reportada, que

presenta una eliminación parcial del exón 6 denominada del130-pCST. La clonación del *slc35a1*/pcDNA3.1 D/V5 His de perro, permitió caracterizar molecularmente 2 isoformas del pCST.

### Isoforma del130 *Canis lupus familiaris* (del130-pCST)



**Figura 33. Cromatogramas de la secuenciación de Sanger analizada por exones de la isoforma del130 del *slc35a1* de perro (del130-pCST).** A partir de la posición 621 se observa la pérdida de 130 pb del exón 6, así como un cambio en el marco de lectura abierto a partir del aminoácido 208 con respecto a la isoforma *wt* del pCST (NM 001003058.1). En la posición 993 (exón 8) de la secuenciación se observa un gap (hueco) provocado por la ausencia de una adenina en la secuenciación considerada como antisentido en este análisis. Para descartar la validez se inspeccionó la calidad de ambas secuenciaciones (sentido y antisentido) y se concluyó que el gap es provocado por un error de lectura en esta región en la secuenciación considerada como antisentido.

La isoforma *wt* de 1014 pb y la isoforma del130 de 884 pb (figura 34) que presenta la eliminación o pérdida de 130 pb en el exón 6 mediante un mecanismo de *splicing* alternativo que se explica a continuación.

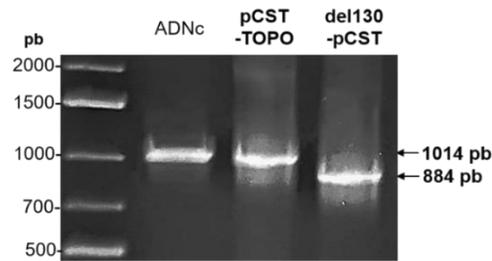


Figura 34. Isoformas del *slc35a1* identificadas en perro.

La ausencia de 130 pb del exón 6 en la isoforma del130-pCST del transportador de CMP-ácido siálico de perro se debe a la presencia de un sitio de *splicing* alternativo GT...AG (donante-aceptor de empalme) entre el extremo 5' del exón 6 y 3' del intrón 6 (Karambataki et al., 2010). Estas bases presentes en casi todos los genes eucariontes generan una incorrecta eliminación del intrón 6, ocasionando la eliminación de 130 pb a partir de la posición 621 correspondiente al exón 6. La eliminación parcial del exón 6 provoca un cambio del marco de lectura abierto y la aparición de un codón de paro prematuro en la posición 682 pb que resulta en una proteína de 227 aa, de menor tamaño que la isoforma *wt* (337 aa) del pCST, figura 35.

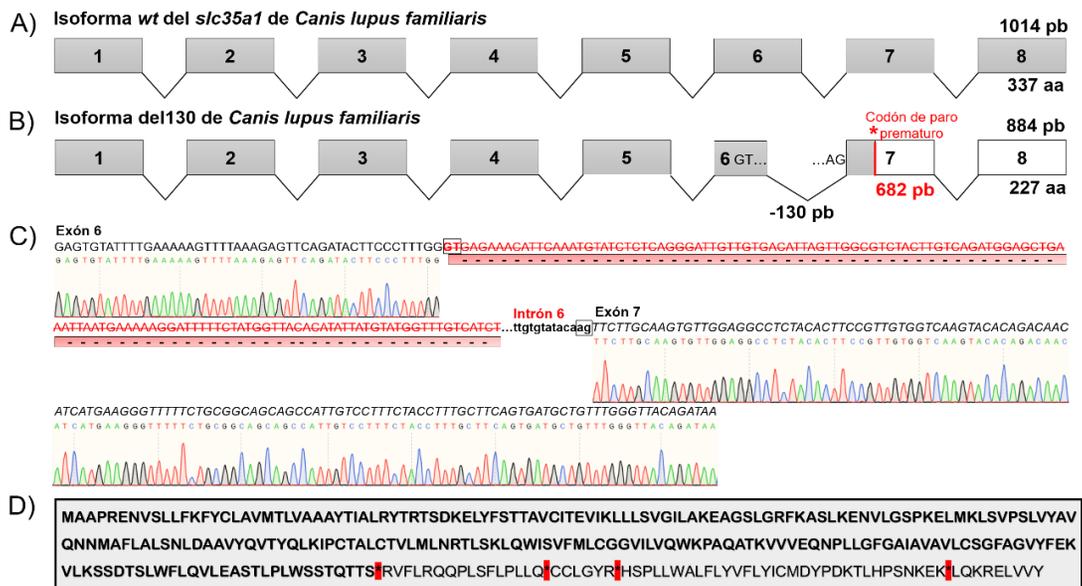


Figura 35. Análisis de la isoforma del130 del *slc35a1* de perro. A) Isoforma silvestre del pCST presenta 8 exones (1014 pb) que codifican para una proteína de 337 aa. B) La isoforma del130-pCST codificada por 884 pb contiene un codón de paro prematuro en la posición 682 pb, debido a la presencia de un sitio donador de *splicing* que provoca la traducción de una proteína de 227 aa de menor tamaño que la isoforma *wt*. C) Cromatogramas de secuenciación de Sanger que señalan el mecanismo de *splicing* de la isoforma del130 del *slc35a1* de perro. En recuadros se indica el sitio de *splicing* alternativo GT...ag presente entre la posición 621 del exón 6 y 3' del intrón 6.

La presencia de esta isoforma del130 ha sido reportada previamente como una de las isoformas de *splicing* del hCST. La isoforma del130 de humano y perro son generadas por el mismo mecanismo de *splicing* alternativo (Martinez-Duncker et al., 2005).

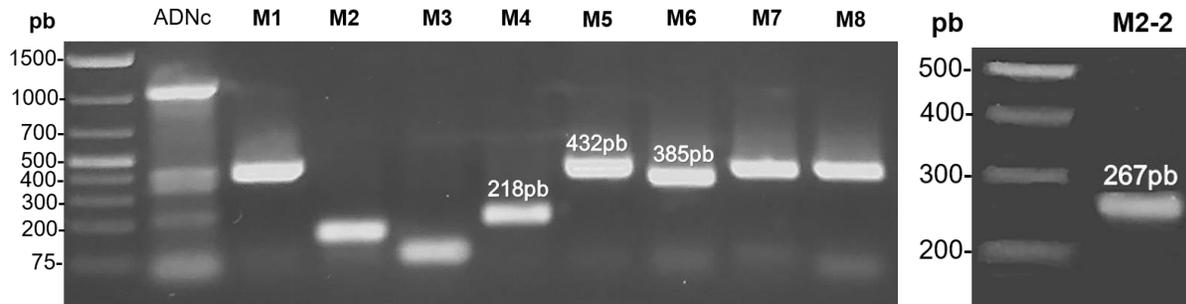
De manera similar a la isoforma del130 de humano, la isoforma del130-pCST del *slc35a1* de perro se presume también como no funcional en el transporte debido a la pérdida del motivo IIGV en su extremo carboxilo terminal que permitiría su translocación a Golgi (Zhao et al., 2006).

### **8.6.2 Análisis de la clonación del *slc35a1* de ratón en el vector pcDNA 3.1 D/V5 His**

En la transformación bacteriana utilizando el vector con el inserto *slc35a1* del mCST se obtuvieron 20 colonias, de las cuales purificaron plásmidos y se procedió a realizar PCR convencional utilizando los oligos Mouse F y Musmus R. Las 20 colonias fueron positivas para el gen *slc35a1* de ratón, por lo tanto la eficiencia de clonación fue del 100%.

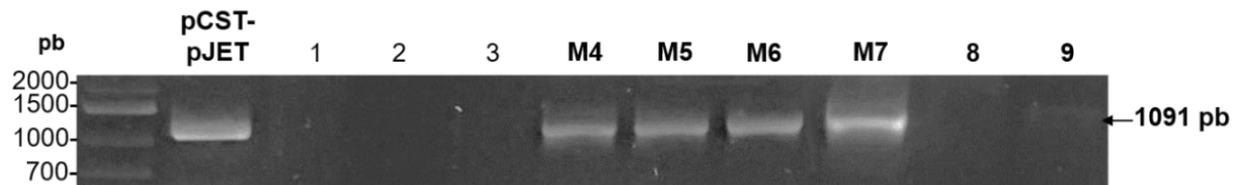
El plásmido purificado se utilizó como templado para una segunda PCR, para confirmar el tamaño del inserto al compararlo con ADNc de ratón. Se observó similitud en el peso molecular de los plásmidos recombinantes obtenidos, por lo que se eligieron a las a las construcciones M4-M6 como representativas los amplicones observados por presentar un mayor peso. Una segunda clonación se realizó bajo las mismas condiciones donde se obtuvieron 2 colonias identificando una de ellas como positiva M2-2 (*figura 36*).

La secuenciación de las clonas M2-2, M4, M5 y M6 no se pudo asociar con la secuencia que corresponde al *slc35a1* de ratón. Se realizó un BLAST de las secuencias obtenidas para poder identificarlas con algún reporte teórico. Se realizó un BLAST de las secuencias obtenidas para poder identificarlas con algún reporte teórico y se presume podrían corresponder a transcritos de las secuencias [NR\\_046233.2](#) y [XM\\_006538575.2](#) de ratón.



**Figura 36. Colonias obtenidas de la clonación del *slc35a1* de ratón a partir de producto de PCR en el vector pcDNA 3.1 D/V5 His.** La secuenciación de los plásmidos recombinantes M2-2, M4-M6 revelaron las secuencias no corresponde a la secuencia del *slc35a1* de ratón.

La clonación de la isoforma *wt* del *slc35a1* de ratón (*wt*-mCST) se realizó mediante la subclonación de la isoforma pCST-pJET, como se describe en la metodología. En la transformación bacteriana se obtuvieron 9 colonias, de las cuales se purificaron plásmidos y se procedió a realizar PCR convencional utilizando los oligonucleótidos Mouse F y Musmus R. Se identificaron 4 colonias como positivas M4-M7 (*figura 37*) obteniendo un 44% de eficiencia.



**Figura 37. PCR de colonias transformadas con el vector pcDNA 3.1 D/V5 His/*slc35a1* de ratón.**

El plásmido recombinante M7 se seleccionó para enviar a secuenciación de Sanger. Una vez obtenidos los resultados se denominó a esta isoforma como *wt*-mCST y se corroboró que la secuencia obtenida correspondía con la secuencia reportada para la isoforma *wt* de ratón ([NM\\_011895.3](#)), *figura 38*.

Transportador de CMP-ácido siálico de *Mus musculus* (mCST). Referencia NM\_011895.3

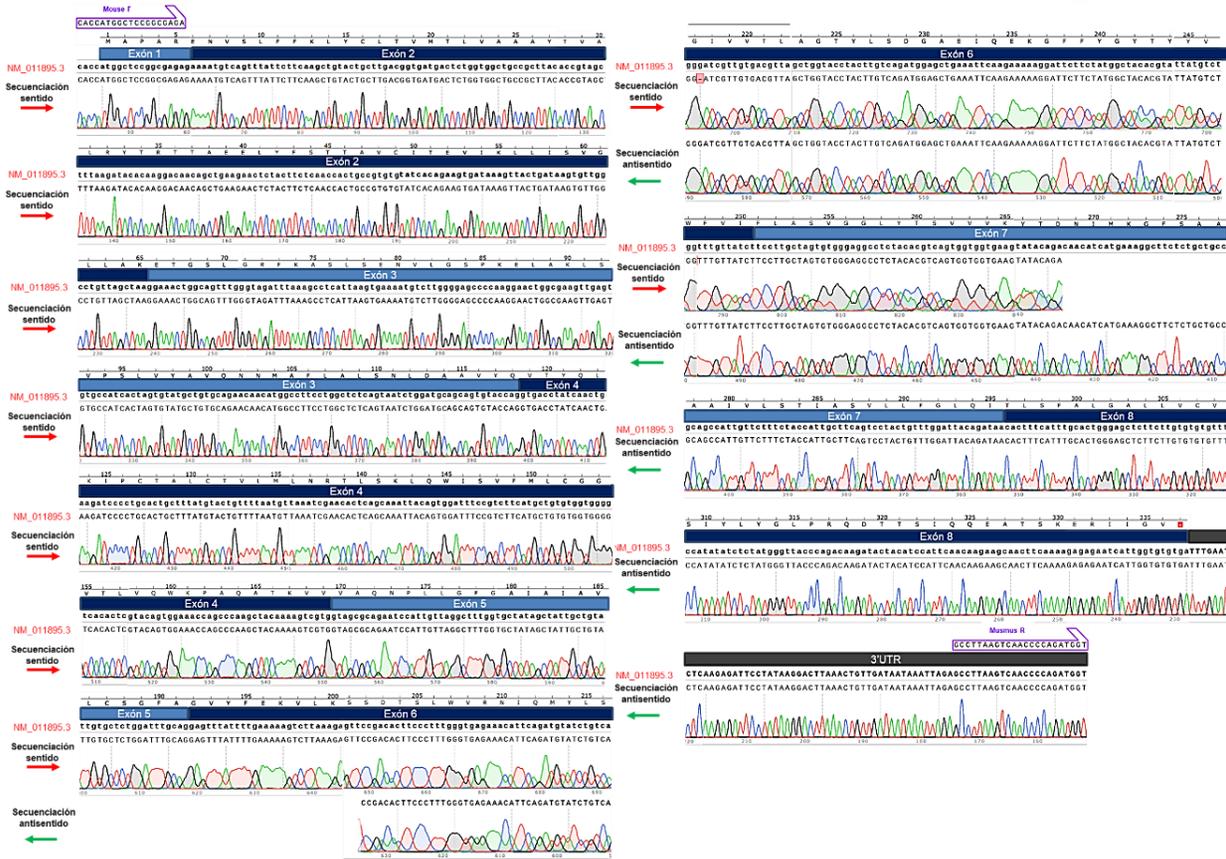


Figura 38. Secuenciación de Sanger de la isoforma *wt* del *slc35a1* de ratón.

La clonación del *slc35a1* en el vector de expresión eucariota pcDNA 3.1 D/V5 His permitió caracterizar molecularmente 2 isoformas del pCST, que corresponden a la forma *wt* y a una isoforma que muestra *splicing* alternativo en el exón 6, de las cuales no se contaba con reportes experimentales. Adicionalmente se obtuvo la isoforma *wt* del mCST, figura 39.

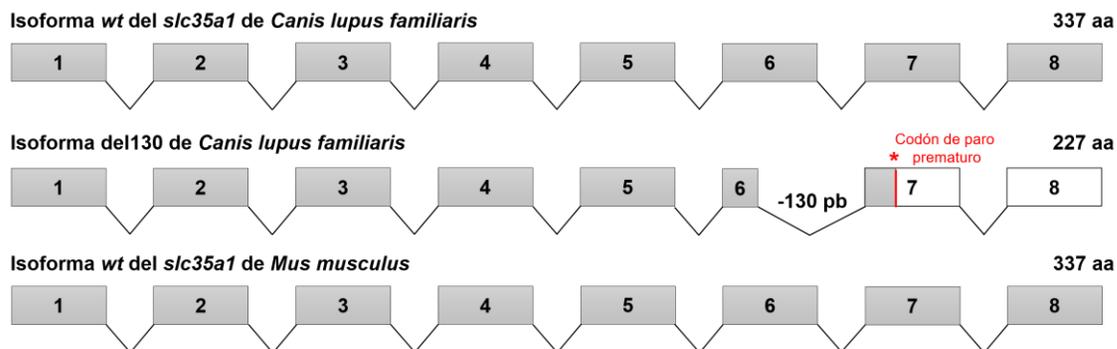
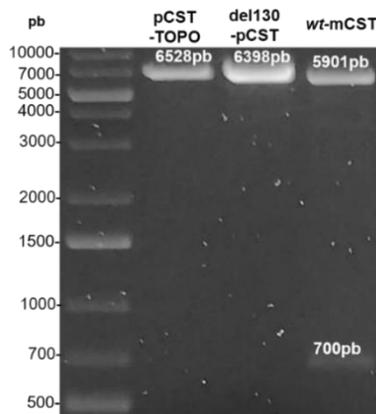


Figura 39. Isoformas del *slc35a1* de perro y ratón clonadas en el vector pCDNA 3.1

### 8.7 Verificación de la direccionalidad de las clonas a transfectar

La verificación de la direccionalidad del inserto en las construcciones *slc35a1*/pCDNA 3.1 se determinó mediante un ensayo de restricción KpnI. La construcción *wt-mCST* tiene 2 sitios de corte para esta enzima que generan 2 fragmentos de 5901 pb y 700 pb.

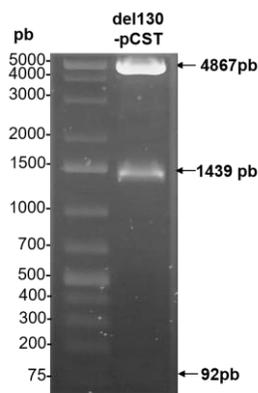
Las construcciones de perro pCST-TOPO y del130-pCST también se linealizaron con KpnI, generando fragmentos de 6528 y 6398 pb, respectivamente. Los valores observados en el gel de agarosa corresponden con los tamaños moleculares esperados, *figura 40*.



**Figura 40. Ensayo de restricción/linealización de las construcciones del *slc35a1* de ratón y perro utilizando la enzima KpnI.**

Los resultados de secuenciación para la construcción del130-pCST/pcDNA 3.1 D-V5His revelaron que el inserto se clonó en sentido opuesto al promotor CMV. Para confirmar lo anterior, se realizó un ensayo de restricción de esta construcción con la enzima PstI que realiza un corte en el inserto de la isoforma del130 en la posición 9, generando fragmentos del peso molecular de 4867 pb, 1439 pb y 92 pb, que corresponden a lo esperado de la clonación del inserto en sentido opuesto al promotor como se observa en la *figura 41*.

Con base en lo anterior se optó por no comprobar la funcionalidad de esta isoforma en el modelo CHO-Lec2.



**Figura 41. Ensayo de restricción de la construcción del130-pCST/pcDNA3.1 D-V5His con la enzima PstI.** Los fragmentos observados corresponden con lo esperado para el inserto clonado en reverso al promotor.

### 8.8 Análisis de células Lec2 complementadas con construcciones de perro y ratón mediante citometría de flujo

La complementación genética de las construcciones que contienen a las isoformas *wt* del *slc35a1* de perro y ratón se realizó en células Lec2 con fenotipo asialilado, derivado de su deficiencia en el transporte de CMP-sia. El análisis de la expresión de ácido siálico en la membrana exterior de las células Lec2, se visualizó mediante la unión de lectinas bionitililadas acopladas al fluoroforo Alexa Flúor 647.

Las lectinas utilizadas fueron, WGA que reconoce residuos ácido siálico y N-acetilglucosamina, MAL I que reconoce ácido siálico unido 2,3 a galactosa, y PNA que reconoce galactosa unida  $\beta$ 1,3 a N-acetilgalactosamina como se ha reportado en otros experimentos (Flynn, R. A., Pedram, K., Malaker, S. A., Batista, P. J., Smith, B. A., Johnson, A. G., & Bertozzi, 2021; Martinez-Duncker et al., 2005; Olczak & Guillen, 2006; Salinas-Marín et al., 2016; Ury et al., 2021).

La proliferación de las células Lec2 transfectadas se monitoreó mediante un microscopio invertido durante 72 h previas a la adición de geneticina y posteriormente durante 15 días de selección con el antibiótico. Las células CHO no se expusieron a geneticina porque se utilizaron como un control positivo en las tinciones de análisis del fenotipo sialilado de las células transfectadas posterior a las 72 h de selección.

A los 3 días post-transfección, las poblaciones celulares tratadas con Lipofectamina mostraron un cambio en su morfología, así como la muerte de una parte de la

población. En el día 6 de la selección se observó la muerte de las células control Lec2. Transcurridos los 15 días de selección, se obtuvieron células estables que expresaban los vectores recombinantes pCST-TOPO y *wt*-mCST de manera transitoria, *figura 42*.

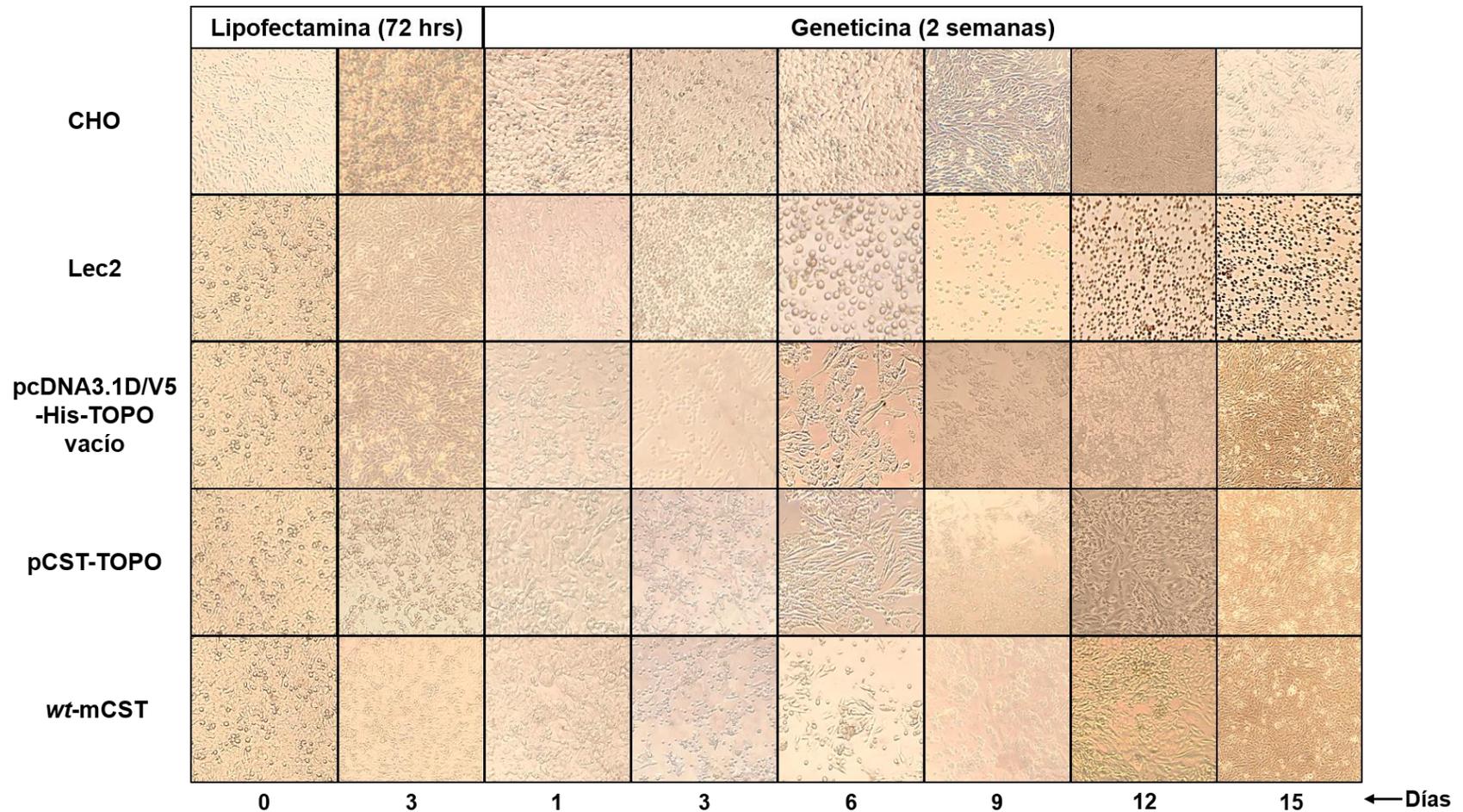
El análisis de diagramas de puntos (dot plots) obtenidos por citometría de flujo representan el porcentaje de la población celular positiva a la unión de la lectina en su superficie celular. Los datos observados evidencian que las poblaciones celulares analizadas fueron correctamente teñidas porque las células control CHO y Lec2 (células no transfectadas) expresaron el glicofenotipo celular esperado.

La población celular CHO fue positiva en la tinción con la lectinas WGA y MAL I en un 93% y 80.3% respectivamente y negativa para la tinción con la lectina PNA. Las células Lec2 mostraron un comportamiento opuesto presentando 87.9% de células positivas con la lectina PNA, y valores de 87.9% y 0.2% de células positivas con las lectinas WGA y MAL I, respectivamente.

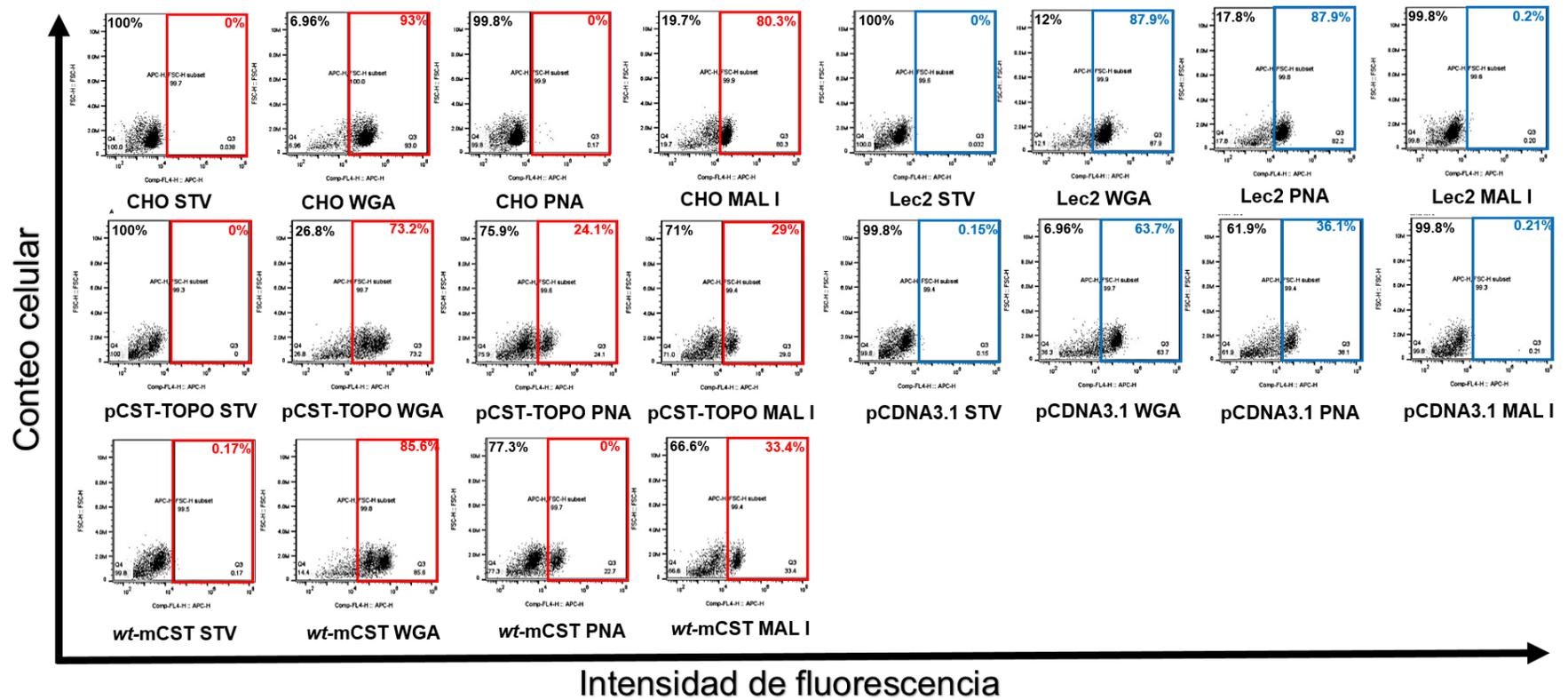
Las poblaciones celulares transfectadas con las isoformas *wt* del CST de perro y ratón muestran un comportamiento similar a las células CHO, presentando 73.2% y 86.6% de células positivas para la lectina WGA, 29% y 33.4% para la lectina MAL I, así como un 24.1% y 0% de células positivas a la lectina PNA, *figura 43*.

La intensidad media de fluorescencia (IMF) obtenida de la unión de cada lectina a las diferentes poblaciones celulares se analizó a los 3 y 15 días de selección con geneticina. En la *figura 44-45*, se observa que las células CHO exhiben mayor unión a la lectina WGA (IMF=100,698 al día 3 y valores de IMF=120,534 a los 15 días) y MAL I (IMF=13,477 al día 3 y una IMF=32,630 a los 15 días), así como menor unión a lectina PNA (IMF=3,746 al día 3 y valores de IMF=4,332 a los 15 días), *figura 46*.

Las células Lec2 teñidas con las mismas lectinas mostraron un comportamiento opuesto, la unión a la lectina WGA (IMF=100,698 al día 3 y una IMF=120,534 a los 15 días) y MAL I (IMF= 2504 al día 3 y valores de IMF=4087) ocurrió en menor proporción que en CHO, (*figura 44-45*), así en mayor proporción a la lectina PNA (IMF=100,698 al día 3 y IMF=120,534 a los 15 días), *figura 46*.



**Figura 42. Monitoreo de la proliferación de las células utilizadas en los experimentos de complementación genética por microscopio binocular invertido.** Células estables que expresan transitoriamente los vectores recombinantes pCST-TOPO y *wt*-mCST después de ser seleccionadas con geneticina durante 3 y 15 días (2 semanas). Se utilizó un como control negativo células transfectadas con el plásmido pcDNA3.1D/V5-His-TOPO vacío (sin inserto) y células Lec2 como control de muerte. Las células CHO no fueron tratadas con antibiótico.



**Figura 43.- Dot plots de las poblaciones celulares analizadas a los 15 días post-selección con genética.** Se adquirieron 10,000 eventos por muestra y los datos se obtuvieron ajustando las poblaciones en el canal de fluorescencia APC-H. Se señala con un recuadro de color rojo y azul la región donde se observa el porcentaje de células positivas a la unión a las lectinas bionitiladas WGA, PNA y MAL I utilizadas para verificar el perfil de sialilación. Adicionalmente se muestran los controles de tinción negativos para cada población celular teñida sólo con estreptavidina (STV).

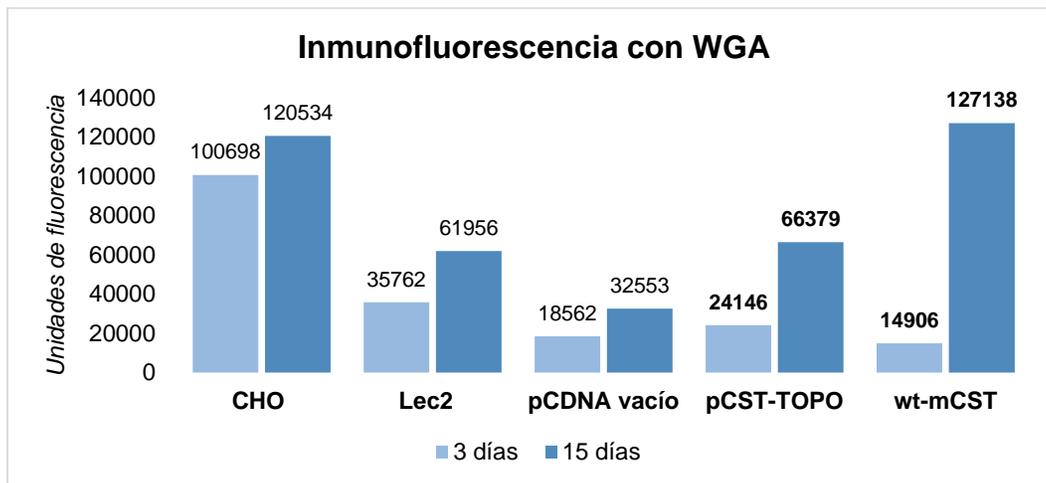
Estos resultados validan los reportes del transporte de CMP- ácido siálico en células CHO y la ausencia del transporte en células Lec2 (Flynn, R. A., Pedram, K., Malaker, S. A., Batista, P. J., Smith, B. A., Johnson, A. G., & Bertozzi, 2021; Salinas-Marín et al., 2016; Ury et al., 2021).

Las células transfectadas con la construcción de *slc35a1* de perro (pCST-TOPO) generó valores de IMF= 24,146 y 66,379 a los 3 y 15 días, respectivamente para la lectina WGA, comparado con los valores de IMF=18,562 (día 3) y 32,553 (día 15) que se obtuvieron para las células transfectadas con el pCDNA 3.1 D/V5 His vacío (PV), *figura 44*. Lo anterior, representa un incremento del doble de magnitud de las IMF observadas a los 15 días de presión selectiva de la construcción pCST-TOPO/pCDNA 3.1 D/V5 His con respecto a los valores de IMF determinados en el PV. Este mismo comportamiento se observó en las mediciones realizadas con la lectina MAL I (*figura 45*), donde el aumento de la IMF fue de aproximadamente 3.6 veces con respecto a los valores obtenidos en las células transfectadas con el PV, *figura 47*.

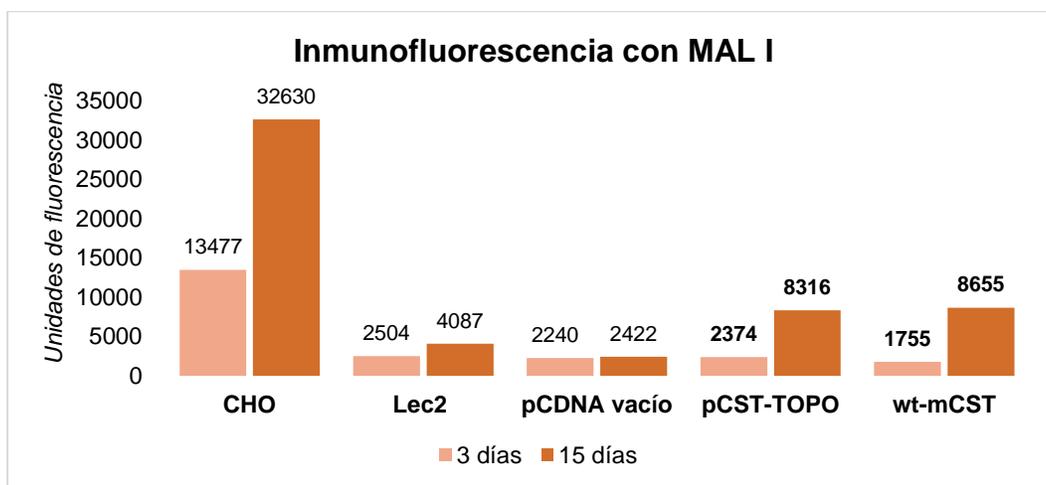
La transfección de la construcción del *slc35a1* de ratón (*wt-mCST*) en células Lec2 generó valores de IMF de 14,906 y 127,138 a los 3 y 15 días, respectivamente para la lectina WGA comparado con los valores del PV de IMF= 18,562 y 32,553 a los 3 días y 15 días de selección, *figura 44*. De acuerdo con los resultados anteriores, la IMF obtenida con la construcción *wt-mCST/pCDNA 3.1 D/V5 His* a los 15 días representa un aumento de 3.9 veces con respecto a los valores de IMF del PV, *figura 47*. El mismo comportamiento se obtuvo de las mediciones realizadas con la lectina MAL I (*figura 44*), donde se observó un aumento de la IMF de 3.6 veces con respecto a los valores medidos para las células transfectadas con el PV, *figura 47*.

El glicofenotipo observado en las células transfectadas con las construcciones mencionadas permitió comprobar que ambas isoformas silvestres del *wt-slc35a1* de perro y ratón complementan el fenotipo asialo de las células Lec2. Los valores de IMF obtenidos por la unión de las lectinas WGA y MAL I, demostró la presencia de residuos de ácido siálico en la superficie celular de las células con expresión transitoria de las construcciones *wt-mCST* o *wt-pCST/pCDNA 3.1 D/V5 His*.

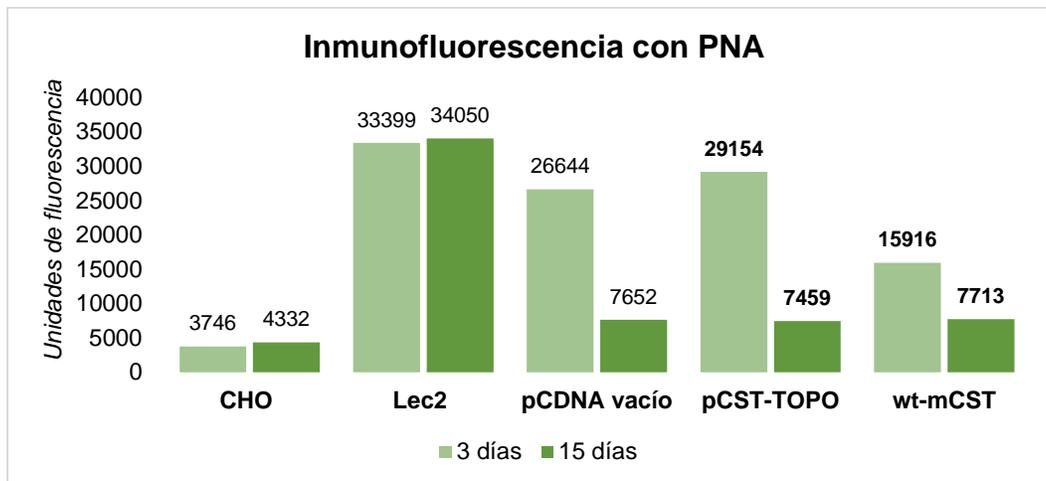
En contraste al comportamiento observado con las lectinas WGA y MAL I, los valores de IMF obtenidos con la tinción de la lectina PNA para las construcciones pCST-TOPO/pcDNA 3.1 D/V5 His y *wt*-mCST/pcDNA 3.1 D/V5 His disminuyó o se mantuvo idéntica con respecto a las células transfectadas con el PV. Esto permitió corroborar que la transfección de las construcciones antes mencionadas redujo ligeramente la presencia de residuos de galactosa desprotegidos o sin protección por residuos de ácido siálico, *figura 46*.



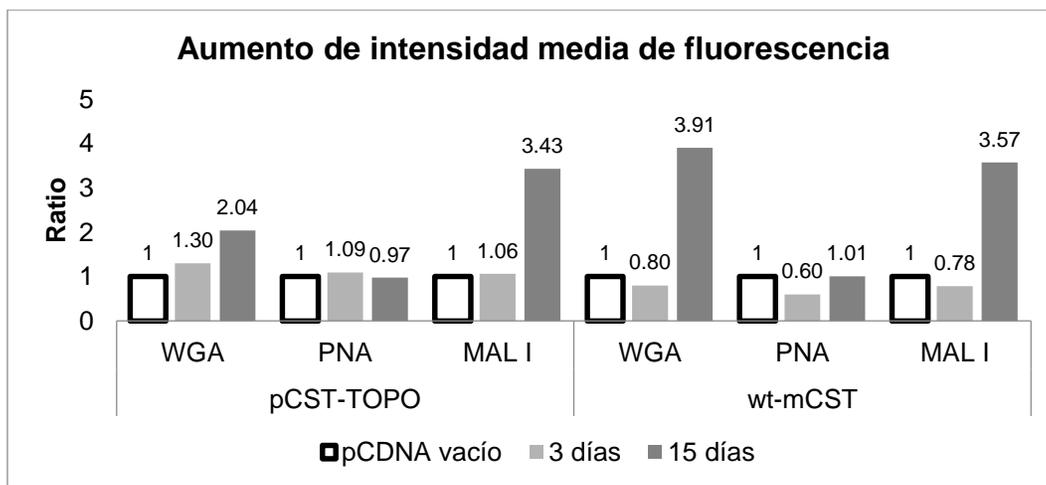
**Figura 44. Intensidad media de fluorescencia (IMF) observada en células teñidas con la lectina WGA.** Construcciones analizadas: pCDNA vacío (células transfectadas con plásmido sin inserto), pCST-TOPO (células transfectadas con la isoforma *wt* del *slc35a1* de perro) y *wt*-mCST (células transfectadas con la isoforma *wt* del *slc35a1* de ratón). Células control (células no transfectadas) CHO y Lec2.



**Figura 45. Intensidad media de fluorescencia (IMF) observada en células teñidas con la lectina MAL I.** Células Lec2 transfectadas con las construcciones pCDNA vacío, pCST-TOPO y *wt*-mCST. Células control CHO y Lec2.

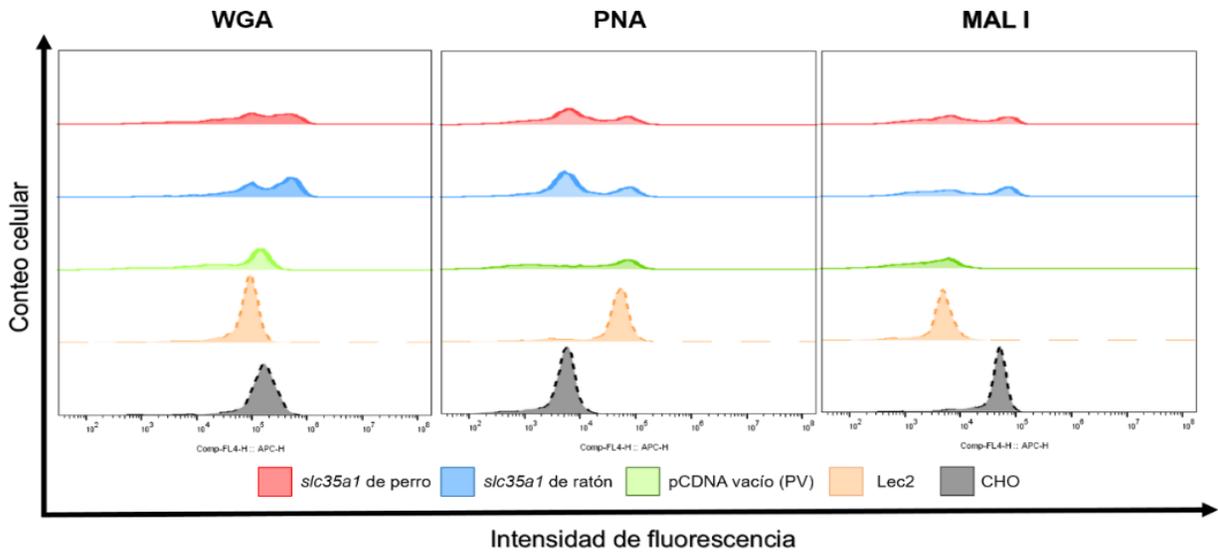


**Figura 46. Intensidad media de fluorescencia (IMF) observada en células teñidas con la lectina PNA.** Células Lec2 transfectadas con las construcciones pCDNA vacío, pCST-TOPO y wt-mCST. Células control CHO y Lec2.



**Figura 47. Aumento de la IMF de las construcciones transfectadas con respecto al plásmido vacío.** En el gráfico se describe el ratio de aumento de IMF de las poblaciones celulares pCST-TOPO y wt-mCST con respecto a pCDNA al cuál se le asigna el valor de la unidad.

El análisis de histogramas y los datos obtenidos por citometría de flujo de las células transfectadas con las construcciones pCST-TOPO/pcDNA 3.1 D/V5 His y wt-mCST/pcDNA 3.1 D/V5 His que corresponden a las isoformas *wt* del *slc35a1* de perro y ratón complementan el modelo CHO-Lec2, permitieron comprobar que las isoformas *wt* del *slc35a1* de perro y ratón clonado son funcionales en el transporte de CMP-ácido siálico porque restauran el fenotipo sialilado de las células Lec2, *figura 48*.



**Figura 48.** Análisis del fenotipo de las poblaciones celulares analizadas. Células Lec2 transfectadas con las construcciones pCDNA vacío (PV), pCST-TOPO (*slc35a1* de perro) y *wt*-mCST (*slc35a1* de ratón). Células control CHO y Lec2.

El análisis realizado del perfil de sialilación observado de las transfecciones no resultó en un 100% de complementación genética y es necesario incrementar la selección con el antibiótico diluyendo el número de células expuestas para obtener poblaciones con mayor expresión de las isoformas silvestres del *slc35a1* de perro y ratón.

## 9. CONCLUSIONES

1. El *slc35a1* de *Mus musculus* y de *Canis lupus familiaris* expresan isoformas de *splicing* alternativo similares a las isoformas identificadas en el *SLC35A1* de humano.
2. Las isoformas silvestres del *slc35a1* de *Mus musculus* y *Canis lupus familiaris*, así como la isoforma del130 de este último se lograron caracterizar molecularmente.
3. La identificación de la isoforma de *splicing* del130 de *Canis lupus familiaris* es el primer reporte de expresión de esta isoforma en otro mamífero adicional al ser humano.
4. Las isoformas silvestres del *slc35a1* de *Mus musculus* y de *Canis lupus familiaris* complementaron genéticamente el glicofenotipo asialo de las células Lec2 determinado mediante el incremento de la unión de las lectinas WGA y MAL I a la superficie celular de estas células.
5. Este trabajo constituye el primer reporte de la presencia de isoformas de *splicing* del *slc35a1* en otros mamíferos diferentes al ser humano.

## 10. PERSPECTIVAS

- Realizar réplicas de los experimentos de citometría de flujo de las células transfectadas, comprobar y correlacionar el glicofenotipo mediante el análisis del genotipo e identificación de los transcritos generados por las construcciones.
- Clonar las isoformas de *splicing* del *slc35a1* reportadas teóricamente que no se clonaron en este trabajo.
- Identificar y clonar la isoforma del 177 del *slc35a1* de ambas especies.
- Realizar un modelo tridimensional por homología de las isoformas del *slc35a1* identificadas y estudiar su interacción con el sustrato CMP-sia.

## **11. ANEXOS. Preparación de soluciones**

### **11.1 Preparación de soluciones para obtener células Mach One**

Buffer TB: La preparación de 1 L de buffer TB se realiza disolviendo 3.24 g de Pipes, 1.93 g  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 18.63 g KCl en agua destilada. Ajustar el pH a 6.7 utilizando KOH 2.5 N y una vez ajustado se adiciona 6.92 g de  $\text{MnCl}_2$ . Al finalizar se procede a filtrar la solución en una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y se almacena la solución a 4 °C hasta su uso.

### **11.2 Preparación del marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA**

La preparación del marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA (SM1333, Thermo Fisher Scientific) utilizado en los geles de agarosa se realizó diluyendo en partes iguales con buffer de carga TriTrack DNA Loading Dye (6X) (R1161, Thermo Fisher Scientific).

### **11.3 Preparación de buffer TAE 50 X**

La preparación de 100 mL de buffer TAE 50x se inicia pesando 24.2 g de tris base en un vaso de precipitado de 250 mL, al cual se le añaden 25 ml de agua destilada y que posteriormente se coloca en agitación magnética hasta su disolución. Una vez que se había disuelto el reactivo tris base, se le agregan 5.71 mL de ácido acético glacial. Después se midieron 10 mL de EDTA 0.5 M en una probeta y se añadieron al mismo vaso de precipitado. Finalmente la solución fue aforada a 100 mL en una probeta y se traspasó a su contenedor final.

### **11.4 Preparación de Medio LB sólido con antibiótico**

La preparación de 250 mL de Medio LB se realiza disolviendo en agua destilada 2.5 g de peptona, 1.25 g de extracto de levadura y 2.5 g de NaCl. Posteriormente se agregaron 3.75 g de agar y pasar a un recipiente de vidrio con tapa. El medio se esterilizó en una autoclave durante 15 min. Luego se dejó entibiar y se agregaron 0.1 mg/mL de ampicilina o 0.05 mg/mL de kanamicina. Finalmente, el medio se vertió en cajas Petri de 100x 15 mm y una vez que se enfriaron, se reservaron a 4 °C hasta su uso.

### **11.5 Preparación de Medio LB líquido con antibiótico**

La preparación de 250 ml de Medio LB líquido se realiza disolviendo en agua destilada 2.5 g de peptona, 1.25 g de extracto de levadura y 2.5 g de NaCl. Posteriormente, el medio se esterilizó en una autoclave durante 15 min, se dejó enfriar a TA y se agregaron 0.1 mg/ mL de ampicilina o 0.05 mg/mL de kanamicina. Finalmente se reservó a 4 °C hasta su uso.

### **11.6 Preparación de Medio SOC**

La preparación de 50 ml de medio SOC se realiza pesando 1 g de triptona, 0.25 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl y 0.0093 g de KCl en un vaso de precipitado. Después se debe ajustar el pH=7 utilizando NaOH 1N. Una vez que el pH fue ajustado se pasó la solución a un frasco de vidrio con tapa. Por último el medio debe esterilizarse durante 30 min y posterior a ello ser resguardado a 4 °C hasta su uso.

### **11.7 Preparación de gliceroles de las clonas positivas**

Las clonas positivas fueron resembradas en una caja Petri con medio LB sólido con antibiótico que incubó a 37 °C durante 12 h, posteriormente se eligió una colonia que fue inoculada en 5 mL de medio LB con antibiótico que se mantuvo a 37 °C, en agitación a 200 rpm durante 12 h. Se colocaron 850 µL del cultivo obtenido en un microtubo de 1.5 mL, se le añadieron 150 µL de glicerol estéril y se resuspendió suavemente el volumen completo. Inmediatamente, se procedió a congelar los tubos a -80 °C.

### **11.8 Preparación de soluciones para purificación de plásmido por lisis alcalina**

Solución de lisis alcalina I: Para obtener un volumen final de 20 mL se disolver en agua destilada 0.180g de glucosa 50mM, 0.0607g de Tris-HCl 25mM y 0.05845 g de EDTA 10mM. Una vez disuelta la solución se esterilizada utilizando una autoclave y se almacenada a 4 °C. Solución de lisis alcalina II: Para preparar 2 mL se añaden 40 µL de NaOH 10N, 200 µL de SDS 10% y 1760 µL de agua MiliQ autoclaveada. Esta solución se debe preparar en fresco. Solución de lisis alcalina III: Para obtener un volumen final de 25 mL se utilizan 15mL de acetato de potasio 5M, 2.9mL de ácido acético glacial y 7.1mL de agua destilada. Reservar a 4 °C y colocar a -20 °C, al menos 20 min antes de su uso.

## 12. REFERENCIAS

- Ahuja, S., & Whorton, M. R. (2019). Structural basis for mammalian nucleotide sugar transport. *ELife*, 8, 1–27. <https://doi.org/10.7554/eLife.45221>
- Aoki, K., Ishida, N., & Kawakita, M. (2003). Substrate recognition by nucleotide sugar transporters: Further characterization of substrate recognition regions by analyses of UDP-galactose/CMP-sialic acid transporter chimeras and biochemical analysis of the substrate specificity of parental and chime. *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), 22887–22893. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302620200>
- Broussard, A. C., & Boyce, M. (2019). Life is sweet: The cell biology of glycoconjugates. *Molecular Biology of the Cell*, 30(5), 525–529. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-04-0247>
- Büll, C., Stoel, M. A., Den Brok, M. H., & Adema, G. J. (2014). Sialic acids sweeten a tumor's life. *Cancer Research*, 74(12), 3199–3204. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0728>
- Burset, M., Seledtsov, I. A., & Solovyev, V. V. (2000). Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(21), 4364–4375. <https://doi.org/10.1093/nar/28.21.4364>
- Chan, K. F., Zhang, P., & Song, Z. (2010). Identification of essential amino acid residues in the hydrophilic loop regions of the CMP-sialic acid transporter and UDP-galactose transporter. *Glycobiology*, 20(6), 689–701. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq016>
- Cotton, T., Parker, E., & Joseph, D. (2014). The role of sialic acid synthases in sialic acid biosynthesis. *Chemistry in New Zealand*, 78(2), 69–74.
- Eckhardt, M., Gotza, B., & Gerardy-Schahn, R. (1998). Mutants of the CMP-sialic acid transporter causing the Lec2 phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), 20189–20195. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20189>
- Eckhardt, M., Gotza, B., & Gerardy-Schahn, R. (1999). Membrane topology of the mammalian CMP-sialic acid transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 274(13), 8779–8787. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.8779>
- Eckhardt, M., Mühlenhoff, M., Bethe, A., & Gerardy-Schahn, R. (1996). Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 7572–7576. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7572>
- Flynn, R. A., Pedram, K., Malaker, S. A., Batista, P. J., Smith, B. A., Johnson, A. G., & Bertozzi, C. R. (2021). (2021). Small RNAs are modified with N-glycans and displayed on the surface of living cells. *Cell*, 184(12), 3109–3124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.023>
- Gerardy-Schahn, R., Oelmann, S., & Bakker, H. (2001). Nucleotide sugar transporters: Biological and functional aspects. *Biochimie*, 83(8), 775–782. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01322-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01322-0)
- Ghosh, S. (2020). Sialic acid and biology of life: An introduction. In *Sialic Acids and Sialoglycoconjugates in the Biology of Life, Health and Disease*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816126-5.00001-9>
- Hadley, B., Litfin, T., Day, C. J., Haselhorst, T., Zhou, Y., & Tiralongo, J. (2019). Nucleotide Sugar Transporter SLC35 Family Structure and Function. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 1123–1134. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.08.002>
- Hadley, B., Maggioni, A., Ashikov, A., Day, C. J., Haselhorst, T., & Tiralongo, J. (2014). Structure and function of nucleotide sugar transporters: Current progress. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 10(16), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.05.003>
- Ishida, N., Miura, N., Yoshioka, S., & Kawakita, M. (1996). Molecular cloning and characterization of a novel isoform of the human UDP-galactose transporter, and of related complementary DNAs

- belonging to the nucleotide-sugar transporter gene family. *Journal of Biochemistry*, 120(6), 1074–1078. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021523>
- Jacobs, C. L., Goon, S., Yarema, K. J., Hinderlich, S., Hang, H. C., Chai, D. H., & Bertozzi, C. R. (2001). Substrate specificity of the sialic acid biosynthetic pathway. *Biochemistry*, 40(43), 12864–12874. <https://doi.org/10.1021/bi010862s>
- Kooner, A. S., Yu, H., & Chen, X. (2019). Synthesis of N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) and its glycosides. *Frontiers in Immunology*, 10(AUG), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02004>
- Lim, S. F., Lee, M. M., Zhang, P., & Song, Z. (2008). The golgi CMP-sialic acid transporter: A new CHO mutant provides functional insights. *Glycobiology*, 18(11), 851–860. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn080>
- Ma, X., Li, Y., Kondo, Y., Shi, H., & Han, J. (2021). *Slc35a1 deficiency causes thrombocytopenia*.
- Maggioni, A., von Itzstein, M., Rodríguez Guzmán, I. B., Ashikov, A., Stephens, A. S., Haselhorst, T., & Tiralongo, J. (2013). Characterisation of CMP-sialic acid transporter substrate recognition. *ChemBioChem*, 14(15), 1936–1942. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300298>
- Martinez-Duncker, I., Dupré, T., Piller, V., Piller, F., Candelier, J. J., Trichet, C., Tchernia, G., Oriol, R., & Mollicone, R. (2005). Genetic complementation reveals a novel human congenital disorder of glycosylation of type II, due to inactivation of the Golgi CMP-sialic acid transporter. *Blood*, 105(7), 2671–2676. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3509>
- Martinez-Duncker, I., Salinas-Marin, R., & Martinez-Duncker, C. (2011). Towards In Vivo Imaging of Cancer Sialylation. *International Journal of Molecular Imaging*, 2011, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2011/283497>
- Mohamed, M., Ashikov, A., Guillard, M., Robben, J. H., Schmidt, S., Van Den Heuvel, B., De Brouwer, A. P. M., Gerardy-Schahn, R., Deen, P. M. T., Wevers, R. A., Lefeber, D. J., & Morava, E. (2013). Intellectual disability and bleeding diathesis due to deficient CMP-sialic acid transport. *Neurology*, 81(7), 681–687. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a08f53>
- Münster-Kühnel, A. K., Tiralongo, J., Krapp, S., Weinhold, B., Ritz-Sedlacek, V., Jacob, U., & Gerardy-Schahn, R. (2004). Structure and function of vertebrate CMP-sialic acid synthetases. *Glycobiology*, 14(10), 43–51. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh113>
- Neelamegham, S., Aoki-kinoshita, K., Bolton, E., Frank, M., Lütteke, T., Boyle, N. O., Packer, N., Stanley, P., & Toukach, P. (2019). Updates to the Symbol Nomenclature For Glycans (SNFG) Guidelines Running. *Glycobiology*, 29(9), 620–624.
- O'Neill, M., McPartlin, J., Arthure, K., Riedel, S., & McMillan, N. D. (2011). Comparison of the TLDA with the nanodrop and the reference qubit system. *Journal of Physics: Conference Series*, 307(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/307/1/012047>
- Olczak, M., & Guillen, E. (2006). Characterization of a mutation and an alternative splicing of UDP-galactose transporter in MDCK-RCAr cell line. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1763(1), 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.12.006>
- Petasny, M., Bentata, M., Pawellek, A., Baker, M., Kay, G., & Salton, M. (2021). Splicing to Keep Cycling: The Importance of Pre-mRNA Splicing during the Cell Cycle. *Trends in Genetics*, 37(3), 266–278. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.08.013>
- Salinas-Marín, R., Mollicone, R., & Martínez-Duncker, I. (2016). A functional splice variant of the human Golgi CMP-sialic acid transporter. *Glycoconjugate Journal*, 33(6), 897–906. <https://doi.org/10.1007/s10719-016-9697-8>
- Schwarzkopf, M., Knobloch, K. P., Rohde, E., Hinderlich, S., Wiechens, N., Lucka, L., Horak, I., Reutter, W., & Horstkorte, R. (2002). Sialylation is essential for early development in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(8),

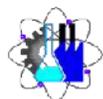
- 5267–5270. <https://doi.org/10.1073/pnas.072066199>
- Takeshima-Futagami, T., Sakaguchi, M., Uehara, E., Aoki, K., Ishida, N., Sanai, Y., Sugahara, Y., & Kawakita, M. (2012). Amino acid residues important for CMP-sialic acid recognition by the CMP-sialic acid transporter: Analysis of the substrate specificity of UDP-galactose/CMP-sialic acid transporter chimeras. *Glycobiology*, *22*(12), 1731–1740. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws116>
- Tavira Montalván, C. A., Ortega García, A., Dávila González, I., Estrada Mondaca, S., & Meneses Acosta, A. (2009). Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica Animal cell culture in pharmaceutical biotechnology : research and perspectives. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, *40*(4), 35–46. [www.redalyc.org](http://www.redalyc.org)
- Ury, B., Potelle, S., Caligiore, F., Whorton, M. R., & Bommer, G. T. (2021). The promiscuous binding pocket of SLC35A1 ensures redundant transport of CDP-ribitol to the Golgi. *Journal of Biological Chemistry*, *296*, 100789. <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.100789>
- Varki, A. (2001). Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: Mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution. *Yearbook of Physical Anthropology*, *44*, 54–69. <https://doi.org/10.1002/ajpa.10018>
- Varki, A. (2010). Uniquely human evolution of sialic acid genetics and biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(SUPPL. 2), 8939–8946. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914634107>
- Varki, A., Cummings, R. D., Aebi, M., Packer, N. H., Seeberger, P. H., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G., Darvill, A., Kinoshita, T., Prestegard, J. J., Schnaar, R. L., Freeze, H. H., Marth, J. D., Bertozzi, C. R., Etzler, M. E., Frank, M., Vliegthart, J. F. G., Lütteke, T., ... Kornfeld, S. (2015). Symbol nomenclature for graphical representations of glycans. *Glycobiology*, *25*(12), 1323–1324. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv091>
- Wickramasinghe, S., & Medrano, J. F. (2011). Biochimie Primer on genes encoding enzymes in sialic acid metabolism in mammals. *Biochimie*, *93*(10), 1641–1646. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.002>
- Yandell, M., & Ence, D. (2012). A beginner's guide to eukaryotic genome annotation. *Nature Reviews Genetics*, *13*(5), 329–342. <https://doi.org/10.1038/nrg3174>
- Zhang, Y., Zhang, Y., Sun, K., Meng, Z., & Chen, L. (2018). The SLC transporter in nutrient and metabolic sensing, regulation, and drug development. *Journal of Molecular Cell Biology*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy052>
- Zhao, W., Chen, T. L. L., Vertel, B. M., & Colley, K. J. (2006). The CMP-sialic acid transporter is localized in the medial-trans Golgi and possesses two specific endoplasmic reticulum export motifs in its carboxyl-terminal cytoplasmic tail. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(41), 31106–31118. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605564200>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS e INGENIERÍA

Programas educativos de calidad reconocidos por CIEES y CACEI  
Certificada en la norma ISO 9000:2008



Facultad de Ciencias  
Químicas e Ingeniería

FORMA T-4  
NOMBRAMIENTO DE COMITÉ REVISOR

Cuernavaca, Mor., a 08 de Julio de 2021.

**DRA. CONSTANZA MACHÍN RAMÍREZ**  
**DRA. ANGÉLICA BERENICE AGUILAR GUADARRAMA**  
**DRA. ROBERTA SALINAS MARÍN**  
**DRA. BLANCA EDA DOMÍNGUEZ MENDOZA**  
**DR. MARCOS AMED SALAZAR BLAS**  
**P R E S E N T E**

Me permito comunicarles que han sido designados integrantes del **COMITÉ REVISOR** de la **TESIS** Titulada:

Análisis del Transportador de CMP-ácido siálico de mamíferos.

Que presenta la **C. ALIN MISHEL HERNÁNDEZ BUSTOS**, del programa educativo de **QUÍMICO INDUSTRIAL**.

ATENTAMENTE  
*Por una humanidad culta*

**DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ**  
**DIRECTORA**

**D I C T A M E N**

**DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNANDEZ**  
**DIRECTORA DE LA FCQeI**  
**P R E S E N T E**

En respuesta a su amable solicitud para emitir DICTAMEN sobre el trabajo que se menciona, me permito informarle que nuestro voto es:

VOTO	NOMBRE	FIRMA
	<b>DRA. CONSTANZA MACHÍN RAMÍREZ</b>	
	<b>DRA. ANGÉLICA BERENICE AGUILAR GUADARRAMA</b>	
	<b>DRA. ROBERTA SALINAS MARÍN</b>	
	<b>DRA. BLANCA EDA DOMÍNGUEZ MENDOZA</b>	
	<b>DR. MARCOS AMED SALAZAR BLAS</b>	

VALH / bac

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**VIRIDIANA AYDEE LEON HERNANDEZ** | Fecha:2021-07-09 00:05:33 | Firmante

CmKbKy6wsELrxGBX6qymHrSUIheLdJATvJOWQL59UzyGrvBiPLrhculbdL7eXKTf5Oe58Nnh2njyX8ju/HH8EwQcNo2a0Lh0zho5v07/K0v2wuovbVyS2AwooR4YT09iKGNxZX7vTcv4HFak76r01+gJ92AG+x9bb5bVsfug/4abGxf0frRMRyb1n4JOpmTVtjOFkpMoLN09akuIvKgr7CT9hsnmO8yQujWKysfx4KQd30GDStmnZ2Fy0zEPtKVW6A8Ja03rJhRH7n10uW9PY55FzJb61mdjif0tDeTYfuTeJ9nPrvmqtA6CIKq6Lj19vTqzVFEEY6wAhdT79gsRA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



V1W6vN

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vESRUTqQNkriOD8HoGKfEVzicOKH1eqY>

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**BLANCA EDA DOMINGUEZ MENDOZA** | Fecha:2021-08-31 12:03:08 | Firmante

eNkDAv1u1InYnkCL3jan1MvVQTx1+qgqoVX0up1hYDUjn9fz2qkrkd/94cmYqW25SVAymkYHXlhOerKHDxz3CvnmQH9537r+jjjWDjodEfpMr9uEQDt8goaMn7n7PYJYGbB6yLjYyPABGyde8KyhmC9wv4pk0LhTp4TF48pNzv3yaexiUyNG+rePM39/3ByRoM1XOd53sl2qxXXWk0LRlcrbWG6hStaFhFQRrRe3WJgvaj94AgTyk7CRSyOIVOR6xKHW4lArsdGHhjB00WHJtT0UDp8Zpkr0816/7eXon8netRRJqnfB72ycky9z0h9+b8ZmP6l8fapji2MicYA==

**CONSTANZA MACHIN RAMIREZ** | Fecha:2021-08-31 12:25:36 | Firmante

aVVEG9y0hmDYCZYc0btLQ4QkqrH9ger/O7jMI2c8igPuLSLhHYzIL5URNkqssWBmT92IFB0fa+fc4q9HbLV8RAslxquqSGOkTb6w2aZSC3QAYrMVAgbcXINc2eH+faHxFrm6+p34wJudp+OE5ErE3mZKbiYuQJ3BvSxhP+lbnNjhi5zXvqSymyZBus9LmzHdlmflG5AO4knd3A3qBBhVOPGbjkCEYtk47KUnH6gx2niIKKqhHz03wrFc4ZiyA5j7Kyvtlvrgo78RgCeT1rXplp/f5wBTE7I3CZ5aC1b+iScDCNfUuKYBW10TzCwiogr6cBwflBYG/42QjeSBQLQ==

**MARCOS AMED SALAZAR BLAS** | Fecha:2021-08-31 12:35:11 | Firmante

f9ZU8/sA6iDhMh+SzwKFG5Kr6vT7UJuTqxUnDgy1BQf3U1yYCD+PxY3JmJB98OMWjPg1hhRmOMohckGFzHh+DG7OTeAL4zXE1YRnaDVe7NvDoREWCGLyTfN0U+J14Uugd+0br8b6nWpo1j+ddlObnAPNYOpbnt2nshPgqr4dZbuY0ev2gKBEpVfbrN9lbsBRs9JdDyNIS6Z97ik4ZwJR0s8XnVUEUHeZ5/4nDa3ygYDGPw6iMMIYpidlluScEjBz2fhHzMcNDTh9WN6tfFCqfiML2H3NRVpk0I+tmcFLRd09jvCGs/t5yyw75mTYlylxIX9dfQm6pPITSIAkupih5A==

**ANGELICA BERENICE AGUILAR GUADARRAMA** | Fecha:2021-08-31 15:24:38 | Firmante

OQ99mQE2AoDP0X0FoM5HZtaqRYWmSFoNwq+JgygaZk2JsYdtnQoNWN56XJc4qg5E6zoN/VWIHc8hJgidv8Hdd6ymgYpu7QyHoUAQmaJ7ZZQIKPy7NRHHmYIXsYaaKxRjqpVxrCJDH9U4I2mdysYQpLkGL5zn7+ym4o9Qjt7YCNh7f7bQg9o5Pg8SHK5drdyAmhblTrDmjoZeBF6Mu8umttgF8EaPtmhtlle4ubZtkJtmIR6VGulnSlkJB9zEWLTP/GeNjvBSzk9W2QGQhKB2Cf8arm73mnmXWJfp3tsdZ8PzQpJEjstYSCDPNWHOrdQ1rjXEDMcv1/N32xSDg==

**ROBERTA SALINAS MARIN** | Fecha:2021-08-31 16:00:21 | Firmante

tZBn7tloQKwlyuSHAfvp+Gn9blf58qst4hyfS/ERmmHjG/nPTXr6NFGFDabw7VrWuKgbFWOeubnxCSaopsWdtj2O3eGUFly3qjNcrO07iPM8f6lyRhT/vHkq7+GeRc5GHezLW+wAZw4nXA3HMADK5pYgMFpdjK1GprnDjvB7cBbJVTs81wffRn4LqCUFYG5M3loCHKqNY8d/b6xgB0aKr1xeTBkpkpAUermOrhYiG7FGdWpEOMGAOuIP8sqJ1w+HK/02JxvqUhbKj16R8EDJxSVAL63VImMAGiit9qG4lp2qX2P9wdT189Yp/4xOHL34rAjoj/UhcTnedNw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



MVJQJz

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/aPWoxRvhjwhqolJpvRExIBma2m8v5jD6>