

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE  
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL**

---

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Estudio del efecto de la sobreexpresión de las distrofinas Dp71a y  
Dp71c en las células PC12.”**

**T E S I S**

Que presenta

**Q.F.B. LILIA CAROLINA LEÓN MORENO**

Para obtener el grado de  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

EN LA ESPECIALIDAD DE  
**GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Directora de la Tesis

Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda

Asesores de Tesis

Dra. Rosa María Bermúdez Cruz

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

**DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE PROYECTO, LILIA CAROLINA LEÓN MORENO FUE BECADA POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT).**

**EL PROYECTO FUE APOYADO POR LOS DONATIVOS OTORGADOS A LA DOCTORA SILVIA CECILIA IRENE MONTAÑEZ OJEDA; CONACyT CB-2013-222054 Y POR EL PROYECTO SEP-CONACyT-ECOS-ANUIES M11-S02 208680.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Conacyt por otorgarme una beca para continuar mis estudios y al CINVESTAV por abrir sus puertas para mi desarrollo profesional y personal.

A la Dra. Ceci, por abrirme las puertas de su laboratorio, por los consejos, la paciencia, el apoyo y todo lo que me enseñó durante este año, gracias por ser un modelo a seguir.

A la Dra. Rosa María Bermúdez y el Dr. Luis Kameyama, por sus consejos y sus aportaciones al presente trabajo, por su disponibilidad, amabilidad y atención.

A los auxiliares del laboratorio, Jorge, Víctor y Ale, por sus enseñanzas, consejos, su disposición para ayudarme, su apoyo y sobretodo, por la convivencia.

A la técnica Cleme, gracias por siempre recibirme con una sonrisa, por su valiosa ayuda.

A todos los integrantes de los laboratorios 4 y 7: Mayram, Coztli, Sandy, César, Cande, Ingrid, Israel, Gris, Irais, Chano. Por compartir momentos tanto académicos como de diversión, por escucharme y ayudarme cuando lo necesité. En especial a mis compañeros de labo, Jorge, Mayram, Iraís y Coztli, gracias por hacer mi estancia en el laboratorio 7 mucho más amena y divertida.

A Pablo, Angie y Juan Carlos, los que más escucharon mi voz durante este año. Gracias por todas las comidas, el chisme y las pláticas, los voy a extrañar. A mis demás amigos de generación, Tavo, Loan, Gera, Dani, Janet, Sergio, por compartir conmigo este tiempo, por las risas, desveladas y contratiempos. A Valeria, mi roomie, gracias por la convivencia, por aguantarme 2 años completitos. Lo logramos!

A mis padres, Jorge y Martha, que siempre han creído en mí, que me sostienen cuando me falta fuerza. Gracias por su amor, por hacerme la persona que soy. Los amo.

A mi pequeño Gremlin, gracias por aventarme y ayudarme a dar este paso, por estar ahí y ser mi mejor amiga. Te amo

José Luis, gracias por ser y estar. Por ser mi compañero durante esta aventura, sin ti seguramente hubiera sido opaca. Te amo profundamente.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	.vii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	.ix
<b>RESUMEN</b> .....	.x
<b>ABSTRACT</b> .....	.xi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE .....	1
1.1.1 ALTERACIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN DMD .....	1
1.2 DISTROFINA .....	3
1.3 FORMAS CORTAS DE DISTROFINA .....	7
1.3.1 ISOFORMAS DE LA DISTROFINA Dp71. ....	8
1.4 CÉLULAS PC12 .....	10
1.4.1 PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS PC12 .....	11
1.4.2 DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS PC12 .....	11
1.4.3 SISTEMA TET-ON .....	12
<b>2. ANTECEDENTES DIRECTOS</b> .....	15
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	19
4.1 OBJETIVO GENERAL .....	19
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	20
5.1 CULTIVO Y COSECHA DE CÉLULAS PC12 TET-ON .....	20
5.2 INDUCCIÓN CON DOXICICLINA .....	20
5.3 EXTRACCIÓN DE DNA .....	20
5.4 EXTRACCIÓN DE RNA .....	21
5.5 TRANSCRIPCIÓN REVERSA ACOPLADA A PCR (RT-PCR) .....	21
5.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....	22
5.7 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR .....	23
5.8 SECUENCIACIÓN .....	23
5.9 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS .....	24
5.10 WESTERN BLOT .....	24
5.11 ENSAYO DE RESPUESTA A DOXICICLINA .....	25
5.12 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA .....	26
5.13 CURVA DE PROLIFERACIÓN .....	26

5.14 CURVA DE DIFERENCIACIÓN.....	27
5.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	27
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
6.1 CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Myc/Dp71a y Myc/Dp71c EN LAS CLONAS ESTABLES DE PC12 TET-ON/Dp71a Y Dp71c .....	28
6.2 INMUNODETECCIÓN DE MYC Y $\beta$ -DISTROGLICANO EN LA CLONA CONTROL.....	37
6.3 LOCALIZACIÓN CELULAR DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Myc/Dp71a Y Myc/Dp71c.....	38
6.4 CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN DE LAS CLONAS SELECCIONADAS DE PC12 TET-ON/Dp71a y Dp71c.....	42
6.5 MARCADORES MOLECULARES DE PROLIFERACIÓN .....	47
6.6 CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CLONAS SELECCIONADAS DE PC12 TET-ON/Dp71a y Dp71c.....	49
6.7 MARCADORES MOLECULARES DE DIFERENCIACIÓN.....	56
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	<b>59</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>69</b>
<b>9. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>71</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>72</b>

## LISTA DE FIGURAS

Página

<b>FIGURA 1.</b> Representación esquemática de la estructura de la Distrofina....	3
<b>FIGURA 2.</b> Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina .....	4
<b>FIGURA 3.</b> Isoformas Dp71 y Dp40 y complejos tipo DAP que forma Dp71 en diferentes tejidos .....	7
<b>FIGURA 4.</b> Isoformas de la Distrofina Dp71 .....	9
<b>FIGURA 5.</b> Esquema representativo de la regulación del sistema Tet-On .....	13
<b>FIGURA 6.</b> Plásmido pTRE2pur-Myc.....	14
<b>FIGURA 7.</b> Obtención de los fragmentos de DNA de Dp71a y Dp71c.....	28
<b>FIGURA 8.</b> Secuenciación del fragmento de Dp71/pTRE2pur-Myc de las células de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4. ....	29
<b>FIGURA 9.</b> Secuenciación de los fragmentos Dp71/pTRE2pur-Myc de las células de las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5.....	29
<b>FIGURA 10.</b> Expresión de las proteínas recombinantes Myc-Dp71a y Myc-Dp71c en las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4, Dp71c-5....	30
<b>FIGURA 11.</b> Curva de inducción con DOX para PC12 Tet-On/Dp71a-4 .....	31
<b>FIGURA 12.</b> Curva de inducción con DOX de PC12 Tet-On/Dp71c-1.....	32
<b>FIGURA 13.</b> Curva de inducción con DOX de PC12 Tet-On/Dp71c-4.....	33
<b>FIGURA 14.</b> Curva de inducción con DOX de PC12 Tet-On/Dp71c-5.....	34
<b>FIGURA 15.</b> Curva de amplificación de las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5.....	35
<b>FIGURA 16.</b> Niveles de mRNA de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 .....	35
<b>FIGURA 17.</b> Niveles de mRNA de las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5.....	36
<b>FIGURA 18.</b> Localización de la proteína Myc y $\beta$ -distroglicano en células de la clona control no diferenciadas y diferenciadas a 9 días con NGF en presencia de DOX .....	37
<b>FIGURA 19.</b> Localización de las proteínas recombinantes Myc/Dp71a y Myc/Dp71c en células PC12 Tet-On no diferenciadas.....	39
<b>FIGURA 20.</b> Localización de las proteínas recombinantes Myc/Dp71a y Myc/Dp71c en células PC12 Tet-On diferenciadas a 9 días con NGF.....	41

<b>FIGURA 21.</b> Ensayo de proliferación celular de las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4, Dp71c-5 y control.....	44
<b>FIGURA 22.</b> Análisis de la proliferación celular de las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4, Dp71c-5 y control.....	46
<b>FIGURA 23.</b> Análisis de la expresión de proteínas relacionadas con proliferación.....	48
<b>FIGURA 24.</b> Diferenciación de células PC12 Tet-On con NGF .....	49
<b>FIGURA 25.</b> Diferenciación de las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4, Dp71c-5 y control durante 3 días con NGF. ....	51
<b>FIGURA 26.</b> Diferenciación de las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4, Dp71c-5 y control durante 6 y 9 días con NGF en presencia de 500 ng/ml de DOX.....	53
<b>FIGURA 27.</b> Morfología nuclear de las células de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 diferenciadas con NGF durante 9 días. ....	55
<b>FIGURA 28.</b> Análisis de la expresión de proteínas relacionadas con diferenciación .....	57
<b>FIGURA 29.</b> Expresión de las proteínas recombinantes Myc/Dp71a y Myc/Dp71c en las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4 y Dp71c-4 .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABD	Región de unión a actina
CB	Buffer de citoesqueleto
CR	Región rica en cisteína
CTD	Región carboxilo terminal
DAPC	Complejo de proteínas acopladas a Distrofina
Dbr	Distrobrevina
DG	Distroglicano
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DOX	Doxiciclina
Erk	Del inglés, Extracellular signal-regulated kinase
G418	Geneticina
NGF	Factor de crecimiento neuronal
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos 2
MCS	Sitio de clonación múltiple
NF-L	Neurofilamento de cadena ligera
nNOS	Óxido nítrico sintetasa neuronal
NTD	Región amino terminal
PBS	Buffer de solución de fosfatos
Pcmv	Promotor mínimo de citomegalovirus
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PSD	Densidades post-sinápticas
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a PCR
SNC	Sistema Nervioso Central
Syn	Sintrofina
TBE	Buffer Tris-borato-EDTA
tTA	Transactivador controlado por tetraciclina
Tet	Tetraciclina
TetR	Operón de resistencia a Tet
TeR	Elemento de respuesta a Tet

## RESUMEN

La proteína Dp71 es codificada por el gen de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) y es un miembro de la familia de distrofinas. Esta proteína es el primer producto del gen *DMD* detectado en células embrionarias y es la más abundante en cerebro y retina. Dp71 mantiene funciones importantes en el Sistema Nervioso Central (SNC). Su ausencia ha sido asociada con proliferación neuronal lenta, disminución en la capacidad de diferenciación, así como retraso mental en pacientes con DMD. El transcrito de Dp71 sufre procesamientos alternativos en los exones 71-74 y 78. Las proteínas resultantes se agrupan de acuerdo a su C-terminal (CTD). Se ha sugerido que esta región es responsable de la diferencia en localización y función de las diferentes isoformas. La mayoría de la información que se tiene a la fecha corresponde a las isoformas del grupo Dp71d, el cual se encuentra mayormente expresado en cerebro y contiene el exón 78. Este grupo incluye isoformas que difieren en el procesamiento del exón 71 (Dp71a) o 71 a 74 (Dp71c). Se desconoce si estos procesamientos pueden darle a cada isoforma diferentes funciones. El objetivo principal de este estudio fue la caracterización de células PC12 que sobreexpresan Dp71a y Dp71c. Para ello, se utilizaron clones PC12 Tet-On transfectados de manera estable con las secuencias de las proteínas Dp71a y Dp71c, cuya expresión es inducida con Doxiciclina (DOX). La expresión de las proteínas Myc/Dp71a o Myc/Dp71c se evaluó por Western blot usando un anticuerpo anti-Myc y por medio de RT-PCR. La localización de las proteínas recombinantes es similar a lo reportado en un estudio previo. La proliferación de las células PC12 Tet-On se modifica por la sobreexpresión de Myc/Dp71a y Myc/Dp71c de manera diferente ya que Myc/Dp71a acelera la proliferación, mientras que Myc/Dp71c la hace más lenta, ambas en comparación con el control. En caso contrario, la sobreexpresión de Myc/Dp71c aumenta la producción de neuritas y Myc/Dp71a la disminuye. Este estudio demuestra que estas isoformas tienen funciones diferentes así como la importancia de estudiar su función de manera individual.

## ABSTRACT

Dp71 protein is coded by Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) gene and is a member of the dystrophin family. This protein is the first *DMD* gene product detected in embryonic stem cells and the most abundant in adult brain and retina. Dp71 preserves Central Nervous System important functions. Its absence has been associated with slower neural growth, absence of differentiation and cognitive impairment in DMD patients. Dp71 transcript undergoes alternative splicing for exons 71-74 and 78 and the resulting protein isoforms are grouped according to its unique C-terminal (CTD). It has been suggested that this region is responsible for the different localization and function. Most of the information obtained to date corresponds to Dp71d group, carrying exon 78, which has been described to be highly expressed in brain. This Dp71 group includes isoforms that differ in the splicing of exon 71 (Dp71a) or 71 to 74 (Dp71c). The CTD region of these proteins contains 13 hydrophilic amino acids present in all dystrophin family. It is unknown if these further splicing could confer each isoform different functions. The aim of the present study was the characterization of PC12 cells overexpressing Dp71a and Dp71c. For this, stably transfected clones PC12 Tet-On/Dp71a and PC12 Tet-On/Dp71c, which are induced with Doxycycline (DOX) were used. Myc/Dp71a or Myc/Dp71c expression was evaluated by western blot using anti-Myc antibody and RT-PCR. Recombinant protein localization was similar to that described before. Proliferation of PC12 Tet-On cells is modified by overexpression of Myc/Dp71a and Myc/Dp71c in different ways: proliferation is increased with Myc/Dp71a while Myc/Dp71c made it slower, both in comparison to control clone. On the contrary, overexpression of Myc/Dp71c improves neurite outgrowth and Myc/Dp71a decreases this capacity. This study demonstrates that these two isoforms play different roles and it is important to study each one individually.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Distrofia Muscular de Duchenne

Las distrofias musculares son un grupo de enfermedades que se caracterizan por la atrofia progresiva del músculo esquelético, lo cual produce en los pacientes que la padecen dependencia a silla de ruedas, dolor severo y muerte prematura (Gintjee 2014). De este grupo de padecimientos, la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es la segunda enfermedad más común en países Occidentales en la que sólo participa un gen (Emery 2003): es un trastorno recesivo ligado al cromosoma X causada por mutaciones en el gen de la distrofina que, hasta el 2011, afecta a 1 entre 5,000 hombres (Mendell 2013).

Las mutaciones encontradas en este gen son principalmente deleciones o mutaciones puntuales, sin embargo existen también en menor proporción inserciones, duplicaciones o translocaciones. Estas mutaciones provocan cambios en el marco de lectura del transcrito de distrofina que resulta en la ausencia de su expresión en todo el cuerpo (Gintjee 2014). Los modelos animales que carecen de distrofina debido a las distintas mutaciones dentro del gen que la codifica desarrollan, entre otras complicaciones, aumento en la susceptibilidad del músculo al daño en respuesta a la actividad física o heridas y aumento de necrosis en miofibras (Bullfield 1984), fenotipos característicos de DMD.

En los últimos años, el estudio del papel de la distrofina en los diferentes sistemas y las consecuencias de su ausencia ha sido de gran importancia para el entendimiento de las complicaciones clínicas que presentan los pacientes con DMD así como para el desarrollo de herramientas de diagnóstico y tratamientos efectivos.

### 1.1.1 Alteraciones del Sistema Nervioso Central en DMD

La causa principal de mortalidad entre los pacientes con DMD es el paro cardíaco o respiratorio por la degeneración del músculo; sin embargo, debido a que la distrofina se expresa en todo el cuerpo, muchos sistemas importantes presentan alteraciones por su ausencia, como es el caso del Sistema Nervioso Central (SNC).

Desde el descubrimiento de la enfermedad, deficiencias cognitivas aparentemente no progresivas se observaron en los pacientes que la padecían (Duchenne 1868). Se sabe que el déficit cognitivo que presentan un número considerable de pacientes con DMD es parte del fenotipo del padecimiento (Daoud 2009): alrededor de un tercio de los pacientes con DMD presentan retraso mental, cuyo nivel varía desde leve hasta severo (Cotton 2001). Existe una amplia heterogeneidad clínica en lo que respecta al déficit cognitivo de los pacientes con DMD: generalmente se presenta con problemas de fluidez verbal y memoria a corto plazo presente en pacientes jóvenes (Cyrulnik 2008), dificultad para la lectura y lenguaje (Billard 1998), así como mayor incidencia del trastorno del espectro autista, déficit de atención e hiperactividad y desorden obsesivo-compulsivo (Hendriksen 2008). Estos padecimientos psicosociales y cognitivos tienen un impacto importante en la calidad de vida de los pacientes, especialmente en edad escolar (Snow 2013) y son completamente independientes a la presencia de trastornos musculares o al ambiente en el que se desarrollan (Billard 1992), como lo demuestra un estudio reciente en el que se han descubierto mutaciones en el gen de la distrofina que causan déficit cognitivo sin presentar trastornos musculares (De Brouwer 2014).

Autopsias realizadas a pacientes con DMD revelaron patologías derivadas del déficit de distrofina en el cerebro tales como: gliosis, pérdida neuronal, heterotopías y adelgazamiento cortical, sin embargo estas patologías son, al igual que los trastornos cognitivos, heterogéneas entre los pacientes (Jagadha 1988). Debido a esta heterogeneidad, los mecanismos que provocan los trastornos neuronales presentes en estos pacientes son menos entendidos que los implicados en anomalías en músculo (Blake 2000, Daoud 2009).

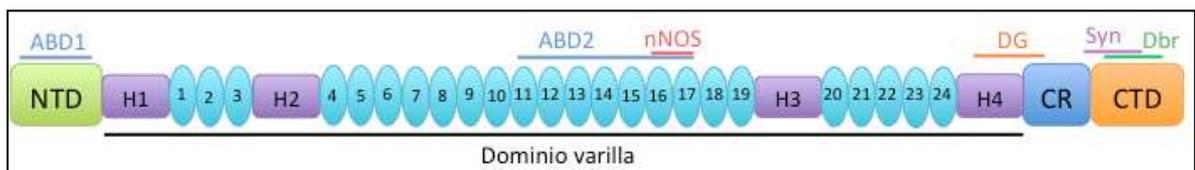
Una de las razones por las cuales el estudio de los mecanismos moleculares implicados en el déficit cognitivo y las neuropatologías en pacientes con DMD es difícil es la diversidad de las isoformas de distrofina que se expresan en el cerebro (Culligan 2001, Romo-Yáñez 2007), la cual se relaciona con la heterogeneidad en la ocurrencia y severidad de los trastornos cognitivos (Hendriksen 2015). Conclusiones tanto de estudios clínicos como de estudios realizados en modelos animales coinciden en la hipótesis de que cada una de las isoformas de la distrofina expresadas en el cerebro contribuye de alguna manera en las alteraciones cognitivas y de comportamiento en pacientes con

DMD. Por consiguiente, es importante determinar el papel específico de cada una en el tejido cerebral para así entender el papel que juegan en el desarrollo de trastornos neuronales y cognitivos en estos pacientes (Perronet 2010).

## 1.2 DISTROFINA

El gen de la Distrofia Muscular de Duchenne es el más grande identificado a la fecha, constituye 1.5% del cromosoma X y 0.1% del genoma humano completo. La secuencia de este gen comprende 79 exones los cuales codifican para una proteína de 427 kDa denominada distrofina (Koenig 1987).

La estructura de la distrofina consiste en cuatro dominios (Figura 1): la región N-terminal de unión a actina (NTD) que también se conoce como dominio de unión a actina 1 (ABD1), una estructura tipo varilla compuesta por 24 repetidos de triple hélice superenrollada tipo espectrina (1-24), intercalados por 4 regiones tipo bisagra (H1-H4) ricas en prolina, una región rica en cisteína (CR) con motivos de unión a calcio y una región C-terminal (CTD) (Koenig 1988). Los primeros 3 repetidos de la estructura tipo varilla le confieren la capacidad de unirse a la membrana celular (Ervasti 2007), del 11 al 17 forman un segundo dominio de unión a actina (ABD2) (Rybakova 1996), y se ha reportado que los repetidos 16 y 17 tienen sitios de unión al óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS) (Lai 2009).



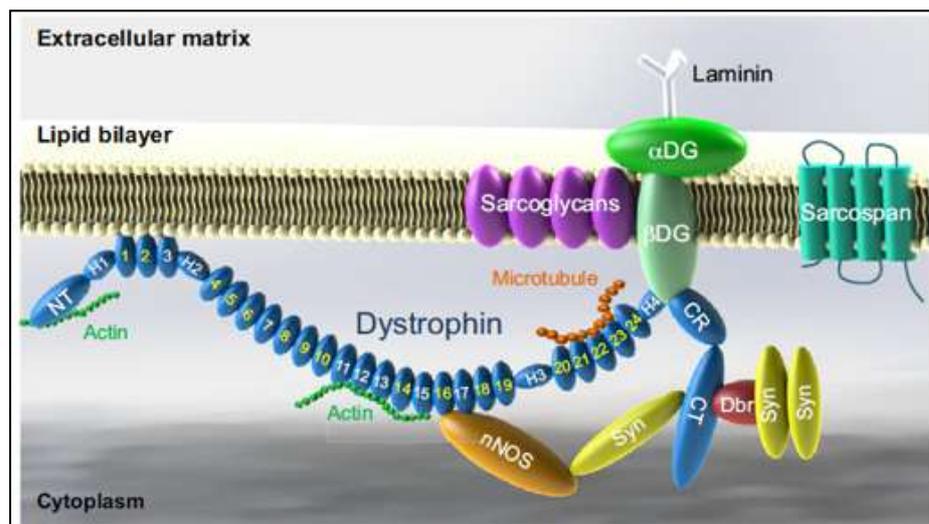
**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura de la Distrofina. Se muestran los cuatro dominios que conforman a la distrofina: región amino terminal (NTD), dominio tipo varilla formados por repetidos tipo espectrina (1-24), región rica en cisteína (CR) y región C-terminal (CTD), así como los dominios tipo bisagra (H1-H4). Los sitios de unión a actina (ABD1 y ABD2), óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS), distroglicano (DG), sintrofina (Syn) y distrobrevina (Dbr) se encuentran señalados en la parte superior de la figura.

Al final de la región de repetidos tipo espectrina se encuentra un dominio conservado denominado WW, el cual se ha descrito como un módulo de unión a proteínas que se encuentra en moléculas de señalización y regulatorias. Este

dominio se une a sustratos ricos en prolina, y es el sitio de unión con la región citoplasmática del distroglicano (DG) junto con el dominio tipo bisagra 4 (H4) (Blake 2002).

En la región CTD se encuentran dos dominios conservados de hélices superenrolladas, los cuales han sido identificados como dominios de interacción proteína-proteína (Blake 1995), mientras que la región CR contiene dos motivos de mano EF que permiten la unión a  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular (Koenig 1988), además de un dominio de dedos de zinc denominado ZZ (Ponting 1996); estas regiones se han determinado como responsables de la asociación de la distrofina con las proteínas extracelulares, membranales y citoplasmáticas que forman parte del complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC), como distroglicano (DG), sintrofina (Syn) y distrobrevina (Dbr) (Suzuki 1994).

A pesar de que la distrofina de tamaño completo fue descubierta hace mucho tiempo, su función exacta aún se desconoce (Blake 2000). En 1990, se descubrió que forma parte de un complejo de glicoproteínas unido a la membrana (Ervasti 1990), al que se le dio el nombre de DAPC, el cual se encuentra constituido por diferentes isoformas de las proteínas: distroglicanos, sarcoglicanos, sintrofinas, distrobrevinas (Blake 2002) y óxido nítrico sintetasa neuronal (Lai 2009) en donde la distrofina funciona como un andamio macromolecular (Waite 2009) (Figura 2).



**Figura 2.** Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina. La distrofina se encuentra asociada con actina, óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS), sintrofina (Syn), distroglicano (DG) y distrobrevina (Dbr) a través de los dominios de su estructura. Los

repetidos tipo espectrina 1 a 3 le confieren la capacidad de unión a la bicapa lipídica  
McGreeve 2015.

Este complejo interactúa tanto con la matriz extracelular como con el citoesqueleto, por lo que constituye un vínculo físico entre estas dos estructuras (Waite 2009). Diversos estudios proveen evidencia de que la distrofina, como parte del DAPC, protege a la membrana plasmática muscular (sarcolema) contra el daño mecánico que se presenta durante la contracción o estiramiento del músculo (Ervasti 2007, Waite 2009). La pérdida de este complejo o de alguno de sus componentes, como sucede en la DMD, conduce al desensamble de proteínas importantes para la estructura de la membrana celular y, por lo tanto, al desarrollo de los trastornos musculares observados en este tipo de enfermedades.

Además de la función mecánica atribuida a la distrofina, otros estudios demuestran que participa en la transducción de señales desde la matriz extracelular hacia el citoesqueleto de actina, ya que es el blanco para cinasas dirigidas a prolina y serina-treonina tanto *in vivo* como *in vitro* puesto que en su extremo CTD posee sitios potencialmente fosforilables (Rando 2001). Asimismo, se encontró que agrupa canales de calcio y participa en el mantenimiento en la homeostasis intracelular de este ion (Carlson 1998).

De manera similar que en músculo, se ha propuesto que la ausencia de distrofina en el SNC contribuye al desarrollo de neuropatologías o déficit cognitivo en los pacientes con DMD, ya que también forma parte de los DAPC en este tejido (Blake 1999) además de que se expresa en muchas regiones cerebrales responsables de las funciones de aprendizaje y memoria (Snow 2013). La complejidad de los DAPC en el cerebro es mayor que en el músculo debido a la expresión diferencial y específica de las isoformas de la distrofina en diferentes regiones (Gorecki 1992). Aunado a esto, se han descrito proteínas cuya expresión es exclusiva en cerebro como  $\beta$ -distrobrevina,  $\epsilon$ -sarcoglicano y las  $\gamma$  sintrofinas que también forman parte del DAPC (Hendriksen 2015). En consecuencia, en el tejido cerebral existen diferentes complejos, denominados “tipo DAP”, que incluso difieren entre neuronas y glia (Waite 2009).

En cuanto a su función en el SNC, la distrofina se encuentra asociada con la membrana postsináptica de las neuronas, en niveles elevados en

densidades postsinápticas (PSD), lo cual sugiere un papel en la estructura y función de la sinapsis (Blake 2000) y es necesaria para el agrupamiento de receptores GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ -1 y  $\alpha$ -2 que se forman en sinapsis inhibitorias en algunas regiones del cerebro (Knuesel 1999). Incluso se ha observado que diferentes complejos tipo DAP se encuentran selectivamente involucrados con la sinapsis o la formación de la barrera hematoencefálica (Perronet 2010).

La regulación del gen de la distrofina es muy compleja y en ésta participan al menos 7 promotores que generan productos independientes y tejido-específicos (Sadoulet-Puccio 1996). La transcripción del gen completo está controlada por 3 promotores independientes que se expresan de manera diferencial en músculo (Dp427-M), corteza cerebral e hipocampo (Dp427-B) o células de Purkinje (Dp427-P), mientras que los promotores internos generan proteínas más cortas (Gorecki 1992). Estas proteínas difieren tanto en estructura como en patrones de expresión (en diferentes tejidos y etapas del desarrollo) y son nombrados según su peso molecular: Dp260 (retina), Dp140 (cerebro y riñón), Dp116 (células de Schwann), Dp71 (ubicua, excepto músculo esquelético) (Blake 1992, Byers 1993, Lidov 1995, D'Souza 1995) y Dp40 (cerebro, músculo, pulmón, hígado) (Tinsley 1993).

A pesar de que todas las isoformas de la distrofina se han detectado en el SNC, sólo mutaciones que afectan la expresión de las proteínas cortas (Dp116, Dp71, Dp40) se han relacionado con el déficit cognitivo (Lenk 1993). Por otro lado, se encontró que la severidad en este padecimiento está relacionada directamente con la expresión de las distrofinas Dp71 y Dp40, ya que pacientes que presentan mutaciones que afectan a todas las distrofinas excepto estas dos presentan un coeficiente intelectual normal y, por el contrario, una expresión reducida o nula de Dp71 agrava su severidad. También se ha reportado que en ratones que carecen de Dp71 y Dp40, la organización sináptica es anormal y la transmisión glutamatérgica incrementa, la plasticidad sináptica en el hipocampo está reducida, y presentan alteraciones en el comportamiento (Daoud 2009).

### **1.3 FORMAS CORTAS DE LA DISTROFINA**

El promotor que da origen al transcrito de Dp71 y Dp40 (también llamada apo-distrofina-3) se encuentra en el intron 62 (Lederfein 1993, Tinsley 1993), y el



sugieren que interactúa con las proteínas presinápticas syntaxina 1A y SNAP25 (Tozawa 2012), además de que se demostró que se expresa mayormente en el cerebro después del nacimiento en células neuronales (Fujimoto 2014).

Dp71 es el producto del gen DMD con niveles más elevados de expresión en cerebro y retina (Lederfein 1992). Es el primer producto detectable de este gen durante el desarrollo y en células madre embrionarias (Rapaport 1992) y su expresión se ve aumentada gradualmente desde la etapa de embrión hasta la de adulto (Jung 1993, Sarig 1999), así como durante la diferenciación del SNC (Sarig 1999).

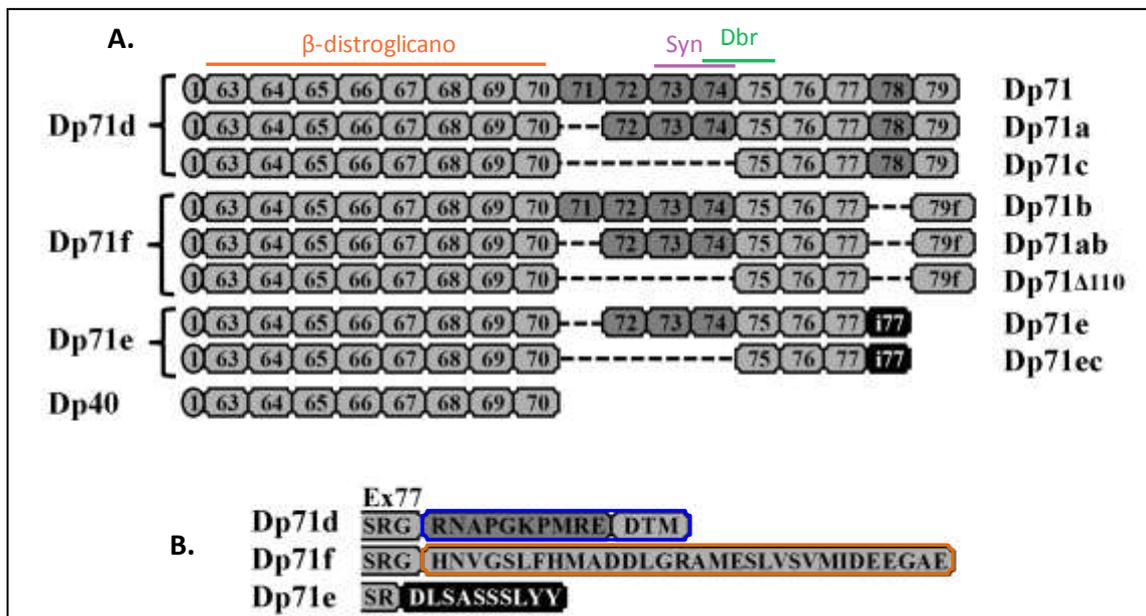
A diferencia de Dp427 y Dp40 que sólo se expresan en neuronas, la proteína Dp71 se expresa tanto en neuronas como en glía. En estas células, se encuentra formando parte de complejos tipo DAP (Figura 3B) de manera similar a lo determinado para la Dp427 (Blake 1999) e incluso se comprobó que es necesaria para estabilizar las DAPC dentro del núcleo de células PC12 (Villarreal-Silva 2010) (Figura 3C). Se han descrito cambios en la composición de estos complejos durante procesos como la diferenciación celular, por lo que se sugiere que cada complejo tiene una función específica y diferente en las distintas fases celulares (Romo-Yáñez 2007).

Diversos estudios han comprobado la participación de Dp71 en el desarrollo y maduración del sistema nervioso. Esta proteína presenta niveles de expresión elevada en las terminaciones de las extensiones de astrocitos perivasculares (Blake 1999) los cuales mantienen la función de la barrera hematoencefálica. En estas estructuras astrocíticas ha sido asociada con el mantenimiento homeostasis de iones y agua, ya que participa en la concentración de canales de agua AQP4 (Waite 2012) y de potasio Kir4.1 (Connors 2004). Otros procesos en los que Dp71 se ha visto involucrado son: adhesión celular, arquitectura nuclear (Tadayoni 2012), división celular y estructura nuclear (Villarreal-Silva 2010), mitosis y ciclo celular (Villarreal-Silva 2011) y en la organización de la sinapsis glutamatérgica en el hipocampo (Daoud 2009, Waite 2012).

### **1.3.1 ISOFORMAS DE LA DISTROFINA Dp71.**

Los transcritos de Dp71 sufren procesamientos alternativos que generan una amplia diversidad de productos (Austin 2002). Feener (1989) fue el primero en identificar la presencia de estos procesamientos, los cuales ocurren en los

exones 71-74 y/o 78. Como se muestra en la figura 4, los productos formados se clasifican en tres grupos (Aragón 2016): el grupo Dp71d, posee el exón 78 e incluye a las isoformas Dp71, Dp71a (sin exón 71) y Dp71c (carece de los exones 71-74); Dp71f, deriva de la exclusión del exón 78 e incluye a Dp71b (contiene el exón 71), Dp71ab (carece además exón 71) y Dp71 $\Delta$ 110 (carece los exones 71-74) (Austin 2000); y Dp71e, que carece de los exones 78-79 y en su lugar retiene 34 pb del intrón 77 e incluye a Dp71e (ausencia del exón 71) y Dp71ec (sin los exones 71-74) (Saint Martin 2012).



**Figura 4.** Isoformas de la Distrofina Dp71. **A.** Clasificación de las isoformas de Dp71 de acuerdo a su extremo 3'. Los sitios de unión a  $\beta$ -distroglicano, Syn y Dbr se encuentran señalados. **B.** Región C-terminal de los 3 grupos de las isoformas de la Dp71. El cambio de aminoácidos hidrofílicos (azul) a hidrofóbicos (naranja) se encuentra señalado (Modificado de Aragón 2016).

Las proteínas resultantes de los tres grupos poseen regiones CTD únicas y diferentes entre sí (Figura 4B): como resultado de la ausencia del exón 78 el marco de lectura se ve alterado y los últimos 13 aminoácidos hidrofílicos presentes en la isoforma Dp71 completa y el grupo Dp71d son reemplazados con 31 aminoácidos hidrofóbicos (Dp71f) (Lederfein 1992), mientras que la retención de 34 pb del intrón 77 causa un cambio en el marco de lectura que permite la traducción de 29 pb de este intrón y genera un codón de paro prematuro que detiene la traducción de los exones 78 y 79 (Dp71e). Como

consecuencia, esta proteína posee un CTD de 10 aminoácidos de carácter principalmente hidrofílico (Saint Martin 2012). La delección del exón 71 o del 71-74 no cambia el marco de lectura. Sin embargo, esta última da como resultado la pérdida del sitio de unión a sintrofina (Dp71c, Dp71 $\Delta$ 110, Dp71ec) (Tadayoni 2012), ya que el dominio codificado por los exones 74 y 75 es la región de hélice superenrollada cuya función es la interacción con  $\alpha$ - y  $\beta$ -sintrofinas. Además, esta región ha sido involucrada en la heterodimerización de las distrofinas (Blake 1995).

La mayoría de las funciones conocidas de la proteína Dp71 han sido determinadas considerándola una sola proteína, sin tomar en cuenta las diferentes isoformas producidas. Sin embargo existen evidencias de que estas isoformas se distribuyen de manera diferente dentro de la célula, tanto en células no diferenciadas como durante la diferenciación neuronal (González 2000, Márquez 2003), incluso si forman parte del mismo grupo, lo cual sugiere que cada una desarrolla una función específica (Aragón 2016). Es importante explorar el papel de cada isoforma en los procesos en los que ya se ha relacionado a Dp71 dentro del SNC para ampliar el conocimiento que se tiene acerca de esta proteína.

El desarrollo de modelos celulares representa una estrategia útil para identificar la función de genes y proteínas, debido a su rápida disponibilidad, proliferación y relativamente fácil manipulación genética en comparación con tejidos u organismos enteros (Tadayoni 2012). El modelo empleado para el estudio de las diferentes isoformas de la Dp71 en los últimos años ha sido la línea celular PC12.

#### **1.4 CÉLULAS PC12**

La línea celular de feocromocitoma adrenal (denominada PC12) fue clonada de un tumor subcutáneo de médula adrenal de ratas blancas en 1976 (Green 1976). Estas células conservan la pluripotencia de su progenitor primitivo para diferenciarse en células cromafines o neuronas simpáticas (Ravni 2006).

El factor de crecimiento neuronal (NGF) promueve su diferenciación hacia neuronas simpáticas (Ravni 2006): desarrollan membranas excitables que pueden secretar catecolaminas y comienzan a formar sinapsis con células musculares en co-cultivo (Guroff 1983), por ello son una herramienta primordial

para estudiar división y ciclo celular, diferenciación neuronal y crecimiento de neuritas en el desarrollo del sistema nervioso (Green 1976, Ravni 2006).

Recientemente se determinó que esta línea celular sólo expresa los productos más cortos del gen DMD, y entre ellas, sólo se ha descrito la expresión a nivel de mRNA de las isoformas Dp71a, Dp71c, Dp71ab, Dp71e y Dp71ec (Saint Martin 2012, Aragón 2016), así como Dp40 (Aragón 2015) cuyos patrones tanto de expresión como de localización cambian durante su diferenciación con NGF (Márquez 2003, Aragón 2016).

#### **1.4.1 PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS PC12**

En condiciones de cultivo estándar, las células PC12 tienen una apariencia redonda, contienen vesículas cromafines, fluorescencia de catecolaminas y en general las características de células cromafines adrenales de las cuales derivan (Guroff 1983). Estas células proliferan lentamente bajo condiciones normales de cultivo, se multiplican de forma logarítmica, con un tiempo de división de 96 horas para células con pasajes tempranos y de 48 a 72 horas en pasajes tardíos (Greene 1982).

La mayoría de las células son parecidas a las de glándulas adrenales embrionarias de rata más que de adulto. El espectro de maduración se refleja en los gránulos secretores que varían en tamaño, número y morfología, lo cual puede estar relacionado en parte con la replicación que se está llevando a cabo (Greene 1982).

Se ha demostrado que las células PC12 sobreexpresan marcadores de proliferación como lo son PCNA (Antígeno nuclear de proliferación celular) y del ciclo celular como ciclinas y cdk's (Sun 2014) en presencia de un estimulante del crecimiento celular.

#### **1.4.2 DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS PC12**

La diferenciación de las células PC12 con NGF se caracteriza por cambios dinámicos que producen moléculas para regular la plasticidad neuronal, la organización del citoesqueleto y el metabolismo de los lípidos (Rodríguez-Muñoz 2008). Estos cambios son el resultado de la unión de NGF al receptor tropomiosina cinasa A (TrkA) presente en las células PC12, lo cual activa la vía de señalización de MAP cinasas en donde están involucradas las

proteínas Raf, MEK y ERK. Esta unión promueve la fosforilación rápida y sostenida de ERK, que es lo que ocasiona la diferenciación (Leon 2014).

El NGF provoca un arresto del ciclo celular en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Rudkin 1989) e induce la sobreexpresión de Ciclina D, la cual inhibe la síntesis y replicación de DNA (Marampon 2008), produce el aumento en los niveles de la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) (Fischer 1991) y  $\beta$ III-tubulina (Joshi 1989) ambos marcadores de diferenciación neuronal y altera la regulación postranscripcional de otro marcador NF-L (neurofilamento de cadena ligera) (Pandey 2015). Además, la matriz nuclear de estas células sufre cambios en su composición y organización espacial para adaptarse a la arquitectura nuclear de las nuevas condiciones fisiológicas de las células especializadas (Rodríguez-Muñoz 2008).

Al suspender el tratamiento con NGF, la creación de las ramificaciones cesa, la división celular se retoma y las células vuelven a presentar la morfología de célula tipo cromafín, lo cual indica que los efectos del NGF son reversibles (Guroff 1983).

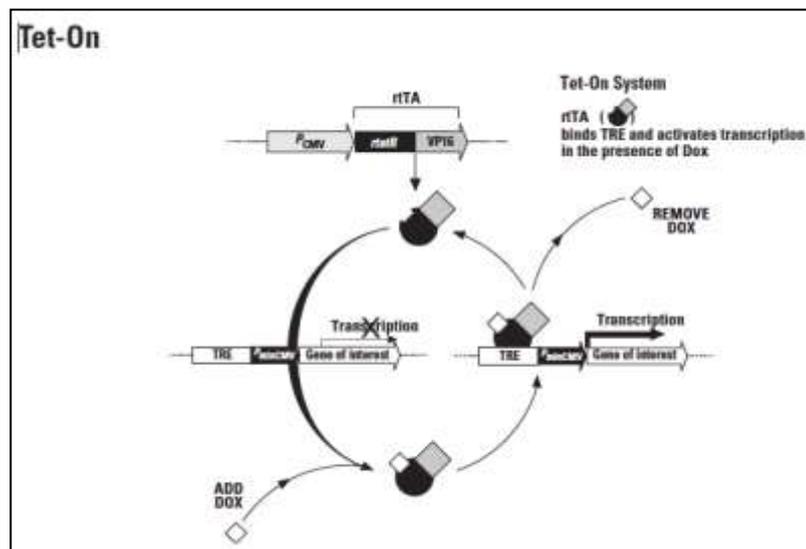
### 1.4.3 SISTEMA TET-ON

A la fecha, uno de los mejores y más utilizados sistemas inducibles de regulación génica para eucariotas es el llamado Tet-Off/On (Shaikh 2006) que está basado en Tn10, el operón de respuesta a tetraciclina (Tet) de *Escherichia coli*.

Este sistema fue desarrollado por Gossen y colaboradores en 1992, y se compone de dos unidades de expresión: un plásmido regulador, el cual contiene un transactivador controlado por tetraciclina (tTA), capaz de unirse al fármaco regulador (Doxiciclina, DOX), para mediar la activación del gen de interés y un segundo plásmido llamado de respuesta que contiene el gen de interés bajo el control del promotor mínimo del citomegalovirus humano IE (Pcmv) combinado con la secuencia TetO y el elemento de respuesta a Tet (TER) (Shaikh 2006, Zhu 2002).

El transactivador controlado por tetraciclina (tTA) fue generado fusionando el dominio de unión a DNA del operón de resistencia a tetraciclina (TetR) codificado en la Tn10 de *Escherichia coli*, con el dominio de activación de la transcripción de la proteína VP16 del Herpes simplex virus. El sistema Tet-On (Figura 5) contiene una mutante del transactivador (rtTA) con un cambio de 4 aminoácidos, el cual sólo en presencia de DOX, se une a tetO y

Pcmv y activa la transcripción del gen blanco (Zhu 2002, Stieger 2009) de manera dependiente de la dosis administrada (Wang 2005).



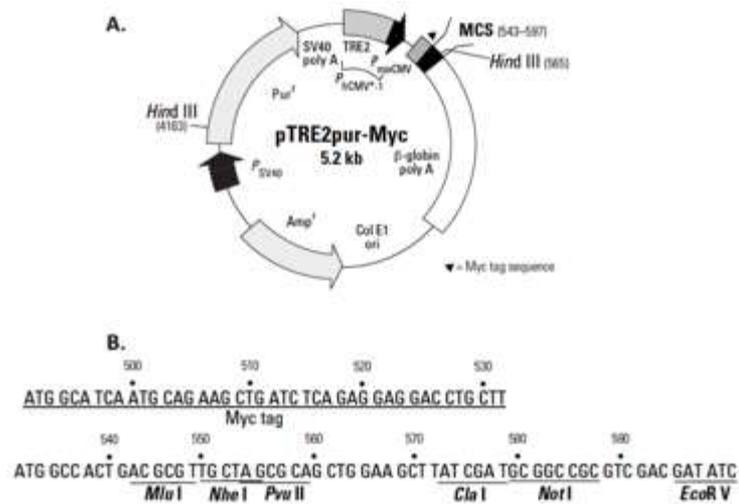
**Figura 5.** Esquema representativo de la regulación del sistema Tet-On. El TRE está localizado río arriba del P<sub>minCMV</sub> el cual se encuentra silenciado en ausencia de activación. rTA se une a TRE sólo en presencia de DOX, permitiendo la transcripción del gen de interés. (Clontech Laboratories, Inc.)

El sistema Tet-On ha sido ampliamente utilizado tanto *in vitro* como *in vivo* (Wang 2005). En los últimos años, se ha utilizado en líneas celulares de retina, cerebro, músculo y otros órganos (Stieger 2009), así como de cáncer cervicouterino y neuroblastoma (Shaikh 2006), para el estudio de diversas enfermedades, incluso se han desarrollado modelos animales con este sistema (Stieger 2009, Zhu 2002).

Transfectantes estables de células PC12 con este sistema fueron generadas por primera vez simultáneamente por Jörnvall y Wyttenbach en 2001. Son un modelo muy útil para estudios *in vitro* que permite un buen control en la expresión de genes (Krawczyk 2014). Las células PC12 Tet-On han sido utilizadas para el estudio de genes involucrados en viabilidad (Wang 2011), señalización celular, crecimiento de neuritas (Uren 2014, Krawczyk 2014) y transporte de mRNA (De Diego 2002).

Recientemente en nuestro grupo de trabajo se crearon modelos de células PC12 Tet-On que expresan de manera estable plásmidos con las diferentes isoformas de Dp71 fusionadas con el epítipo de c-Myc en el extremo NTD, utilizando el plásmido pTRE2pur-Myc (Figura 6), con la finalidad

de conocer el papel de cada una de las isoformas en el contexto neuronal y así avanzar en el conocimiento de las bases moleculares implicadas en el funcionamiento del SNC.



**Figura 6.** Plásmido pTRE2pur-Myc. **A.** Diagrama del plásmido pTRE2pur-Myc. Este plásmido permite la expresión del gen de interés fusionado a una etiqueta de Myc. Contiene un sitio múltiple de clonación (MCS) río abajo del promotor de respuesta a tetraciclina, el cual contiene el elemento de repuesta a Tet (TRE). **B.** Secuencia del sitio múltiple de clonación.

## 2. ANTECEDENTES DIRECTOS

La primera evidencia de que la proteína Dp71 está involucrada en la diferenciación de las células PC12 se encontró en 1996. Cisneros <sup>(1996)</sup> observó el aumento de Dp71 tanto a nivel de mRNA como de proteína durante la diferenciación de estas células, lo cual correlaciona con el aumento del marcador de diferenciación MAP2. Esto sugiere que el aumento de la expresión de Dp71 podría estar relacionado con los cambios que ocurren durante el crecimiento de neuritas.

En 2003, Márquez utilizó anticuerpos específicos para detectar los dos grupos de isoformas descritos a la fecha, Dp71d y Dp71f. Sus estudios revelaron que solo Dp71f incrementa durante la diferenciación neuronal, no así Dp71d. Asimismo, describieron que la localización intracelular de los dos grupos de isoformas es distinta en las células PC12 y que dicha localización cambia durante la diferenciación.

Un año más tarde, utilizando un vector antisentido para Dp71, se describió que el silenciamiento de toda la familia Dp71 disminuye la capacidad de diferenciación de las células PC12 tanto con NGF como con AMPc. De manera interesante, la sobreexpresión de Dp71d (Dp71a), pero no de Dp71f (Dp71b), devuelve a las células esta capacidad <sup>(Acosta 2004)</sup>. Debido a que el grupo Dp71d se ha encontrado mayormente en núcleo y unida a la matriz nuclear <sup>(Rodríguez-Muñoz 2008)</sup>, estos resultados sugieren que Dp71d media respuestas nucleares necesarias para la diferenciación <sup>(Acosta 2004)</sup>.

Diversos estudios posteriores en células PC12 han demostrado que ambos grupos participan en funciones diferentes debido probablemente a su localización y a que forman complejos tipo DAP cuya composición es diferente entre sí <sup>(Cerna, 2006, Romo-Yáñez 2007, Villarreal-Silva 2010)</sup> y en algunos de ellos cambia la composición cuando las células son diferenciadas <sup>(Romo Yáñez 2007)</sup>.

Ya que estos dos grupos difieren únicamente en la presencia o ausencia del exón 78, nuestro grupo de estudio se dio a la tarea de evaluar el papel de los últimos dos exones de la proteína por medio de la creación de una mutante denominada Dp71 $\Delta$ <sub>78-79</sub>, la cual carece de los exones 78 y 79. Se demostró que la transfección estable de las células PC12 con dicha proteína estimula el crecimiento neurítico, incluso en ausencia de NGF. Además, se determinó que

la presencia de la mutante regula la expresión de las proteínas Dp71 endógenas: disminuye Dp71d y aumenta Dp71f (Aragón 2011). Todos estos estudios sugieren que la proteína Dp71 juega un papel importante durante la diferenciación y que los grupos de isoformas desarrollan funciones diferentes e independientes sobre este proceso.

Hasta el 2011, no se había comprobado que la proteína Dp71 fuera importante para la proliferación celular. Villarreal-Silva observó la disminución en la proliferación de las células PC12 que expresaban el antisentido contra Dp71. Sus resultados revelaron que la ausencia de este grupo de proteínas afectaba la transición de la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> a la S, así como la expresión de proteínas importantes para la mitosis:  $\beta$ -dístroglicano y lámina B<sub>1</sub>, disminuyéndola. A la fecha no existen estudios en los que se determine si este efecto se debe a algún grupo particular de isoformas de Dp71.

En adición a lo anterior, se encontró que células PC12 Tet-On que expresan de manera estable a la mutante Dp71 $\Delta$ <sub>78-79</sub> proliferan 3 veces más rápido en comparación con las células control (células transfectadas con el vector vacío) y no responden a NGF. En este caso, la presencia de la mutante aumenta la expresión de Dp71a endógena, así como de PCNA y FAK (Herrera-Salazar tesis de doctorado). Estos resultados refuerzan la importancia del estudio individual de las isoformas de la distrofina Dp71.

Para abordar esta problemática, nuestro grupo de estudio transfectó de manera transitoria células PC12 Tet-On con cada una de las isoformas que se expresa de manera endógena en esas células (Dp71a, Dp71c, Dp71ab, Dp71e Dp71ec y Dp40). Estas proteínas están unidas a un epítipo de c-Myc para facilitar su detección y estudio. Utilizando estas células se determinó que cada isoforma presenta una localización celular diferente y que ésta cambia durante la diferenciación sólo para algunas de ellas (Aragón 2016). Dado los resultados obtenidos en este estudio se transfectaron células PC12 Tet-On de manera estable para poder conocer el papel de cada una, independientemente del grupo al que pertenezca.

Además de lo ya descrito en células PC12, se han realizado estudios en diferentes tejidos humanos en donde se determina que la expresión de los dos grupos de isoformas conocidos hasta la fecha es diferente tanto a nivel de mRNA como de proteína y que esto podría estar relacionado con el crecimiento

celular y diferenciación (Austin 1995) ya que además existe expresión diferencial durante el desarrollo neuronal (Ceccarinni 1997).

Un estudio realizado en células cultivadas *in vitro* confirma la expresión diferencial de los grupos de isoformas Dp71d y Dp71f en compartimentos intracelulares y en diferentes tipos de neuronas. El grupo Dp71d se encuentra mayormente expresado en neuronas GABAérgicas, mientras que el grupo Dp71f en glutamatérgicas, ambas del hipocampo de rata. Esto sugiere que cada grupo de isoformas tiene un papel diferencial en la sinapsis (Rodríguez-Muñoz 2015). En nuestro grupo de estudio recientemente se describió que a pesar de que Dp71 se encuentra mayormente expresada en cerebro y retina, las distribución de los grupos de isoformas es también diferencial tanto a nivel de mRNA como de proteína: Dp71d se expresa en mayor medida en cerebro y Dp71f en retina de ratón (González 2014, Aragon 2016 en preparación).

A pesar de que existen diversos estudios de Dp71d, en ellos no se diferencian las isoformas que lo conforman: Dp71, Dp71a y Dp71c. No obstante, varios trabajos reafirman que cada una de estas isoformas pueden tener funciones diferentes, ya que sólo Dp71a se ha encontrado asociada a la matriz nuclear (Rodríguez-Muñoz 2008) y las isoformas Dp71 $\Delta$ <sub>110</sub> y Dp71c son las primeras expresadas durante el desarrollo embrionario (Ceccarinni 1997) y son las únicas expresadas en algunos tipos celulares, como las plaquetas (Austin 2002).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La importancia de la distrofina Dp71 en el funcionamiento del SNC es ampliamente reconocida y sigue siendo explorada. Algunos estudios demuestran que este grupo de proteínas es importante para el crecimiento y diferenciación de células neuronales. Por otro lado, su ausencia está asociada con trastornos neuronales y gliales presentes en pacientes con DMD; sin embargo, no se han determinado los procesos moleculares responsables de estos efectos.

El transcrito de Dp71 da origen a varias isoformas que presentan diferente expresión y localización celular, lo cual sugiere que cada una de ellas tiene una función particular en todos los procesos en donde se involucra esta proteína.

Estudiar la participación de cada isoforma, de manera individual, en estos procesos, comenzando por aquellas de las cuales se tiene mayor información y son más abundantes en el cerebro, es importante y necesario para ampliar el conocimiento de las funciones de la familia Dp71.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL:**

Caracterizar a las células PC12 Tet-On que sobreexpresan de manera estable a las isoformas de la distrofina Dp71a y c.

### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Comprobar la expresión de Dp71a y Dp71c en las células PC12 Tet-On, a nivel de mRNA y proteína.
2. Determinar la localización de las proteínas recombinantes Dp71a y Dp71c en las células PC12 Tet-On transfectadas de manera estable.
3. Analizar la capacidad de proliferación de las células PC12 Tet-On/Dp71a y Dp71c y determinar la expresión de marcadores de proliferación (PCNA, Ciclina B, FAK).
4. Analizar la capacidad de diferenciación de las células PC12 Tet-On/Dp71a y Dp71c y determinar la expresión de marcadores de diferenciación ( $\beta$ III-tubulina, enolasa).

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 CULTIVO Y COSECHA DE CÉLULAS PC12 TET-ON

Las clonas de las células PC12 Tet-On transfectadas de manera estable con el plásmido pTRE2pur-Myc (células control) (Herrera-Salazar 2016), pTRE2pur-Myc/Dp71a o pTRE2pur-Myc/Dp71c fueron cultivadas en medio selectivo (medio completo): 85% de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero de caballo inactivado, 5% de suero fetal bovino sin tetraciclina, 100 U/ml de penicillina, 1 mg/ml de estreptomicina, 250 ng/ml de micostatina, 150 µg/ml de geneticina (G418), 350 ng/ml de puromicina, a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de crecimiento se cambió dos veces por semana.

La cosecha se llevó a cabo despegando las células de la caja de cultivo, las cuales se centrifugaron a 5,000 rpm por 5 min, se desechó el medio de cultivo y posteriormente se lavó la pastilla celular con PBS (15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 154 mM NaCl pH 7.4). La pastilla fue guardada a -20 °C para su posterior análisis.

### 5.2 INDUCCIÓN CON DOXICICLINA

El número correspondiente de células de las clonas de PC12 Tet-On/Dp71a y Dp71c fueron sembradas en las cajas de cultivo adecuadas para cada caso en medio completo. Posteriormente se adicionó DOX a la concentración final correspondiente durante 16 a 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo, fueron cosechadas para su posterior análisis.

### 5.3 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

Se obtuvo DNA genómico de cada una de las clonas seleccionadas de las células PC12 Tet-On/Dp71a y Dp71c. La extracción se realizó por medio del método Fenol-Cloroformo. Se añadieron 500 µl de buffer de lisis (500 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM de EDTA y 0.5% de Sarcosyl) y 5 µl de RNAsa A (10 mg/ml) a la pastilla celular previamente cosechada y se incubó a 37°C durante una hora. Se agregaron 5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó a 65 °C durante una hora. Se adicionó a la suspensión 1 vol de Fenol saturado con Tris-HCl pH 8, incubando a temperatura ambiente durante 5 min y

posteriormente se adicionó medio vol de cloroformo, incubando 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min, se recuperó la fase acuosa y se lavó con 1 vol de cloroformo. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min y el sobrenadante se pasó a un tubo para proceder a purificar el DNA precipitando con medio vol de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío durante toda la noche a -20 °C. Se centrifugó a 4°C por 15 min a 12,000 rpm y la pastilla de DNA purificado se lavó con etanol al 70% y centrifugó a 12,000 rpm por 15 min. Se decantó y dejó secar por 5 min a temperatura ambiente. Al final de la purificación se solubilizó la muestra de DNA en agua destilada estéril y se verificó la presencia del mismo en un gel de agarosa al 0.8%. El DNA se guardó a -20 °C para su posterior análisis.

#### **5.4 EXTRACCIÓN DE RNA**

Se extrajo RNA de las clonas seleccionadas de las células PC12 Tet-On/Dp71a y Dp71c tanto sin inducción como con inducción de DOX. Se utilizó el método de Trizol. La pastilla celular se disolvió en 1 ml Trizol mezclando con una pipeta. Se incubó por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó para remover todos los componentes celulares. Se agregaron 200 µl de cloroformo por cada ml de Trizol usado en homogenización, se mezcló con vortex por 15 segundos e incubó a temperatura ambiente por 5 min. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C y se recuperó la fase acuosa. El RNA fue precipitado añadiendo 500 µl isopropanol por cada ml de Trizol usado en homogenización. Se incubó a temperatura ambiente por 10 min y centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C. La pastilla de RNA se lavó con 1 ml etanol al 75% frío, mezcló en vortex y centrifugó a 12,000 rpm por 1 min a 2-8 °C, removiendo el alcohol restante al final de la centrifugación con pipeta. El RNA se disolvió en agua libre de RNAsas y se analizó en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Los extractos de RNA se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis.

#### **5.5 TRANSCRIPCIÓN REVERSA ACOPLADA A PCR (RT-PCR)**

La transcripción reversa se realizó utilizando el Kit SuperScript™ II (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante con los siguientes componentes: 1 µl iniciadores 'random', 5 µg de RNA total libre de DNA, 1 µl de

mezcla de dNTP (10 mM de cada uno) y agua libre de RNAsas hasta completar 10 µl de reacción. La mezcla se calentó a 65 °C por 5 min y posteriormente se colocó en hielo por 2 min. Se añadieron 10 µl de una mezcla que contiene: 2 µl de buffer RT 10 x, 4 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µl de DDT 0.1 M, 1 µl de RNasa OUT 40 U/µl y 1 µl de SuperScript III RT 200 U/µl y se incubó a 55°C durante 60 min seguido por una incubación de 5 min a 85°C. Se agregó a la reacción final 1 µl de RNasa H y se incubó a 37°C durante 20 min. La reacción final se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

La cantidad relativa de producto se calculó midiendo la intensidad del fragmento de interés y dividiéndolo entre la intensidad del producto de actina con ayuda del programa Image J. Los resultados fueron graficados y analizados con el programa GraphPad.

## **5.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

Las reacciones de PCR para corroborar la presencia de las isoformas Dp71a o Dp71c en los extractos de DNA o cDNA de las clonas seleccionadas se llevaron a cabo con los siguientes componentes: 5 µl de buffer PCR 10X, 3.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µl de dNTPs (2 mM c/u), 1 µl del iniciador Exón 69F (5'-CATGGTAGAGTACTGCACTCCG-3') o Exón 77F (5'-CTCCCCAGGACACAAGCACAG-3'), 1 µl del iniciador pTRE2 3' (5'-AACAAATCAAGGGTCCCCAAACT-3'), 2 µl de producto a amplificar, 0.3 µl de Taq DNA Polimerasa (2 U/µl) y el vol de agua estéril para completar un 50 µl. La reacción se realizó en el termociclador Veriti (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 95 °C por 2 min, 35 ciclos de 95 °C 30 seg y 68 °C 3 min para el Exón 69F y 26 o 28 ciclos de 95 °C, 60 °C y 72 °C por 30 seg cada uno, para el Exón 77F y una temperatura final de 72 °C por 7 min.

Para verificar la calidad y cantidad del cDNA, se amplificó la secuencia de actina utilizando los iniciadores Actin 1 (5'-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG -3') y Actin 2 (5'-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG -3') con las condiciones: 95 °C por 5 min, 24 ciclos de 95 °C, 60 °C y 72 °C por 30 seg cada uno y 72 °C por 7 min. Los productos amplificados se guardaron a -20 °C para su posterior análisis.

Una alícuota de cada reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% con buffer TBE (45 mM Tris-borato, 1mM EDTA).

Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y los productos de PCR se evaluaron mediante el tamaño de fragmento: 1,020 y 729 pb para Dp71a y Dp71c respectivamente con el Exón 69F y 181 pb para ambos con el Exón 77F.

## **5.7 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR**

Se corrió un gel de agarosa al 1.5% cargando la reacción de PCR, se cortaron las bandas de los fragmentos correspondientes y se colocaron en la cámara de electroelución durante 1.5 horas a 100 V. Al término del corrimiento se recuperó el DNA en el buffer de electroelución (acetato de amonio 7.5 M, buffer de carga de DNA), el cual fue removido de la cámara y transferido en tubos nuevos, adicionando 2.5 volúmenes de etanol frío y dejando precipitar toda la noche a -20 °C. Se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm por 15 min y se lavó la pastilla de DNA con etanol al 70%, volviendo a centrifugar a 12,000 rpm por 15 min. Se dejó secar la pastilla después de decantar y eliminar todo el etanol restante. Las pastillas se disolvieron en 20 µl de agua destilada estéril y se verificó la presencia de DNA en gel de agarosa al 1.5%.

## **5.8 SECUENCIACIÓN**

A partir de los fragmentos de DNA purificados se procedió a secuenciarlos utilizando el kit comercial Big Dye™ Terminator (Applied Biosystems), utilizando los siguientes componentes: 8 µl de la mezcla "Terminator Ready Reaction Mix", 800 ng del iniciador correspondiente, 50 ng de DNA purificado y agua destilada estéril para completar 20 µl. La reacción se llevó a cabo en el termociclador Veriti (Applied Biosystems) con las condiciones siguientes: 94 °C por 5 min, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y 60 °C por 4 min y una temperatura final de 72 °C por 10 min.

El producto de secuenciación se precipitó utilizando isopropanol. Para ello, se pasó la reacción de secuenciación a tubos de 1.5 ml, se agregaron 80 µl de isopropanol al 75% y se mezcló en vórtex. Se incubó por 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 15 min a 12,000 rpm. El sobrenadante se eliminó y se adicionaron 250 µl de isopropanol al 75%, mezclando en vórtex. Se centrifugó por 5 min a 10,000 rpm y se eliminó el

sobrenadante. Las muestras se secaron al vacío durante 10 a 15 min y se enviaron a procesamiento. Se recibió la secuencia de cada una, la cual fue analizada para determinar la homología con la secuencia esperada.

## **5.9 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**

Se obtuvo la pastilla celular de la clona 4 de PC12 Tet-On/Dp71a y clonas 1, 4 y 5 de PC12 Tet-On/Dp71c, como se mencionó anteriormente, y se disolvió en buffer de extracción de proteínas (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Tris X-100, inhibidor de proteasas). El extracto fue guardado a -20 °C para su posterior análisis.

La concentración de las proteínas se determinó por medio una curva de concentración utilizando el método de Bradford. Se realizó una dilución 1:5 del reactivo de Bradford (RB, Azul Brillante de Coomassie) con agua destilada. La curva de calibración se realizó con concentraciones de BSA desde 0 hasta 5 µg/ml. A los puntos de la curva y las muestras se le añadió la cantidad de agua destilada necesaria para completar 40 µl y 180 µl de RB. La absorbancia se midió haciendo uso del Lector de Microplacas de BioRad Mod. 680.

## **5.10 WESTERN BLOT**

Se preparó la muestra de cada extracción agregando buffer de carga (50mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 4% Glicerol, 2% beta-mercaptoetanol, 0.1% Azul de bromofenol) e hirviendo por 10 min.

Un vol equivalente a 20 – 30 µg de proteína se separó por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% (Acrilamida-bisacrilamida, Trizma 1.5 M pH 8.8, H<sub>2</sub>O, SDS, APS, Temed) a 100V durante 1.5 horas. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa cargada positivamente a 22 V durante toda la noche en ambiente frío. Se comprobó la transferencia de proteínas tiñendo la membrana con rojo de Ponceau. El bloqueo se llevó a cabo con 5% de leche sin grasa en buffer TBS-T (10 mM Trizma pH 8, 150 mM NaCl, 0.5% Tween 20) por 1 hr en agitación. Se realizaron lavados y se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 1) a 4 °C en agitación. Se lavó nuevamente e incubó con anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón o de conejo conjugado con peroxidasa) en una solución de 5% de leche sin grasa durante 2 hrs en agitación. La detección basada en la reacción

de peroxidasa se efectuó utilizando un kit de quimioluminiscencia de Perkin Elmer, los lavados y la dilución de los anticuerpos se llevaron a cabo en buffer TBS-T. Todas las membranas fueron reveladas con el anticuerpo anti- $\beta$ -actina como control de carga. Para obtener la expresión relativa de cada proteína, la intensidad de la banda fue cuantificada por escaneo de densitometría usando el programa Image J, se obtuvo la relación entre el valor de cada proteína y el de su actina y se graficaron los resultados. En la tabla 1 se muestran los anticuerpos que fueron utilizados así como sus diluciones.

<b>Tabla 1. Características de anticuerpos primarios</b>			
<b>ANTICUERPO</b>	<b>DILUCIÓN</b>	<b>NATURALEZA</b>	<b>ESPECIFICIDAD</b>
Anti-Myc <sup>1</sup>	WB: 1:1000 IF: 1:200 y 1:25	Monoclonal ratón	Aminoácidos 408 – 439
Anti-Actina <sup>2</sup>	WB: 1:300	Monoclonal ratón	$\beta$ -Actina
Anti-Grb <sub>2</sub> <sup>1</sup>	WB: 1:500	Policlonal conejo	C-terminal de Grb <sub>2</sub>
Anti-PCNA <sup>3</sup>	WB: 1:1000	Monoclonal ratón	PCNA
Anti-Ciclina B <sub>1</sub> <sup>3</sup>	WB: 1:200	Policlonal conejo	Ciclina B <sub>1</sub> total
Anti- $\beta$ -dystroglicano <sup>4,5</sup>	WB: 1:500 IF: 1:300	Monoclonal ratón Policlonal conejo	Últimos 15 aminoácidos del extremo C-terminal
Anti-Fak <sup>1</sup>	WB: 1:1000	Policlonal conejo	C-terminal de FAK
Anti-HspB <sub>1</sub> <sup>4</sup>	WB: 1:500	Policlonal conejo	Proteína HspB <sub>1</sub> nativa
Anti-Enolasa <sup>1</sup>	WB: 1:300	Monoclonal ratón	$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ enolasa
Anti- $\beta$ <sub>III</sub> tubulina <sup>6</sup>	WB: 1:500	Monoclonal ratón	$\beta$ <sub>III</sub> tubulina específica de neuronas

WB: Western Blot. IF: Inmunofluorescencia. Anticuerpos obtenidos de: <sup>1</sup>Santa Cruz Biotechnology, <sup>2</sup>Dr. Manuel Hernández (CINVESTAV), <sup>3</sup>Cell Signalling Technology, <sup>4</sup>Abcam, <sup>5</sup>Dr. Dominique Mornet y <sup>6</sup>Covance.

### 5.11 ENSAYO DE RESPUESTA A DOXICICLINA

Se sembraron 500,000 células de las clonas seleccionadas de PC12 Tet-On/Dp71a y Dp71c en placas de cultivo de 12 pozos para evaluar la respuesta del sistema Tet-On a diferentes dosis de DOX (0, 50, 100, 200, 500 y 1000 ng/ml). Las células fueron inducidas durante 24 horas. Después del tiempo establecido, se procedió a la cosecha de células y se utilizaron 10  $\mu$ l para realizar el recuento celular en cámara de Neubauer mezclando con 10  $\mu$ l de azul tripano. Se contaron las células viables en los cuadrantes grandes de la

cámara con el objetivo 40x del microscopio de inversión. El número de células obtenido corresponde a 1 ml de cultivo y los resultados fueron graficados en una curva de viabilidad.

Las pastilla celular fue tratada para obtener el extracto proteico utilizando 100 µl de buffer de extracción y analizar la cantidad de proteína recombinante (Myc-Dp71a o Myc-Dp71c) generada por medio de Western Blot. Los resultados fueron graficados y analizados por estadística.

## **5.12 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA**

Se cultivaron las clonas de las células PC12 Tet-On/Dp71a y Dp71c en portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina durante 24 horas y con diferentes tratamientos, según el caso (sin inducción y con inducción con DOX y ambas sin diferenciar y diferenciadas con 50 ng/ml de NGF). Se lavaron los portaobjetos con buffer de citoesqueleto (CB, 10 mM MES, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glucosa) y la permeabilización y fijación se llevó a cabo con 0.4% de tritón X-100 en paraformaldehído y paraformaldehído al 4% (preparados ambos en CB) durante 5 y 20 min, respectivamente. Para los lavados posteriores se utilizó PBS. Los portaobjetos se bloquearon con 0.5% de gelatina por 40 min y se incubaron con los anticuerpos primarios (Tabla 1) toda la noche a 4 °C. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos para detectar el anticuerpo primario, incubando 1.5 hrs a temperatura ambiente en la oscuridad y posteriormente se tiñeron los núcleos con DAPI. Después de lavar con agua destilada estéril, el montaje sobre el portaobjeto se llevó a cabo en medio Vectashield de montaje. Las imágenes se tomaron con el objetivo de inmersión 63x usando un microscopio confocal Leica TCS. Para cada imagen, de 20 a 25 se escanearon secciones y se muestra el corte ecuatorial para ver la localización celular de las proteínas analizadas.

## **5.13 CURVA DE PROLIFERACIÓN**

Se colocaron 50,000 células de cada clona de PC12 Tet-On/Dp71a y Dp71c estudiada en una placa de 6 pozos bajo las condiciones estándar de cultivo y, en su caso, se indujeron con 500 ng/ml de DOX. De cada curva se cosecharon células a 0, 3, 6 y 9 días de crecimiento, haciendo cambio de

medio en los días 3 y 6 con la correspondiente inducción con DOX. De esa cosecha, se recuperaron 10  $\mu$ l para contar las células en la cámara de Neubauer como se describió anteriormente. Los datos por día fueron graficados para obtener la curva de crecimiento.

Se realizó un análisis morfométrico utilizando un microscopio invertido y el programa AxioVision LE Rel. 4.7, capturando 10 campos de cada caja a 0, 3, 6 y 9 días de crecimiento. En este análisis se determinó el tamaño promedio de las células y su morfología general.

Las células fueron cosechadas al día 9 para extraer sus proteínas y cuantificarlas por el método de Bradford y evaluar el nivel de marcadores moleculares por medio de Western Blot.

#### **5.14 CURVA DE DIFERENCIACIÓN**

Se colocaron 30,000 células de las clonas de PC12 Tet-On/Dp71a y Dp71c en cajas p30 recubiertas con colágeno, en su caso, se indujeron con 500 ng/ $\mu$ l de DOX y se dejaron 24 horas en medio de cultivo completo. Después de ese tiempo se cambió el medio de cultivo por uno adicionado con 50 ng/ml de NGF 2.5S para inducir la diferenciación de las células. Este medio se cambió cada 3 días, adicionando cada vez 500 ng/ml de DOX.

Se realizó el análisis morfométrico con microscopio invertido utilizando el programa AxioVision LE Rel. 4.7, capturando 10 campos de cada caja a 0, 3, 6 y 9 días de diferenciación. En este análisis se determinaron parámetros de diferenciación como lo son el rango de diferenciación, porcentaje o índice de diferenciación y promedio de longitud de neuritas. Las células fueron cosechadas al día 9 para extraer sus proteínas y evaluar el nivel de marcadores moleculares por medio de Western Blot.

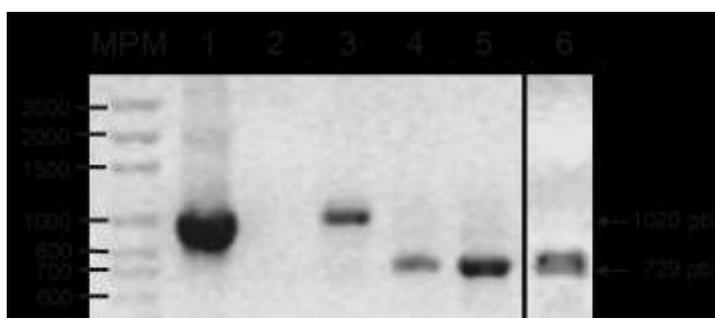
#### **5.16 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los datos obtenidos de todos los experimentos fueron analizados por la prueba “unpaired Student’s t-test, utilizando el software GraphPad Prism 5. Los valores se expresan como el promedio  $\pm$  desviación estándar (SD) de 2 o 3 experimentos independientes entre sí. El criterio de significancia estadística usado fue  $P < 0.05$  o, en su caso,  $P < 0.01$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE Myc/Dp71a y Myc/Dp71c EN LAS CLONAS ESTABLES DE PC12 TET-ON/Dp71a Y Dp71c.

Con el fin de conocer el comportamiento de las clonas PC12 Tet-On transfectadas de manera estable, se realizó la caracterización de una clona de PC12 Tet-On/Dp71a (clona 4) y tres de PC12 Tet-On/Dp71c (clonas 1, 4 y 5), en adelante mencionadas como PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5. Para esto, se procedió a la extracción de DNA de cada una de las clonas así como de la clona 3 de PC12 Tet-On/pTRE2pur-Myc (que en este trabajo se nombrará como clona control) para verificar la secuencia correspondiente. Se amplificaron por medio de PCR utilizando los iniciadores Exón 69F y pTRE2 3', los cuales cubren parte de la secuencia de Dp71 y una parte del plásmido pTRE2pur-Myc. Como se muestra en la Figura 7, se obtuvieron los fragmentos deseados de 1,020 y 729 pb para Dp71a y Dp71c, respectivamente. No se obtuvo amplificado con el ADN de la clona 3 del vector pTRE2pur-Myc, de acuerdo a lo esperado.



**Figura 7.** Amplificación de los fragmentos de DNA de Dp71a y Dp71c. El carril 1 muestra el control positivo de la reacción utilizando el plásmido pTRE2pur-Myc/Dp71a, mientras que en el carril 2 se muestra el control negativo de PC12 Tet-On/pTRE2pur-Myc. Se indica el tamaño de los fragmentos de Dp71 amplificados; 1020 corresponde a Dp71a y 729 a Dp71c. Los fragmentos obtenidos de las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5 se muestran en los carriles 3, 4, 5 y 6, respectivamente. MPM: Marcador de peso molecular M-DNA-100bp de Axygen. Se muestra una imagen representativa de dos experimentos independientes.

Los fragmentos obtenidos se purificaron y secuenciaron utilizando el oligonucleótido pTRE2 3'. El alineamiento de la secuencia teórica del RNA

mensajero de las distrofinas Dp71a y Dp71c con las secuencias de los fragmentos obtenidos, mediante la reacción de secuenciación muestra la homología entre las secuencias (Figuras 8 y 9), por lo que se confirmó que las clonas poseen la secuencia para obtener la proteína esperada correspondiente.

	<b>... Ex 76</b>	<b>Ex 77</b>	
Dp71a_mRNA	GGCAGTCAAACCTTCAGAATCTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTCCTCCCCAGGACACA		434
Dp71a_clona4	GGCAGTCAAACCTTCAGAATCTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTCCTCCCCAGGACACA		540
	*****		
		<b>Ex 78</b>	
Dp71a_mRNA	AGCACAGGGTTAGAAGAAGTGATGGAGCAACTCAACAACCTCCTTCCCTAGTTCAAGAGGA		494
Dp71a_clona	AGCACAGGGTTAGAAGAAGTGATGGAGCAACTCAACAACCTCCTTCCCTAGTTCAAGAGGA		600
	*****		
		<b>Ex 79</b>	
Dp71a_mRNA	AGAAATGCCCTGGAAAGCCAATGAGAGAGGACACAATGTAGGAAGCCTTTTCCACATGG		554
Dp71a_clona4	AGAAATGCCCTGGAAA <b>CCAATGAGAGAGGACACAATGTAGCGCCCG</b> GTCCGACGGTTC		660
	***** * * *		

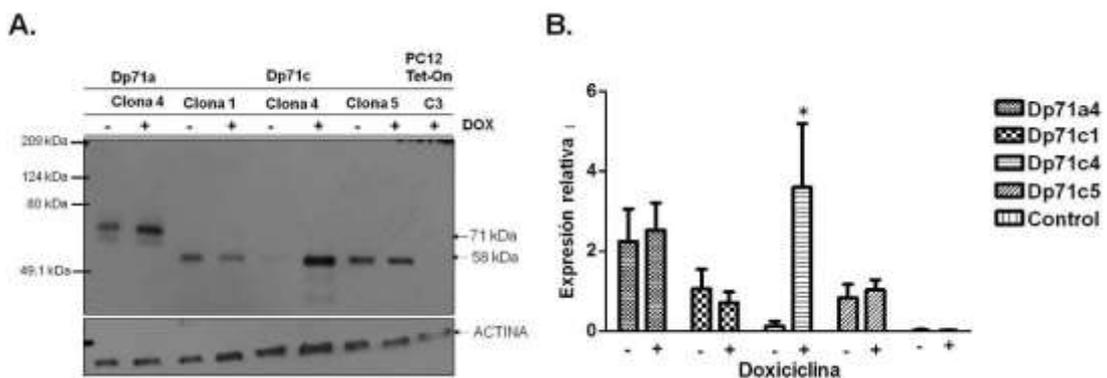
**Figura 8.** Secuenciación del fragmento de Dp71/pTRE2pur-Myc de las células de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4. Alineamiento con la secuencia nucleotídica teórica del mRNA de Dp71a. En negritas se muestra el número de exón que corresponde a cada región de la secuencia. En amarillo se muestra parte de la secuencia reversa complementaria del oligonucleótido rDp71dR-Not (5'-GATCTAG**CGGCCG**CTACATTGTGTCCTCTCTCATTGGC-3'), usado para la construcción del vector pTRE2pur-Myc/Dp71a. En verde se encuentra indicado el codón de paro de la secuencia. La secuencia del sitio de restricción para *Not* se encuentra subrayada. Los \* representan homología entre las pares de bases de ambas secuencias.

	<b>...Ex76</b>	<b>Ex 77</b>	
Dp71c_mRNA	TCTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTCCTCCCCAGGACACAAGCACAGGGTTAGAAGAA		1440
Dp71c_clona5	TCTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTCCTCCCCAGGACACAAGCACAGGGTTAGAAGAA		580
Dp71c_clona1	TCTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTCCTCCCCAGGACACAAGCACAGGGTTAGAAGAA		420
Dp71c_clona4	TCTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTCCTCCCCAGGACACAAGCACAGGGTTAGAAGAA		578
	*****		
		<b>Ex 78</b>	
Dp71c_mRNA	GTGATGGAGCAACTCAACAACCTCCTTCCCTAGTTCAAGAGGAAGAAATGCCCTGGAAAG		1500
Dp71c_clona5	GTGATGGAGCAACTCAACAACCTCCTTCCCTAGTTCAAGAGGAAGAAATGCCCTGGAAAG		640
Dp71c_clona1	GTGATGGAGCAACTCAACAACCTCCTTCCCTAGTTCAAGAGGAAGAAATGCCCTGGAAAG		480
Dp71c_clona4	GTGATGGAGCAACTCAACAACCTCCTTCCCTAGTTCAAGAGGAAGAAATGCCCTGGAAAG		638
	*****		
		<b>Ex 79</b>	
Dp71c_mRNA	CCAATGAGAGAGGACACAATGTAGGAAGCCTTTTCCACATGGCAGATGATTTGGGCAGA-		1559
Dp71c_clona5	<b>CCAATGAGAGAGGACACAATGTAGCGCCCG</b> GTGACGATATCTCTAGGAGCTGAGAAA		700
Dp71c_clona1	<b>CCAATGAGAGAGGACACAATGTAGCGCCCG</b> GTGACGATATCTCTAGGAGCTGAGAACTCA		540
Dp71c_clona4	<b>CCAATGAGAGAGGACACAATGTAGCGCCCG</b> GTGACGATATCTAGAGCTGAGAACTACA		698
	***** * *		

**Figura 9.** Secuenciación de los fragmentos Dp71/pTRE2pur-Myc de las células de las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5. Alineamiento con la secuencia nucleotídica teórica del mRNA de Dp71c. En negritas se muestra el número de exón que corresponde a cada secuencia. En amarillo se muestra parte de la secuencia reversa complementaria del oligonucleótido rDp71dR-Not (5'-GATCTAG**CGGCCG**CTACATTGTGTCCTCTCTCATTGGC-3'), usado para la

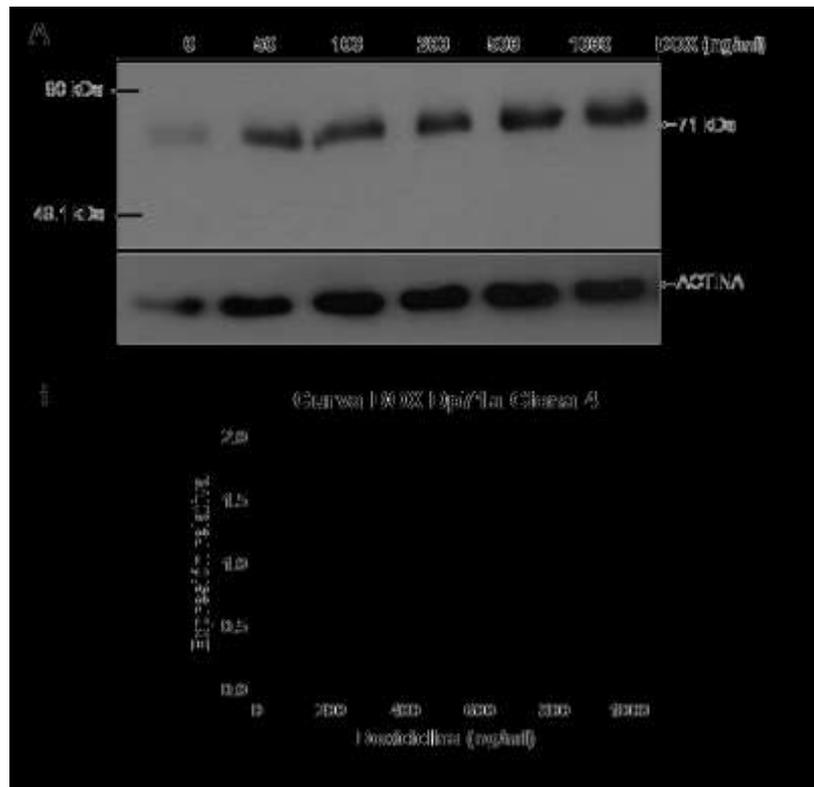
construcción del vector pTRE2pur-Myc/Dp71c. En verde se encuentra indicado el codón de paro de la secuencia. La secuencia del sitio de restricción para *Not* se encuentra subrayada. Los \* representan homología entre las pares de bases de las tres secuencias.

Posteriormente, se verificó la expresión de las proteínas recombinantes Myc-Dp71a y Myc-Dp71c por Western Blot, después de inducir su expresión con 1  $\mu\text{g/ml}$  de DOX y utilizando el anticuerpo anti-Myc. En la figura 10A se observa que se obtienen las proteínas recombinantes del tamaño esperado de 71 kDa (Dp71a) y 58 kDa (Dp71c). Todas las clonas presentan una expresión basal (fuga) de las proteínas correspondientes en ausencia de la inducción con DOX. En la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4, así como PC12 Tet-On/Dp71c-1 y Dp71c-5 no se observa un incremento significativo de la expresión al inducir con DOX (Figura 10B). La clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 muestra expresión basal baja, en ausencia de inducción y un claro incremento de la expresión al inducir con DOX.



**Figura 10.** Expresión de las proteínas recombinantes Myc-Dp71a y Myc-Dp71c en las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4, Dp71c-5. **A)** Western Blot en ausencia o presencia de 1  $\mu\text{g/ml}$  de DOX usando el anticuerpo anti-Myc, así como el control de carga de  $\beta$ -actina ( $\sim 40$  kDa). Todas las proteínas presentan los tamaños esperados de 71 kDa (Dp71a) y 58 kDa (Dp71c). **B)** Gráfica que muestra los niveles de expresión relativa de las proteínas Myc/Dp71a y Myc/Dp71c normalizada con actina. No se observa la expresión en las células control (C3). La expresión de la proteína de la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 presenta una diferencia significativa entre la condición de ausencia y presencia de DOX, mientras que las demás clonas presentan niveles de expresión similares sin y con DOX. Imagen representativa y gráfica construida con el promedio  $\pm$  desviación estándar de dos experimentos independientes. \*:  $P < 0.05$ .

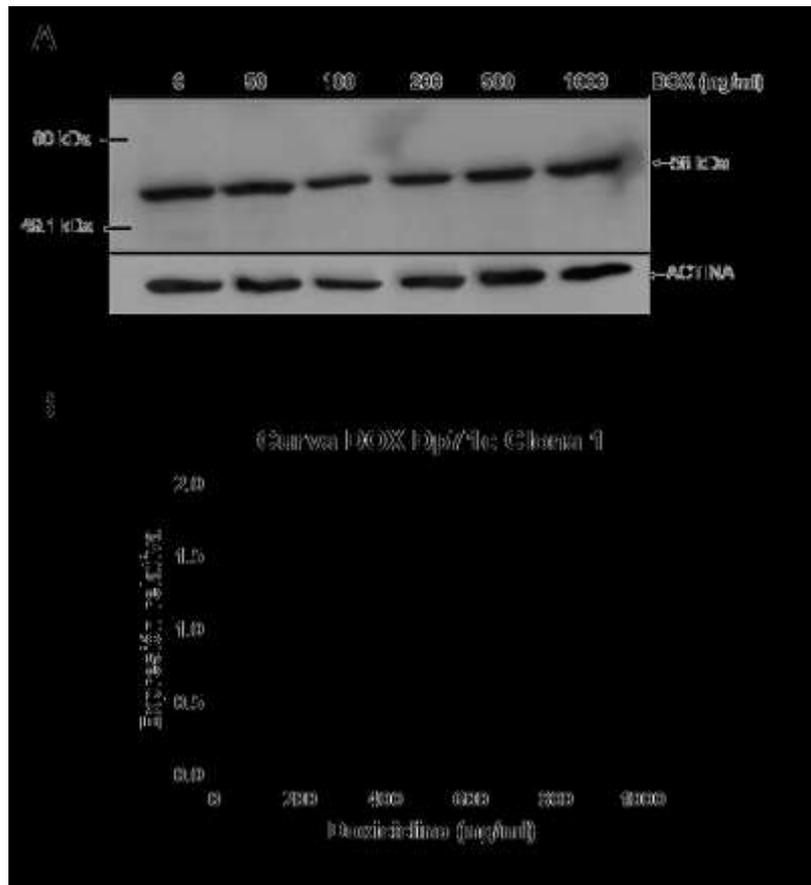
Debido a los resultados observados y con el fin de utilizar la dosis óptima de DOX a la cual se produzca la mayor cantidad de proteína recombinante en todas las clonas, se realizó una curva de inducción usando las siguientes dosis de DOX: 0, 50, 100, 200, 500 y 1000 ng/ml y se determinó la expresión relativa de las proteínas correspondientes normalizada con la expresión de actina.



**Figura 11.** Inducción de la expresión de Myc-Dp71a en la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4. **A)** Detección de la proteína recombinante Myc/Dp71a por Western Blot, utilizando el anticuerpo anti-Myc. Se observan bandas con un peso molecular correspondiente de 71 kDa. Control de carga:  $\beta$ -actina. **B)** Expresión relativa de la proteína Myc/Dp71a durante la inducción con 0, 50, 100, 200, 500 y 1000 ng/ml de DOX. No existe diferencia significativa en la expresión de proteína entre ninguna de las condiciones. La imagen representa dos experimentos independientes y la gráfica fue construida con el promedio  $\pm$  desviación estándar de dichos experimentos. Se indican los marcadores de peso molecular.

En la figura 11 se muestra la curva de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4, en donde se observa que no existen diferencias en la expresión de Myc/Dp71a con la inducción a las diferentes dosis de DOX. La clona PC12 Tet-On/Dp71c-1 (Figura 12) muestra un comportamiento similar, ya que a pesar de que se

observa un aumento de expresión de la proteína Myc/Dp71c a 200 ng/ml de DOX, éste no es estadísticamente significativo.

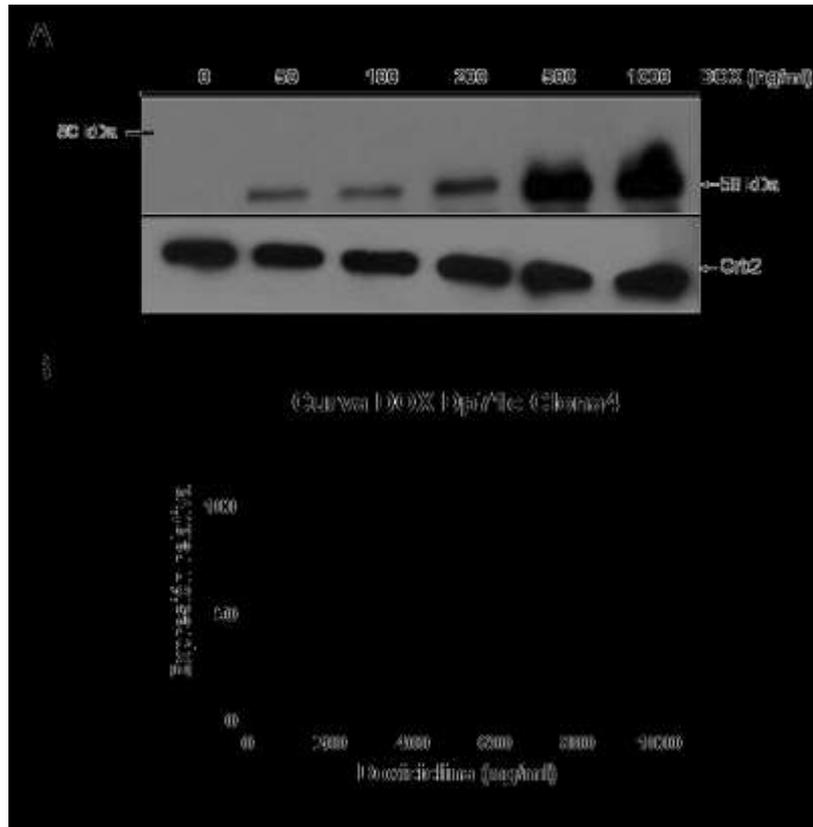


**Figura 12.** Curva de inducción con DOX de la clona PC12 Tet-On/Dp71c-1. **A)** Western Blot para la identificación de la proteína recombinante Myc/Dp71c utilizando anticuerpo anti-Myc. Se obtienen bandas al peso correspondiente de 58 kDa. Control de carga:  $\beta$ -actina. **B)** Expresión relativa de la proteína Myc/Dp71c en relación con las dosis administradas de DOX. No existe diferencia significativa en la expresión de proteína entre ninguna de las condiciones. Imagen representativa y gráfica construida con el promedio  $\pm$  desviación estándar de dos experimentos independientes.

Por el contrario, como se muestra en la figura 13, las células de la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 sí presentan aumento en la expresión de la proteína Dp71c en relación con la dosis administrada de DOX. La expresión máxima de la proteína se alcanza con la adición de 500 ng/ml de DOX, en donde se obtiene alrededor de 100 veces más que sin DOX y dos veces más que la dosis anterior de 200 ng/ml; asimismo, no existe diferencia estadísticamente significativa con el nivel de expresión obtenida con 1000 ng/ml.

En lo que respecta a la clona PC12 Tet-On/Dp71c-5 (Figura 14), la expresión de la proteína recombinante observada a las diferentes dosis no

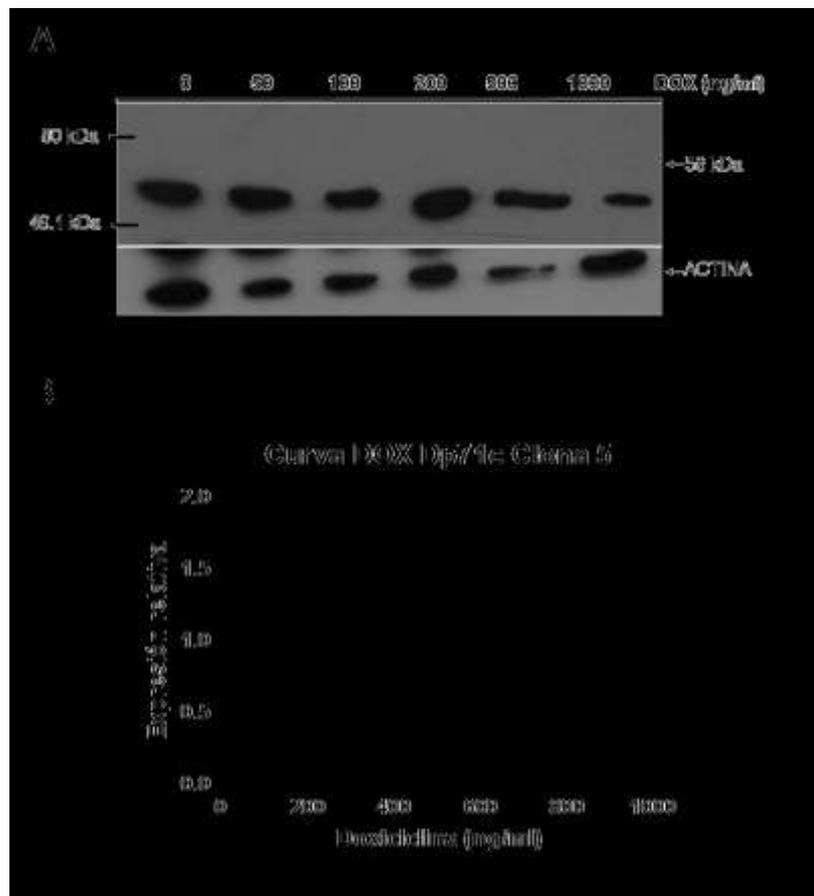
presenta diferencias, comportamiento similar a las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4 y Dp71c-1. Considerando estos resultados y debido a que la cantidad de DOX usada en todas las clonas debe de ser la misma para que los resultados puedan ser comparados, se determinó utilizar 500 ng/ml de DOX como dosis de inducción de todas las clonas analizadas para los posteriores experimentos.



**Figura 13.** Curva de inducción con DOX de la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4. **A)** Western Blot para la identificación de la proteína recombinante Myc/Dp71c utilizando anticuerpo anti-Myc. Se observan bandas al peso correspondiente de 58 kDa. Control de carga: Grb2. **B)** Expresión relativa de la proteína Dp71c en relación con las dosis administradas de DOX. Se observa un claro aumento de la expresión de Myc/Dp71c conforme las dosis de DOX aumentan. La máxima expresión se obtiene con 500 ng/ml de DOX y no se observa diferencia significativa al administrar una dosis de 1000 ng/ml. La imagen es representativa y la gráfica fue construida con el promedio  $\pm$  desviación estándar de dos experimentos independientes.

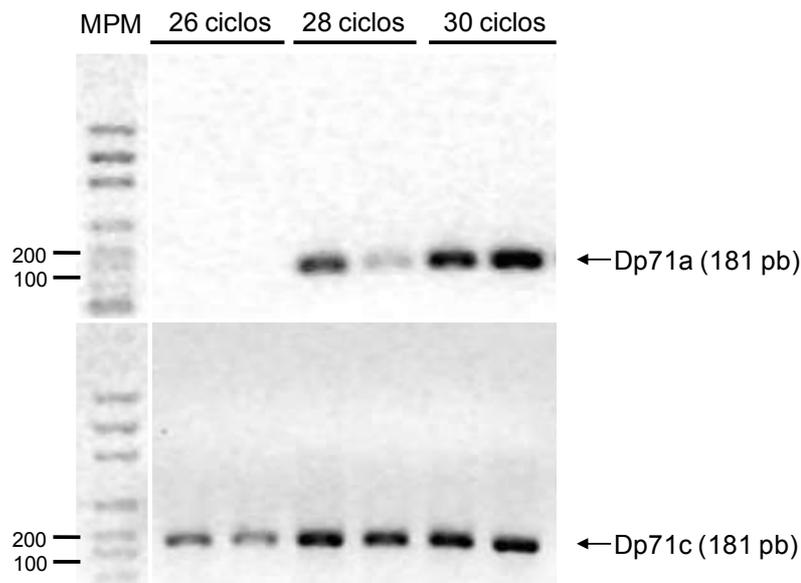
Se obtuvo además la viabilidad celular de todas las clonas con las diferentes dosis de DOX a 24 horas de exposición. Los resultados mostraron que ésta oscila entre 95.6 a 97.9% para PC12 Tet-On/Dp71a-4, 93.8 a 96.8%, 96.5 a 99.0% y 97.5 a 99.2% para las clonas 1, 4 y 5 de PC12 Tet-On/Dp71c

respectivamente. En ningún caso se presentaron diferencias significativas en la viabilidad entre ninguna de las dosis.

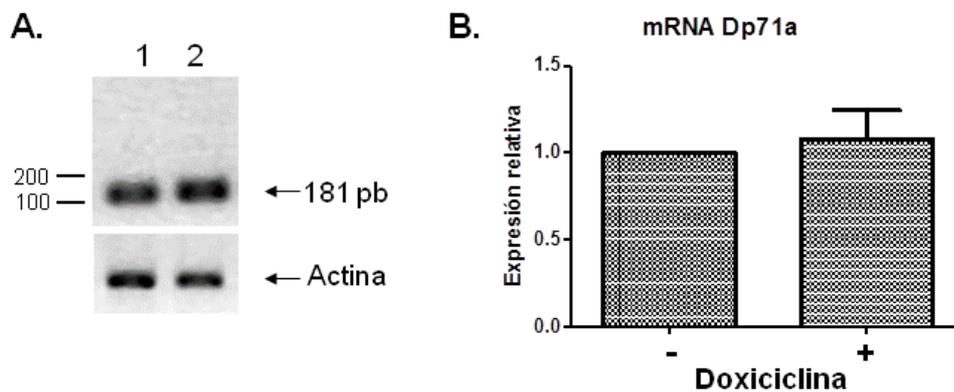


**Figura 14.** Curva de inducción con DOX de la clona PC12/Dp71c-5. **A)** Western Blot para la identificación de la proteína recombinante Myc/Dp71c utilizando anticuerpo anti-Myc. Control de carga:  $\beta$ -actina. Imagen representativa y gráfica construida con el promedio  $\pm$  desviación estándar de dos experimentos independientes. **B)** Expresión relativa de la proteína Myc/Dp71c de acuerdo a las dosis administradas de DOX. No existe diferencia significativa en la expresión de la proteína recombinante entre todas las dosis de DOX administradas.

Por medio de un ensayo de RT-PCR semicuantitativo se analizó la presencia de mRNA en cada una de las clonas anteriormente mencionadas, usando los iniciadores Ex77F y pTRE2 3'. Como primer paso se realizó una curva de amplificación para determinar los ciclos de PCR a los cuales no se presentara saturación en ninguna de las reacciones. Para actina se eligieron 24 ciclos, mientras que para la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 se determinaron 28 ciclos y para las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5, 26 ciclos (Figura 15).

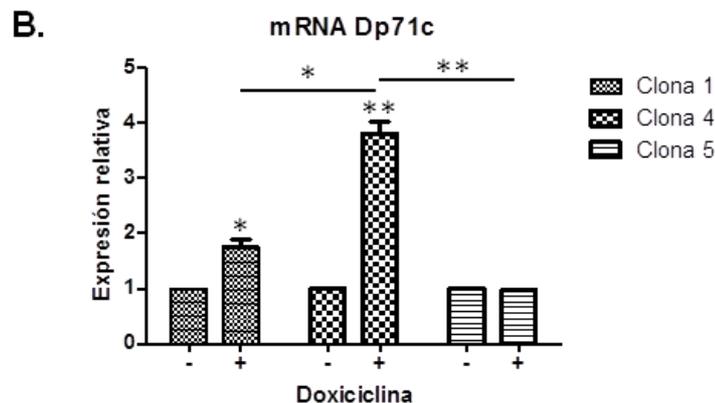
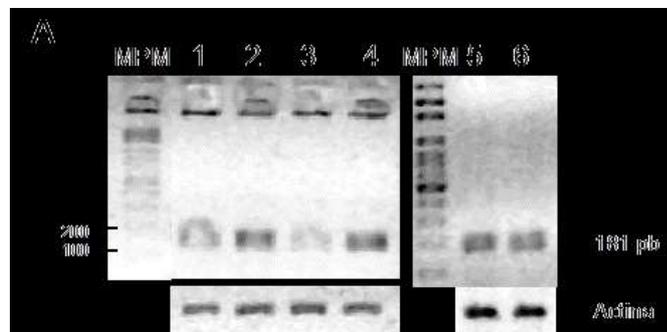


**Figura 15.** Curva de amplificación de las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5. Se indican los fragmentos de Dp71 amplificados a 26, 28 y 30 ciclos. Los fragmentos tienen un tamaño de 181 pb. MPM: Marcador de peso molecular. Se muestra una imagen representativa de dos experimentos independientes de las clonas Dp71a-4 y Dp71c-4.



**Figura 16.** Niveles de mRNA de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 **A)** Fragmentos esperados de 181 pb del mRNA de Dp71a, así como el fragmento del gen de actina. En el carril 1 y 2 se muestra el amplificado de Dp71a sin y con DOX, respectivamente. **B)** Expresión relativa del mRNA de Dp71a, normalizada con actina. No existe diferencia significativa entre ninguna de las condiciones. La imagen es representativa y la gráfica representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de dos experimentos independientes.

En la figura 16 se observa que la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 no muestra diferencias significativas de la expresión del mensajero sin o con inducción con DOX. Por otro lado, tanto la clona PC12 Tet-On/Dp71c-1 como la Dp71c-4 si presentan diferencias significativas en la expresión del mensajero (Figura 17), siendo más evidente en la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4, lo cual concuerda con la expresión proteica. La clona PC12 Tet-On/Dp71c-5 no presenta diferencia en la expresión del mensajero entre las dos condiciones. La comparación de la expresión del mensajero entre todas las clonas PC12 Tet-On/Dp71c en la condición de inducción con DOX revela que la expresión más alta del mensajero, se obtiene en la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4.

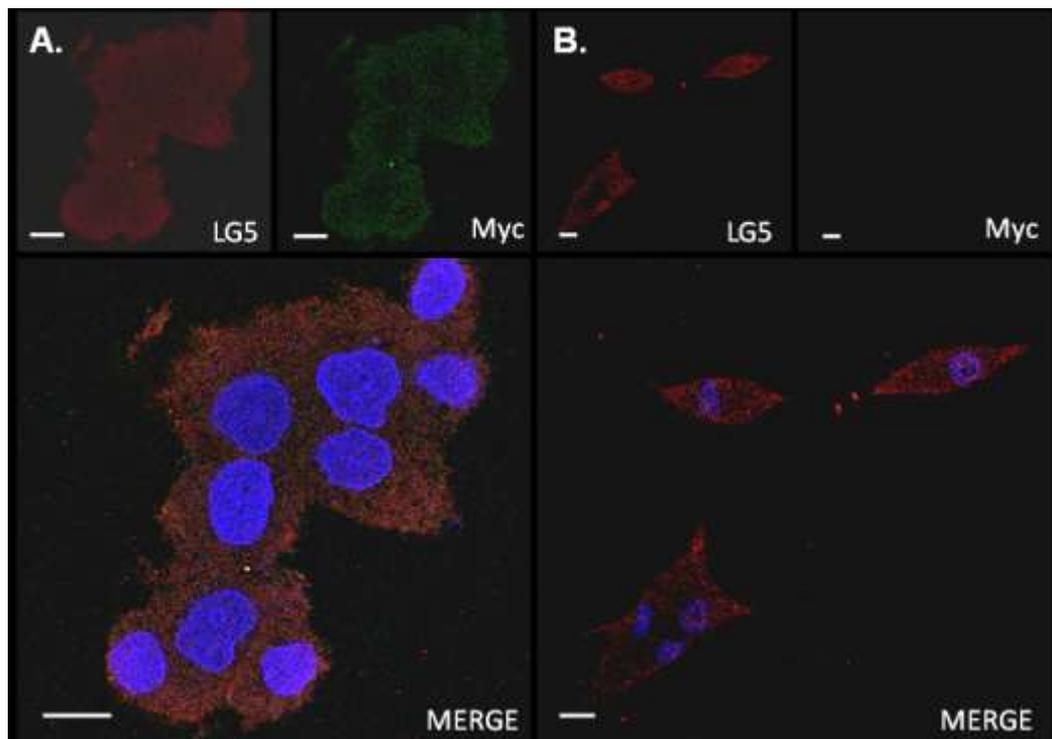


**Figura 17.** Niveles de mRNA de las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5. **A)** Fragmentos esperados de 181 pb del mRNA de Dp71c así como el fragmento del gen de actina. Los carriles 1, 3 y 5 muestran el amplificado de Dp71c sin DOX, mientras que los carriles 2, 4 y 6 corresponden a los fragmentos amplificados con DOX. **B)** Expresión relativa del mRNA de Dp71c normalizada con actina. Las clonas Dp71c-1 y Dp71c-4 presentan diferencias significativas las condiciones sin y con DOX. Esta diferencia es mayor en la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4. La clona PC12 Tet-On/Dp71c-5 no presenta diferencia significativa entre ambas condiciones. Existe diferencia significativa entre las tres clonas en la condición de inducción con DOX. La

mayor expresión se obtiene con la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 inducida con DOX. La imagen es representativa y la gráfica representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de dos experimentos independientes. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ .

## 6.2 INMUNODETECCIÓN DE MYC Y $\beta$ -DISTROGLICANO EN LA CLONA CONTROL.

Ya que la clona control contiene al plásmido pTRE2pur-Myc, el cual a pesar de no contener ninguna construcción de la distrofina Dp71 sí expresa la proteína de bajo peso molecular Myc (aproximadamente 1,202 Da), las células de dicha clona fueron procesadas de la misma manera que las células de todas las clonas anteriormente mencionadas, por medio de inmunofluorescencia indirecta, y se obtuvieron imágenes para determinar la localización tanto de la proteína Myc, como de  $\beta$ -distroglicano utilizando anticuerpos específicos contra estas proteínas (Tabla 1). La marca de Myc se observó en verde,  $\beta$ -distroglicano en rojo y los núcleos se tiñeron con DAPI en azul.



**Figura 18.** Localización del péptido Myc y  $\beta$ -distroglicano en células de la clona control no diferenciadas y diferenciadas a 9 días con NGF en presencia de DOX. Las células PC12 Tet-On crecidas en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina fueron fijadas y marcadas para la inmunodetección de Myc y  $\beta$ -distroglicano. Imágenes de una sola sección ecuatorial Z. **A)** Localización de Myc en células PC12 Tet-On/Myc no diferenciadas. **B)** Localización de Myc en células PC12 Tet-On/Myc diferenciadas a 9

días con NGF. En los primeros paneles se observa la localización de  $\beta$ -dístroglicano (rojo), en los segundos de Myc/ (verde) y en el tercero el "Merge" de ambas marcas con tinción de DAPI (azul) para el núcleo. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes. La barra blanca representa la escala de 10  $\mu$ m

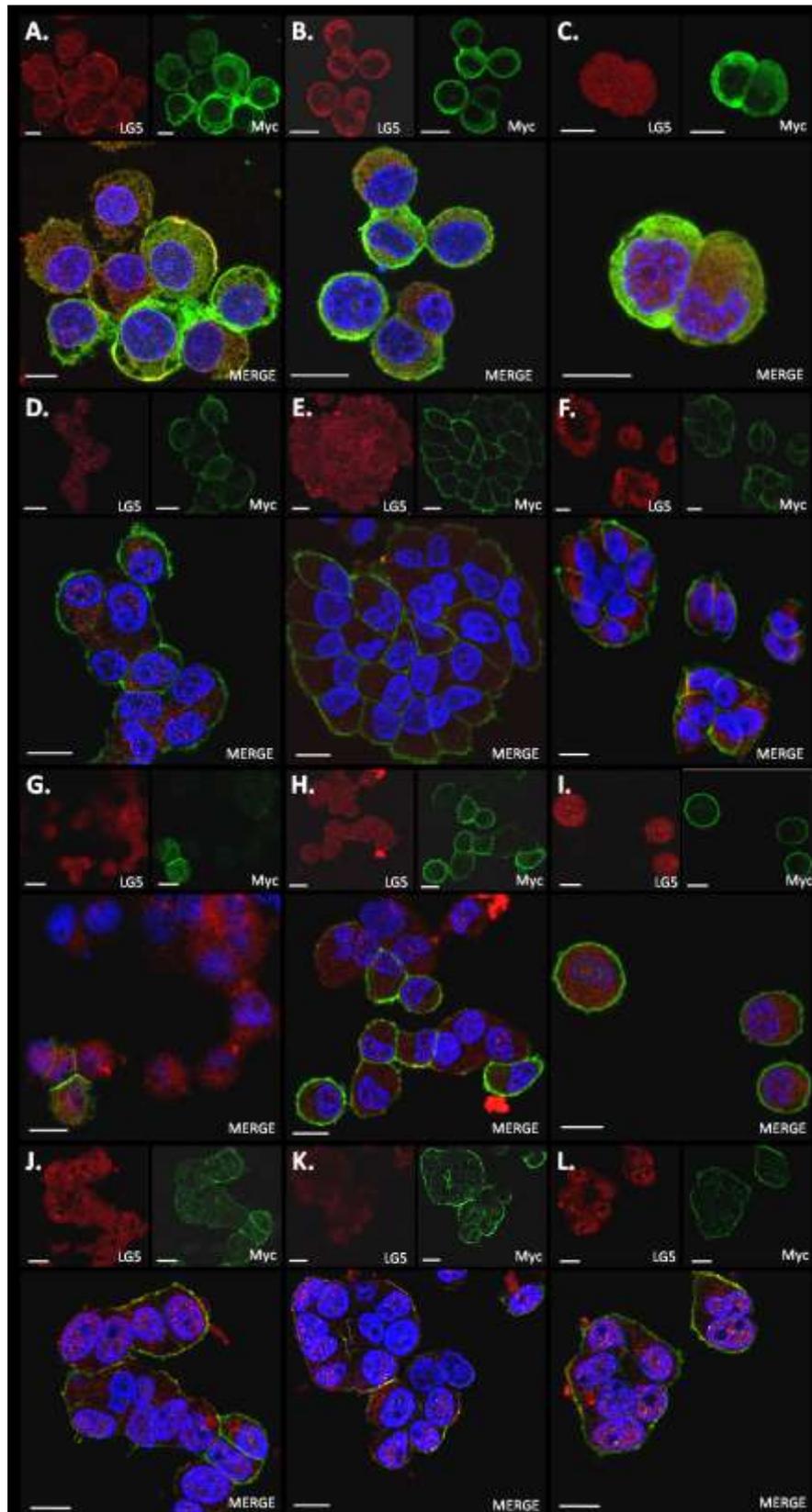
Se utilizó la dosis de 500 ng/ml de DOX tanto en células no diferenciadas como en diferenciadas. En células no diferenciadas la marca del anticuerpo anti-Myc (verde) se encuentra distribuída en toda la célula con una intensidad muy baja y  $\beta$ -dístroglicano (rojo) se encuentra de manera uniforme en periferia, citoplasma y núcleo (Figura 18A). En células diferenciadas durante 9 días con NGF la marca de Myc está ausente en la mayoría de las células, mientras que  $\beta$ -dístroglicano se distribuye igual que en células no diferenciadas y también en las neuritas (Figura 18B).

### **6.3 LOCALIZACIÓN CELULAR DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Myc/Dp71a y Myc/Dp71c**

Una vez comprobado que las clonas seleccionadas (PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5) tienen la capacidad de expresar a las proteínas recombinantes Myc/Dp71a y Myc/Dp71c, se procedió a determinar su localización y colocalización con  $\beta$ -dístroglicano como lo indicado para la clona control. La marca de las proteínas recombinantes Myc/Dp71a y Myc/Dp71c se muestra en verde,  $\beta$ -dístroglicano en rojo y los núcleos se tiñeron con DAPI en azul.

En cada clona sin diferenciar se utilizaron tres concentraciones de DOX (0, 500 y 1000 ng/ml), para determinar si la dosis del antibiótico producía cambios en la concentración y/o la localización de la proteína recombinante. En la figura 20 se muestran imágenes de la localización de las proteínas recombinantes de todas las clonas estudiadas en células PC12 Tet-On no diferenciadas.

En las células de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 no diferenciadas, Myc/Dp71a se encuentra distribuida de manera uniforme en citoplasma y periferia, en donde colocaliza con  $\beta$ -dístroglicano (Figura 19 A-C). La colocalización se observa en mayor medida en células con una menor concentración de Myc/Dp71a y en la periferia celular.



**Figura 19.** Localización de las proteínas recombinantes Myc/Dp71a y Myc/Dp71c en células PC12 Tet-On no diferenciadas. Las células PC12 Tet-On de todas las clonas (PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5), crecidas en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina, fueron fijadas y marcadas para la inmunodetección de

Myc/Dp71a, Myc/Dp71c y  $\beta$ -dístroglicano con los anticuerpos anti Myc y LG5 respectivamente. En los primeros pánenes se observa la localización de  $\beta$ -dístroglicano (rojo), en los segundos la localización de de Myc/Dp71a o Myc/Dp71c (verde) y en los terceros el "Merge" de ambas marcas con tinción de DAPI (azul) para el núcleo. (A-L) Imágenes de una sola sección ecuatorial Z. Las dosis utilizadas de DOX fueron 0 (A,D,G,J), 500 (B,E,H,K) y 1000 (C,F,I,L) ng/ml. **A-C**) Localización de Myc/Dp71a en las células de la clona PC12/Tet-On/Dp71a-4. **D-L**) Localización de Myc/Dp71c en las células de la clona PC12 Tet-On/Dp71c-1 (D-F), Dp71c-4 (G-I) y Dp71c-5 (J-L). Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes. La barra blanca representa la escala de 10  $\mu$ m.

Se observa una mayor fluorescencia en las interacciones entre células, lo cual sugiere una concentración más alta de la proteína en estos sitios (Figura 19 A,B). La localización de Myc/Dp71a en el núcleo es escasa en la mayoría de las células y moderada en otras. No se observan cambios en la concentración o localización de la proteína a las diferentes dosis.

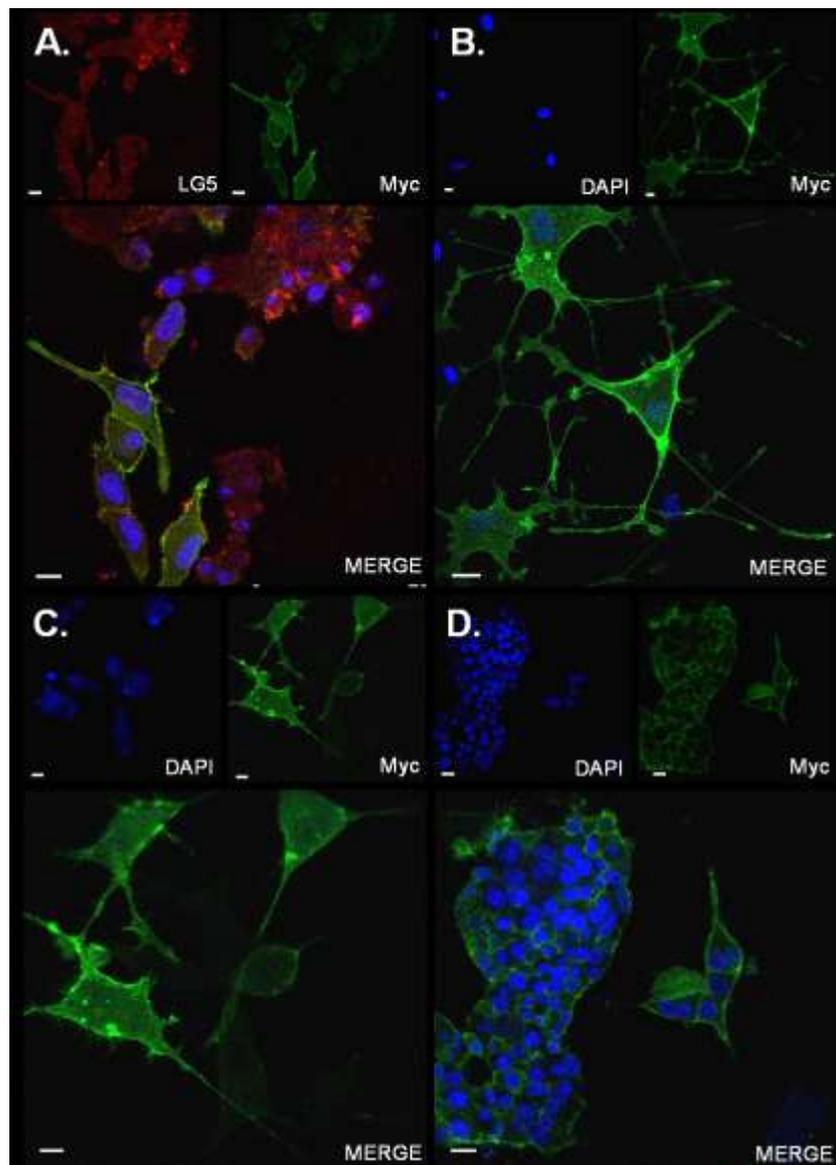
La distribución de la proteína Myc/Dp71c en las células no diferenciadas de las tres clonas seleccionadas es semejante: mayormente en la periferia en todas las dosis utilizadas (Figura 19 D-L). La baja expresión de la proteína Myc/Dp71c es evidente en la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 que no fue inducida con DOX, en donde incluso la mayoría de las células no expresan la proteína (Figura 19G).

Hay pocas células en las que la proteína Myc/Dp71c se encuentra en el citoplasma y solo en el caso de la clona PC12 Tet-On/Dp71c-5 se observa colocalización con  $\beta$ -dístroglicano en la periferia de algunas células tanto a 500 como a 1000 ng/ml de DOX (Figura 19 K,L). En la clona PC12 Tet-On/Dp71c-5, se observa la particularidad de que forma cúmulos de células en un alto porcentaje en donde la concentración de la proteína es mayor en la periferia del cúmulo y no en la membrana de las células de manera individual, como sería de esperarse (Figura 19 J-L).

Una vez que se determinó que no había diferencias en la localización de la proteína recombinante a la dosis de 500 ng/ml del inductor en comparación con 1000 ng/ml (recomendada por el fabricante), se procedió a analizar la localización en células diferenciadas con NGF usando solamente 500 ng/ml.

En células de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 (diferenciadas durante 9 días con NGF,) la localización de la proteína en citoplasma y periferia es similar

a lo encontrado en células no diferenciadas (Figura 20A). Myc/Dp71a se encuentra a lo largo de las neuritas en las pocas células cuya morfología indica diferenciación. Estas neuritas son gruesas y largas. La cantidad de fluorescencia en núcleo de las células diferenciadas aumenta con respecto a las células no diferenciadas, sin embargo en la mayoría de las células no logra igualar la cantidad observada en citoplasma y periferia. La colocalización con  $\beta$ -dístroglicano se mantiene tanto en el citoplasma como en la periferia, siendo más evidente en ésta última (Figura 20A).



**Figura 20.** Localización de las proteínas recombinantes Myc/Dp71a y Myc/Dp71c en células PC12 Tet-On diferenciadas a 9 días con NGF. Las células PC12 Tet-On de todas las clonas (PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4, Dp71c-5) crecidas en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina fueron fijadas y marcadas para la

inmunodetección de Myc/Dp71a y Myc/Dp71c. Solamente las células de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 fueron marcadas para la inmunodetección de  $\beta$ -dístroglicano. (A-D) Imágenes de una sola sección ecuatorial Z en donde se aprecian las neuritas. **A)** Localización de Myc/Dp71a en la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4. En el primer panel se observa la localización de  $\beta$ -dístroglicano (rojo), en el segundo de Myc/Dp71a (verde) y en el tercero el "Merge" de ambas marcas con tinción de DAPI (azul) para el núcleo. **B-D)** Localización de Myc/Dp71c en células de las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1 (B), Dp71c-4 (C) y Dp71c-5 (D). En los primeros paneles se observa el núcleo teñido con DAPI (azul), en los segundos la localización de Myc/Dp71c (verde) y en los terceros el "Merge" de ambas imágenes. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes. La barra blanca representa la escala de 10  $\mu$ m.

La localización de Myc/Dp71c cambia durante la diferenciación a 9 días en presencia de NGF, ya que a pesar de que la marca del anticuerpo está presente mayormente en la periferia celular, su distribución en el citoplasma y núcleo es más evidente en la mayoría de las células (Figura 20 B-D). Además se encuentra a lo largo de las neuritas, las cuales son más delgadas y ramificadas en las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1 y Dp71c-4, en comparación a las observadas en células PC12 Tet-On/Dp71a (Figura 20). En las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1 y Dp71c-4, existen cúmulos de proteína a lo largo de su membrana y en las neuritas, en donde parecen coincidir con varicosidades y conos de crecimiento axonal (Figura 20B,C).

La mayoría de las células de la clona PC12 Tet-On/Dp71c-5 no presentan una morfología de diferenciación. Las pocas células diferenciadas presentan neuritas largas y gruesas, comparables con las encontradas en la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4. La localización de la proteína Myc/Dp71c en esta clona coincide con la distribución observada en células diferenciadas. Además, el crecimiento en cúmulos continúa presente como en las células no diferenciadas (Figura 20D).

#### **6.4 CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN DE LAS CLONAS DE PC12 TET-ON/Dp71a y Dp71c.**

Se sabe que la expresión de familia de proteínas Dp71 es necesaria para el crecimiento de las células PC12 (Villarreal-Silva 2011), por esto se decidió realizar curvas de proliferación con el fin de conocer el efecto que tiene la sobreexpresión de las proteínas analizadas en este proceso y compararlas con

la clona control. Cada clona se analizó en ausencia y presencia de DOX en una dosis de 500 ng/ml. Se realizó un análisis morfométrico y se contó el número de células a los días 3, 6 y 9 después de iniciada la curva de crecimiento, como se menciona en la sección de métodos.

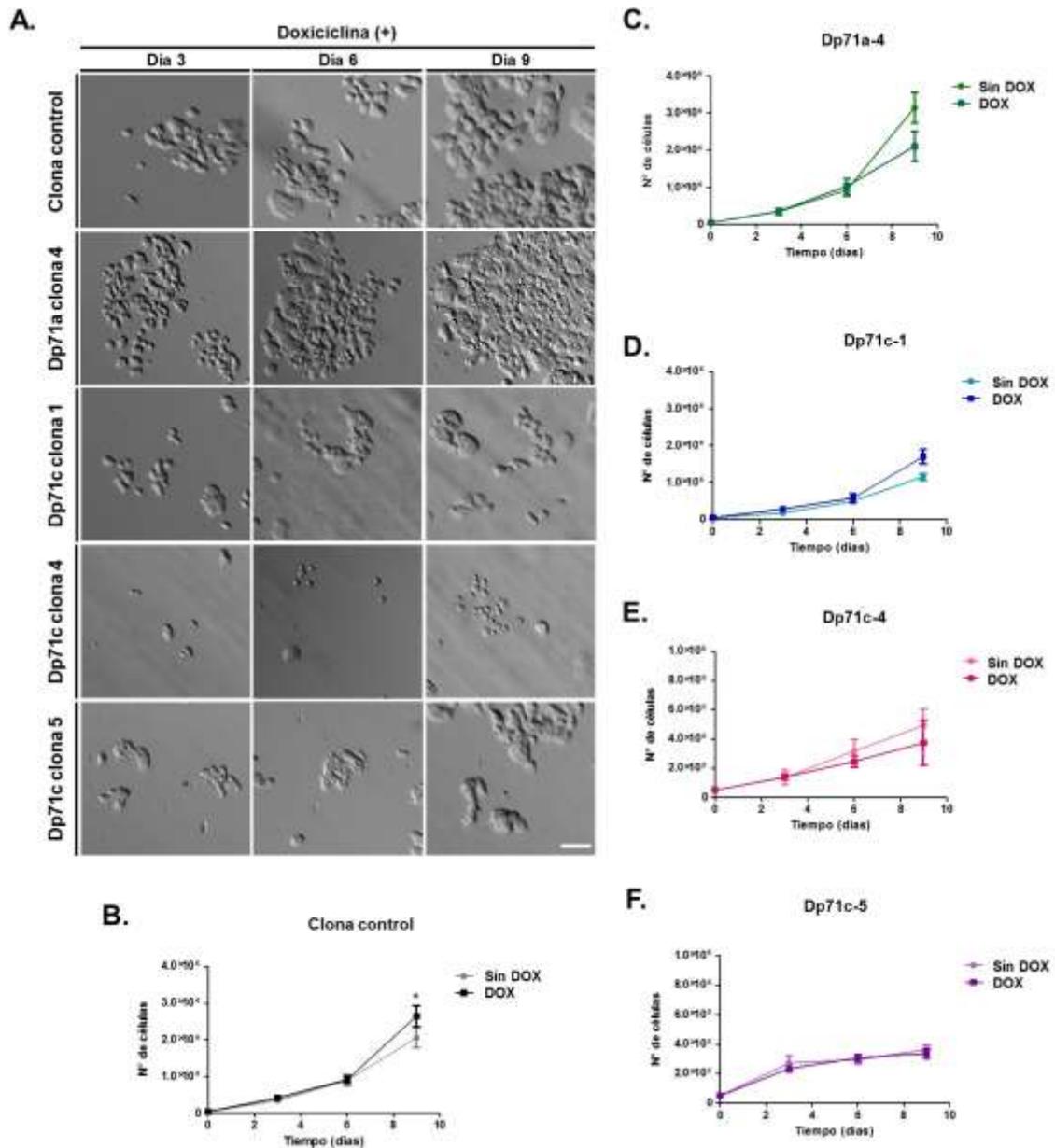
La figura 21 muestra las gráficas de proliferación así como imágenes representativas del crecimiento celular a los días mencionados. En todas las clonas de PC12 Tet-On las células crecen adheridas a la placa de cultivo y forman aglomerados. Esta característica se presenta en mayor medida al día 9 en la clona control, PC12 Tet-On/Dp71a-4 y Dp71c-5; sin embargo, en esta última los aglomerados se conforman de un menor número de células.

En lo que respecta a la proliferación, la adición de DOX actúa de manera similar en la clona control y en la clona PC12 Tet-On/Dp71c-1, ya que el número de células en ambas es mayor cuando se adiciona DOX en comparación con la condición sin DOX, y esta diferencia es significativa (Figura 21 A, D). A pesar de ello, la viabilidad de las dos condiciones oscila entre 96 y 98%. La clona PC12 Tet-On/Dp71c-1 crece significativamente más lento que la clona control.

Por otro lado, la proliferación de PC12 Tet-On/Dp71a-4 es mucho mayor que en las demás clonas, lo cual se ve reflejado en el número de células contadas al día 9. Sin embargo, esta clona se ve afectada por la adición de DOX, pues el número de células contadas es significativamente menor que sin DOX y la viabilidad celular al día 9 llega a un máximo de 93%, comparado con 97 - 99% obtenido sin DOX (Figura 21C). Las figuras 21 E y F muestran que el crecimiento celular de las dos clonas restantes (PC12 Tet-On/Dp71c-4 y Dp71c-5) no se modifica por la adición de DOX, puesto que el número de células es similar en ambas condiciones, así como su viabilidad (97-99%). El número de células contadas de ambas clonas al 9 día es mucho menor a las contadas en cualquiera de las demás clonas.

Se observan pequeñas diferencias en la morfología de las clonas y la adición de DOX no produce modificaciones (Figura 21A). La clona control crece aplanada, con un tamaño celular promedio que permanece constante a lo largo de los días monitoreados (3.8  $\mu\text{m}$ ). Existen pocos cúmulos de células en el día 3 y un número considerable están estiradas y presentan neuritas, lo cual no se observa en los días 6 y 9, en donde es claro que existe proliferación

ya que los cúmulos celulares son más abundantes, de mayor tamaño y se cuentan más células por campo (Figura 21A).



**Figura 21.** Ensayo de proliferación celular de las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4, Dp71c-5 y control. Se sembraron 50,000 células de cada clona en cajas de 6 pozos cultivadas con medio DMEM. El número de células se determinó por conteo directo de células viables con azul de tripano. **(A)** Imágenes representativas del crecimiento celular a los días 3, 6 y 9 en presencia de DOX. **(B, C, D, E, F)** Curvas de proliferación sin y con 500 ng/ml de DOX. Existe diferencia significativa entre ambas condiciones en las clonas control, PC12 Tet-On/Dp71c-4 y Dp71c-1. La barra blanca

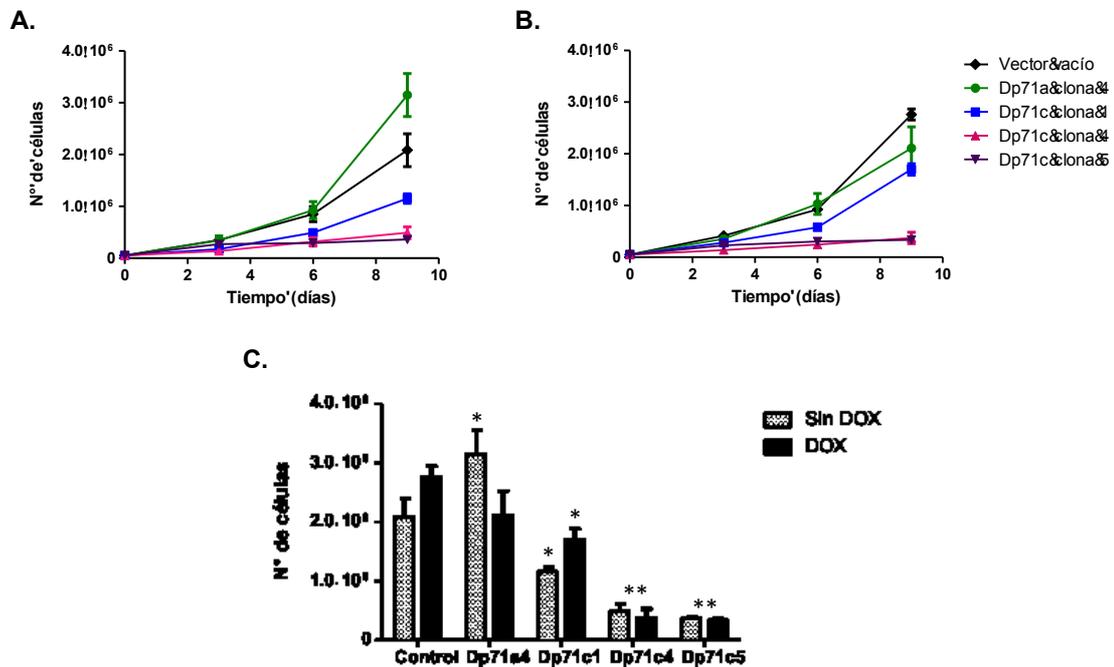
representa una escala de 15  $\mu\text{m}$ . Las gráficas representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ .

Desde el día 3, el número de células de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 es considerablemente mayor que las demás clonas (Figura 21C), se observan cúmulos de células con espacios entre sí, los cuales desaparecen conforme pasa el tiempo hasta llegar a cubrir casi toda la placa al día 9, por lo cual no es posible contarlas (Figura 21A). Su morfología es aplanada y el tamaño promedio aumenta con los días, de 3.7 a 4.3  $\mu\text{m}$ . Semejante a lo que se observa en la clona control, algunas células están estiradas y con neuritas de tamaño pequeño; sin embargo en esta clona a diferencia del control este tipo de células están presentes en los tres días monitoreados (Figura 21A).

Las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5 muestran ligeras diferencias entre sí: las células son más pequeñas en las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-4 y Dp71c-5 (3.4  $\mu\text{m}$  en promedio) y su tamaño se mantiene constante en el tiempo, mientras que las de la clona PC12 Tet-On/Dp71c-1 son más grandes y su tamaño va en aumento (de 3.8 a 4.5  $\mu\text{m}$ ), esto parece estar relacionado con su capacidad de proliferación, ya que las células pequeñas crecen de manera más lenta (Figura 21A). Tanto la clona PC12 Tet-On/Dp71c-1 como Dp71c-5 presentan una morfología ligeramente aplanada y forman más cúmulos, en contraste con la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 que crece en forma redonda (Figura 21A). Visiblemente hay un mayor número de células en la clona PC12 Tet-On/Dp71c-1 al día 9 que en sus pares, pero este número es mucho menor a lo observado tanto en la clona control como en la Dp71a-4 (Figura 21 B-D).

Con el fin de conocer las diferencias o similitudes en la proliferación de las clonas, se realizó una comparación separando las condiciones sin y con DOX (Figura 22) y se obtuvieron datos estadísticos al día 9, ya que en ese día las diferencias son más claras. En la condición sin DOX la proliferación de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 es significativamente mayor que la clona control, esto no sucede con DOX en donde el número de células es menor. En comparación con la clona control y con PC12 Tet-On/Dp71a-4, la tres clonas PC12 Tet-On/Dp71c proliferan de manera más lenta en ambas condiciones. Esta

característica se manifiesta de manera más clara en las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-4 y Dp71c-5.



**Figura 22.** Análisis de la proliferación celular de las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4, Dp71c-5 y control. Se sembraron 50,000 células de cada clona en cajas de 6 pozos y se cultivaron con medio DMEM. El número de células fue determinado por conteo directo de las células viables utilizando azul de tripano. **A)** Ensayo de proliferación en ausencia de DOX. **B)** Ensayo de proliferación en presencia de 500 ng/ml de DOX. **C)** Análisis comparativo al día 9 de proliferación sin y con DOX. Existe diferencia significativa entre las clonas control, PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-4 en la condición sin DOX. Solamente se presentan diferencias significativas con DOX entre la clona control con las clonas de Dp71c. Las gráficas representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ .

En base a los experimentos anteriores se decidió seleccionar una clona representativa para cada isoforma para determinar marcadores moleculares: PC12 Tet-On/Dp71a-4 y Dp71c-4. Ya que la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 requiere de la adición de DOX para inducir la expresión de la proteína correspondiente, los experimentos realizados con ambas clonas se realizaron con 500 ng/ml del antibiótico.

## 6.5 MARCADORES MOLECULARES DE PROLIFERACIÓN.

Una vez caracterizado el comportamiento del crecimiento celular en ambas clonas, se procedió a determinar si estas diferencias están relacionadas con el aumento o disminución de marcadores moleculares de proliferación como son PCNA y Ciclina B. El primero es un cofactor de las DNA polimerasas que se expresa durante la replicación del DNA (Moldoban 2007), mientras que el segundo corresponde a un marcador del ciclo celular, específico de la fase G<sub>2</sub>-M (Yan 1995). La expresión de ambas proteínas se ha visto modificada durante cambios en la proliferación de las células PC12 (Mark 1997).

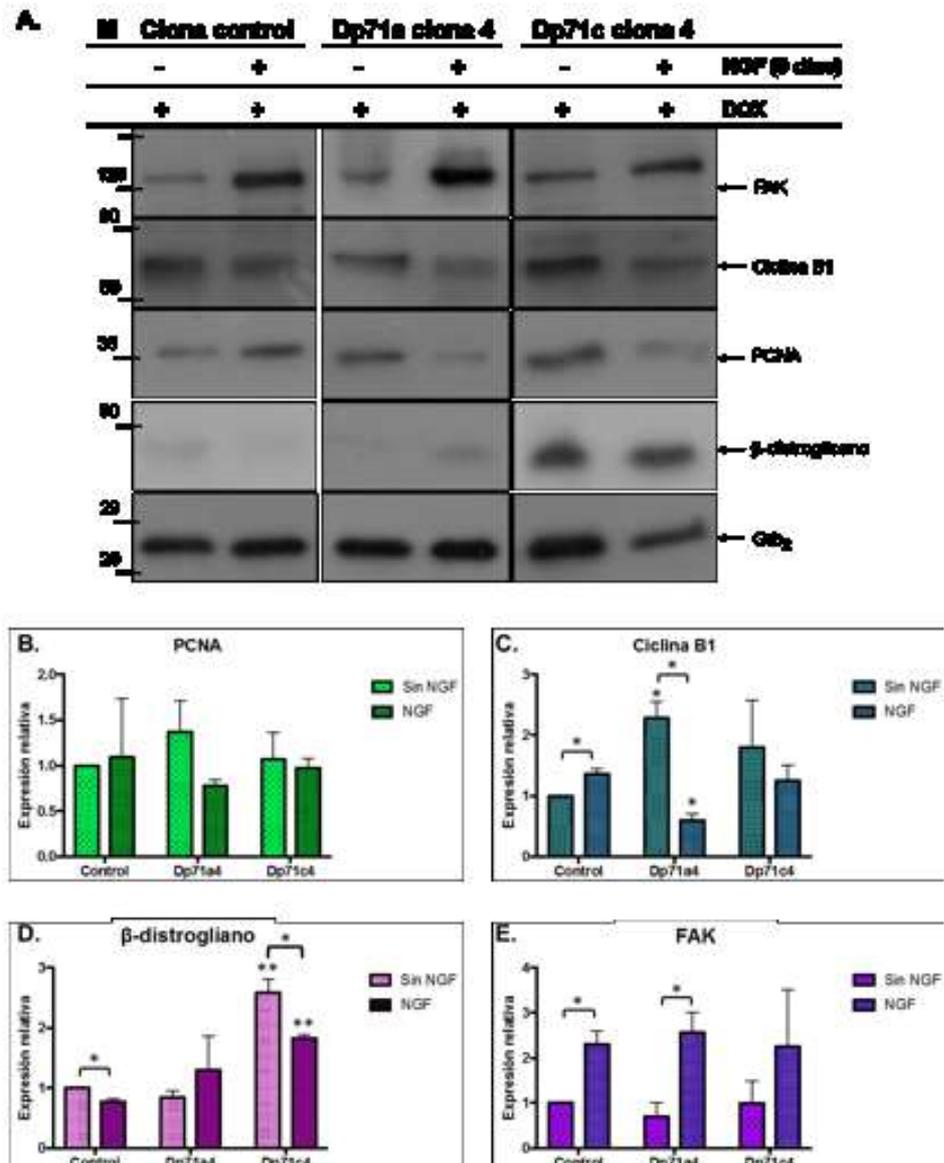
Adicionalmente se determinó la expresión de  $\beta$ -dístroglicano puesto que es conocido que está estrechamente relacionado con Dp71 formando los complejos tipo DAP y su expresión se modifica de acuerdo a la proliferación de las células PC12 (Villarreal-Silva 2010, Aragón 2011, Herrera-Salazar 2016). En un estudio previo se encontró que las células PC12 Tet-On/Dp71 $\Delta$ 78-79 cuya proliferación se encuentra acelerada debido a la expresión de una mutante de Dp71 expresan 3 veces más FAK, una tirosina cinasa importante para la adhesión y la progresión del ciclo celular (Herrera-Salazar 2016), por lo que también se decidió incluirla en el presente trabajo.

Todos los marcadores fueron analizados en células en 9 días de cultivo en presencia de 500 ng/ml de DOX y en ausencia o presencia de NGF. Como se muestra en la Figura 23A, FAK aumenta en todas las clonas en presencia de NGF y el aumento es más evidente en la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4. Este aumento fue corroborado en la cuantificación (Figura 23E).

La expresión de Ciclina B1 disminuye al contacto con NGF tanto en la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 como en la Dp71c-4 (Figura 23C). La clona que tiene una menor cantidad de esta proteína sin NGF es la control, sin embargo una vez adicionado el NGF, el decremento de su expresión más importante se observa en la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4.

PCNA se encuentra elevado en ausencia de NGF tanto en la clona de PC12 Tet-On/Dp71a-4 como en la Dp71c-4 en comparación con el control y su expresión disminuye durante la diferenciación lo cual es más evidente en la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4. Contrario a lo esperado, PCNA se ve aumentado en la clona control en presencia de NGF (Figura 23B).

De manera interesante, la expresión de  $\beta$ -dístroglicano es mayor en la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 en la condición sin NGF y disminuye una vez adicionándolo. Aún así, la expresión de esta proteína se mantiene elevada con respecto a las demás clonas. Tanto en el Western como en la cuantificación se observa que la menor cantidad de  $\beta$ -dístroglicano se obtiene en la clona control (Figura 23E).



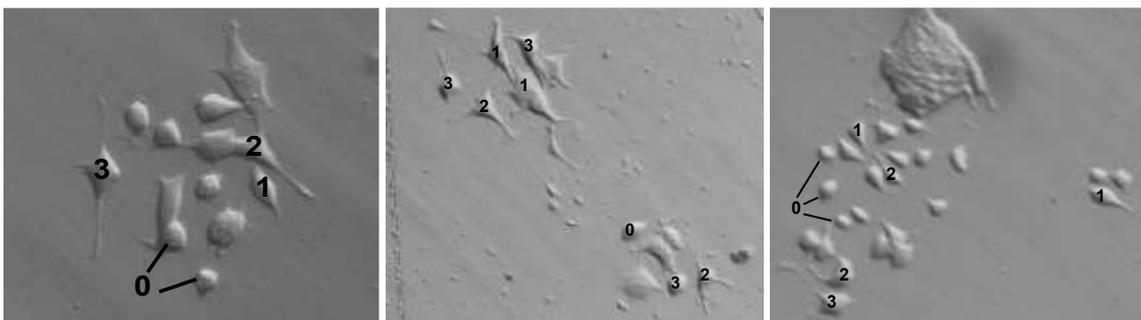
**Figura 23.** Análisis de la expresión de proteínas relacionadas con proliferación. **A)** Western Blot para el análisis de las proteínas FAK, Ciclina B, PCNA y  $\beta$ -dístroglicano. El marcador de peso molecular se muestra a la izquierda. **B)** Expresión relativa de PCNA **C)** Expresión relativa de Ciclina B. **D)** Expresión relativa de  $\beta$ -dístroglicano. **E)** Expresión relativa de FAK. La expresión relativa de todas las proteínas se obtuvo normalizando con Grb2. Imágenes representativas de dos experimentos. Las gráficas

representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 2 experimentos independientes. \* =  $P < 0.05$ , \*\* =  $P < 0.01$ .

## 6.6 CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CLONAS DE PC12 TET-ON/Dp71a y Dp71c.

Otro proceso para el cual la familia de las isoformas Dp71 ha demostrado ser esencial en las células PC12 es la diferenciación con NGF (Acosta 2004). Por este motivo, se evaluó la capacidad de diferenciación mediante el análisis de la formación de neuritas expresión de marcadores de diferenciación de las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4, Dp71c-5 y control. Cada clona se analizó en ausencia y presencia de DOX a una dosis de 500 ng/ml. Como se indica en la sección de métodos, se realizó para cada clona un análisis morfométrico que incluye porcentaje y rango de diferenciación y promedio de longitud neurítica a los días 0, 3, 6 y 9 días de tratamiento con NGF y se comparó con la clona control.

El rango de diferenciación se definió de acuerdo a lo descrito por Bai (Bai 1991) como: 0 = sin cambio en la morfología, 1 = extensión de una o más neuritas de menos de un cuerpo de largo, 2 = extensión de una o más neuritas entre uno y dos cuerpos celulares, 3 = al menos una neurita de más de dos cuerpos celulares de largo. En la figura 24 se muestran células representativas de cada rango.



**Figura 24.** Diferenciación de células PC12 Tet-On con NGF. Se sembraron aproximadamente 30,000 células en una caja de cultivo cubierta con colágena y se adicionó NGF (50 ng/ml) durante 9 días. Las células fueron fotografiadas usando un microscopio invertido y el programa AxioVision LE Rel 4.7. El rango de diferenciación fue determinado como se describe en la metodología. Los números indican el rango de diferenciación de cada célula.

El porcentaje de diferenciación se calculó en todos los días contando manualmente la totalidad de células de cada campo y obteniendo el porcentaje de células diferenciadas (considerando todas las células con neuritas como positivas) respecto al total de células observadas. El promedio de longitud de las neuritas se determinó midiendo el largo de cada neurita y se calculó el promedio de longitud de todas las neuritas, si una neurita tenía ramificaciones, sólo se contó la rama más larga.

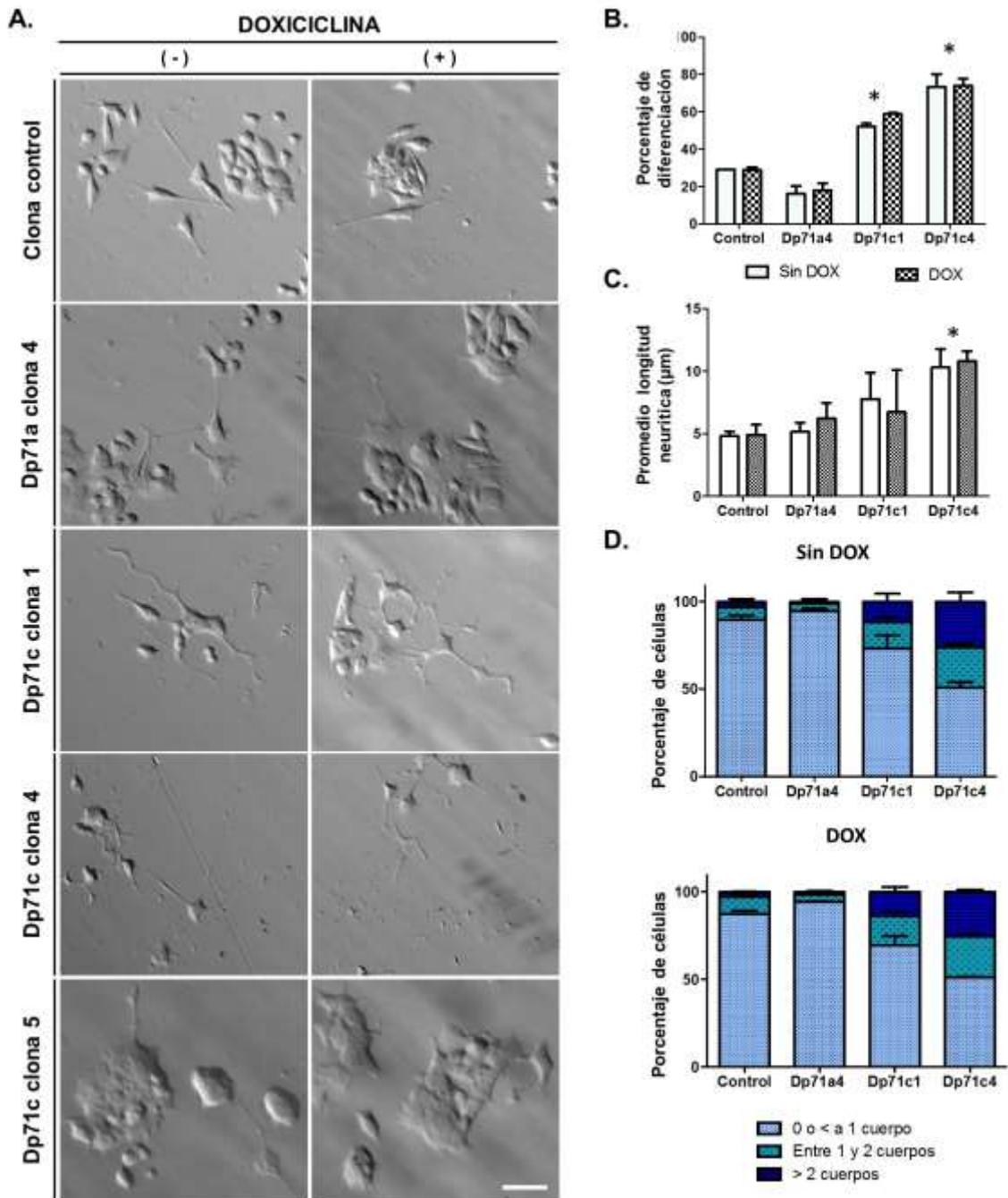
Todas las clonas poseen características morfológicas muy similares en el día 0: células en su mayoría redondas, sin proyecciones neuríticas. A partir del día 3 las diferencias son evidentes, por lo que se procedió a hacer el análisis anteriormente mencionado a partir de este día. En la figura 25 se muestran imágenes representativas de las células PC12 Tet-On a 3 días de diferenciación con NGF de cada clona en presencia o ausencia de DOX, así como las gráficas correspondientes de los parámetros analizados.

La morfología de las células diferenciadas (Figura 25A) varía, ya que las células que sobreexpresan la proteína Myc/Dp71c son en su mayoría de forma aplanada y estrellada, correspondiente a neuronas multipolares, mientras que tanto en la clona control como en la PC12 Tet-On/Dp71a-4 se observan células alargadas similares a las denominadas neuronas bipolares y muy pocas neuronas estrelladas. Debido a que las células de la clona PC12 Tet-On/Dp71c-5 crecen en cúmulos donde no se pueden distinguir de manera individual, no se pudo realizar el análisis al día 3. Sin embargo, si se observa que la mayoría de las células no tienen neuritas.

Un mayor porcentaje de células pertenecientes a las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1 y Dp71c-4 forman neuritas con respecto a la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 y la clona control (60-80% vs 20-30%, Figura 25B) y la diferencia de porcentajes es estadísticamente significativa. A pesar de que las células de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 se encuentran en su mayoría aplanadas y con un aspecto correspondiente a diferenciación temprana, alrededor del 80% no tiene crecimiento neurítico (Figura 25D).

Las neuritas de las clonas con sobreexpresión de Myc/Dp71c son más delgadas y largas (8-12  $\mu\text{m}$  vs 4-6  $\mu\text{m}$ , Figura 25C), sin embargo solamente se observan diferencias significativas al comparar la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 con el control. El 25% de las células de esta clona tienen neuritas mayores a

dos cuerpos celulares, comparado con el 15% en la clona PC12 Tet-On/Dp71c-1 y menos del 10% en las clonas restantes.



**Figura 25.** Diferenciación de las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4, Dp71c-5 y control durante 3 días con NGF. Las células se sembraron en cajas de cultivo p30 cubiertas con colágena **A)** Imágenes de las células diferenciadas durante 3 días con NGF. **B)** Porcentaje de células con neuritas. Las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1 y Dp71c-4 presentan diferencia significativa con el control, tanto sin como con DOX. **C)** Promedio de longitud neurítica. Se observa diferencia significativa en la clona PC12

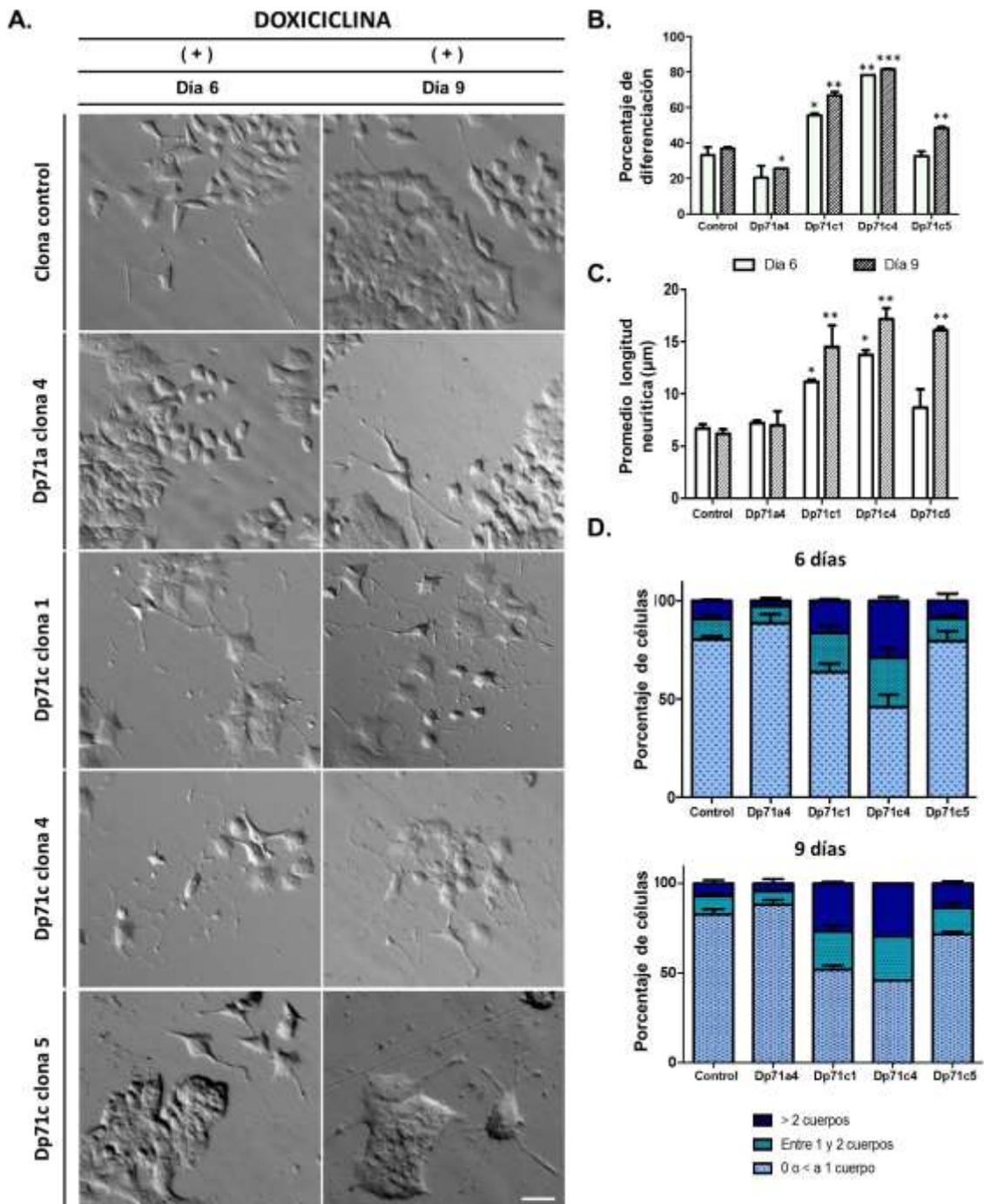
Tet-On/Dp71c-4 tanto sin como con DOX comparado contra el control. **D)** Rango de diferenciación. Este rango fue calculado según lo descrito en la sección de metodología. Al comparar cada clona en ausencia o presencia de DOX, no se observan diferencias significativas. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes. Las gráficas se construyeron con el promedio  $\pm$  desviación estándar de 2 experimentos independientes.  $*= P < 0.05$ . La barra blanca representa la escala de 15  $\mu\text{m}$

En ningún caso se modifica la morfología ni se observan diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados de las células PC12 Tet-On con la adición de la dosis de 500 ng/ml de DOX, por lo que se decidió hacer los análisis posteriores solamente en la condición de presencia de DOX.

En el día 6 la clona control no presenta diferencias en el promedio de diferenciación o de longitud neurítica con la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 (Figura 26 B,C), sin embargo un porcentaje ligeramente mayor de células de la clona control tiene neuritas de tamaño mayor a 1 cuerpo celular. En ambas clonas la morfología celular es predominantemente bipolar.

La morfología de las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5 se mantiene aplanada y multipolar y el porcentaje de diferenciación es significativamente mayor que la clona control. En la clona PC12 Tet-On/Dp71c-5, se observan neuritas que salen de los cúmulos de células indistinguibles los cuales siguen presentes en todo el cultivo, pero las pocas células aisladas presentan las mismas características de sus pares (Figura 26A). En las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1 y Dp71c-4 poco más de 40% y 60% de células tienen neuritas mayores a un cuerpo celular y 20% y 25% mayores a dos cuerpos, respectivamente (Figura 26D). A pesar las similitudes morfológicas, en la clona PC12 Tet-On/Dp71c-5 alrededor de un 75% de las células contadas no poseen neuritas o éstas son menores a un cuerpo celular, similar a lo encontrado en la clona control y la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 (Figura 26D).

Las diferencias entre la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 con las demás clonas se hace más evidente en el día 9 de diferenciación (Figura 26 A). La mayoría de sus células, a pesar de estar aplanadas, no presentan neuritas. De manera interesante, en las células que sí tienen neuritas, su longitud promedio es muy similar a lo observado en la clona control (Figura 26C).



**Figura 26.** Diferenciación de las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4, Dp71c-5 y control durante 6 y 9 días con NGF en presencia de 500 ng/ml de DOX. Las células se sembraron en cajas de cultivo p30 cubiertas con colágena **A)** Imágenes representativas de las células diferenciadas durante 6 y 9 días con NGF en presencia de DOX. **B)** Porcentaje de células con neuritas. Al día 6 sólo se observan diferencias significativas al comparar las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1 y Dp71c-4 con el control. Al día 9 todas las clonas presentan diferencias significativas con el control. **C)** Promedio de longitud neurítica al día 6 y 9 de diferenciación. Solamente se observan diferencias significativas entre las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5

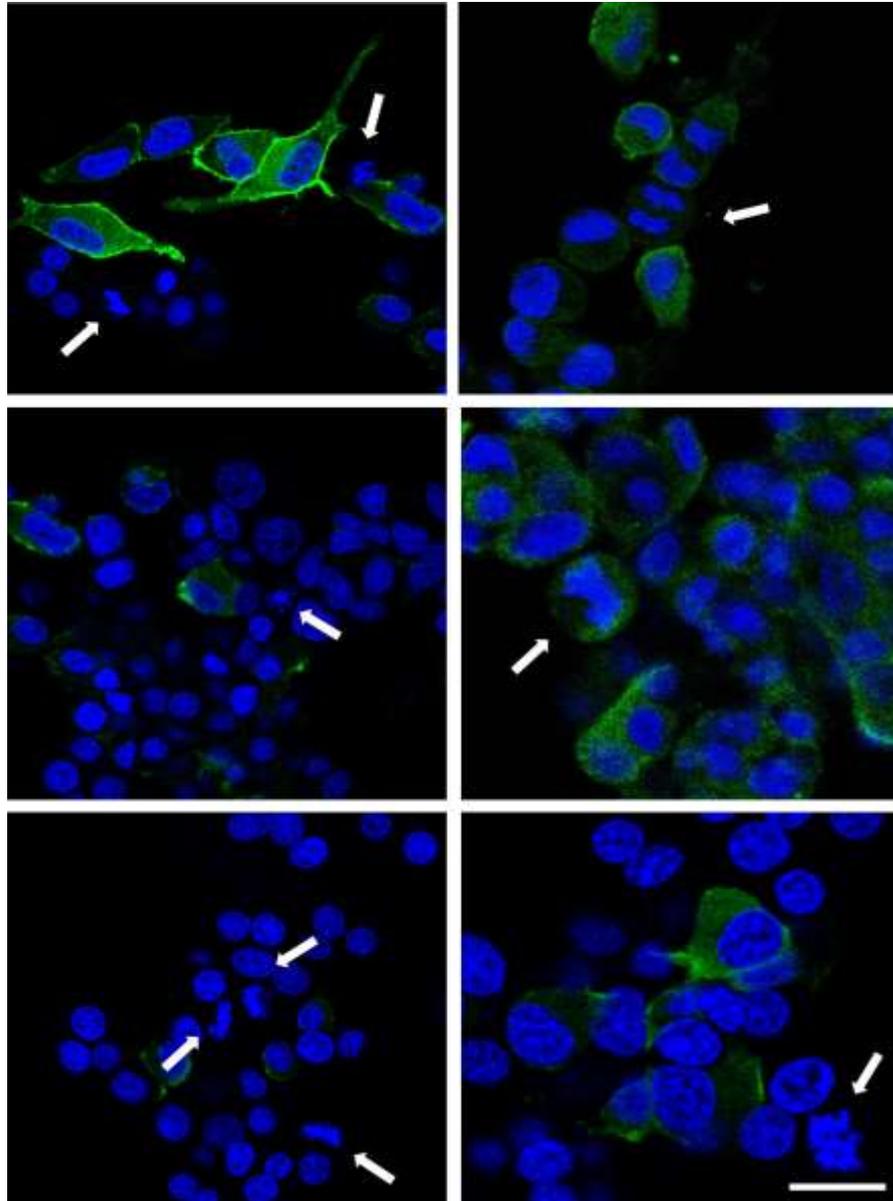
con el control **D**) Rango de diferenciación; fue calculado según lo descrito en la sección de metodología. Se observa que la clona PC12 Tet-On/Dp71c-1 aumenta la cantidad de neuritas mayores a 2 cuerpos celulares, las demás permanecen constantes al día 6 y 9. Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes. Las gráficas se construyeron con el promedio  $\pm$  desviación estándar de 2 experimentos independientes \* = $P < 0.05$ , \*\* = $P < 0.01$ . La barra blanca representa la escala de 15  $\mu\text{m}$

Una característica importante de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 es que a pesar de la adición de NGF, su proliferación parece continuar, ya que se observa una mayor cantidad de células por campo desde el día 6 (Figura 20A). Como se observa en la Figura 27, en los ensayos de inmunofluorescencia se aprecia un número importante de núcleos cuya morfología concuerda con células en metafase o anafase. En ninguna otra clona se observó este fenómeno, por lo que parece que solamente con la sobreexpresión de Myc/Dp71a muchas células continúan el ciclo celular.

Tanto el porcentaje como la longitud de las neuritas de la clona PC12 Tet-On/Dp71c-1 aumenta ligeramente en el día 9 y se mantiene la diferencia encontrada con la clona control (Figura 26 B, C). Los resultados obtenidos parecen indicar que la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 alcanza su máximo de diferenciación en el día 6, ya que el porcentaje de células con neuritas y el porcentaje encontrado de células con neuritas mayores a 1 o 2 cuerpos celulares es similar en el día 6 y el 9 (Figura 26 B,D). En contraste, el porcentaje de las células de la clona PC12 Tet-On/Dp71c-1 que presentan neuritas mayores a 1 cuerpo celular sí aumenta (40% al día 6 vs 55% al día 9), igualando a lo encontrado en la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 en el día 9 (Figura 26D).

El promedio de la longitud de las neuritas de la clona PC12 Tet-On/Dp71c-5 (Figura 26C) es comparable con las clonas que sobreexpresan la misma isoforma, sin embargo el porcentaje de diferenciación, aún cuando es mayor que la clona control, no alcanza las dimensiones observadas en sus pares y el porcentaje de células con neuritas menores a 1 cuerpo celular se mantiene (alrededor de 75%) (Figura 26B).

En concordancia con lo anterior, se decidió seleccionar a las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4 y Dp71c-4 para determinar los marcadores de diferenciación, utilizando 500 ng/ml de DOX para la inducción de ambas clonas.



**Figura 27.** Morfología nuclear de las células de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 diferenciadas con NGF durante 9 días. Las células PC12 Tet-On crecidas en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina fueron fijadas y marcadas para la inmunodetección de Myc (verde). Imágenes de una sola sección ecuatorial Z. Se utilizó DAPI para teñir los núcleos (azul). Las flechas blancas señalan núcleos celulares en metafase/anafase, lo que indica división celular. Imágenes representativas de varios campos de 2 experimentos independientes. La barra blanca representa la escala de 10  $\mu\text{m}$ .

## 6.7 MARCADORES MOLECULARES DE DIFERENCIACIÓN.

Al igual que en proliferación, marcadores moleculares de la diferenciación de células PC12 como lo son  $\beta_{III}$  tubulina y enolasa fueron analizados para determinar si su expresión es diferente en las clonas estudiadas.  $\beta$  tubulina es una de las principales subunidades de los microtúbulos, los cuales son importantes en la diferenciación neuronal: participan en la formación de neuritas, transporte intracelular y la integridad estructural (Aletta 1996) y  $\beta_{III}$  tubulina está restringida solamente a neuronas (Joshi 1989).

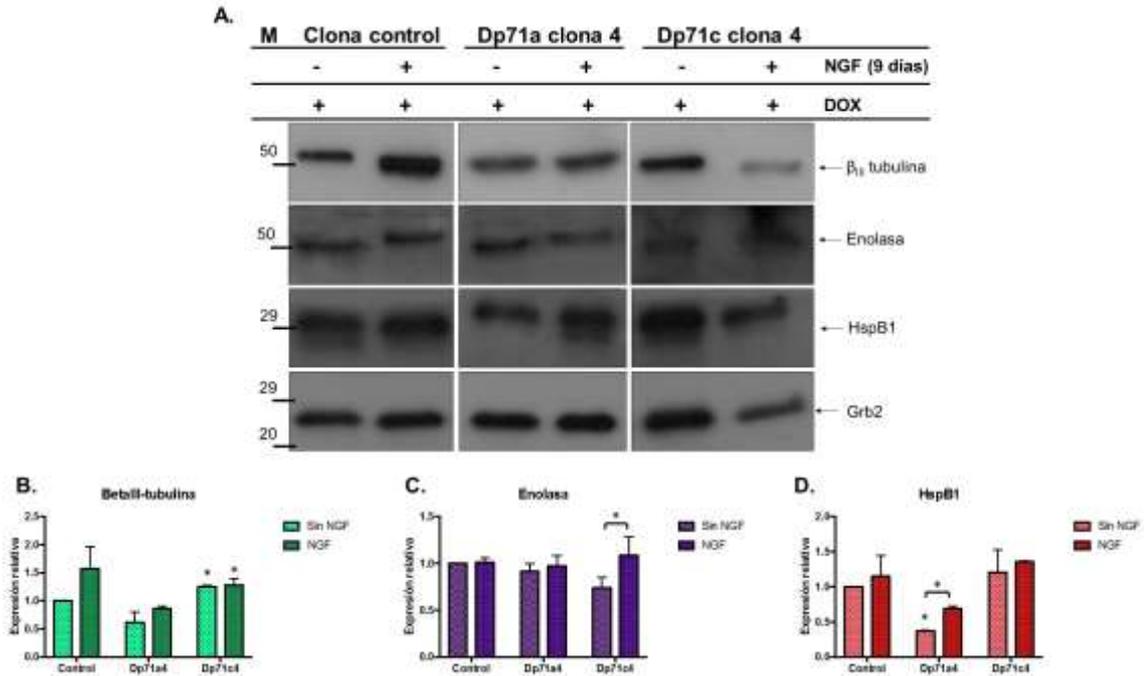
La enolasa específica de neuronas es un indicador de neuronas maduras y es ampliamente usado en células PC12 ya que su presencia en cantidades elevadas ha sido relacionada con diferenciación (Marangos 1980). Asimismo en un estudio donde las células PC12 que expresan la mutante de Dp71 $\Delta$ 7879 presentan un mayor porcentaje de diferenciación su expresión se encontró elevada a 6 días de diferenciación con NGF (Aragón 2011). En estas mismas células, un estudio reciente reveló que la expresión de la proteína de choque térmico HspB1 se encuentra aumentada y ayuda e incrementa la formación de neuritas (Merino-Jiménez 2016), por lo que resultó interesante también analizar su expresión.

Tanto en el Western Blot como en el análisis cuantitativo se muestra que los niveles basales de  $\beta_{III}$  tubulina no se modifican con la adición de NGF en las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4 y Dp71c-4 (Figura 28). Sin embargo, sin la adición de NGF se observa que esta proteína está expresada en menor medida en la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 con respecto al control y en mayor medida en la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4. Una vez adicionado el NGF, los niveles de  $\beta_{III}$  tubulina en la clona control alcanzan un nivel mayor que en las clonas restantes (Figura 28B).

A pesar de que la expresión de enolasa en la condición sin NGF es menor en la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 comparada con otras clonas, una vez adicionado el NGF se aumenta de manera significativa. Tanto en la clona control como la PC12 Tet-On/Dp71a-4 dicha expresión es constante sin o con NGF (Figura 28C).

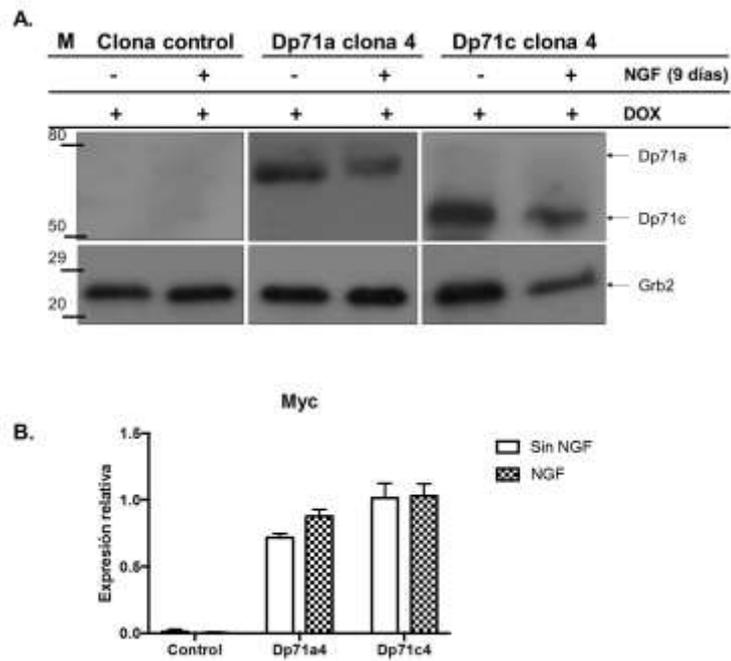
La expresión de la proteína HspB1 sigue un patrón similar a  $\beta_{III}$  tubulina, ya que también se encuentra elevado en la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 y

disminuido en la PC12 Tet-On/Dp71a-4, la cual es la única que se modifica de manera significativa al adicionar NGF. A pesar de ello, el nivel de expresión no se iguala a lo encontrado en las otras dos clonas incluso sin NGF (Figura 28D).



**Figura 28.** Análisis de la expresión de proteínas relacionadas con diferenciación. **A)** Western Blot para el análisis de las proteínas β<sub>III</sub> tubulina, HspB1 y Enolasa. El marcador de peso molecular se anota a la izquierda. **B)** Expresión relativa de β<sub>III</sub> tubulina. **C)** Expresión relativa de HspB1. **D)** Expresión relativa de Enolasa. Imágenes representativas de dos experimentos independientes. La expresión relativa de todas las proteínas se obtuvo corrigiendo contra Grb2. Las gráficas representan el promedio ± la desviación estándar de 2 experimentos independientes. \* =  $P < 0.05$ .

De manera adicional, se determinó el comportamiento de las clonas seleccionadas en condiciones de diferenciación para saber si existen cambios en la presencia de la proteína recombinante y si pasando los días de cultivo la expresión se modifica. En la figura 29 se aprecia que solamente Myc/Dp71a tiene un ligero aumento cuando se agrega NGF, sin embargo esta diferencia no es significativa. La proteína recombinante Myc/Dp71c se mantiene constante a lo largo de los días y con presencia de NGF, mientras que en la clona control, como se espera, no existe presencia de ninguna distrofina recombinante.



**Figura 29.** Expresión de las proteínas recombinantes Myc/Dp71a y Myc/Dp71c en las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4 y Dp71c-4. **A)** Western Blot en ausencia o presencia NGF y con DOX usando el anticuerpo anti-Myc, así como el control de carga de Grb2. **B)** Expresión relativa de las proteínas Myc/Dp71a y Myc/Dp71c corregida contra Grb2. No se observa expresión en la clona control. No existen diferencias significativas Imagen representativa y gráfica construida con el promedio  $\pm$  desviación estándar de dos experimentos independientes. \*:  $P < 0.05$ .

## 7. DISCUSIÓN

Las isoformas de Dp71 han sido estudiadas y asociadas con diversos procesos importantes para la línea celular PC12 como diferenciación (Cisneros 1996, Márquez 2003, Acosta 2004, Aragón 2011), proliferación (Villareal-Silva 2011, Herrera-Salazar 2016) y adhesión (Enríquez-Aragón 2004, Cerna 2006), en donde los efectos de los grupos de isoformas conocidos a la fecha son evidentemente diferentes. En ninguno de estos estudios se ha determinado si existen diferencias entre las isoformas que pertenecen al mismo grupo debido principalmente a la falta de anticuerpos específicos para cada una.

Con el propósito de conocer las diferencias de localización y función entre isoformas se planteó el presente proyecto en el que se analizó el efecto de la sobreexpresión de dos isoformas de Dp71 pertenecientes al grupo Dp71d (Tadayoni 2012), el cual tiene mayor expresión en el cerebro (González M, 2014), con ayuda de un sistema de expresión inducible con DOX y la adición de una bandera de c-Myc. El presente estudio nos permitió determinar que a pesar de que las isoformas Myc/Dp71a y Myc/Dp71c poseen el mismo CTD, las características que confiere su sobreexpresión a las células PC12 Tet-On son diferentes.

El primer paso para la realización de este trabajo fue crecer las clonas de PC12 Tet-On transfectadas de manera estable con los plásmidos pTRE2purMyc, pTRE2pur-Myc/Dp71a y pTRE2pur-Myc/Dp71c. En el caso de PC12 Tet-On/Dp71a solo se contó con la clona 4, mientras que de PC12 Tet-On/Dp71c se eligieron las clonas 1, 4 y 5. Todas estas clonas expresan las proteínas correspondientes tanto en ausencia como en presencia de DOX (Figura 10); sin embargo la expresión basal de la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 es mucho menor. Lo anterior puede deberse a que el sitio donde se insertó el plásmido en las clonas con expresión basal alta es más accesible a la unión de otros factores transcripción y por lo tanto requieren menores cantidades de DOX para expresar las proteínas recombinantes.

Se realizaron curvas de dosis-respuesta en donde solamente PC12 Tet-On/Dp71c-4 mostró inducción de la expresión conforme a lo esperado del sistema Tet-On (Figura 13). A la dosis de 500 ng/ml se obtuvo la mayor

cantidad de proteína y no se encontraron diferencias con la dosis recomendada por el fabricante de 1000 ng/ml. Tomando en cuenta que se ha demostrado que la DOX es tóxica desde 200 ng/ml (Ermak, 2003) y que en este estudio se requirió que todas las clonas se analizaran en las mismas condiciones, con el fin de que los resultados fueran comparables, se determinó utilizar 500 ng/ml para todas las clonas en los experimentos posteriores.

Aragón y colaboradores (2016) determinó en células PC12 Tet-On transfectadas de manera transitoria la localización de las proteínas recombinantes de las isoformas que se expresan de manera endógena en las células PC12. Ya que en este estudio se trabajó con células transfectadas de manera estable y que la dosis de DOX se disminuyó con respecto a lo que indica el fabricante, era importante determinar si la localización de las isoformas permanecía igual a lo descrito previamente. Como se muestra en la figura 19, se comprobó que de la misma forma que en las células transfectadas de manera estable, la proteína Myc/Dp71a localiza en la periferia celular y citoplasma y Myc/Dp71c principalmente en periferia en las células PC12 Tet-On no diferenciadas (Aragón 2016). En correspondencia a lo observado por Márquez y colaboradores (2003), Myc/Dp71a se encuentra expresada en niveles altos en las uniones célula-célula. Myc/Dp71c se encuentra también en el citoplasma de algunas células, esto puede ser resultado de la expresión de una cantidad elevada de proteína debido a la transfección estable, por lo que la membrana se satura y el resto se mantiene en el citoplasma, similar a lo observado en la clona B10 que sobreexpresa a la proteína mutante Dp71 $\Delta$ 78-79 (Herrera-Salazar 2016).

Lo que respecta a las células diferenciadas a 9 días con NGF, en la figura 20 se muestra que a pesar de que en general se mantiene la localización descrita por Aragón (2016), existen diferencias evidentes. Contrario a lo que se observa en otros estudios (González 2000, Márquez 2003, Aragón 2016), Myc/Dp71a no aumenta considerablemente en el núcleo de las células diferenciadas, ya que a pesar de que está presente en este organelo, no llega a igualar la cantidad en citoplasma, periferia y neuritas. Es importante resaltar que durante este análisis fue difícil encontrar células de PC12 Tet-On con morfología de diferenciación.

Por otra parte, Myc/Dp71c se observa en mayor medida en núcleo y citoplasma, así como en la periferia en células diferenciadas comparado a lo

observado por Aragón y colaboradores (2016), en donde se describe una localización casi exclusivamente periférica (Figura 19). Esto parece indicar que al haber una mayor cantidad de esta isoforma de lo habitual, ésta se localiza en el núcleo de la misma manera que Dp71a ya que ambas isoformas poseen regiones importantes en común: Los dominios EF1/EF2 (localizados en los exones 65 y 67, respectivamente), identificados como posibles moduladores de la localización periférica, citoplasmática o nuclear de Dp40 y, por lo tanto de Dp71 (Aragón, 2015); las serinas y treoninas en los exones 75 (S3538), 76 (S3616, S3624) y 79 (T3685) identificadas como posibles sitios de fosforilación y probables responsables de la localización nuclear de Dp71a (Calderilla-Barbosa 2006) y la región ZZ, la cual ha sido identificada como la región responsable de la localización nuclear de Dp71d (Suárez-Sánchez 2015); aunado a esto, ambas isoformas comparten la región CTD la cual es sugerida por varios estudios como la responsable de la función de cada isoforma (Aleman 2001, Aragón 2011); sin embargo, es necesario profundizar en este resultado. Myc/Dp71a y Myc/Dp71c colocalizan con  $\beta$ -dístroglicano de manera similar a lo observado por Aragón et al, 2011. Todos estos resultados dan la certeza de que se trabajó con clones que reflejan lo que sucede de manera general en las células PC12.

Se ha demostrado que Dp71 es una proteína esencial para el mantenimiento del SNC y los procesos en los que se ha visto involucrada específicamente (proliferación, diferenciación, adhesión) son de suma importancia para el correcto funcionamiento de este sistema (Navarro 2014). Durante la diferenciación de células PC12 ya está determinado que existen variaciones entre los grupos de isoformas de Dp71 (Márquez 2003, Acosta 2004, Aragón 2015, Aragón 2016), mientras que en la proliferación solamente se ha estudiado el efecto del silenciamiento de toda la familia (Villarreal-Silva 2011) y la sobreexpresión de la mutante Dp71 $\Delta$ <sub>78-79</sub> (Herrera-Salazar 2016). En ninguno de los dos procesos se conoce si alguna isoforma en particular es responsable de los fenómenos observados. Debido a ello, se decidió analizar el efecto de la sobreexpresión de dos de las isoformas pertenecientes al grupo Dp71d (Dp71a y Dp71c), del cual se tiene mayor información en la literatura y que se encuentra en niveles más altos en el cerebro.

La sobreexpresión de la proteína recombinante Myc/Dp71a confiere a las células PC12 Tet-On la capacidad de proliferar de manera más rápida en

comparación con el control en ausencia de DOX. La presencia de DOX parece ser tóxica solamente en esta clona, ya que la viabilidad celular disminuye hasta un 93%. Sin embargo, no está bien definido si este efecto es solamente por la adición del antibiótico o si la sobreexpresión de Myc/Dp71a está causando sensibilidad en las células PC12 Tet-On. Sin DOX el número de células de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 al noveno día de cultivo llega casi a los 3.5 millones cuando en la clona control se cuentan solamente 2.5 millones.

El efecto que confiere la sobreexpresión de Myc/Dp71c resulta contrario a lo observado con Myc/Dp71a ya que en las tres clonas seleccionadas de PC12 Tet-On/Dp71c la proliferación está disminuida: el conteo de la clona PC12 Tet-On/Dp71c-1 no el millón y medio de células mientras que las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-4 y Dp71c-5 solamente se cuentan alrededor de medio millón de células al día 9 de cultivo. La diferencia entre los efectos en las clonas no se debe a la cantidad de proteína, ya que a pesar de que las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1 y Dp71c-5 tienen la misma cantidad en ausencia y presencia del inductor, la proliferación de la clona PC12 Tet-On/Dp71c-5 es más lenta. Por otro lado, en ausencia de DOX la cantidad de proteína en la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 es significativamente menor, sin embargo los efectos en la proliferación son los mismos sin y con DOX.

Una posible explicación es el lugar en donde se encuentra el plásmido que contiene la secuencia de Dp71c, ya que posiblemente la clona PC12 Tet-On/Dp71c-1 presenta características diferentes que la hacen menos propensa al efecto de desaceleración del crecimiento. Por otro lado, es posible que no todas las células de la clona PC12 Tet-On/Dp71c-1 expresen de la misma manera a Myc/Dp71c, por lo que pueden existir algunas células con crecimiento normal.

En cuanto a morfología, las células de las clonas seleccionadas presentan diferencias relacionadas con el tamaño y la forma, lo cual parece indicar que la morfología se relaciona con la capacidad de proliferación ya que en la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 en donde las células son más aplanadas y grandes, la proliferación es más rápida (Figura 21A, C), mientras que en las células de las clonas de PC12 Tet-On/Dp71c que son más pequeñas y muy redondas, la proliferación está disminuida (Figura 21A, D-F).

Una vez que se adicionó el factor de crecimiento neuronal se observa que las células de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 no tienen la capacidad de formar neuritas (Figuras 25 y 26) e incluso parecen ser resistentes al NGF, pues sus núcleos se ven condensados al día 9 de diferenciación (Figura 27) lo cual coincide con células en metafase o anafase. En los ensayos de inmunofluorescencia se observa que Myc/Dp71a se localiza en núcleo a una baja concentración en comparación con lo observado en otros estudios (González 2000, Márquez 2003, Aragón 2016), lo que sugiere que esta es la razón de que las células no se diferencien.

Nuestro grupo de trabajo ha reportado que células PC12 con diferenciación incrementada tienen niveles más bajos de la proteína endógena Dp71a (Aragón 2011) y en aquellas resistentes a NGF, dicha proteína está elevada (Herrera-Salazar 2016, tesis de doctorado). Tomando en cuenta estos resultados y dado que en el presente estudio se demuestra que la sobreexpresión de Dp71a produce que las células PC12 Tet-On no se diferencien, se puede sugerir que los niveles de Dp71a regulan la proliferación celular y el crecimiento de neuritas.

Llama la atención que en un trabajo previo se observó que la transfección de un vector que expresa a Dp71a aumenta el crecimiento neurítico comparado con células transfectadas con un vector antisentido para las isoformas de Dp71 que perdió esta característica (Acosta 2004); sin embargo, los resultados no pueden compararse debido a que la secuencia usada por Acosta y colaboradores fue obtenida de tejido humano y con la que se trabajó en este estudio es de rata.

Tomando otro enfoque, la ausencia de diferenciación de las células PC12 Tet-On en nuestro estudio puede deberse a la cantidad de proteína, ya que es conocido que el sistema Tet-On permite la producción de una mayor cantidad con respecto a otros sistemas. Al igual que lo observado con la expresión de la isoforma mutante Dp71 $\Delta$ <sub>78-79</sub>, a niveles bajos de Dp71a se favorece la diferenciación (Aragón 2011) mientras que cuando se sobreexpresa se obtiene un efecto contrario (Herrera-Salazar 2016). Este mismo comportamiento ha sido descrito para diversas moléculas relacionadas con diferenciación (Lee 2004).

Adicionalmente resulta importante conocer si la sobreexpresión de Myc/Dp71a modifica de alguna manera la vía de señalización de respuesta a NGF, ya que el contacto de este factor con el receptor TrkA resulta en la activación de vías de señalización que facilitan el rearrreglo del citoesqueleto

necesario para el crecimiento de neuritas (Sierra-Fonseca 2014), por medio de la fosforilación rápida y sostenida de Erk1/2 y su traslocación al núcleo. Sin embargo, cuando esta molécula es fosforilada de manera lenta y breve, el efecto obtenido es la proliferación celular (León 2014).

Por otro lado, no se conoce si la sobreexpresión de Dp71a pueda estar modificando la expresión de las isoformas endógenas, especialmente Dp71ab que forma parte del complejo de adhesión (Cerna 2006, Romo-Yáñez 2008) y que se ha visto sobreexpresada en células con capacidad elevada de diferenciación (Aragón 2011). Debido a que la adhesión de las células neuronales a su sustrato es esencial para dar movimiento y dirección a los conos de crecimiento (Renaudin 1999), es necesario saber si la capacidad de adhesión de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 se encuentra modificada y si este efecto se debe a la subexpresión de la isoforma Dp71f.

En contraste, las clonas que sobreexpresan Myc/Dp71c aumentan el crecimiento de neuritas desde el día 3 de cultivo con NGF y se mantiene hasta el día 9 (Figura 25 y 26). Las neuritas que se forman en estas células son muy largas y delgadas en comparación con las presentes tanto en la clona control como en la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4. Los resultados de proliferación y diferenciación de estas clonas parecen indicar que el crecimiento lento derivado de la sobreexpresión de Myc/Dp71c produce el ambiente idóneo para la diferenciación y el crecimiento de neuritas, ya que esta isoforma se encuentra principalmente en la membrana y por lo tanto, se puede sugerir que forma complejos con proteínas responsables del rearrreglo y formación de neuritas.

La clona PC12 Tet-On/Dp71c-5 presenta diferencias con respecto a las otras clonas que expresan la misma isoforma, ya que a pesar de que su crecimiento es también lento, la mayoría de células no produce neuritas. Las células de esta clona crecen muy pegadas entre sí, lo cual puede estar evitando el correcto rearrreglo de la membrana y su consiguiente estiramiento para el crecimiento de neuritas. El crecimiento en cúmulos parece comparable con la morfología que adquieren las plaquetas al momento de agregarse: células aplanadas que extienden filopodia para adherirse mejor al sustrato (Nachmias 1980). Dado que el grupo de Dp71d, especialmente Dp71c, ha sido descrito en la membrana de las plaquetas e involucrado con el proceso de

adhesión y rearrreglo del citoesqueleto en estas células (Cerecedo 2005, Cerecedo 2006), es probable que en la clona PC12 Tet-On/Dp71c-5 la proteína Myc/Dp71c promueva la adhesión célula/célula y al sustrato pero, a diferencia de PC12 Tet-On/Dp71c-1 y Dp71c-4, no produce el rearrreglo del citoesqueleto para el crecimiento de neuritas o este es muy poco.

La morfología de las células diferenciadas varía según la isoforma que sobreexpresa: Myc/Dp71c confiere una forma estrellada multipolar, con neuritas delgadas, semejante a una neurona motora, mientras que Myc/Dp71a, al igual que la clona control, presentan tanto neuronas multipolares como una morfología de neuronas bipolares que pudieran ser del tipo sensitivo. Un estudio reciente demostró que los grupos Dp71d y Dp71f se expresan de manera diferencial en dos tipos de neuronas: Dp71d es mayormente encontrada en neuronas bipolares (GABAérgicas) y Dp71f en multipolares (glutamatérgicas), ambas del hipocampo, por lo que su expresión parece estar relacionada con las funciones sinápticas de las neuronas (Rodríguez-Muñoz 2015).

De acuerdo a lo anterior, se puede sugerir que a pesar de que Dp71a y Dp71c se encuentran clasificadas dentro del mismo grupo, cada una tiene una función específica y por lo tanto se favorece la diferenciación a dos tipos de neuronas distintas. Sin embargo, es importante resaltar que las células PC12 se diferencian a neuronas simpáticas, las cuales tienen funciones diferentes a las neuronas del cerebro

Asimismo, se debe recordar que es posible que la sobreexpresión de Myc/Dp71c aumente la expresión proteínas endógenas, entre ellas la isoforma Dp71ab, del grupo Dp71f y esto induzca a las células PC12 a diferenciarse con el fenotipo de neurona multipolar.

En correspondencia con lo encontrado a nivel macroscópico, los marcadores de proliferación PCNA y Ciclina B se expresan en mayor proporción en la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 con respecto al control y a la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 (Figura 25). Este resultado es interesante y es congruente con lo obtenido por Herrera-Salazar y colaboradores (2016), en donde en las células PC12 Tet-On que proliferan de manera acelerada se observa el aumento considerable en la expresión de PCNA. Así como lo obtenido en diferentes estudios en donde los niveles de Ciclina B se encuentran aumentados en células PC12 con proliferación exacerbada (Mark

1997) y disminuidos con proliferación lenta (Villarreal-Silva 2011, Serna 2014), comparadas ambas con células control.

Sin embargo, estas mismas proteínas reducen su expresión al adicionar NGF. Esto puede indicar que aunque en algunas células de la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 la replicación se encuentre disminuida en presencia de NGF, el efecto no es uniforme, por lo que el crecimiento exacerbado se mantiene con las células en donde la replicación no se encuentra afectada.

A pesar de que la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 tiene un crecimiento marcadamente menor que la clona control, al comparar los marcadores de proliferación seleccionados, ninguno se encuentra modificado (Figura 24). Lo anterior sugiere que los procesos de replicación y mitosis no se encuentran afectados, por lo menos a grandes rasgos, y resalta la necesidad de analizar otras proteínas involucradas en este proceso para determinar de qué manera está actuando la isoforma Dp71c.

La expresión de  $\beta$ -dístroglicano no fue comparable a lo descrito por Herrera-Salazar (2016), ya que a pesar de que la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 prolifera de manera acelerada, sus niveles de  $\beta$ -dístroglicano son comparables con la clona control. En concordancia con lo observado por Aragón (2011), la clona con mayor capacidad de diferenciación es la que tiene mayor expresión de esta proteína. No obstante, como  $\beta$ -dístroglicano es una proteína multifuncional (Bozzi 2009), no se puede tener la certeza de que otras funciones relacionadas con ambas proteínas estén alteradas y por ello se obtienen estos resultados.

En todas las clonas analizadas la expresión de FAK es uniforme entre ellas y aumenta una vez adicionado el NGF. Estos resultados parecen contradictorios a lo encontrado por Herrera-Salazar y colaboradores (2016), en donde la clona con proliferación elevada posee mayor cantidad de FAK comparada con su control. Sin embargo, es importante resaltar que en ambos trabajos se induce la sobreexpresión de isoformas distintas de Dp71 y aún cuando el crecimiento celular se ve aumentado con la sobreexpresión de Dp71a de manera similar que con de Dp71 $\Delta$ 78-79, los niveles de proliferación pueden ser diferentes así como las vías por las cuales se produce este y otros efectos observados en las células PC12 TetOn, y por consiguiente, el perfil de las proteínas expresadas puede ser también diferente.

Además, a pesar de que se ha demostrado que la cascada que activa FAK es necesaria para la progresión del ciclo celular (Lee 2004), también se ha relacionado con la neuritogénesis pues su ausencia elimina puntos de adhesión indispensables para la dirección y crecimiento de neuritas (Navarro 2014). Esto se debe principalmente a que posee muchos sitios de fosforilación que responden a estímulos diversos y cada uno se relaciona con un proceso diferente (Mitra 2005). Por lo tanto, el aumento en su expresión no es determinante para que la maquinaria celular se dirija hacia proliferación o diferenciación.

Similar a lo observado a nivel morfológico, los niveles de expresión de las proteínas relacionadas con diferenciación  $\beta_{III}$  tubulina y HspB1 son menores en la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4 que en la clona control, pero los niveles de enolasa son similares. Por otra parte, la clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 tiene los niveles más altos de los tres marcadores seleccionados sin la adición de NGF. Solamente una proteína por clona se incrementa durante la diferenciación ( $\beta_{III}$  tubulina en la clona control, HspB1 en PC12 Tet-On/Dp71a-4 y enolasa en Dp71c-4). Con lo anterior se puede proponer que las células PC12 Tet-On ya están predispuestas a un fenotipo neuronal y que posiblemente exista en ellas más de una vía que lleve al proceso de diferenciación en la cual las diferentes isoformas de la distrofina actúan.

Un dato importante a resaltar es el hecho de que, a pesar de que las proteínas totales utilizadas fueron cosechadas a 9 días de cultivo, no todas se obtuvieron al mismo tiempo, lo que puede ocasionar que el cultivo no se encontrara en las mismas condiciones y por lo tanto, el experimento no es totalmente reproducible. Además, el control de carga utilizado es Grb2, que si bien en el laboratorio se ha determinado que no existe cambios hasta el día 6 de cultivo (Aragón 2016), esto sólo se realizó en la clona PC12 con la isoforma Dp71 $\Delta$ 7879 y, como se ha visto en este estudio, todas las clonas pueden comportarse de manera diferente. Por ello, es importante repetir este experimento obteniendo los extractos al mismo tiempo y utilizando como control de carga  $\beta$ -actina.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la sobreexpresión de las dos isoformas del grupo Dp71d producen efectos diferentes en dos de los procesos celulares más importantes para el mantenimiento del SNC: proliferación y diferenciación. Esto contribuye a la

importancia de determinar si las funciones de las isoformas está involucrada con regiones tanto dentro como independientes del CTD, así como con factores estructurales, ya que Dp71a y Dp71c difieren en su estructura tridimensional debido al procesamiento de los exones 71-74 en esta última. Además, este procesamiento provoca la pérdida del sitio de unión a sintrofinas (Ceccarinni 1997) por lo que los efectos heterogéneos observados pueden estar relacionados a los diferentes complejos proteicos que forman. Asimismo, se destaca la necesidad de analizar con mayor profundidad los procesos en los que participan estas dos isoformas, ya que se expresan en diferentes etapas del crecimiento embrionario (Ceccarinni 1997, Schofield 1994) y en diferentes tejidos y tipos celulares (Austin 1995, Austin 2002, Aragón 2016 en preparación).

Este trabajo las puertas para determinar además que efectos produce la sobreexpresión de todas isoformas de Dp71 descritas hasta la fecha.

## 8. CONCLUSIONES

1. Las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp7c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5 expresan las isoformas Dp71a y Dp71c tanto a nivel de mRNA como de proteína.
2. La expresión de las proteínas recombinantes ocurre de manera independiente a la adición de DOX, excepto en PC12 Tet-On/Dp71c-4 cuya expresión es inducible con DOX, alcanzando la máxima expresión con 500 ng/ml.
3. En células no diferenciadas, la proteína recombinante Myc/Dp71a se localiza en citoplasma y periferia celular y en menor cantidad en núcleo. Esta distribución se mantiene en células diferenciadas a 9 días con NGF, observándose también a lo largo de las neuritas. Además, colocaliza con  $\beta$ -distinglicano tanto en células no diferenciadas como en diferenciadas.
4. La sobreexpresión de la proteína Myc/Dp71a causa una proliferación más rápida de las células PC12 Tet-On/Dp71a-4 en comparación con la clona control.
5. La mayoría de las células con sobreexpresión de la proteína Myc/Dp71a adicionadas con NGF no presentan neuritas en comparación con las clonas PC12 Tet-On/Dp71c. Las células diferenciadas con NGF son, en su mayoría, bipolares y sus neuritas son gruesas y cortas.
6. El nivel de las proteínas PCNA y Ciclina B1 se encuentra elevado en la clona PC12 Tet-On/Dp71a-4, mientras que  $\beta$ III tubulina y HspB1 se encuentran en menor proporción ambos comparados con los niveles obtenidos de las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-4 sin NGF.
7. En las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5, la proteína recombinante Myc/Dp71c se encuentra principalmente en la periferia celular, con muy poca cantidad en citoplasma y núcleo en células no diferenciadas. En células diferenciadas se localiza principalmente en periferia y se observa a lo largo de las neuritas y citoplasma. En las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1 y Dp71c-4 se observan cúmulos de proteína a lo largo de la membrana.
8. Las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1, Dp71c-4 y Dp71c-5 proliferan más lento que las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4 y control.

9. Con la adición de NGF, la mayoría de las células de clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1 y Dp71c-4 son multipolares, con neuritas delgadas y de mayor longitud que las presentes en la clona control.
10. La clona PC12 Tet-On/Dp71c-5 forma cúmulos de células aún con la adición de NGF. Una menor proporción de células de esta clona forma neuritas, las cuales son anchas y cortas, comparadas con las de las clonas PC12 Tet-On/Dp71c-1 y Dp71c-4.
11. La clona PC12 Tet-On/Dp71c-4 tiene un nivel de expresión elevado de  $\beta$ III tubulina, comparado con la clona PC12/Tet-On Dp71a-4 y control, sin NGF y este valor se mantiene constante con la adición de NGF. Las proteínas PCNA, Ciclina B1 y Enolasa son comparables en esta clona con la clona control y el nivel de  $\beta$ -dístroglicano es mayor tanto en células no diferenciadas como en diferenciadas.

## 9. PERSPECTIVAS

- Identificar los factores que promueven un incremento en la proliferación de la clona PC12 Tet-On/Dp71a como respuesta a la sobreexpresión de la isoforma Dp71a.
- Identificar los factores que promueven un incremento en la diferenciación de las clonas PC12 Tet-On/Dp71c como respuesta a la sobreexpresión de la isoforma Dp71c.
- Identificar a las proteínas cuya expresión está afectada por la sobreexpresión de las isoformas Dp71a y Dp71c, por geles bidimensionales y espectrometría de masas.
- Determinar la capacidad de adhesión para las clonas PC12 Tet-On/Dp71a y PC12 Tet-On/Dp71c.
- Determinar las proteínas que forman complejos con las isoformas Dp71a y Dp71c para conocer más acerca de su posible función.
- Evaluar la expresión de otros marcadores de proliferación, así como ensayos de citometría de flujo para determinar la fase del ciclo celular que se encuentra afectadas en las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4 y Dp71c-4.
- Caracterizar otras clonas que sobreexpresen a la isoforma Dp71a.
- Obtener la secuencia completa de Myc/Dp71a y Myc/Dp71c de las clonas Dp71a-4 y Dp71c-1 para asegurar que no existan cambios importantes.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta R, Montañez C, Fuentes-Mera L, Gonzalez E, Gómez P, Quintero-Mora L, et al. (2004). Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Exp Cell Res.*;296(2):265-75.
- Aletta JM. (1996). Phosphorylation of type III beta-tubulin PC12 cell neurites during NGF-induced process outgrowth. *J Neurobiol.*;31(4):461-75.
- Aragón J, Romo-Yáñez J, Martínez-Herrera A, Ceja V, Rendon A, Montañez C. (2011). Characterization of Dp71Δ(78-79), a novel dystrophin mutant that stimulates PC12 cell differentiation. *J Neurochem.*;119(4):697-707. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07347.x. Epub 2011 Sep 22.
- Aragón J, Martínez-Herrera A, Bermúdez-Cruz RM, Bazán ML, Soid-Raggi G, Ceja V, et al. (2015). EF-hand domains are involved in the differential cellular distribution of dystrophin Dp40. *Neurosci Lett.*;600:115-20. doi: 10.1016/j.neulet.2015.05.038. Epub 2015 May 21.
- Aragón J, Martínez-Herrera A, Romo-Yáñez J, Ceja V, Azotla-Vilchis C, Siqueiros-Márquez L, et al. (2016). Identification of Dp71 Isoforms Expressed in PC12 Cells: Subcellular Localization and Colocalization with  $\beta$ -Dystroglycan and  $\alpha$ 1-Syntrophin. *J Mol Neurosci.*;58(2):201-9. doi: 10.1007/s12031-015-0657-8. Epub 2015 Sep 28.
- Aragón J, González-Reyes M, Romo-Yáñez J, Vacca O, Aguilar-González G, Rendón A, et al. Dystrophin Dp71 isoforms are differentially expressed in mouse brain and retina: report of new alternative splicing and a novel nomenclature for Dp71 isoforms. En preparación.
- Austin RC, Howard PL, D'Souza VN, Klamut HJ, Ray PN. (1995). Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Hum Mol Genet.*;4(9):1475-83.
- Austin RC, Morris GE, Howard PL, Klamut HJ, Ray PN. (2000). Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain. *Neuromuscul Disord.*;10(3):187-93.
- Austin RC, Fox JE, Werstuck GH, Stafford AR, Bulman DE, Dally GY, et al. (2002). Identification of Dp71 isoforms in the platelet membrane cytoskeleton. Potential role in thrombin-mediated platelet adhesion. *J Biol Chem.*;277(49):47106-13. Epub 2002 Oct 4.
- Bai G, Weiss B. (1991). The increase of calmodulin in PC12 cells induced by NGF is caused by differential expression of multiple mRNAs for calmodulin. *J Cell Physiol.*;149(3):414-21.
- Billard C, Gillet P, Signoret JL, Uicaut E, Bertrand P, Fardeau M, et al. (1992). Cognitive functions in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal and comparison with spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord.*;2(5-6):371-8.
- Billard C., Gillet P., Barthez M.A., Hommet C., Bertrand P. (1998). Reading ability and processing in Duchenne muscular dystrophy and spinalmuscular atrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology.* vol. 40, no. 1, pp 12–20.
- Blake DJ, Love DR, Tinsley J, Morris GE, Turley H, Gatter K, et al. (1992). Characterization of a 4.8kb transcript from the Duchenne muscular dystrophy locus expressed in Schwannoma cells. *Hum Mol Genet.*;1(2):103-9.
- Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE, Knight AE, Winder SJ, Kendrick-Jones J. (1995). Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci.*; 20(4):133-5.
- Blake DJ, Hawkes R, Benson MA, Beesley PW. (1999). Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J Cell Biol.*;147(3):645-58.
- Blake DJ, Kröger S. (2000). The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci.*; 23(3):92-9.

- Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.*;82(2):291-329.
- Bozzi M, Morlacchi S, Bigotti MG, Sciandra F, Brancaccio A. (2009) Functional diversity of dystroglycan. *Matrix Biol.*;28(4):179-87. doi: 10.1016/j.matbio.2009.03.003. Epub 2009 Mar 19.
- Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;81(4):1189-92.
- Byers TJ, Lidov HG, Kunkel LM. (1993). An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet.*;4(1):77-81.
- Carlson CG. (1998) The dystrophinopathies: an alternative to the structural hypothesis. *Neurobiol Dis.*;5(1):3-15.
- Ceccarini M, Rizzo G, Rosa G, Chelucci C, Macioce P, Petrucci TC. (1997). A splice variant of Dp71 lacking the syntrophin binding site is expressed in early stages of human neural development. *Brain Res Dev Brain Res.*;103(1):77-82.
- Cerecedo D, Martínez-Rojas D, Chávez O, Martínez-Pérez F, García-Sierra F, Rendon A, et al. (2005). Platelet adhesion: structural and functional diversity of short dystrophin and utrophins in the formation of dystrophin-associated-protein complexes related to actin dynamics. *Thromb Haemost.*;94(6):1203-12.
- Cerecedo D, Mondragón R, Cisneros B, Martínez-Pérez F, Martínez-Rojas D, Rendón A. (2006). Role of dystrophins and utrophins in platelet adhesion process. *Br J Haematol.*;134(1):83-91.
- Cerna J, Cerecedo D, Ortega A, García-Sierra F, Centeno F, Garrido E, et al. (2006). Dystrophin Dp71f associates with the beta1-integrin adhesion complex to modulate PC12 cell adhesion. *J Mol Biol.*;362(5):954-65. Epub 2006 Aug 1.
- Cisneros B, Rendon A, Genty V, Aranda G, Marquez F, Mornet D, et al. (1996). Expression of dystrophin Dp71 during PC12 cell differentiation. *Neurosci Lett.*;213(2):107-10.
- Connors, N.C., Adams, M.E., Froehner, S.C., Kofuji, P. (2004). The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin–glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J. Biol. Chem.*279, 28387–28392.
- Cotton S, Voudouris NJ, Greenwood KM. (2001). Intelligence and Duchenne muscular dystrophy: full-scale, verbal, and performance intelligence quotients. *Dev Med Child Neurol.*;43(7):497-501.
- Culligan K, Glover L, Dowling P, Ohlendieck K. (2001). Brain dystrophin-glycoprotein complex: persistent expression of beta-dystroglycan, impaired oligomerization of Dp71 and up-regulation of utrophins in animal models of muscular dystrophy. *BMC Cell Biol.*; 2:2. Epub 2001 Feb 2.
- Cyrulnik SE, Fee RJ, Batchelder A, Kiefel J, Goldstein E, Hinton VJ. (2008). Cognitive and adaptive deficits in young children with Duchenne muscular dystrophy (DMD). *J Int Neuropsychol Soc.*;14(5):853-61. doi: 10.1017/S135561770808106X.
- Daoud F, Angeard N, Demerre B, Martie I, Benyaou R, Leturcq F, et al. (2009). Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Hum Mol Genet.*;18(20):3779-94. doi: 10.1093/hmg/ddp320. Epub 2009 Jul 14.
- De Brouwer AP, Nabuurs SB, Verhaart IE, Oudakker AR, Hordijk R, Yntema HG, et al. (2014). A 3-base pair deletion, c.9711\_9713del, in DMD results in intellectual disability without muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet.*;22(4):480-5. doi: 10.1038/ejhg.2013.169. Epub 2013 Jul 31.
- De Diego Otero Y, Severijnen LA, van Cappellen G, Schrier M, Oostra B, Willemsen R. (2002). Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. *Mol Cell Biol.*;22(23):8332-41.

- D'Souza VN, Nguyen TM, Morris GE, Karges W, Pillers DA, Ray PN. (1995). A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum Mol Genet.*; 4(5):837-42.
- Duchenne, G.B.A. (1868). Reserches sur la paralysie musculaire pseudeohyper-trofique, ou paralysie myo-sclerosique. *Arch. Gen. Med.* 11, 5–25, 179–209,305–121, 421–143, 552–188.
- Emery AEH, Muntoni F, Quinlivan R. (2003). *Duchenne muscular dystrophy*. Oxford; New York, NY: Oxford University Press. p 1.
- Enríquez-Aragón JA, Cerna-Cortés J, Bermúdez de León M, García-Sierra F, González E, Mornet D, et al. (2005). Dystrophin Dp71 in PC12 cell adhesion. *Neuroreport.*;16(3):235-8.
- Ermak G, Cancasci VJ, Davies KJ. (2003). Cytotoxic effect of doxycycline and its implications for tet-on gene expression systems. *Anal Biochem.*;318(1):152-4.
- Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP. (1990). Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature.*;345(6273):315-9.
- Ervasti JM. (2007). Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta.*;1772(2):108-17. Epub 2006 Jun 7.
- Feener CA, Koenig M, Kunkel LM. (1989). Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature.*;338(6215):509-11.
- Fischer I, Richter-Landsberg C, Safaei R. (1991). Regulation of microtubule associated protein 2 (MAP2) expression by nerve growth factor in PC12 cells. *Exp Cell Res.*;194(2):195-201.
- Fujimoto T, Itoh K, Yaoi T, Fushiki S. (2014). Somatodendritic and excitatory postsynaptic distribution of neuron-type dystrophin isoform, Dp40, in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.*; 452(1):79-84. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.064. Epub 2014 Aug 21.
- Gintjee TJ, Magh AS, Bertoni C. (2014). High throughput screening in duchenne muscular dystrophy: from drug discovery to functional genomics. *Biology (Basel)*; 3(4):752-80. doi: 10.3390/biology3040752.
- González E, Montañez C, Ray PN, Howard PL, García-Sierra F, Mornet D, et al. (2000). Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS Lett.*;482(3):209-14.
- González-Reyes M. (2014). Caracterización de las isoformas Dp71/Dp40 que se expresan en cerebro y retina de ratón. Tesis de Maestría.
- Górecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ. (1992). Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet.*;1(7):505-10.
- Gossen M, Bujard H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;89(12):5547-51.
- Greene LA, Tischler AS. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;73(7):2424-8.
- Greene LA, Tischler AS (1982) PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research. In: Fedoroff S, Hertz L (eds) *Advances in cellular neurobiology*. Academic Press, New York, p 373
- Guroff G. (1983). Nerve Grow Factor and Other Factors Acting in the Nervous System. In: Lajtha Abel (ed). *Handbook of Neurochemistry*. Volume 5: Metabolic Turnover in the Nervous System. Springer Science, New York, p 455.
- Hendriksen JG, Vles JS. (2008). Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive--compulsive disorder. *J Child Neurol.*;23(5):477-81. doi: 10.1177/0883073807309775. Epub 2008 Mar 19.

- Hendriksen RG, Hoogland G, Schipper S, Hendriksen JG, Vles JS, Aalbers MW. (2015). A possible role of dystrophin in neuronal excitability: a review of the current literature. *Neurosci Biobehav Rev.*;51:255-62. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.01.023. Epub 2015 Feb 10.
- Herrera-Salazar A, García-Villegas R, Aragón J, Sánchez-Trujillo A, Ceja V, Martínez-Herrera A, et al. (2016). Overexpression of mutant dystrophin Dp71[INCREMENT]<sub>78-79</sub> stimulates cell proliferation. *Neuroreport.*;27(1):6-11. doi: 10.1097/WNR.0000000000000475.
- Herrera-Salazar, A. (2016). Efecto de la sobre-expresión de la distrofina Dp71Δ78-79 en el modelo neuronal PC12 Tet-On. Tesis de doctorado.
- Jagadha V, Becker LE. (1988). Brain morphology in Duchenne muscular dystrophy: a Golgi study. *Pediatr Neurol.*;4(2):87-92.
- Joshi HC, Cleveland DW. (1989). Differential utilization of beta-tubulin isotypes in differentiating neurites. *J Cell Biol.*;109(2):663-73.
- Jörnvall H, Blokzijl A, ten Dijke P, Ibáñez CF. (2001). The orphan receptor serine/threonine kinase ALK7 signals arrest of proliferation and morphological differentiation in a neuronal cell line. *J Biol Chem.*;276(7):5140-6. Epub 2000 Nov 17.
- Jung D, Filliol D, Metz-Boutigue MH, Rendon A. (1993). Characterization and subcellular localization of the dystrophin-protein 71 (Dp71) from brain. *Neuromuscul Disord.*;3(5-6):515-8.
- Knuesel, I. (1999) Short communication: altered synaptic clustering of GABA<sub>A</sub> receptors in mice lacking dystrophin (mdx mice). *Eur. J. Neurosci.* 11, 4457–4462
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell.*;50(3):509-17.
- Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell.*;53(2):219-28.
- Krawczyk P, Twarog E, Kurowska E, Kłopotowska D, Matuszyk J. (2015). Establishment of a cellular model to study TrkC-dependent neuritogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2015 Mar;51(3):241-8. doi: 10.1007/s11626-014-9829-z. Epub 2014 Nov 15.
- Lai Y, Thomas GD, Yue Y, Yang HT, Li D, Long C, et al. (2009). Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. *J Clin Invest.*;119(3):624-35. doi: 10.1172/JCI36612. Epub 2009 Feb 23.
- Lederfein D, Levy Z, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, et al. (1992). A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;89(12):5346-50.
- Lederfein D, Yaffe D, Nudel U. (1993). A housekeeping type promoter, located in the 3' region of the Duchenne muscular dystrophy gene, controls the expression of Dp71, a major product of the gene. *Hum Mol Genet.*; 2(11):1883-8.
- Lee JW, Juliano R. (2004). Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells.*;17(2):188-202.
- Lenk U, Hanke R, Thiele H, Speer A. (1993). Point mutations at the carboxy terminus of the human dystrophin gene: implications for an association with mental retardation in DMD patients. *Hum Mol Genet.*;2(11):1877-81.
- Leon G, Sanchez-Ruiloba L, Perez-Rodriguez A, Gragera T, Martinez N, Hernandez S, et al. (2014). Shoc2/Sur8 protein regulates neurite outgrowth. *PLoS One.*;9(12):e114837. doi: 10.1371/journal.pone.0114837. eCollection 2014.
- Lidov HG, Selig S, Kunkel LM. (1995). Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet.*;4(3):329-35.
- Marampon F, Casimiro MC, Fu M, Powell MJ, Popov VM, Lindsay J, et al. (2008). Nerve Growth factor regulation of cyclin D1 in PC12 cells through a p21RAS

extracellular signal-regulated kinase pathway requires cooperative interactions between Sp1 and nuclear factor-kappaB. *Mol Biol Cell*.;19(6):2566-78. doi: 10.1091/mbc.E06-12-1110. Epub 2008 Mar 26.

- Mark MD, Storm DR. Antiproliferative activity of KCl contributes to EGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Neurosci Lett*.;230(2):73-6.
- Marquez FG, Cisneros B, Garcia F, Ceja V, Velázquez F, Depardón F, et al. (2003). Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience*.;118(4):957-66.
- Martínez-Herrera A, Aragón J, Bermúdez-Cruz RM, Bazán ML, Soid-Raggi G, Ceja V, et al. (2015). In silico analyses of dystrophin Dp40 cellular distribution, nuclear export signals and structure modeling. *Data Brief*.;4:349-52. doi: 10.1016/j.dib.2015.06.007. eCollection 2015.
- Mendell JR, Lloyd-Puryear M. (2013). Report of MDA muscle disease symposium on newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*.;48(1):21-6. doi: 10.1002/mus.23810. Epub 2013 May 29.
- Merino-Jiménez C, Aragón J, Ceja V, Rodríguez-Martínez G, Cázares-Raga FE, Chardonnet S, et al. (2016). Dp71 $\Delta$ 78-79 dystrophin mutant stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via upregulation and phosphorylation of HspB1. *Proteomics*.;16(9):1331-40. doi: 10.1002/pmic.201500211. Epub 2016 Apr 13.
- Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*.;6(1):56-68.
- Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*.;129(4):665-79.
- Navarro AI, Rico B. (2014). Focal adhesion kinase function in neuronal development. *Curr Opin Neurobiol*.;27:89-95. doi: 10.1016/j.conb.2014.03.002. Epub 2014 Apr 3.
- Nachmias VT. (1980). Cytoskeleton of human platelets at rest and after spreading. *J Cell Biol*.;86(3):795-802.
- Pandey A, Singh P, Jauhari A, Singh T, Khan F, Pant AB, et al. (2015). Critical role of the miR-200 family in regulating differentiation and proliferation of neurons. *J Neurochem*.;133(5):640-52. doi: 10.1111/jnc.13089.
- Perronnet C, Vaillend C. (2010). Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. *J Biomed Biotechnol*.;2010:849426. doi: 10.1155/2010/849426. Epub 2010 Jun 17.
- Ponting CP, Blake DJ, Davies KE, Kendrick-Jones J, Winder SJ. (1996). ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends Biochem Sci*.;21(1):11-13.
- Rando TA. (2001). The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve*.;24(12):1575-94.
- Rapaport D, Fuchs O, Nudel U, Yaffe D. (1992). Expression of the Duchenne muscular dystrophy gene products in embryonic stem cells and their differentiated derivatives. *J Biol Chem*.; 267(30):21289-92.
- Ravni A, Bourgault S, Lebon A, Chan P, Galas L, Fournier A, et al. (2006). The neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells: control by multiple transduction pathways. *J Neurochem*.;98(2):321-9.
- Renaudin A, Lehmann M, Girault J, McKerracher L. (1999). Organization of point contacts in neuronal growth cones. *J Neurosci Res*.;55(4):458-71.
- Rodríguez-Muñoz R, Villarreal-Silva M, González-Ramírez R, García-Sierra F, Mondragón M, Mondragón R, et al. (2008). Neuronal differentiation modulates the dystrophin Dp71d binding to the nuclear matrix. *Biochem Biophys Res Commun*.;375(3):303-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.135. Epub 2008 Aug 5.
- Rodríguez-Muñoz R, Cárdenas-Aguayo M del C, Alemán V, Osorio B, Chávez-González O, Rendon A, et al. (2015). Novel Nuclear Protein Complexes of Dystrophin

71 Isoforms in Rat Cultured Hippocampal GABAergic and Glutamatergic Neurons. *PLoS One*.;10(9):e0137328. doi: 10.1371/journal.pone.0137328. eCollection 2015.

- Romo-Yáñez J, Ceja V, Ilaraza-Lomelí R, Coral-Vázquez R, Velázquez F, Mornet D, et al. (2007). Dp71ab/DAPs complex composition changes during the differentiation process in PC12 cells. *J Cell Biochem*.;102(1):82-97.
- Rudkin BB, Lazarovici P, Levi BZ, Abe Y, Fujita K, Guroff G. (1989). Cell cycle-specific action of nerve growth factor in PC12 cells: differentiation without proliferation. *EMBO J*.;8(11):3319-25.
- Rybakova IN, Amann KJ, Ervasti JM. (1996). A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J Cell Biol*.;135(3):661-72.
- Saint Martín A, Aragón J, Depardon-Benítez F, Sánchez-Trujillo A, Mendoza-Hernández G, Ceja V, et al. (2012). Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy-terminal end. *FEBS J*.;279(1):66-77. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08399.x. Epub 2011 Nov 17.
- Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, et al. (1999). Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Hum Mol Genet*.;8(1):1-10.
- Sadoulet-Puccio HM, Kunkel LM. (1996). Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol*.;6(1):25-35.
- Schofield JN, Blake DJ, Simmons C, Morris GE, Tinsley JM, Davies KE, et al. (1994). Apo-dystrophin-1 and apo-dystrophin-2, products of the Duchenne muscular dystrophy locus: expression during mouse embryogenesis and in cultured cell lines. *Hum Mol Genet*. 1994 Aug;3(8):1309-16.
- Serna A, Galán-Cobo A, Rodrigues C, Sánchez-Gomar I, Toledo-Aral JJ, Moura TF, et al. (2014). Functional inhibition of aquaporin-3 with a gold-based compound induces blockage of cell proliferation. *J Cell Physiol*.;229(11):1787-801. doi: 10.1002/jcp.24632.
- Shaikh S, Nicholson LF. (2006) Optimization of the Tet-On system for inducible expression of RAGE. *J Biomol Tech*.;17(4):283-92.
- Sierra-Fonseca JA, Najera O, Martínez-Jurado J, Walker EM, Varela-Ramírez A, Khan AM, et al. (2014). Nerve growth factor induces neurite outgrowth of PC12 cells by promoting G $\beta$  $\gamma$ -microtubule interaction. *BMC Neurosci*.;15:132. doi: 10.1186/s12868-014-0132-4.
- Snow WM, Anderson JE, Jakobson LS. (2013). Neuropsychological and neurobehavioral functioning in Duchenne muscular dystrophy: a review. *Neurosci Biobehav Rev*.;37(5):743-52. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.03.016. Epub 2013 Mar 29.
- Stieger K, Belbellaa B, Le Guiner C, Moullier P, Rolling F. (2009). In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems. *Adv Drug Deliv Rev*.;61(7-8):527-41. doi: 10.1016/j.addr.2008.12.016. Epub 2009 Apr 23.
- Suárez-Sánchez R, Aguilar A, Wagstaff KM, Velez G, Azuara-Medina PM, Gomez P, et al. (2014). Nucleocytoplasmic shuttling of the Duchenne muscular dystrophy gene product dystrophin Dp71d is dependent on the importin  $\alpha/\beta$  and CRM1 nuclear transporters and microtubule motor dynein. *Biochim Biophys Acta*.;1843(5):985-1001. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.01.027. Epub 2014 Jan 30.
- Sun L, Carr AL, Li P, Lee J, McGregor M, Li L. (2014). Characterization of the human oncogene SCL/TAL1 interrupting locus (Stil) mediated Sonic hedgehog (Shh) signaling transduction in proliferating mammalian dopaminergic neurons. *Biochem Biophys Res Commun*.;449(4):444-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.048. Epub 2014 May 20.
- Suzuki A, Yoshida M, Hayashi K, Mizuno Y, Hagiwara Y, Ozawa E. (1994). Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. Three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin. *Eur J Biochem*.;220(2):283-92.

- Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B. (2012). Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Neurobiol.*;45(1):43-60. doi: 10.1007/s12035-011-8218-9. Epub 2011 Nov 22.
- Tinsley JM1, Blake DJ, Davies KE. (1993). Apo-dystrophin-3: a 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Hum Mol Genet.*;2(5):521-4.
- Tozawa T, Itoh K, Yaoi T, Tando S, Umekage M, Dai H, et al. (2012). The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain. *Mol Neurobiol.*;45(2):287-97. doi: 10.1007/s12035-012-8233-5. Epub 2012 Jan 19.
- Uren RT, Turbić A, Wong AW, Klein R, Murray SS, Turnley AM. (2014). A novel role of suppressor of cytokine signaling-2 in the regulation of TrkA neurotrophin receptor biology. *J Neurochem.*;129(4):614-27. doi: 10.1111/jnc.12671. Epub 2014 Mar 4.
- Villarreal-Silva M, Suárez-Sánchez R, Rodríguez-Muñoz R, Mornet D, Cisneros B. (2010). Dystrophin Dp71 is critical for stability of the DAPs in the nucleus of PC12 cells. *Neurochem Res.*;35(3):366-73. doi: 10.1007/s11064-009-0064-z. Epub 2009 Sep 27.
- Villarreal-Silva M, Centeno-Cruz F, Suárez-Sánchez R, Garrido E, Cisneros B (2011). Knockdown of dystrophin Dp71 impairs PC12 cells cycle: localization in the spindle and cytokinesis structures implies a role for Dp71 in cell division. *PLoS One.*;6(8):e23504. doi: 10.1371/journal.pone.0023504. Epub 2011 Aug 19.
- Waite A, Tinsley CL, Locke M, Blake DJ. (2009). The neurobiology of the dystrophin-associated glycoprotein complex. *Ann Med.*;41(5):344-59. doi: 10.1080/07853890802668522.
- Waite A, Brown SC, Blake DJ. (2012). The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease. *Trends Neurosci.*; 35(8):487-96. doi: 10.1016/j.tins.2012.04.004. Epub 2012 May 23.
- Wang Y, Cong X, Liu D, Zhang W, Cui L, Liu W, Cao Y. (2005). The transfection of embryonic stem cells with Tet-On system and its responsiveness to doxycycline. *Sci China C Life Sci.*;48(4):307-10.
- Wang ZJ, Zhou B, Mao WW, Yin M. (2011). Overexpression of 5-lipoxygenase increases the neuronal vulnerability of PC12 cells to  $A\beta_{42}$ . *Yakugaku Zasshi.*;131(12):1843-53.
- Wyttenbach A, Swartz J, Kita H, Thykjaer T, Carmichael J, Bradley J, et al. (2001). Polyglutamine expansions cause decreased CRE-mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.*;10(17):1829-45.
- Yan GZ1, Ziff EB. (1995). NGF regulates the PC12 cell cycle machinery through specific inhibition of the Cdk kinases and induction of cyclin D1. *J Neurosci.*;15(9):6200-12.
- Zhu Z, Zheng T, Lee CG, Homer RJ, Elias JA. (2002). Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Semin Cell Dev Biol.*;13(2):121-8.