



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Establecimiento del cultivo primario de células troncales/progenitoras neurales
para la transfección y expresión de isoformas de Dp71”**

T E S I S

Que presenta

I.B.T. SILVIA KARINA VARGAS BARÓN

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directora de Tesis:

Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. SILVIA CECILIA IRENE MONTAÑEZ OJEDA Y CON LA ASESORÍA DE LOS DOCTORES ROSA MARÍA BERMÚDEZ CRUZ Y LUIS MARAT ÁLVAREZ SALAS, INVESTIGADORES DEL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR. EL TRABAJO FUE REALIZADO CON APOYO DE LOS DONATIVOS CONACyT 127600, 222054 Y SEP-CONACyT-ECOS-ANUIES-SEP-CONACYT 276330

DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO LA ALUMNA SILVIA KARINA VARGAS BARÓN FUE BECARIA DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT) CON NÚMERO DE REGISTRO 777660

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a la Dra. Cecilia Montañez por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, y por el apoyo brindado en todo momento. Gracias por la experiencia durante la realización de este trabajo, que fue realmente enriquecedora, llena de aprendizaje. Por su paciencia y por ser un modelo a seguir.

Al doctor Luis Marat Álvarez y a la doctora Rosy Bermúdez por su siempre buena disposición para ayudarme en la realización de este proyecto, por los consejos y su asesoría que fue enormemente valiosa.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio, porque forman un excelente equipo de trabajo y me brindaron la oportunidad de integrarme a ellos. A los auxiliares de investigación Jorge, Victor y Ale por todos sus consejos y siempre estar al pendiente de cómo iban los resultados de mi proyecto. A Sandy por su guía y apoyo en los cultivos, de quien también recibí siempre buenos consejos. Al resto de mis compañeros: Clemen, Lulú, Coztli, César, Pablo, Mayram y Valeria por hacer del laboratorio un segundo hogar, por tantos momentos de trabajo y convivencias. Aprendí mucho de cada uno de ustedes y estaré eternamente agradecida por haberlos conocido. Gracias por las risas y los momentos que hicieron que mi estadía fuera divertida.

A todos mis compañeros de generación y compañeros del departamento por las experiencias compartidas. En especial, gracias a Pech por ser de mis mejores amigos, sé que siempre podré contar con tu amistad (y con reactivos y material de tu laboratorio), he aprendido mucho de ti y te deseo el mayor de los éxitos porque te lo mereces.

A todos mis amigos que atravesaron esta nueva etapa conmigo desde que inicie los trámites para ingresar y que nunca se han ido: Xiom, Mar, Fátima y Dianita.

.

A mi mejor amigo Carlos, gracias por siempre tener un consejo listo para mí. Por hacerle de psicólogo y papá a la vez. Gracias por las terapias a las 3 de la mañana, gracias por tu amistad

A mi novio Pandita, por apoyarme en todo momento, por confiar en mí y animarme cada vez que entro en crisis. Gracias por creer en mí y no dejar que me dé por vencida. Por ser mi compañero de vida, te amo profundamente.

A mi hermana y mejor amiga Brenni por ser mi pilar más fuerte, por tu paciencia y tu sensatez, sin ti me habría vuelto loca. Gracias por aceptarme como roomie, y por compartir conmigo las metas y logros. A mi hermano y mi cuñada por estar ahí siempre que necesito un consejo o un jalón de orejas. A mis dos hermosos monstruitos Chago y Luisma porque son mi más grande inspiración. Gracias a ustedes por ser mi fortaleza para que yo continúe en mi camino, por ser la luz que siempre estaba encendida.

Finalmente, a mis padres, por hacer de mí una persona fuerte y con valores para poder superarlo todo, por mostrarme que las respuestas siempre están en el fondo de mi corazón. Gracias por enseñarme a volar y hoy con la meta alcanzada, solo puedo decirles, gracias por ser siempre, mis dos alas. Los amo.

Contenido

	Página
INDICE DE TABLAS.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	i
ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).....	1
1.2. El gen de la distrofia muscular de Duchenne y la distrofina.....	1
1.3. Distrofina Dp71 y Dp40.....	3
1.4. Células troncales/progenitoras neurales (CTPN).....	11
2. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. Objetivo general.....	19
4.2. Objetivos específicos.....	19
5. MATERIALES Y METODOS.....	20
5.1. Obtención del tejido neuroepitelial y establecimiento del cultivo primario en suspensión.....	20
5.2. Nucleofección.....	22
5.3. Inmunofluorescencia Indirecta.....	31
5.4. Análisis de la viabilidad celular.....	23
5.5. Eficiencia de la transfección.....	24
5.6. Construcción de vectores pCMV-myc/Dp71d pCMV-myc/Dp71d _{Δ71-74} ...	24
5.7. Transfección de células PC12 Tet-On con plásmidos pCMV-myc/Dp71d y pCMV-myc/Dp71d _{Δ71-74}	30
5.8. Extracción de proteína total y Western Blot.....	32

6.	RESULTADOS	33
6.1.	Establecimiento de las condiciones para el cultivo primario de CTPN...	33
6.2.	Establecimiento de las condiciones para la nucleofección de pmaxGFP®	35
6.3.	Construcción de los vectores pCMV-myc/Dp71d y pCMV-myc/ Dp71d Δ 71-74.....	39
6.4.	Nucleofección del cultivo de CTPN con los vectores pCMV-myc/Dp71d y pCMV-myc/Dp71d Δ 71-74	50
7.	DISCUSIÓN.....	53
8.	CONCLUSIONES	59
9.	PERSPECTIVAS	60
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	61

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Condiciones empleadas en los ensayos de Nucleofección	23
Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos empleados en ensayos de PCR, condiciones de reacción y tamaño del producto amplificado.....	26
Tabla 3. Características de los anticuerpos empleados	31
Tabla 4. Eficiencias de transformación de las células DH5 α	44

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación esquemática de los dominios de la proteína distrofina de longitud completa.....	2
Figura 2. Promotores y productos del gen DMD..	3
Figura 3. Representación esquemática de los tres grupos de isoformas de Dp71. ...	5
Figura 4. Niveles de Dp71 durante la diferenciación celular de PC12.....	9
Figura 5. Expresión y distribución diferencial de las isoformas Dp71d y Dp71f en células PC12 durante la diferenciación inducida por NGF.	9
Figura 6. Inhibición de la diferenciación neuronal inducida por NGF en células PC12.	10
Figura 7. Diferenciación de las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4, Dp71c-5 y control durante 3 días con NGF.....	12
Figura 9. Expresión de mensajeros de las distrofinas durante la diferenciación de CTPN.....	15
Figura 10. RT-PCR del procesamiento alternativo de los exones 71, 71-74 y 78....	16
Figura 11. Expresión de nestina, β III-tubulina y GFAP durante la diferenciación del cultivo de CTPN.....	17
Figura 12. Morfología de los embriones de rata E14.....	20
Figura 13. Cultivo de CTPN en proliferación y diferenciación (Ensayo de Neuroesferas).....	34
Figura 14. Efecto de los métodos de disociación, enzimático y mecánico, de las neuroesferas del cultivo de CTPN.	35
Figura 15. Viabilidad a las 24 horas después de la nucleofección.	36

Figura 16. Eficiencia de transfección utilizando nucleofección.	36
Figura 17. Expresión de GFP en CTPN en proliferación.	37
Figura 18. Expresión de GFP en CTPN en proliferación (Ampliación).	37
Figura 19. Eficiencias de transfección de las CTPN.	38
Figura 20. Expresión de GFP en CTPN diferenciadas.	39
Figura 21. Fragmentos de Dp71d y Dp71d Δ_{71-74}	40
Figura 22. Esquema de los procesamientos alternativos de las isoformas de Dp71.	41
Figura 23. Productos de la reacción de PCR de colonia.	41
Figura 24. Secuencia de los fragmentos Dp71d Δ_{71-74} y Dp71d.	43
Figura 25. Restricción enzimática de los vectores pCMV-myc, pGEM- Teasy/Dp71d Δ_{71-74} y pGEM-Teasy/Dp71d con EcoRI y NotI.	44
Figura 26. Gel de electroforesis de la PCR colonia.	45
Figura 27. Caracterización de los plásmidos pCMV-myc, pCMV-myc/Dp71d Δ_{71-74} y pCMV-myc/Dp71d por digestión enzimática con PstI.	46
Figura 28. Secuencia de los fragmentos de Dp71d Δ_{71-74} y Dp71d.	48
Figura 29. Expresión de las proteínas recombinantes myc/Dp71d y myc/Dp71d Δ_{71-74} en las célula PC12 Tet-On.	49
Figura 30. Localización de las proteínas recombinantes myc/Dp71d y myc/Dp71d Δ_{71-74} en células PC12 Tet-On no diferenciadas..	50
Figura 31. Inmunodetección de las proteínas recombinantes Myc/Dp71d y Myc/Dp71d Δ_{71-74} en cultivo de CTPN sin diferenciar.	51
Figura 32. Cambios en la morfología del cultivo de CTPN transfectado y sin diferenciar.	52

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius	E14	Día 14 de desarrollo embrionario
µl	Microlitros	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
µm	Micrómetros	EGF	Factor de crecimiento epidermal
A₅₅₀	Absorbancia a 550 nanometros	ESC	Células troncales embrionarias
BSA	Albúmina sérica bovina	FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
CaCl₂	Cloruro de Calcio	GEN	Gentamicina
CB	Buffer de citoesqueleto	GFAP	Proteína ácido-fibrilar Glial
CH₃COOK	Acetato de potasio	GFP	Proteína verde fluorescente
CH₃COONH₃	Acetato de amonio	Kb	Kilobases
CNTF	Factor neurotrófico ciliar	KCl	Cloruro de potasio
CO₂	Dióxido de carbono	kDa	Kilodaltones
C-terminal	Carboxilo terminal	KH₂PO₄	Fosfato monobásico de potasio
CTPN	Células troncales/progenitoras neurales	M	Molar
DAPC	Complejos proteicos asociados a distrofinas	MAP2	Proteína asociada a microtúbulos
DAPs	Proteínas asociadas a distrofinas	MgCl₂	Cloruro de magnesio
DG	Distroglicano	MgSO₄	Sulfato de magnesio
DMD	Distrofia muscular de Duchenne	MI	Mililitros
DMSO	Dimetilsulfóxido	mM	Milimolar
DNA	Ácido Desoxirribonucleico	Mpb	Mega pares de bases
dNTPs	Desoxinucleótido trifosfato		

NaCl	Cloruro de Sodio	PEF	Fibroblastos embrionarios porcinos
NaHCO₃	Bicarbonato de sodio	PLL	Poli-L-lisina
NaOH	Hidróxido de sodio	RC	Dominio rico en cisteínas
NES	Señal de exporte nuclear	RNA	Ácido ribonucleico
Ng	Nanogramos	mRNA	RNA mensajero
NGF	Factor de crecimiento neural	Rpm	Revoluciones por minuto
NLS	Señal de importe nuclear	SDS	Dodecilsulfato sódico
nNOS	Sintasa de óxido nítrico neuronal	Sin	Sintrofina
Pb	Pares de bases	SNC	Sistema nervioso central
PBS	Solución reguladora de fosfatos	SVZ	Zona subventricular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	T3	Hormona tiroidea
		UTR	Región no traducida
		UV	Ultravioleta
		V	Volts

RESUMEN

La proteína Dp71 se expresa a partir de uno de los siete promotores del gen DMD y pertenece a la familia de proteínas conocidas como distrofinas. La alteración de este gen provoca la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la ausencia de la proteína Dp71 se ha asociado con déficit cognitivo y retraso mental en pacientes con DMD. El transcrito de Dp71 presenta procesamiento alternativo de los exones 71-74 y 78, generando así diversas isoformas que se han agrupado de acuerdo con el Carboxilo terminal (C-terminal). Se ha sugerido que esta región es la responsable de las diferencias de localización y función de las diversas isoformas. Dp71 es el producto principal del gen DMD que se expresa en el sistema nervioso central (SNC) y es el primero en expresarse durante las etapas tempranas del desarrollo cerebral embrionario; sin embargo, se desconoce su función durante el desarrollo cerebral. La isoforma Dp71d Δ 71-74 se ha estudiado en células PC12 y se le ha relacionado con la diferenciación celular de estas células. Adicionalmente, Dp71d y Dp71d Δ 71-74 han sido identificadas en células troncales progenitoras neurales (CTPN) de rata, donde también se expresan durante la proliferación y la diferenciación. Para contribuir al estudio de la función de las isoformas de Dp71 durante la diferenciación celular, se realizó la construcción de los vectores pCMV-myc que expresan las proteínas Dp71d y Dp71d Δ 71-74 y se estableció un sistema de transfección para expresar a las distrofinas en las CTPN. Considerando lo anterior, el objetivo principal de este estudio fue la obtención y transfección del cultivo de CTPN para la expresión de las isoformas Dp71d y Dp71d Δ 71-74, y el análisis de su distribución celular. Los resultados obtenidos muestran que fue posible la obtención del cultivo de CTPN, su transfección mediante la técnica de nucleofección y expresión de las distrofinas Dp71 en este cultivo en proliferación.

ABSTRACT

The Dp71 protein is expressed from one of the seven promoters from the DMD gene and belongs to the family of proteins known as dystrophins. Mutations in this gene causes Duchenne muscular dystrophy (DMD), and the absence of the Dp71 protein has been associated with cognitive deficit and mental retardation in patients with DMD. Dp71 transcript presents alternative splicing of exons 71-74 and 78, generating different isoforms that have been grouped according to the carboxy terminal end (C-terminal). It has been suggested that this region is involved in the differential localization and function of the Dp71 isoforms. Dp71 is the main product of the DMD gene that is expressed in the central nervous system (CNS) and is the first to be expressed during early stages of embryonic brain development; however, its function during brain development is unknown. The Dp71 Δ 71-74 isoform has been studied in PC12 cells and it has been related with the differentiation process of these cells. Additionally, Dp71d and Dp71d Δ 71-74 have been characterized in rat neural progenitor stem cells (NPSC), where they are expressed during proliferation and differentiation. To contribute to the study of the function of the Dp71 isoforms during cell differentiation, we obtained recombinant vectors of pCMV-myc expressing the proteins Dp71d and Dp71d Δ 71-74 and establish a transfection system to express them in NPSC. Considering this, the main objective of this study was to obtain and transfect the NPSC culture for the expression of the Dp71d and Dp71d Δ 71-74 isoforms and the analysis of their cellular distribution. The results obtained show that nucleofection and expression of Dp71 dystrophins on proliferating NSPC cultures is feasible.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad progresiva en la que se presenta degeneración de los músculos esquelético y cardíaco; además, un porcentaje de pacientes exhibe deterioro cognitivo. Este padecimiento ocurre cuando se presenta una mutación en el marco de lectura del gen de la DMD, que expresa a la proteína distrofina. Esta proteína se encarga de enlazar las fibras de actina del citoesqueleto con la membrana extracelular. Las mutaciones que ocurren en este gen pueden introducir un codón de paro prematuro generándose una proteína trunca, ocasionando una ruptura en la conexión del citoesqueleto con la matriz extracelular y provocando la pérdida de la función muscular (Hoffman, Brown, & Kunkel, 1987; Lapidos, Kakkar, & McNally, 2004). Por otro lado, se especula que la ruptura de las interacciones entre la distrofina con otras proteínas y moléculas de señalización del sistema nervioso central (SNC) provoca fallas en el metabolismo neuronal (Anand *et al.*, 2015).

En la actualidad no existe terapia para corregir los defectos que se presentan en el gen de la DMD, el tratamiento consiste en retrasar el progreso de la enfermedad con antiinflamatorios no esteroideos, terapia física y tratar las complicaciones cardíacas. Esto ha llevado a la búsqueda de terapias genéticas que permitan curar la enfermedad (Bushby *et al.*, 2010; Ramos & Chamberlain, 2015; Ricotti *et al.*, 2013; Wagner, Lechtzin, & Judge, 2007).

1.2. El gen de la distrofia muscular de Duchenne y la distrofina

El gen de la DMD es el más grande identificado en la actualidad, con un tamaño de 2.5 Mpb, corresponde al 1.5% del cromosoma X y está ubicado en el brazo corto del mismo. El gen consta de 79 exones y codifica para una proteína de 427-kDa de 3,685 aminoácidos (Monaco *et al.*, 1986; Koenig *et al.*, 1987; Tadayoni *et al.*, 2012). La proteína consiste de cuatro dominios estructurales: i) un dominio amino terminal de unión a actina, ii) un dominio

central con repetidos de espectrina, iii) un dominio rico en cisteína (RC) que a su vez contiene un dominio WW de unión a sustratos ricos en prolina, importante para la unión a β -dístroglicano, un dominio EF de unión a calcio y un dominio ZZ que representa el sitio de unión a calmodulina, y iv) un dominio carboxilo terminal que le permite asociarse a componentes extracelulares de membrana interna y citoplásmicos para formar los complejos asociados a dístrofinas (DAPC) (Fig. 1) (Ervasti *et al.*, 1991; Ervasti & Campbell, 1991; Koenig *et al.*, 1988).

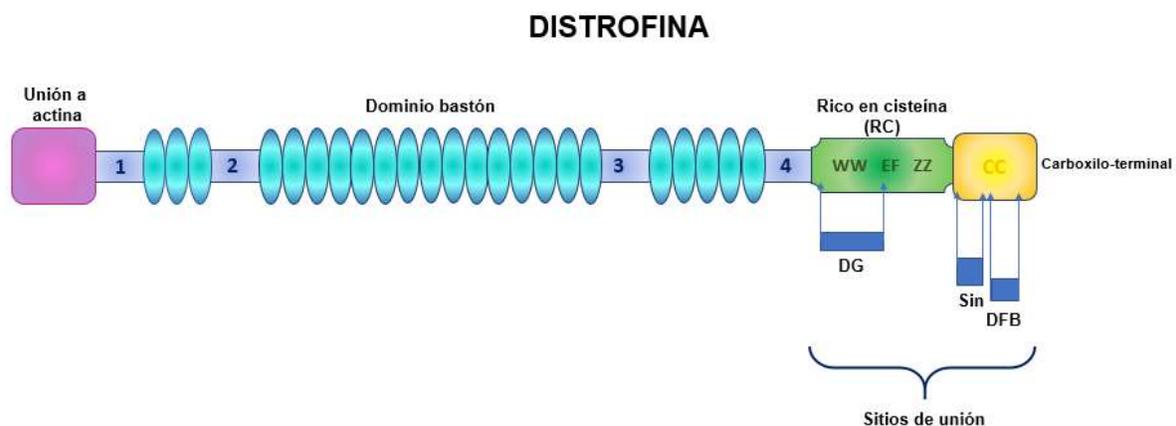
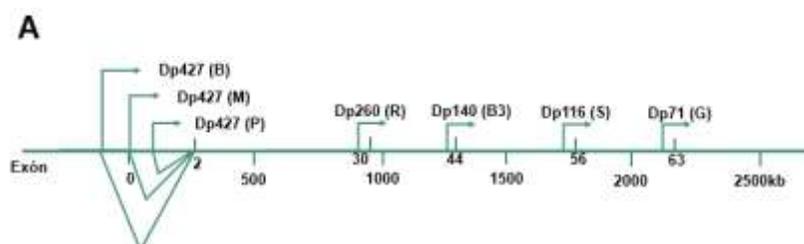


Figura 1. Representación esquemática de los dominios de la proteína dístrofina de longitud completa; Dp427. En el esquema se muestran los dominios N-terminal de unión a actina (morado), el dominio bastón (azul), el dominio rico en cisteína (RC, verde) y el dominio Carboxilo terminal (C-terminal, amarillo). Las 4 regiones ricas en prolina dentro del dominio bastón están señaladas como 1-4. En el dominio rico en cisteínas se representan las regiones correspondientes a los dominios WW, ZZ y EF y en el dominio C-terminal la región superenrollada (CC). También se señalan los sitios de unión para β -dístroglucano (DG), dístrofina (Sin) y proteínas de la familia de la dístrofina (DFB) (Modificado de Blake *et al.*, 2002).

El gen DMD cuenta con siete promotores que codifican para la familia de las dístrofinas (Dp427, Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 y Dp40), las cuales difieren en estructura y peso molecular (Fig. 2) (Bar *et al.*, 1990; Blake *et al.*, 2002; Hugnot *et al.*, 1992).



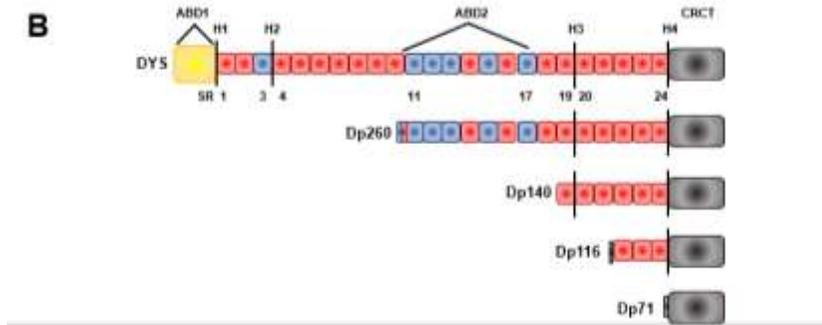


Figura 2. Promotores y productos del gen DMD. **A)** Representación esquemática de los promotores del gen DMD. Modificado de Blake *et al.* (2002). **B)** Representación esquemática de los diferentes productos proteicos del gen DMD. Se muestran los distintos dominios que conforman la estructura completa de las proteínas: Dominio de unión a actina (ABD1) repetidos triple hélice tipo espectrina (SR) con 4 módulos de bisagras (H1-H4), dominio rico en cisteínas (CR) crítico para la unión a β -dístroglicano, y un dominio carboxilo terminal (CT). Los números representan la posición de los repetidos de espectrina (repetidos básicos de color azul y repetidos básicos de color rojo). Clúster de repetidos ácidos que forman un segundo dominio de unión a actina independiente (ABD2). (Modificado de Ervasti, 2007).

1.3. Distrofina Dp71 y Dp40

La distrofina Dp71 se expresa a partir de un promotor que se encuentra en el intrón 62, dicho promotor contiene una zona rica en GCs y no cuenta con caja TATA (Lederfein, Yaffe, & Nudel, 1993). La distrofina Dp40 es transcrita a partir del mismo promotor que Dp71 y sus transcritos tienen un mismo patrón de expresión (Tinsley, Blake, & Davies, 1993). Además, sus extremos 5'-UTR y los primeros 7 aminoácidos son idénticos entre estas distrofinas (Tozawa *et al.*, 2012). Se ha demostrado que los factores de transcripción Sp1 y AP2 α se unen al promotor basal para activar o reprimir su actividad, respectivamente. La inducción de la expresión en células diferenciadas es el resultado de dos procesos: la transactivación por Sp1 y la liberación de AP2 α del promotor. Las evidencias presentadas en este estudio sugieren que la regulación de la expresión de Dp71 durante la diferenciación neuronal ocurre a nivel transcripcional (Morales-Lázaro *et al.*, 2010).

Actualmente se conoce que el RNA mensajero (mRNA) de Dp71 sufre procesamientos alternativos de los exones 71, 71-74 y 78 e intrón 77, lo cual conduce a que dicha proteína presente al menos 12 isoformas (Aragón *et al.*, 2018). La expresión de las isoformas ocurre de manera diferencial

dependiendo del tipo de tejido y/o cultivo celular, la etapa de diferenciación y la especie.

Las isoformas generadas por los eventos de procesamiento alternativo se agrupan de acuerdo con sus carboxilos terminales. El grupo de Dp71d incluye a las isoformas que contienen al exón 78; Dp71 de longitud completa (Dp71d), Dp71a (Dp71d Δ 71) y Dp71c (Dp71d Δ 71-74). El grupo Dp71f se deriva de la exclusión, por procesamiento alternativo del exón 78 y contiene a Dp71b (Dp71f), Dp71ab (Dp71f Δ 71) y Dp71 Δ 110 (Dp71f Δ 71-74). Mientras que la pérdida del exón 71 no cambia el marco de lectura, la pérdida del exón 78 sí, resultando en que los 13 aminoácidos del carboxilo terminal son reemplazados por 31 aminoácidos de propiedades hidrofóbicas (Austin, Howard, Souza, Kiamut, & Ray, 1995). Finalmente, el grupo Dp71e retiene 34 pares de bases del intrón 77 e incluye a las isoformas Dp71e (Dp71e Δ 71) y Dp71ec (Dp71e Δ 71-74) (Saint Martín *et al.*, 2012). En el trabajo de Aragón y colaboradores en 2016, se identificaron las isoformas de Dp71 que se expresan a nivel mRNA en células PC12: Dp71a, Dp71ab, Dp71c, Dp71e y Dp71ec (Aragón *et al.*, 2016). Sin embargo, en otro estudio se identificaron 4 nuevas variantes que resultan del procesamiento alternativo para Dp71, y debido a que no existían nombres reportados en la literatura, se propuso mantener la información basada en el carboxilo terminal de cada variante seguido de un símbolo Δ y las letras especificando los números de exones internos donde se realiza el procesamiento alternativo (Fig. 3) (Aragón *et al.*, 2018).

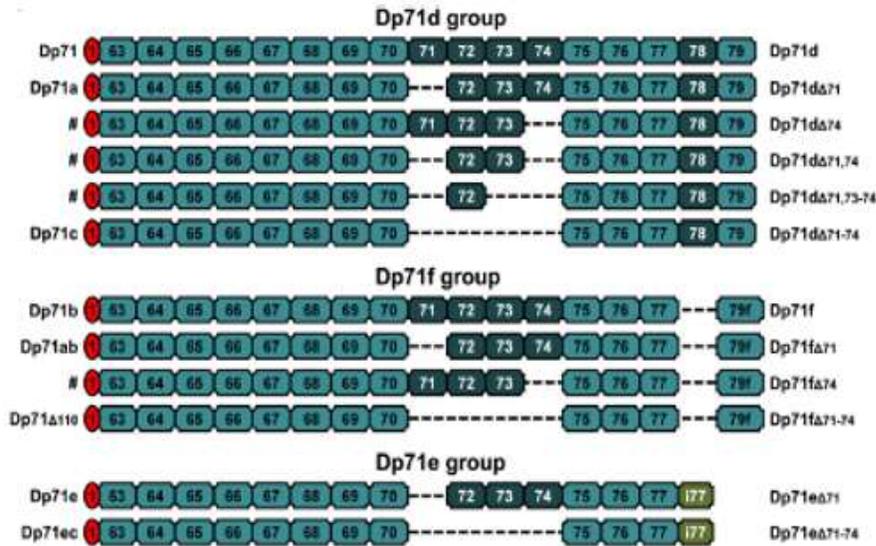


Figura 3. Representación esquemática de los tres grupos de isoformas de Dp71. Del lado izquierdo se indican los nombres previamente descritos y del derecho los nombres reportados por nuestro grupo. (#) isoformas nuevas no reportadas previamente en literatura (Aragón et al., 2018).

La línea celular PC12 es uno de los modelos más utilizados para estudiar la expresión y función de Dp71 en células neurales. Las células PC12 provienen de un feocromocitoma adrenal de rata y responden al tratamiento con factor de crecimiento neural (NGF) diferenciándose en células parecidas a neuronas simpáticas. Estas células se han utilizado como modelo ya que expresan diversas isoformas de Dp71; sin embargo, no expresa ningún otro producto proteico del gen DMD (Márquez *et al.*, 2003). En 2003, el trabajo de Márquez y colaboradores, reportó que la distribución de las isoformas del grupo Dp71d es predominantemente en el núcleo y del grupo Dp71f exclusivamente en el citoplasma (Márquez *et al.*, 2003).

La distrofina se asocia a proteínas para formar un complejo conocido como complejo proteico asociado a distrofina (DAPC). Este complejo actúa como puente y a través de la matriz extracelular, conecta a la actina citoesquelética intracelular con la lámina basal, y se cree que su función es estabilizar a la membrana del sarcolema durante la relajación y contracción del músculo (Darras, Menache-Starobinski, Hinton, & Kunkel, 2015).

Las proteínas que componen los DAPC se organizan en tres distintos subcomplejos: i) distrofinas (proteínas del citoesqueleto), distrobrevinas (subunidades α y β) y las sintrofinas (subunidades α , β y γ); ii) distroglicanos (subunidades α y β) y iii) sarcoglicanos (subunidades α , β , γ , δ y ϵ). En el músculo esquelético los DAPC ensamblados con la distrofina actúan como una conexión entre el citoesqueleto interno y la matriz extracelular, anclando a las sintrofinas y distrobrevinas a la membrana muscular. La distrofina es esencial para mantener la integridad de este complejo y su ausencia provoca una reducción de los demás componentes del complejo en el sarcolema (Ervasti *et al.*, 1990).

En el caso de los complejos asociados con Dp71, se ha encontrado que la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) se une a la sintrofina a través de interacciones de los dominios PDZ, sugiriendo que los DAPC pueden regular la transducción de señales (Fuentes-Mera *et al.*, 2006), por lo que en pacientes con DMD hay pérdida de nNOS en el sarcolema (Blake & Kröger, 2000).

En células PC12 se ha demostrado la interacción citoplasmática de Dp71f con el complejo proteico de adhesión β 1-integrin, β -distroglicano, α 1-sintrofina y β -distrobrevina (Romo-Yáñez *et al.*, 2007). En el caso de Dp71d se ha demostrado que su interacción nuclear se da con β -distroglicano, β -distrobrevina, α 1-sintrofina, γ 1-sintrofina y ϵ -sarcoglicano. Algunos componentes del DAPC formado por Dp71d (β -distroglicano, β -distrobrevina) interactúan con las proteínas de la matriz nuclear actina y laminina B1 en la línea celular HeLa (Villarreal-Silva, Suárez-Sánchez, Rodríguez-Muñoz, Mornet, & Cisneros, 2010).

Se ha reportado que Dp71 se asocia con proteínas como β -distroglicano, distrobrevinas y sintrofinas y su presencia en estos complejos es necesaria para el anclaje y organización de las DAPC en el cerebro (Greenberg *et al.*, 1996).

En el trabajo de Aragón *et al.*, 2016, se reportó que las proteínas de Dp71_{dΔ71} (Dp71a), Dp71_{fΔ71} (Dp71ab) y Dp71_{eΔ71} (Dp71e) colocalizan con β-distroglicano y α1-sintrofina en células PC12 Tet-On diferenciadas y no diferenciadas. Sin embargo, Dp71_{dΔ71-74} (Dp71c) y Dp71_{eΔ71-74} (Dp71ec) se asocian en menor medida a estas moléculas.

Uno de los sitios en donde se localiza Dp71 es en la membrana plasmática (Rapaport *et al.*, 1993; Jung *et al.*, 1993). Esto posteriormente fue corroborado por Imamura & Ozawa (1998) quienes encontraron a Dp71 localizada en la membrana celular de astrocitos de ratón.

En el trabajo de Aragón *et al.* (2016) se reportó que las proteínas de Dp71_{dΔ71} (Dp71a), Dp71_{fΔ71} (Dp71ab) y Dp71_{eΔ71} (Dp71e) se localizan en la periferia/citoplasma de células PC12 tanto no diferenciadas como en diferenciadas con NGF y Dp71_{dΔ71}, Dp71_{eΔ71} y Dp71_{eΔ71-74} (Dp71ec) muestran un incremento en la localización nuclear en las células diferenciadas. Además, diferentes estudios han mostrado que algunas isoformas de Dp71 se encuentran en el núcleo, como el de González *et al.* (2000), donde se observó que las isoformas que carecen del exón 71 y 78 son citoplásmicas, mientras que la Dp71 que incluye dichos exones se localiza principalmente en el núcleo. En el estudio de Márquez *et al.*, (2003), se localizó a Dp71d endógena concentrada en el núcleo, siendo mayor cuando las células eran diferenciadas con NGF. De igual manera en el estudio de Alemán *et al.* (2001), encontraron que Dp71d y f, se localizan en el aparato de Golgi y en el núcleo de neuronas y astrocitos de ratas. A pesar de carecer de una señal de importe nuclear (NLS) en la proteína, se ha visto que la fosforilación por la cinasa de proteínas dependiente de calmodulina-Ca²⁺ facilita su entrada al núcleo (Calderilla-Barbosa, Ortega, & Cisneros, 2006). Sin embargo, se han identificado “motifs” NLS y señal de exporte nuclear (NES) responsables del transporte nucleocitoplasmático de Dp71d, siendo que, el importe y exporte al núcleo de Dp71d es mediado por IMPα/β1 y exportina-1/CRM1, respectivamente (Suárez-Sánchez *et al.*, 2014).

Aunque se sabe que mutaciones en el gen DMD son responsables de causar la distrofia muscular de Duchenne, diversos estudios han reportado la participación de isoformas de Dp71 en funciones específicas.

El retraso mental se presenta en el 30% de las personas con distrofia muscular de Duchenne, y estudios como el de Cotton *et al.* (2001) han demostrado que el coeficiente intelectual está afectado en estos pacientes. De igual forma, un estudio integral realizado por Desguerre *et al.* (2009) reportó que la ausencia de las distrofina en cerebro puede contribuir al retraso mental en pacientes con DMD.

Dicho retraso mental se debe a la ausencia de Dp71 y a las DAPC que son utilizadas como andamiaje por los receptores de glutamato y se requieren para la correcta plasticidad durante la transmisión sináptica (Daoud *et al.*, 2009). Además, el estudio de Miranda *et al.* (2011) demostró que en ratones que carecen de Dp71 existe una disminución de las vesículas sinápticas en la proximidad de la zona de acción sináptica.

Annese *et al.* (2016) identificaron células troncales/progenitoras neurales (CTPN) en cerebro de ratón silvestre y *mdx* adulto y concluyeron que la pérdida de distrofina sumada a la disminución de α - y β -dístroglicano y Dp71, junto con un incremento en apoptosis podría ser responsable de la alteración en el mantenimiento de células gliales resultando en fallas homeostáticas en el cerebro. Estos resultados pueden ser una explicación a la causa del retraso mental en los pacientes que sufren de DMD.

Varios estudios indican que Dp71 está involucrada en la diferenciación celular de las células PC12, en donde estimula la formación de neuritas. Estas células responden al estímulo con NGF, diferenciándose en células equivalentes a neuronas simpáticas. Los estudios muestran que los niveles de mRNA y de proteína Dp71 en células PC12 tratadas con NGF aumentan durante el proceso de diferenciación celular (Fig. 4) (Cisneros *et al.*, 1996). De la misma forma, Sarig *et al.* (1999) observaron una alta actividad del promotor durante el desarrollo y la diferenciación del sistema nervioso de ratones.

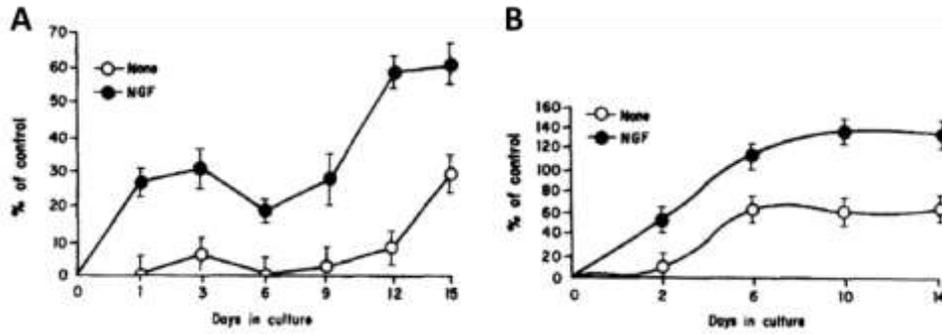


Figura 4. Niveles de Dp71 durante la diferenciación celular de PC12. A) Niveles de mRNA de Dp71 y **B)** Niveles de proteína Dp71, en presencia o ausencia de NGF, expresados como porcentaje de inducción comparado a los valores del día 0 (Cisneros *et al.*,1996).

En el trabajo de Márquez *et al.* (2003) observaron que la expresión de Dp71f aumenta 9 veces en el extracto total, durante la diferenciación de PC12 inducida por NGF (Fig. 5A) y se localizó a esta distrofina principalmente en citoplasma, mientras que la distribución de Dp71d aumentó 7 veces en el núcleo (Fig. 5B). Además, Acosta *et al.* (2004) determinaron la importancia de Dp71 en la extensión de las neuritas, analizando los efectos de la reducción en las cantidades endógenas de todas las isoformas Dp71. Los autores realizaron construcciones con RNA anti sentido para disminuir los niveles de las isoformas, observando células con menor diferenciación y alteración en la extensión de las neuritas (Fig. 6).

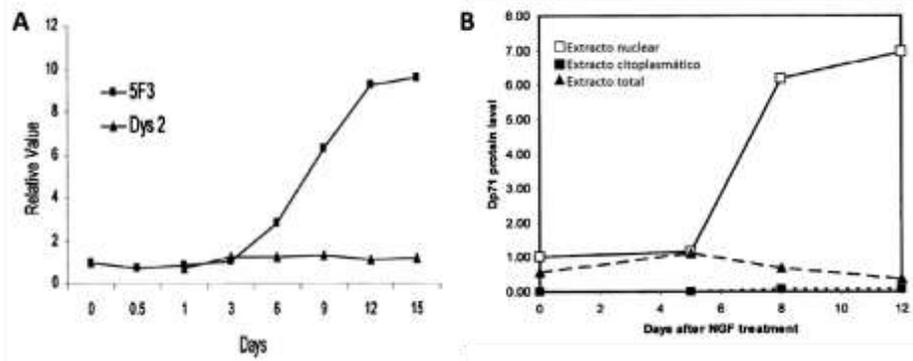


Figura 5. Expresión y distribución diferencial de las isoformas Dp71d y Dp71f en células PC12 durante la diferenciación inducida por NGF. A) Con los anticuerpos específicos para Dp71d (Dys2) y Dp71f (5F3) se evaluaron los niveles de las proteínas en células PC12 tratadas con NGF. **B)** Niveles de

la proteína Dp71d en diferentes fracciones celulares de células tratadas con NGF. Tomado de Márquez *et al.* (2003).

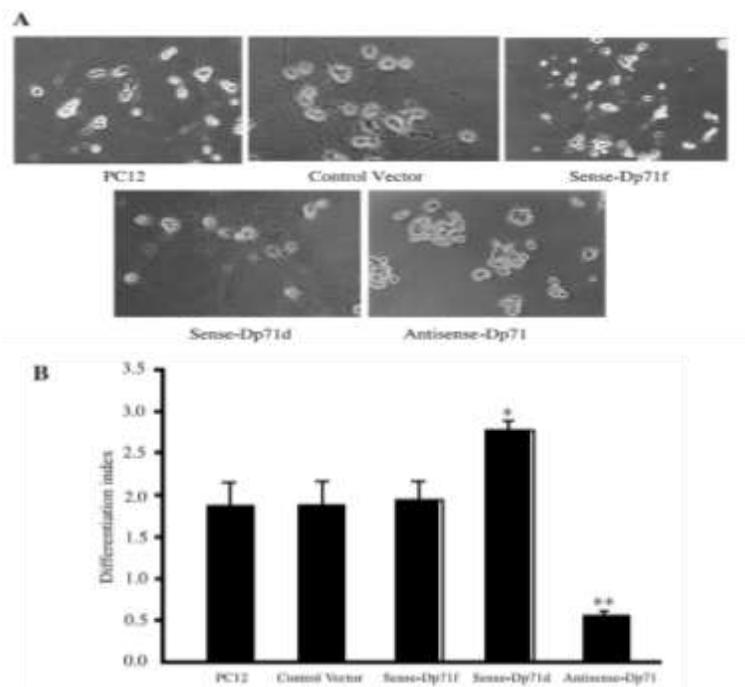


Figura 6. Inhibición de la diferenciación neuronal inducida por NGF en células PC12. A) Micrografías de contraste de fases ilustrando la morfología de los cultivos indicados a los 6 días de exposición a NGF. **B)** Niveles de diferenciación obtenidos de 5 clones diferentes para cada grupo. Los asteriscos representan diferencias significativas ($P < 0.05$). Tomado de Acosta *et al.* (2004).

Recientemente Aragón *et al.*, (2011) y Merino-Jiménez *et al.* (2016) demostraron que la sobreexpresión de la isoforma mutante de Dp71 Δ 78-79 favorece la diferenciación neuronal inducida con NGF y observaron que al comparar los perfiles proteicos de las células diferenciadas con las no diferenciadas, la sobreexpresión de esta mutante incrementa la expresión de la proteína HspB1, y que esta proteína es responsable de la estimulación del crecimiento de las neuritas.

En trabajos realizados por León Moreno, 2016, se encontró que la sobreexpresión de la isoforma Dp71d Δ 71-74 (Dp71c) incrementa notablemente el crecimiento de las neuritas en células PC12, en comparación con la sobreexpresión de la isoforma Dp71d Δ 71 (Dp71a) de las cuales alrededor del 80% de las células no presentaron neuritas (Fig. 7) (León-Moreno, 2016).

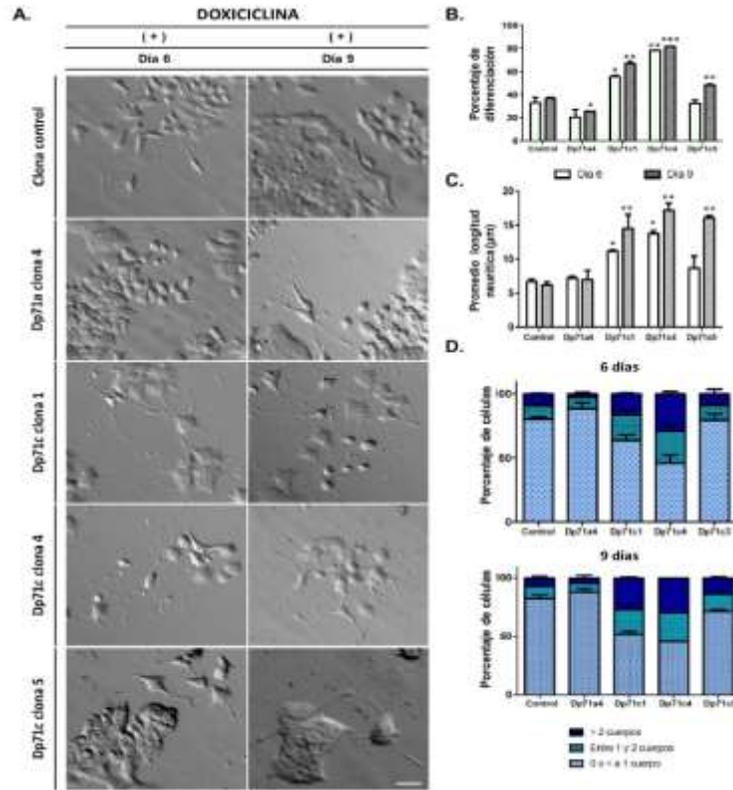


Figura 7. Diferenciación de las clonas PC12 Tet-On/Dp71a-4, Dp71c-1, Dp71c-4, Dp71c-5 y control durante 3 días con NGF. Las células se sembraron en cajas de cultivo p30 cubiertas con colágeno como se indica en materiales y métodos. **A)** Imágenes de las células diferenciadas durante 3 días con NGF. **B)** Porcentaje de células con neuritas. **C)** Promedio de longitud neurítica. **D)** Rango de diferenciación (León-Moreno, 2016).

1.4. Células troncales/progenitoras neurales (CTPN)

El desarrollo del sistema nervioso se lleva a cabo durante el estado embrionario, la placa neuronal da origen a las distintas regiones del SNC: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo y posteriormente se generan las regiones telencéfalo, mesencéfalo, cerebelo y medula espinal. Se ha descrito que el neuroepitelio es una región rica en células troncales (Greene & Copp, 2009). Desde los primeros estudios sobre células troncales se ha descrito su presencia en distintas regiones del SNC de embriones; sin embargo recientemente también se han encontrado en adultos, principalmente en el hipocampo y en la zona subventricular (SVZ) (Fig. 8) (Temple, 2001).

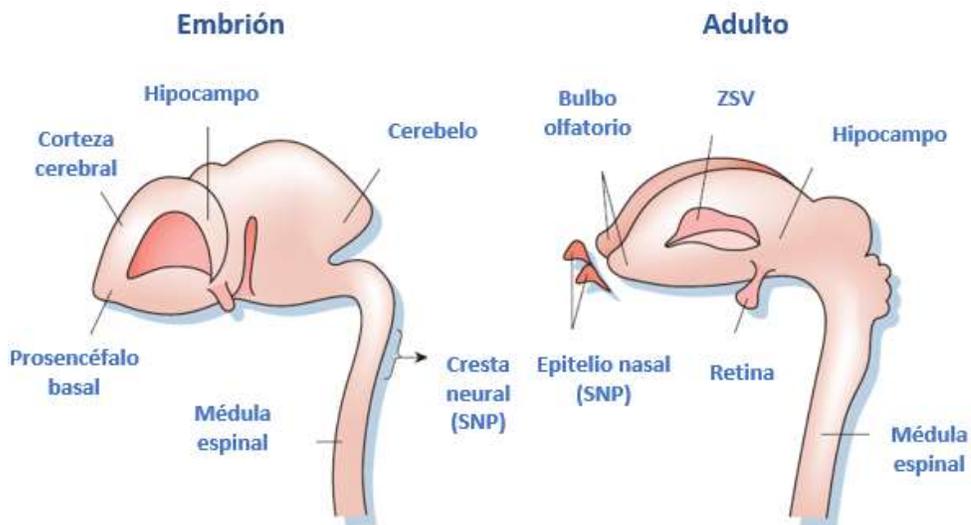


Figura 8. Regiones del SNC de embrión y adulto que contienen células troncales. (Modificado de Temple, 2001)

En mamíferos las células troncales/progenitoras son una fuente de células no diferenciadas y en constante renovación, en caso de daño o enfermedad son consideradas una fuente para el reemplazo de células funcionales.

La existencia de CTPN fue descrita por primera vez por Reynolds & Weiss (1992) en el SNC de mamíferos adultos. Las CTPN tienen la capacidad de auto renovarse y así estar en proliferación continua; además poseen multipotencialidad, es decir, pueden diferenciarse en uno de los tres tipos celulares del SNC: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Kalyani & Rao, 1998).

Goslin *et al.* (1988) demostraron que las células fetales removidas del cerebro y colocadas en cultivo *in vitro* pueden dar lugar a neuronas diferenciadas. Sin embargo, pueden mantenerse *in vitro* y sin diferenciarse, bajo la estimulación de factores mitógenos, como el factor de crecimiento epidermal (EGF, por sus siglas en inglés) y/o el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF2) (Tropepe *et al.*, 1999).

Las CTPN pueden expandirse continuamente *in vitro* como un clúster de células que flotan libremente, denominado neuroesfera, manteniendo su multipotencialidad a nivel clonal (Louis *et al.*, 2008).

Las células troncales aisladas de embrión o de adulto comparten varias características funcionales, así como la habilidad de formar neuroesferas en cultivo, auto renovarse y diferenciarse en los tres tipos de linajes ya mencionados. Adicionalmente, comparten la expresión de marcadores moleculares, entre los cuales se incluyen factores de transcripción de la familia Sox y Pax, miembros de las vías de señalización de Notch y Wnt y el filamento intermedio Nestina, entre otros (Pevny & Rao, 2003).

1.4.1. Diferenciación de células troncales/progenitoras neurales

Se han encontrado muchas moléculas que desempeñan funciones importantes en el cerebro en desarrollo y que además persisten en el cerebro adulto, por lo que definir los factores y sustratos que guían procesos como la neurogénesis ha sido de las áreas más investigadas.

Chang *et al.* (2004) demostraron que existe una transición de la capacidad de diferenciación de las células precursoras, que va de neurogénico a astrogénico durante el tiempo de cultivo *in vitro*, similar a las condiciones *in vivo*. Observaron que aquellos precursores cultivados por un largo tiempo presentaban las mismas propiedades que precursores obtenidos de estados de desarrollo más avanzados, por lo que es importante considerar la duración de la expansión de precursores durante el cultivo *in vitro*.

Durante el cultivo se puede restringir el linaje de la diferenciación a glía o a neuronas dependiendo del uso de distintos factores extracelulares que favorezcan uno u otro (Gage, 2000). Por ejemplo, Johe (1996) demostró que una exposición transitoria del factor neurotrófico ciliar (CNTF) y la hormona tiroidea T3, permite inducir el linaje glial (astrocitos y oligodendrocitos). El factor derivado de plaquetas (PDGF), la combinación de ácido retinoico con foscolina (Johe *et al.*, 1996), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Bernardino *et al.*, 2008) o la histamina (HA), por otro lado, favorecen la

diferenciación neuronal. El uso de ciertos factores para inducir el desarrollo a los diferentes linajes ha llevado a diversos grupos de investigación a identificar las cascadas de señalización que intervienen durante la elección de un destino u otro (Jessberger, Toni, Jr, Ray, & Gage, 2008).

1. ANTECEDENTES DIRECTOS

En nuestro grupo de trabajo se determinó que las CTPN expresan los transcritos de las distrofinas Dp427, Dp140, Dp71 y Dp40, en condiciones de proliferación y diferenciación (Fig. 9). De éstos, los últimos dos mantienen su expresión constante durante la diferenciación; lo anterior sugiere que Dp71 y Dp40 participen en etapas tempranas de la diferenciación de las CTPN (Romo-Yáñez *et al*, en preparación).

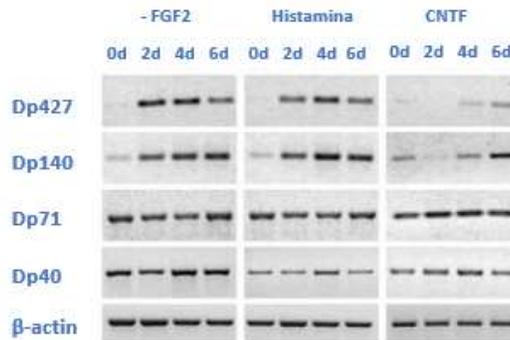


Figura 9. Expresión de mensajeros de las distrofinas durante la diferenciación de CTPN. Las células fueron diferenciadas durante 6 días, ya sea por retiro del factor FGF2 o por adición de histamina o CNTF. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada isoforma para el análisis por RT-PCR. La expresión del mRNA de Dp71 y Dp40 permanecen constantes mientras que Dp427 y Dp140 incrementan conforme aumenta la diferenciación. Modificado de (Romo-Yáñez *et al*, en preparación).

Los resultados obtenidos indican que existe procesamiento alternativo en los exones 71, 71-74 y 78 de los transcritos de distrofina presentes en las CTPN (Fig.10). Ya que la expresión de Dp71 y Dp40 permanece constante es probable que la frecuencia de expresión de las isoformas de estas proteínas sea la que cambie; sin embargo, los productos de procesamiento alternativo podrían corresponder a cualquiera de las distrofinas y no ser exclusivos de Dp71.

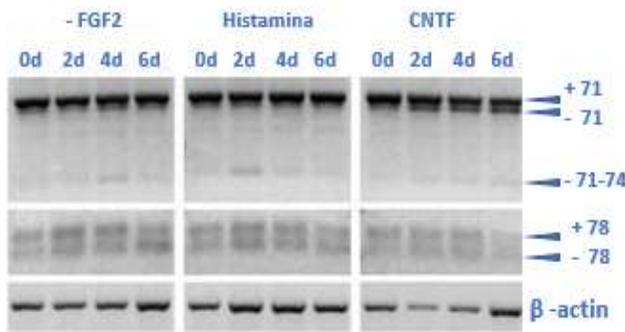


Figura 10. RT-PCR del procesamiento alternativo de los exones 71, 71-74 y 78. Las células fueron diferenciadas durante 6 días, ya sea por retiro del factor FGF2 o por adición de histamina o CNTF. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para identificar el procesamiento alternativo de los exones durante la diferenciación de las CTPN. La expresión de éstos es muy similar durante los 3 protocolos de diferenciación. Modificado de (Romo-Yáñez *et al*, en preparación).

La expresión de factores moleculares, como Sox2 que es indispensable durante el desarrollo embrionario temprano y es un factor crítico para controlar la multipotencialidad de las células (Suh *et al.*, 2007) o nestina, que es un filamento intermedio (Gilyarov, 2008), han sido utilizados para caracterizar a este tipo de células. Cuando las células troncales comienzan el proceso de diferenciación, dejan de expresar Sox2 y nestina, y empiezan a expresar marcadores de diferenciación. βIII tubulina y MAP2 (proteína asociada a microtúbulos) son proteínas específicas de neuronas, la primera es un elemento de microtúbulos de la familia tubulina y la segunda pertenece a una familia de proteínas encargadas de la formación de microtúbulos. GFAP (proteína ácido-fibrilar Glial) es una proteína que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto celular de astrocitos y por último O4, detecta sulfatos de la superficie de oligodendrocitos (Zecevic, 2004).

En nuestro grupo de trabajo, se caracterizaron cultivos de CTPN provenientes de embriones de rata (Fig. 10) y se detectó que la expresión del mensajero y la proteína de nestina disminuye conforme aumenta la diferenciación, sin importar el factor utilizado para diferenciar. Esto último en comparación con el aumento de la expresión de los marcadores de diferenciación; βIII tubulina incrementa más cuando se utiliza histamina, factor para restringir diferenciación a neuronas y GFAP cuando se utiliza CNTF, factor para restringir diferenciación al linaje glial. (Romo-Yáñez *et al.*, en preparación).

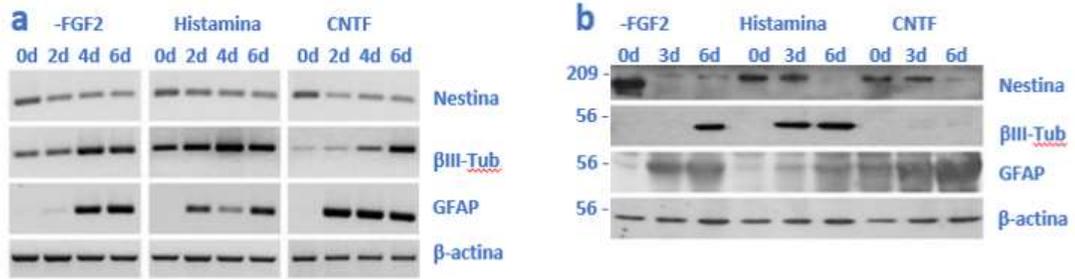


Figura 11. Expresión de nestina, β III-tubulina y GFAP durante la diferenciación del cultivo de CTPN. a) RT-PCR mostrando mRNA de nestina, β III-tubulina y GFAP. b) Western Blot mostrando proteínas de nestina, β III-tubulina y GFAP.

2. JUSTIFICACIÓN

La ausencia de la proteína Dp71 se ha relacionado con daños en el funcionamiento y desarrollo del sistema nervioso central, así como con fallas cognitivas en pacientes con DMD. Esta proteína ha sido ampliamente estudiada y se ha descrito su expresión en el cultivo *in vitro* de células troncales/progenitoras neurales provenientes de embriones de rata, así como participando en los procesos de crecimiento y diferenciación de células PC12.

El transcrito de Dp71 puede dar origen a distintas isoformas que difieren en su expresión y localización celular, sugiriendo que cada una puede tener distintas funciones. Se ha demostrado que las isoformas Dp71d $_{\Delta 71-74}$ (Dp71c) y Dp71d (Dp71), participan en la diferenciación de células PC12. Así, el estudio de estas isoformas, durante la proliferación y diferenciación de las células troncales/progenitoras neurales, es importante para entender la función que desempeñan durante el desarrollo del sistema nervioso central.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Obtener y transfectar cultivos de células troncales/progenitoras neurales para la expresión de las distrofinas Dp71d y Dp71d Δ 71-74.

3.2. Objetivos específicos

- Establecimiento de las condiciones para el cultivo primario de células troncales/progenitoras neurales (neuroesferas) de embriones (E14) de rata Wistar.
- Analizar diferentes condiciones para transfectar el cultivo primario de células troncales/progenitoras neurales con el vector pmaxGFP®.
- Construir los vectores recombinantes pCMVmyc/Dp71d y pCMVmyc/Dp71d Δ 71-74.
- Transfectar el cultivo de células troncales/progenitoras neurales y evaluar la expresión de las distrofinas Dp71d y Dp71d Δ 71-74 mediante ensayos de inmunofluorescencia.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Obtención del tejido neuroepitelial y establecimiento del cultivo primario en suspensión

El tejido neuroepitelial fue obtenido de la región dorso-medial de las vesículas telencefálicas de embriones de rata de 14 días de gestación (E14) (Fig. 13). Se sacrificaron por decapitación ratas Wistar hembras gestantes y los embriones fueron removidos del útero y transferidos a placas Petri con solución Krebs fría (NaCl 100 mM, KCl 2 mM, KH₂PO₄ 0.6 mM, NaHCO₃ 12 mM, glucosa 7 mM, rojo fenol 0.1%, BSA 0.3% y MgSO₄ 0.3 %, pH=7.4). La disección de la región dorso-medial de las vesículas telencefálicas fue realizada con ayuda de un microscopio estereoscópico.

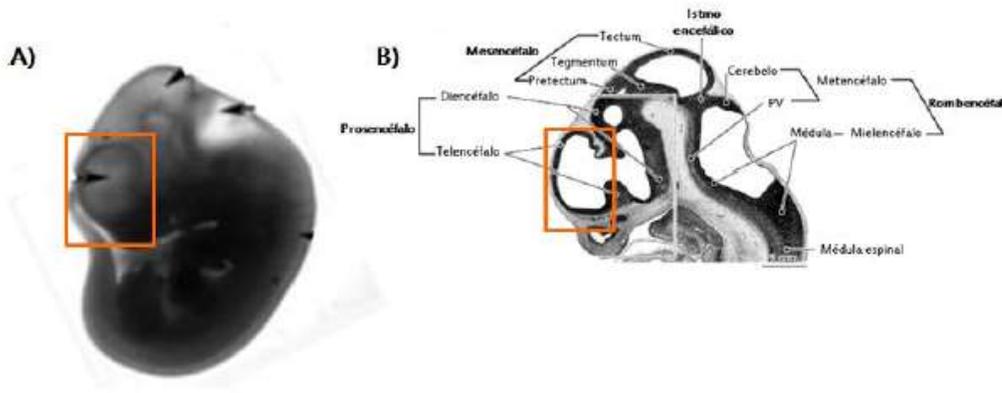


Figura 12. Morfología de los embriones de rata E14. Para la obtención del tejido neuroepitelial se realizó la disección de la región dorso-medial de las vesículas telencefálicas de los embriones de rata E14. **A)** Embrión de rata E14 visto a través del microscopio estereoscópico. Las vesículas telencefálicas (señaladas por el recuadro) se observan como un par de estructuras casi esféricas que se encuentran en la parte anterior de la cabeza, justo arriba del ojo. **B)** Corte sagital de un embrión de rata E14 en donde se señalan todas las estructuras que conforman el SNC de los embriones en este estadio de desarrollo. El recuadro señala la región de la cual se obtuvo el tejido para el cultivo primario de las CTPN. (Modificado de Paxinos, 2004)

El tejido obtenido se centrifugó 2 minutos a 78 g, se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado de la pastilla celular con PBS pH 7.4 estéril, centrifugando 2 minutos a 78 g. Se descartó nuevamente el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 500 µl de medio NeuroCult™ NS-A Basal Medium (Rat, STEMCELL TECHNOLOGIES) y se disoció mecánicamente. Se permitió que el tejido no disociado se asentara en fondo del tubo, y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo y estéril. Se resuspendió nuevamente el tejido

no disociado en 500 μ l de medio NeuroCult y se disoció mecánicamente por segunda ocasión. Se dejó precipitar el tejido no disociado y se pasó el sobrenadante al tubo con el sobrenadante anterior. La suspensión celular se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y la pastilla obtenida se volvió a resuspender en 1 ml de medio NeuroCult. Las células se contaron en una cámara de Neubauer, empleando colorante azul de tripano para identificar a las células viables. Se sembraron de 800,000 a 1 millón de células en suspensión, en cajas de cultivo p60 y se agregó el medio NeuroCult, FGF2 10 ng/ml, Heparina 2 μ g/ml y 80 μ g/ml de gentamicina (GEN). Estos cultivos de pasaje 0 (P0) se incubaron a 37°C en una atmósfera saturada de agua con 5.0% de CO₂. Se adicionaron 500 μ l de medio de cultivo con 10 ng/ml de FGF2 cada dos días hasta que las neuroesferas alcanzaron un diámetro entre 100 y 200 μ m (antes de que se observara hipoxia en el centro de las esferas). Cuando las células alcanzaron estos diámetros se realizó un pasaje (P1); para ello, se retiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS, el cual fue recuperado y centrifugado 5 minutos a 78 g, se descartó el sobrenadante y se procedió a los tratamientos de disociación de neuroesferas. Para la disociación mecánica se resuspendió la pastilla celular en 1 ml de medio NeuroCult y con ayuda de la micropipeta y la punta de 1000 μ l se disociaron las esferas mecánicamente triturando suavemente la pastilla de 25 – 35 ocasiones. Para la disociación enzimática se resuspendió la pastilla en 200 μ l de ACCUTASE® solution (Sigma) por cada volumen recuperado de una caja p60. Se incubó la suspensión a 37°C durante 5 minutos, a la mitad del tiempo se mezcló nuevamente con golpes suaves para asegurar que la suspensión de células estuviera bien mezclada. Bajo el microscopio se determinó la existencia de agregados restantes y se realizó una trituración mecánica suave con la micropipeta de 200 μ l. Se centrifugó durante 1 minuto, se descartó el sobrenadante y se hizo un lavado con 1 ml de NeuroCult. Se volvió a centrifugar 1 minuto, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 ml de medio de cultivo. Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer y sembradas en las condiciones previamente

mencionadas, con la adición diaria de FGF2 y de medio cada 2 días. Tras alcanzar las neuroesferas nuevamente el diámetro de 100-200 μm se realizó un segundo pasaje (P2).

Los experimentos de células en proliferación fueron realizados con cultivos de P2. Para el P2 las células fueron sembradas en condiciones adherentes, en cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina (PLL, 100 $\mu\text{g/ml}$).

Una vez que se realizó el P2 se mantuvieron las células en proliferación durante 3-4 días, por adición de FGF2, hasta que alcanzaron una confluencia mayor al 80% y se llevó a cabo la diferenciación de las células manteniéndolas 6 días en medio NeuroCult en ausencia de FGF2.

Se tomaron fotografías del cultivo correspondiente a las diferentes etapas, utilizando un microscopio de campo claro: primer día de cultivo (P0), antes de realizar el primer pase (P0/P1), antes de realizar el segundo pase (P1/P2) y después del segundo pase a los 6 días de diferenciación (P2).

4.2. Nucleofección

Los experimentos de nucleofección fueron realizados con cultivos de P2, antes de que las células se sembraran en condiciones adherentes. Se colocaron cubreobjetos previamente tratados con PLL en placas de 24 pozos (uno por pozo), se les añadió 0.5 ml de medio de cultivo NeuroCult y se pre-incubó en incubadora a 37°C/5% CO₂.

Durante el P2, después de contar las células viables, se centrifugaron las células requeridas (4 - 5 $\times 10^6$ por muestra a transfectar) durante 5 min a ~78 g y se retiró el sobrenadante. Cada precipitado de células fue resuspendido con 100 μl de Solución de Nucleofección del Kit de transfección Amaxa™ Rat NSC Nucleofector Kit (Lonza) a temperatura ambiente y se añadió el vector a transfectar (Tabla1). Posteriormente se transfirió la suspensión de células/DNA al cuvette certificado (cubriendo el fondo sin burbujas). En el equipo Amaxa™ Nucleofector 4D (Lonza) se seleccionó el programa apropiado y se insertó el cuvette con la suspensión en el Nucleofector Cuvette

Holder. Después de seleccionar el programa adecuado, se retiraron los cuvettes y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añadieron 500 μ l de medio de cultivo pre-incubado a cada cuvette y se transfirieron las muestras a los cubreobjetos, sembrando aproximadamente 200 mil células por pozo, en ese momento se les añadió FGF2 y las células se incubaron a 37°C/5% CO₂. Después de 24 horas se reemplazó el medio de cultivo con medio NeuroCult nuevo para las células que se dejarían de 3 a 6 días en diferenciación. Se realizó cambio de medio a las células en diferenciación cada 3 días, las condiciones de nucleofección se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones empleadas en los ensayos de Nucleofección

Ensayo	Vector utilizado	Concentración del vector	Programa de Nucleofección utilizado
Viabilidad celular	pmaxGFP®	2 μ g	CU-133 (HV) o EM-110 (HE)
Eficiencia de transfección	pmaxGFP®	2, 3, 4 y 10 μ g	CU-133 (HV)
Eficiencia de transfección	pmaxGFP®	4, 7 y 10 μ g	CU-133 (HV)
Evaluación de la expresión de las distrofinas Dp71	pCMVmyc-Dp71d, pCMVmyc-Dp71d Δ 71-74, Control sin DNA y Control Vector Vacío pCMVmyc	5 μ g	CU-133 (HV)

4.3. Análisis de la viabilidad celular

Se tomaron 10 imágenes por muestra con el objetivo de inmersión 40x usando un microscopio confocal Leica TCS, para cada imagen se escanearon secciones y se muestra el corte ecuatorial. Las imágenes fueron analizadas

con ImageJ y el plugin Cell counter, para contar el número de células que permanecieron adheridas 24 horas después de la transfección. Se calculó la viabilidad celular en porcentaje respecto al número de células que fueron sembradas.

4.4. Eficiencia de la transfección

Se tomaron 10 imágenes con el objetivo de inmersión 40x usando un microscopio confocal Leica TCS, para cada imagen, se escanearon secciones y se muestra el corte ecuatorial. Las imágenes fueron analizadas con ImageJ y el plugin Cell counter, para contar el número de células que presentan la marca de expresión de GFP y el número de células totales. Se calculó la eficiencia de transfección como un porcentaje de la relación entre las células transfectadas (con marca de GFP) y el número de células totales (núcleos con marca DAPI).

4.5. Construcción de vectores pCMV-myc/Dp71d pCMV-myc/Dp71d Δ 71-74

Las reacciones de PCR para la amplificación de Dp71d y Dp71d Δ 71-74 se llevaron a cabo utilizando una mezcla de reacción con 5 μ l de Buffer PCR 10X, 3.5 μ l de MgCl₂ 25 mM, 1 μ l de mix de dNTPs (10 mM cada uno), 1 μ l (200 ng/ μ l) de cada uno de los oligonucleótidos EcoRI-Exon1 y Dp71dR-Not (Tabla 2), 100 ng de cada plásmido pGEMTeasy-Dp71d y pTREpurmyc-Dp71d Δ 71-74, 0.3 μ l de Taq DNA Polimerasa (5 U/ μ l) y ajustando a un volumen de 50 μ l con agua miliQ (MQ) estéril. Las condiciones de amplificación empleadas se describen en la Tabla 2. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.2% a 100 V durante 1.5 horas.

Después de la reacción de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V durante 1 hora, teñido con bromuro de etidio 5 μ g/ml. El DNA amplificado fue visualizado en un transiluminador de luz UV y se cortó la fracción del gel que contenía al producto de PCR. Posteriormente se colocó esta fracción del gel en una cámara de electroelución, previamente cargada

con 150 μ l de acetato de amonio 7 M y se corrió a 100 V durante 1.5 horas. Transcurrido este tiempo, se recuperó el acetato de amonio (400 μ l) y se precipitó el DNA agregando 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío (1000 μ l) y dejando incubar a -20°C toda la noche. A continuación, la muestra se centrifugó durante 15 minutos a 11.290 g a 4°C , se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 75%, centrifugando durante 15 minutos a 11.290 g a 4°C . Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el producto purificado en 10-15 μ l de agua MQ. Los productos de PCR purificados fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

Se realizó una reacción de poliadenilación usando 10 μ l del producto de PCR purificado y 2.5 μ l de una mezcla previamente preparada con 5 μ l Buffer PCR 10X, 3.5 μ l de MgCl_2 25 mM, 1 μ l de mix de dNTPs (10 mM de cada uno) y 0.3 μ l de Taq DNA Polimerasa (5 U/ μ l). Esta mezcla se sometió a un ciclo de extensión a 72°C durante 20 minutos en el termociclador.

Para hacer la ligación de los productos de PCR Dp71d y Dp71d Δ_{71-74} en el vector de clonación, se empleó el kit pGEM-T Easy Vector System (Promega) y se preparó la reacción siguiendo las instrucciones del fabricante: 5 μ l de Buffer de ligación rápida, 1 μ l del vector pGEM (50 ng), 1 μ l de ligasa T4 DNA con 35 y 15 ng de los productos de PCR Dp71d y Dp71d Δ_{71-74} respectivamente, previamente adenilados y ajustando a un volumen de 10 μ l. Se incubó la reacción durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente a 4°C toda la noche.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos empleados en ensayos de PCR, condiciones de reacción y tamaño del producto amplificado

DNA amplificado	Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del prod. de PCR	Condiciones de PCR
Dp71d	EcoRI-Exon1	GTAGAATT <u>CACATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACG</u>	1,859 pb	95°C/2min
Dp71d _{Δ71-74}	Dp71dR-Not	GATCTAG <u>CGGCCG</u> GCTACATTGTGTCCTCTCTCATTGGC	1,531 pb	95°C/30s, 68°C/3min, 35 ciclos y 72°C/7min
Dp71d Exones 69-75	Ex69F	CATGGTAGAGTATTGCACTCCG	564 pb	95°C/2min
Dp71d _{Δ71-74} Exones 69-75	Ex75R	GGAGGAGATGGCAGTGGAGAC	234 pb	95°C/30s, 55°C/30s, 72°C/20seg, 28 ciclos y 72°C/7min
	Ex77U	CCTTCCCTAGTTCAAGAG		
Dp71d	Dp71dR-Not	GATCTAG <u>CGGCCG</u> GCTACATTGTGTCCTCTCTCATTGGC		
Secuenciación	247	TCTGCAGGATATCCATGGGCTGATC	---	94°C/5min
	Exon1	ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACG		94°C/30s,
	U562	CAGTTGGGTGAAGTTGCCTCCTTTG		55°C/20s,
	1366	AGGAGACGGCAGTGGGGACAG		60°C/4min, 40 ciclos y 72°C/7min
	Ex77U	CCTTCCCTAGTTCAAGAG		
Dp71d _{Δ71-74}	Dp71dR-Not	GATCTAG <u>CGGCCG</u> GCTACATTGTGTCCTCTCTCATTGGC		
Secuenciación	247	TCTGCAGGATATCCATGGGCTGATC	---	
	Exón 1	ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACG		
	U562	CAGTTGGGTGAAGTTGCCTCCTTTG		

Se inoculó una colonia de células de *E. coli* cepa DH5 α en 4 ml de medio SOC (Bacto Triptona 2%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Glucosa 20 mM) y se incubó durante 16 horas a 37°C con agitación. Posteriormente se inocularon 550 μ l de la suspensión bacteriana en 55 ml de medio SOC y se incubó nuevamente a 37°C con agitación, durante 2.5 horas hasta obtener una suspensión con una densidad óptica (A_{550}) de 0.4-0.6. La suspensión se centrifugó a 1250 g durante 15 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en FSB (KCl 100 mM, CaCl₂ 50 mM, CH₃COOK 10 mM y Glicerol al 10% w/v, pH 6.2) a 4°C. Se incubó durante 15 minutos a 4°C y después se centrifugó a 1250 g durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 2 ml de FSB frío y se añadieron 70 μ l de DMSO, incubando en hielo durante 5 minutos; se añadieron 70 μ l de DMSO y se incubó en hielo 15 minutos más. Finalmente se prepararon alícuotas de 150 - 200 μ l, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su posterior uso.

Se emplearon células competentes de *E. coli* cepa DH5 α para ser transformadas con el vector pGEM-T Easy-Dp71 (Promega). Se añadió el producto de ligación (10 μ l) a una alícuota previamente descongelada de células competentes DH5 α , se incubó en hielo durante 30 minutos y posteriormente se realizó choque térmico colocando la muestra en un baño de agua a 42°C durante 90 segundos y enseguida en hielo durante 2 minutos. El volumen completo de las células fue transferido a un tubo Eppendorf con 500 μ l de medio SOC. Se incubó a 37°C durante una hora con agitación y posteriormente se sembraron placas de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron a 37°C durante 18 horas.

De las placas sembradas se identificaron colonias para caracterizar la presencia de los plásmidos pGEMTeasy-Dp71d y pGEMTeasy-Dp71d Δ 71-74. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando una mezcla de reacción con 5 μ l de Buffer PCR

10X, 3.5 μ l de MgCl₂ 25 mM, 1.5 μ l de mix de dNTPs (10 mM cada uno), 0.5 μ l (200 ng/ μ l) de cada uno de los oligonucleótidos Ex69F y Ex75R (Tabla 2), 0.3 μ l de Taq DNA Polimerasa (5 U/ μ l) y ajustando a un volumen de 50 μ l con agua MQ estéril. Utilizando palillos estériles, y en presencia de mechero, se picó ligeramente cada una de las colonias seleccionadas y se colocó dentro de cada

tubo de PCR, las condiciones de amplificación empleadas se describen en la Tabla 2. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.2% a 100 V durante 1.5 horas.

Para la purificación de los plásmidos, las colonias seleccionadas se inocularon en 3 ml de medio LB con ampicilina y se incubaron en agitación durante 18 horas a 37°C. Después de incubar, cada muestra se centrifugó a 9.486 g durante 5 minutos a 4°C se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 200 µl de solución de resuspensión (glucosa 1 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8.0), se añadieron 5 µl de RNasa A (20 mg/ml) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadieron 400 µl de solución de lisis (SDS 1%, NaOH 0.2 N) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 400 µl de solución neutralizadora (CH₃COONH₃ 7.5 M), se incubó durante 10 minutos en hielo seco y se centrifugó a 15.366 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y el DNA plasmídico se precipitó añadiendo 0.6 volúmenes de isopropanol e incubando a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 15.366 g por 15 minutos a 4°C, el precipitado se resuspendió en 200 µl de agua MQ estéril y se re-precipitó con 2.5 volúmenes (500 µl) de etanol absoluto a -20°C, incubando en hielo seco por 20 minutos y en seguida se centrifugó a 15.366 g por 15 minutos a 4°C. La pastilla obtenida se secó al vacío y finalmente se resuspendió en 30 µl de agua MQ estéril. El DNA se cuantificó en espectrofotómetro de luz UV a 260 nm y se verificó su pureza mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 80 V durante 45 minutos. Los vectores fueron almacenados a -20°C hasta su posterior utilización.

Se realizó secuenciación automática de las isoformas clonadas de Dp71d y Dp71d_{Δ71-74}, mediante el uso del kit PRISM™ Ready Reaction DyeDeoxy™ Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Se prepararon reacciones con 8 µl del mix de reacción Terminator Ready Reaction Mix que contiene AmpliTaq DNA Polimerasa FS, dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dUTP), ddNTPs (A-terminador con colorante dicloro-R6G, C-terminador con colorante dicloro-ROX, G- terminador con colorante dicloro-R110, T- terminador con colorante dicloro-TAMRA), MgCl₂ y Buffer Tris-HCl pH 9.0. Se añadieron 500 ng de DNA, 800 ng

de cada oligonucleótido (247, Exón 1, U562, 1366, Dp71dR-Not y Ex77U para Dp71d, 247, Exón 1, U562, Dp71dR-Not y Ex77U para Dp71d Δ 71-74, Tabla 2) y se ajustó cada reacción a un volumen de 20 μ l con agua MQ estéril. La reacción se llevó a cabo en un termociclador, los productos obtenidos se precipitaron con 80 μ l de isopropanol al 75%, incubando 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugando a 15.366 g durante 20 minutos. La pastilla obtenida se lavó con 250 μ l de isopropanol al 75% centrifugando 8 minutos a 15.366 g. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se secó la pastilla en un secador de vacío durante 15 minutos a 30°C. Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando el programa Clustal Omega de EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Se realizó una doble digestión utilizando 1 μ l de la enzima NotI (10 unidades/ μ l, Thermo Scientific), 3 μ l del Buffer 2.1 10x (New England Biolabs® inc), 3 μ l de BSA (10 mg/ml, New England Biolabs® inc), 5, 7 y 1 μ l de DNA de los plásmidos pGEMTeasy-Dp71d, pGEMTeasy-Dp71d Δ 71-74 y pCMV-myc-N (Clontech), respectivamente. Se ajustó el volumen a 30 μ l con agua MQ estéril, se incubó durante 2 horas a 37°C en agitación. Posteriormente se agregaron 2 μ l de la enzima EcoRI (20,000 unidades/ml, New England Biolabs® inc) y se dejó en las mismas condiciones de incubación toda la noche. Los fragmentos de la digestión fueron visualizados en geles de agarosa al 1.2% a 100 V durante 1.5 horas, recortados y purificados por electroelución.

Los fragmentos purificados por electroelución fueron diluidos en 10 μ l de agua MQ estéril. La reacción de ligación para cada isoforma se preparó con 1 μ l del vector aceptor pCMV-myc, 10 μ l del fragmento correspondiente purificado, 1.5 μ l de Buffer 10x (Invitrogen), 1 μ l de ligasa T4 DNA (Invitrogen) ajustando a un volumen de 15 μ l. Se incubó cada reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos y 2 horas a 16°C. Posteriormente se utilizaron 3 μ l para la transformación de células competentes de *E. coli* cepa DH5 α , las placas sembradas se dejaron a 37°C en incubadora toda la noche. Las células transformantes se analizaron por PCR de colonia.

Para la purificación de los plásmidos que serían usados en las reacciones de secuenciación y posteriores transfecciones, las colonias seleccionadas se inocularon en 100 ml de medio LB con ampicilina y se incubaron en agitación

durante 18 horas a 37°C. Después de incubar, cada muestra se centrifugó a 5.018 g durante 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 4 ml de solución de resuspensión (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8.0), se añadieron 100 µl de RNasa A (10 mg/ml) y se incubó durante 5 minutos en hielo. A continuación, se añadieron 8 ml de solución de lisis fresca (SDS 1%, NaOH 200 mM) y se incubó 5 minutos en hielo, se añadieron 6 ml de solución neutralizadora (CH₃COONH₃ 7.5 M), se incubó durante 10 minutos en hielo y se centrifugó a 11.290 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y el DNA plasmídico se precipitó añadiendo 1 volumen de isopropanol incubando toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó a 11.290 g por 15 minutos a 4°C, el precipitado se lavó 2 veces con 4 ml de etanol al 70%, centrifugando a 11.290 g durante 3 minutos a 4°C entre cada lavado. La pastilla obtenida se secó al vacío y finalmente se resuspendió en 1 ml de agua MQ estéril. El DNA se cuantificó en espectrofotómetro de luz UV a 260 nm y se verificó su pureza mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 80 V durante 45 minutos. Los plásmidos fueron almacenados a -20°C hasta su posterior utilización. Se realizó secuenciación automática de las isoformas clonadas de Dp71d y Dp71d Δ 71-74, mediante el uso del kit PRISM™ de acuerdo con lo descrito anteriormente.

4.6. Transfección de células PC12 Tet-On con plásmidos pCMV-myc/Dp71d y pCMV-myc/Dp71d Δ 71-74

Se crecieron células PC12 Tet-ON hasta alcanzar una confluencia del 90% en placas de 6 pozos tratadas previamente con colágena, y en cubreobjetos previamente tratados con PLL. Se transfectaron con 2 y 4 µg de cada vector (pCMV-myc, pCMV-myc/Dp71d y pCMV-myc/Dp71d Δ 71-74). Por muestra se colocaron 100 µl de OptiMEM (Gibco) y 5 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) en un tubo, y 100 µl de OptiMEM más el vector en otro tubo. Se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y se juntó el contenido de los dos tubos dejándose incubar 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 800 µl de OptiMEM y se añadió el medio de transfección a las células, incubándolas a 37°C/5% CO₂. 5 horas después se realizó cambio de medio utilizando medio de crecimiento DMEM (Gibco).

4.7. Inmunofluorescencia Indirecta

Se cultivaron las clonas de las células PC12 Tet-On y CTPN transfectadas en cubreobjetos recubiertos de PLL durante 24 horas. Se lavaron los cubreobjetos con buffer CB 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 1x, los portaobjetos se bloquearon con 0.5% de gelatina por 40 min y se incubaron con los anticuerpos primarios (Tabla 3) toda la noche a 4 °C. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos para detectar el anticuerpo primario, incubando 1.5 horas 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 células transfectadas con pmaxGFP® fueron fijadas y teñidas con DAPI. Las imágenes se tomaron con el objetivo de inmersión 63x usando un microscopio confocal Leica TCS. Para cada imagen (10 a 15) se escanearon secciones, el corte ecuatorial muestra la localización celular de las proteínas analizadas.

Tabla 3. Características de los anticuerpos empleados

Cultivo celular	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
PC12 Tet-On	Anti-Myc ¹	WB: 1:200	Monoclonal de ratón	1:7,500
		IF: 1:200	Monoclonal Alexa 488	1:300
	Anti-Grb2 ¹	WB: 1:100	Policlonal de conejo	1:10,000
	Anti-β-distroglicano ²	IF: 1:50	Policlonal Alexa 594	1:200
CTPN	Anti-Myc ¹	IF: 1:200	Monoclonal Alexa 488	1:300
	Nestina ³	IF: 1:100	Policlonal Alexa 594	1:200

WB: Western Blot. IF: Inmunofluorescencia. Anticuerpos obtenidos de: ¹Santa Cruz Biotechnology, ²Dr. Dominique Mornet y ³Covance.

4.8. Extracción de proteína total y Western Blot

Las células fueron cosechadas 24 horas después de la transfección, lavando las cajas con el mismo medio para recuperar las células y se centrifugó por 5 minutos a 1.960 g. Para extraer la proteína total se añadieron 100 µl de Buffer de extracción (Tris HCl 50 Mm, NaCl 150 Mm, Tritón 1%, inhibidor de proteasas 1x) y se incubó durante 20 minutos. Las proteínas extraídas fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior utilización. Se preparó la muestra de cada extracción agregando buffer de carga (Tris HCl 50 mM, SDS 2%, β-mercaptoetanol 2%, Glicerol 4% y azul de bromofenol 0.1%, pH 6.8) e hirviendo durante 10 minutos.

Las muestras fueron analizadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% (Acrilamida--bisacrilamida 29.2-0.8%, Trizma 1.5 M pH 8.8, H₂O, SDS 10%, APS 10%, Temed) un volumen equivalente a 20 – 30 µg de proteína 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 TrisHCl pH 8, 150 Mm NaCl, 0.5% Tween 20) por 1 hora en agitación. Se realizaron lavados y se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 3) a 4°C. 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 horas 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 Grb₂ como control de carga. En la Tabla 3 se muestran los anticuerpos que fueron utilizados, así como sus diluciones.

5. RESULTADOS

5.1. Establecimiento de las condiciones para el cultivo primario de CTPN

Los cultivos primarios de CTPN se realizaron en el laboratorio de acuerdo con lo descrito en la sección de materiales y métodos. Para este cultivo se utilizó el medio de cultivo NeuroCult kit Proliferation Rat, que es un medio estandarizado libre de suero que permite el cultivo de células troncales y progenitoras neurales, manteniendo sus propiedades de auto-renovación y multipotencialidad. Para comprobar las características de las células en cultivo, se realizó un ensayo de neuroesferas a lo largo de las distintas etapas del cultivo.

En la Fig. 13 se muestran las fotografías de campo claro que corresponden a cada una de las etapas del cultivo primario. Como puede observarse las células individuales tienen la capacidad de formar neuroesferas y éstas una vez dissociadas, volver a formar neuroesferas (Fig. 13a-b). El aumento en el tamaño de las neuroesferas es consecuencia de la proliferación constante de las células y cuando una de éstas tiene la capacidad de formar una neuroesfera a partir de ella misma, es porque se está autorrenovando (Fig. 13c). Por lo que un aumento en la cantidad de neuroesferas presentes es consecuencia de la autorrenovación continua de las células. Finalmente, la última fotografía corresponde al cultivo en condiciones adherentes a los 6 días de diferenciación, donde podemos observar la formación de neuritas y la capacidad de cada célula de diferenciarse (Fig. 13d).

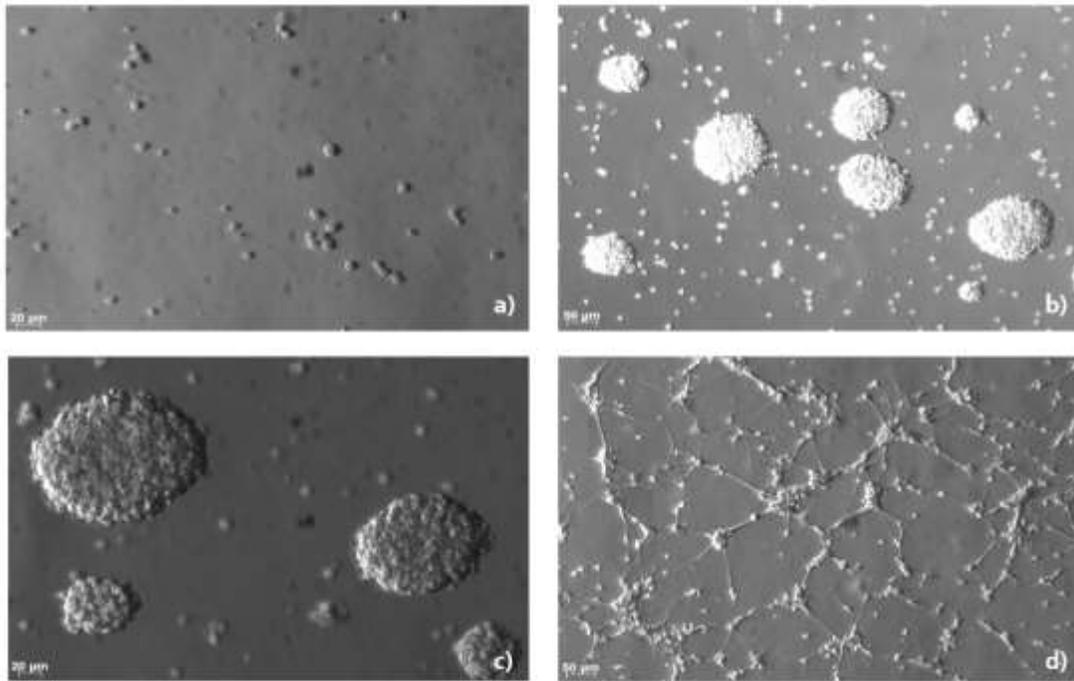


Figura 13. Cultivo de CTPN en proliferación y diferenciación (Ensayo de Neuroesferas): a) células individuales del primer día de cultivo, correspondiente a P0, **b)** Neuroesferas correspondientes al P0 minutos antes del primer pase (P1), **c)** Neuroesferas correspondientes al P1 minutos antes del segundo pase (P2) y **d)** CTPN en monocapa a 6 días de diferenciación. Se muestra las fotografías en campo claro y las barras muestran la amplificación a la que fueron tomadas las fotografías.

Durante el ensayo de neuroesferas se detectó que el factor limitante para obtener un buen rendimiento de células después del P2, es el método de disociación de éstas. Se realizaron pruebas con distintos métodos de disociación de neuroesferas de acuerdo con lo descrito en la sección de materiales y métodos. En la Fig. 14 se puede observar que al utilizar Accutase®, se incrementó el número de células para el P2 hasta 2.3 veces, por el contrario, el método mecánico generó una pérdida de células de 0.8 veces con respecto al P0.

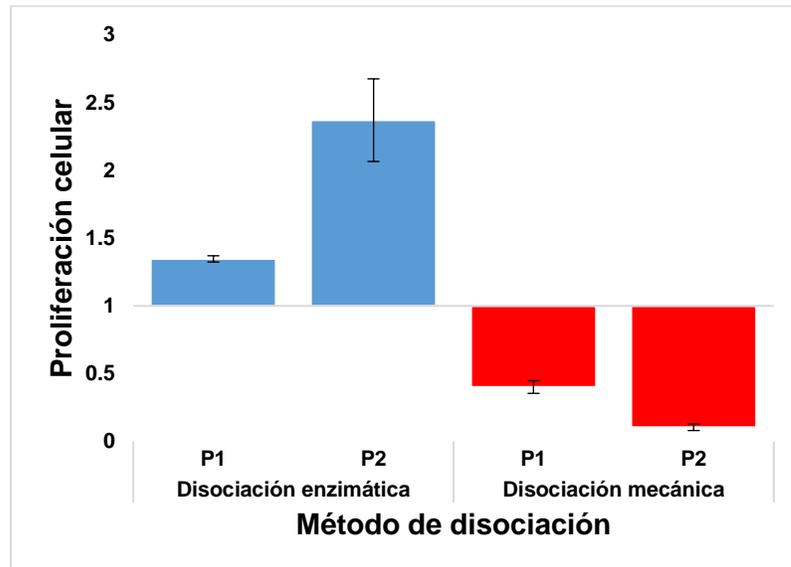


Figura 14. Efecto de los métodos de disociación, enzimático y mecánico, de las neuroesferas del cultivo de CTPN. Proliferación celular relativa, calculada a partir de la relación entre el número de células en los pasajes 1 y 2 (después de la disociación) y la cantidad de células obtenidas de la disociación del pase 0. Disociación enzimática: Accutase. Los datos de la gráfica corresponden a dos experimentos independientes.

5.2. Establecimiento de las condiciones para la nucleofección de pmaxGFP®

Los ensayos de nucleofección se llevaron a cabo como se describe en la sección de materiales y métodos, utilizando los programas HV y HE. Se usó el kit Amaxa™ Rat NSC Nucleofector, el cual es específico para el cultivo primario de CTPN de rata y contiene el vector pmaxGFP®. El equipo Amaxa™ Nucleofector 4D cuenta con distintos programas de transfección precargados para uso de cada kit, las características de estos programas son conocidas exclusivamente por el proveedor.

En la Fig. 15 observamos que las células que fueron transfectadas utilizando el programa HV mantienen una viabilidad celular de 35.76% 24 horas después de la transfección, lo que corresponde a 5 veces más que la viabilidad obtenida utilizando el programa HE, siendo ésta del 7.28%. Adicionalmente, evaluamos la eficiencia de transfección de cada programa (Fig. 16) y observamos que con el programa HE se obtuvo una eficiencia del 2.99%, sólo 0.71% mayor a lo obtenido con el programa HV.

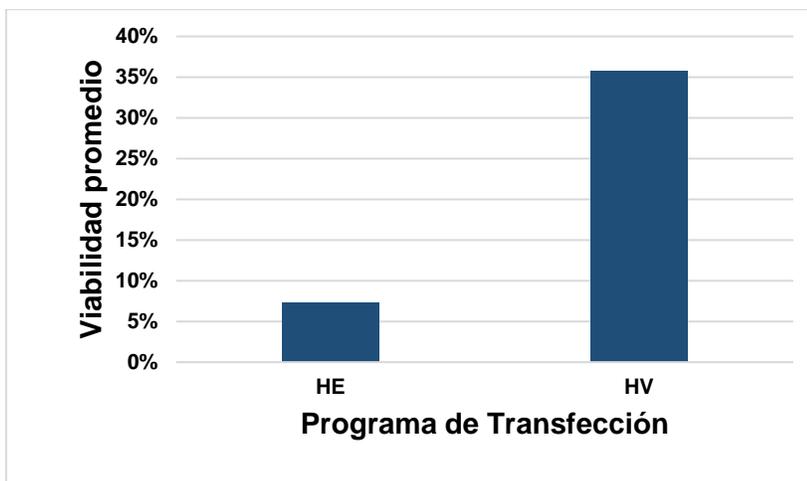


Figura 15. Viabilidad a las 24 horas después de la nucleofección. Determinación del número de células después de la nucleofección con 2 µg de pmaxGFP® utilizando los programas de transfección High Expression (HE) y High Viability (HV). Las células fueron contadas utilizando el programa ImageJ con el plugin Cell counter. La viabilidad celular, expresada en % se calculó con el promedio de la cantidad de células presentes de 10 fotografías aleatorias y representa la cantidad de células adheridas 24 horas después de la nucleofección en relación al número de células sembradas después de la nucleofección. Los datos de la gráfica corresponden a un único experimento.

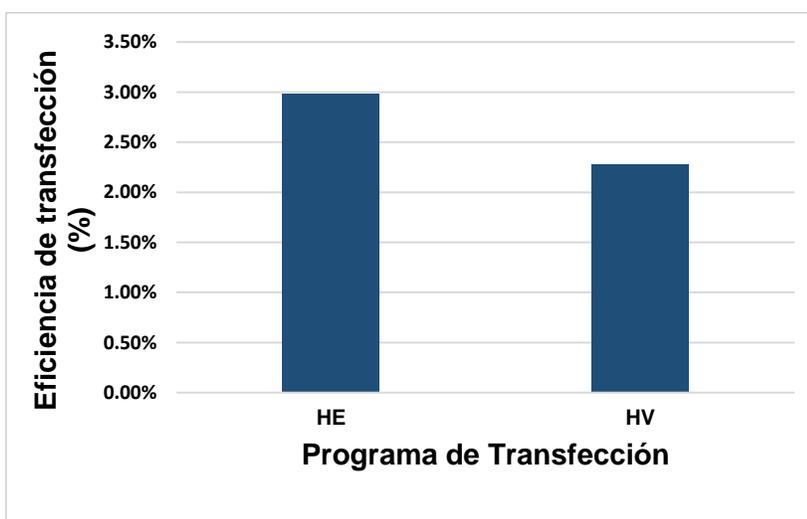


Figura 16. Eficiencia de transfección utilizando nucleofección. Determinación del número de células después de la nucleofección con 2 µg de pmaxGFP® con los programas de transfección High Expression (HE) y High Viability (HV). Las células fueron contadas utilizando el programa ImageJ con el plugin Cell counter. La eficiencia de transfección representa la relación entre células que expresan GFP y las células presentes por campo 24 horas después de la nucleofección y se calculó con el promedio de 10 fotografías aleatorias por muestra. Los datos de la gráfica corresponden a un único experimento.

A continuación, se analizó la expresión de GFP que como se puede ver en la Fig. 17, el número de células transfectadas es bajo en comparación con el

número de células presentes en el campo. En la Fig. 18 se ve la ampliación de una célula transfectada con GFP y podemos observar que GFP se expresa en todo el cuerpo celular.

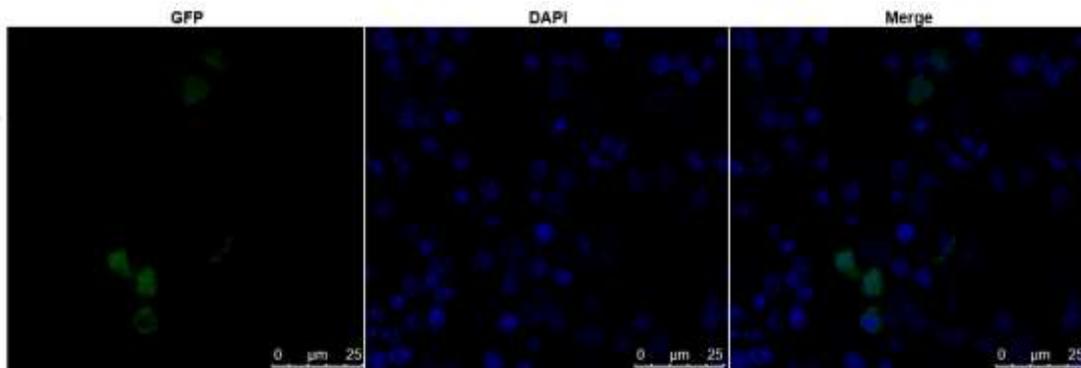


Figura 17. Expresión de GFP en CTPN en proliferación. Fotografías tomadas 24 horas después de la nucleofección, utilizando el programa HV como se indica en materiales y métodos. Se utilizaron 2 μg del vector pmaxGFP[®] y 5×10^6 células en P2. En los primeros paneles se observa la expresión del vector pmaxGFP[®] (verde) y en los terceros el "Merge" con tinción de DAPI (azul) para los núcleos. La expresión de GFP se encuentra en todo el cuerpo celular. La barra blanca representa la escala de 25 μm , ampliación a la cual fueron tomadas las fotografías.

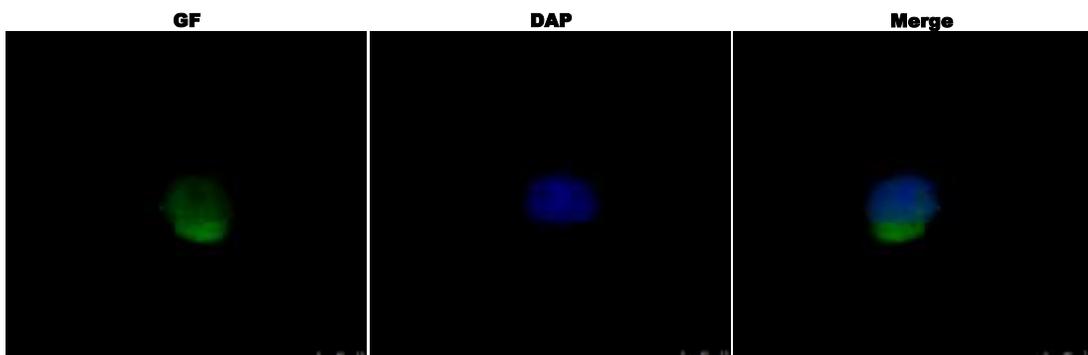


Figura 18. Expresión de GFP en CTPN en proliferación (Ampliación). Fotografías tomadas 24 horas después de la nucleofección, utilizando el programa HV como se indica en materiales y métodos. Se utilizaron 2 μg del vector pmaxGFP[®] y 5×10^6 células en P2. En los primeros paneles se observa la expresión del vector pmaxGFP[®] (verde) y en los terceros el "Merge" con tinción de DAPI (azul) para los núcleos. La expresión de GFP se encuentra en todo el cuerpo celular. La barra blanca representa la escala de 7.5 μm , ampliación a la cual fueron tomadas las fotografías.

Se realizó un ensayo para determinar la eficiencia de transfección de las CTPN utilizando 4 concentraciones distintas del vector pmaxGFP[®], como se describe en la sección de métodos y materiales. Se observó que al usar 2, 3 y 4 μg las eficiencias de transfección fueron del 2.5 %, 4.1 % y 14.2 %, respectivamente (Fig. 19). Por lo anterior, se utilizaron 10 μg de plásmido con la intención de mejorar la eficiencia de transfección; sin embargo, ésta fue del 2.75%, similar a

la obtenida con 2 μg . Se realizó un segundo ensayo utilizando 4, 7 y 10 μg del vector pmaxGFP[®] para explorar las eficiencias de transfección entre estos límites. La eficiencia de transfección obtenida utilizando 7 μg del vector pmaxGFP[®] fue de 12.2%, siendo menor a la obtenida con 4 μg .

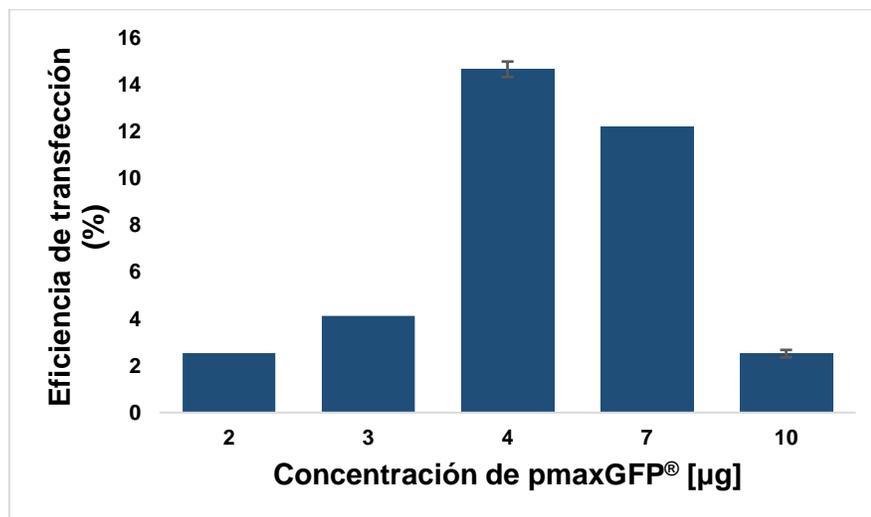


Figura 19. Eficiencias de transfección de las CTPN. Conteo celular después de la nucleofección con 2, 3, 4, 7 y 10 μg de pmaxGFP[®]. Las células fueron contadas utilizando el programa ImageJ con el plugin Cell counter; la eficiencia de transfección, expresada en porcentaje (%), se calculó con el promedio de 10 fotografías aleatorias como la relación de células transfectadas en relación con las células totales. Los datos obtenidos de 4 y 10 μg corresponden a dos experimentos independientes, el resto corresponde a un único experimento.

Para saber si el vector mantendría su expresión después del tratamiento de diferenciación, se retiró el factor de crecimiento FGF2 del medio durante los 6 días siguientes a las 24 horas de la nucleofección. Como se puede observar en la Fig. 20, la expresión de GFP se mantuvo después de los 6 días de diferenciación del cultivo de CTPN. Independientemente de la concentración del vector utilizada, se encontraron células diferenciadas expresando a la proteína GFP en todo el cuerpo celular, incluyendo las neuritas.

Adicionalmente, de acuerdo con las imágenes de campo claro, se trata de un cultivo celular en diferenciación puesto que se observan células diferenciadas que no expresan a GFP. Sin embargo, se puede observar daño celular causado por el tratamiento eléctrico que implica la nucleofección.

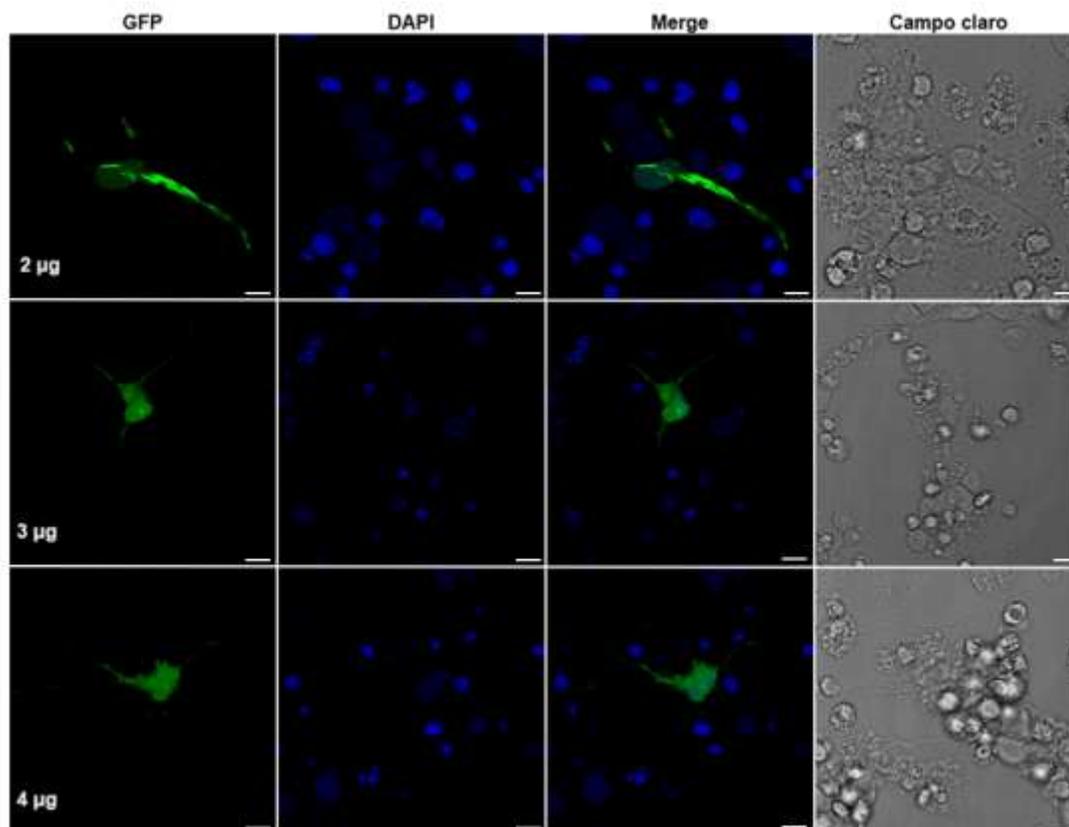


Figura 20. Expresión de GFP en CTPN diferenciadas. Las CTPN se transfectaron con el vector pmaxGFP® como se indica en materiales y métodos. La nucleofección se llevó a cabo con 2, 3 y 4 µg del vector, utilizando el programa HV. Se indujo diferenciación de las CTPN 24 horas después de la nucleofección retirando el factor de crecimiento FGF2 del medio durante 6 días. En los paneles de la izquierda se observa la expresión del vector pmaxGFP® (verde), en los centrales la tinción de los núcleos con DAPI (azul), seguidas del “Merge” y en el extremo derecho las fotografías de campo claro. Imágenes de una sola sección ecuatorial Z. La expresión de GFP se encuentra en todo el cuerpo celular incluyendo las neuritas. La barra blanca representa la escala de 10 µm, amplificación a la cual fueron tomadas las fotografías.

5.3. Construcción de los vectores pCMV-myc/Dp71d y pCMV-myc/Dp71d Δ 71-74

La construcción de los vectores pCMV-myc/Dp71d y pCMV-myc/Dp71d Δ 71-74 se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en la sección de materiales y métodos. Se partió de dos vectores existentes que contenían a cada una de las proteínas de interés, pGEMTeasy-Dp71d y pTREpurmyc-Dp71d Δ 71-74. Se amplificaron las secuencias completas de Dp71d y Dp71d Δ 71-74 mediante PCR (Fig. 21a-b). Para ambas proteínas se utilizaron los oligonucleótidos que amplifican desde la región 5'UTR (Exon1) hasta el último exón de la secuencia (Exón 79), generando productos de PCR de 1,859 pb y 1531 pb, respectivamente.

Los productos de PCR se purificaron por electroelución (Fig. 21c) y posteriormente se adenilaron para poder ligarlos al vector de transito pGEM-T

Easy, el cual contiene una región codificante de β -lactamasa que permitió la selección de células competentes DH5 α transformadas mediante su crecimiento en medio de cultivo LB con ampicilina (100 μ g/ml).

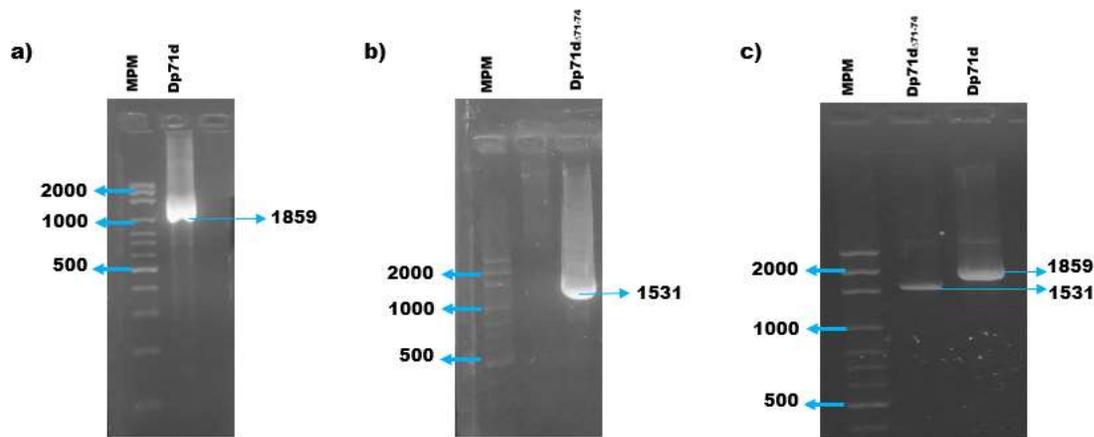


Figura 21. Fragmentos de Dp71d y Dp71d Δ 71-74. a) Producto de PCR de Dp71d, amplificado a partir del vector pGEMTeasy-Dp71d. b) Producto de PCR de Dp71d Δ 71-74, amplificado a partir del vector pTREpurmyc-Dp71d Δ 71-74. Los productos de PCR obtenidos corresponden a fragmentos de 1,859 y 1,531 pb, respectivamente. c) Productos de PCR purificados por electroelución. Los productos fueron visualizados y purificados utilizando electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. MPM: Marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Las colonias obtenidas fueron analizadas por una reacción de PCR de colonia para identificar aquellas que tuvieran el inserto correspondiente a cada una de las proteínas Dp71d y Dp71d Δ 71-74. Para identificar a las diferentes isoformas de Dp71 se empleó un ensayo de PCR en el cual se utilizó un par de oligonucleótidos iniciadores dirigidos a una de las regiones de procesamiento alternativo del mRNA de Dp71. Con el par de oligonucleótidos Ex69F y Ex75R (Tabla 2) se amplifica la secuencia desde el exón 69 hasta el exón 75, que corresponde a 564 pb y 234 pb para las isoformas que carecen de los exones 71-74 (Fig. 22).

Después de realizar el ensayo de PCR, se llevó a cabo una electroforesis en geles de agarosa para visualizar los productos obtenidos en la reacción. En la Fig. 23 se muestran los fragmentos correspondientes a las dos isoformas de Dp71 utilizadas para transformar a las células competentes. Estas son: Dp71d, que presenta los exones del 71 al 74 y por tanto genera una banda de 564 pb

(carril 21) en el gel y Dp71d Δ 71-74 con un producto de PCR de 234 pb (carril 9), ya que esta isoforma no presenta los exones del 71 al 74.

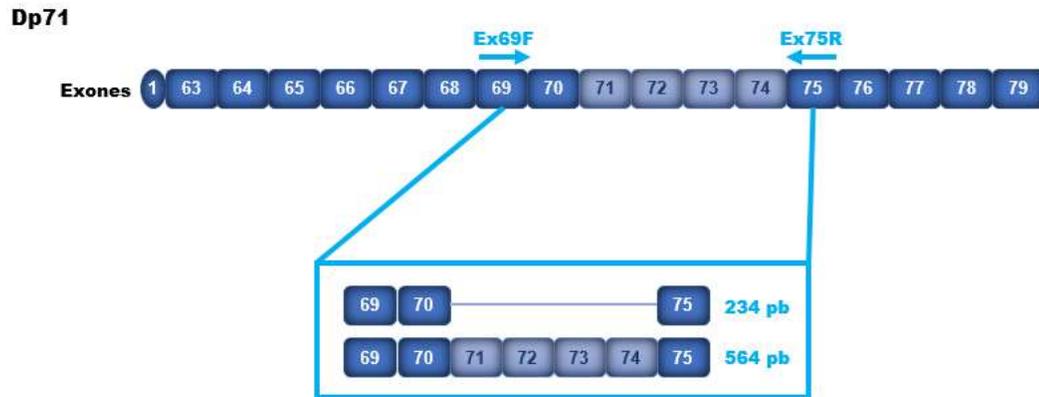


Figura 22. Esquema de los procesamientos alternativos de las isoformas de Dp71. En el diagrama se representan los exones que componen a la secuencia de Dp71. Las flechas señalan los sitios de la secuencia en donde se alinean los oligonucleótidos y en los recuadros aparecen los tamaños de producto de PCR esperados de acuerdo con el procesamiento alternativo de las isoformas.

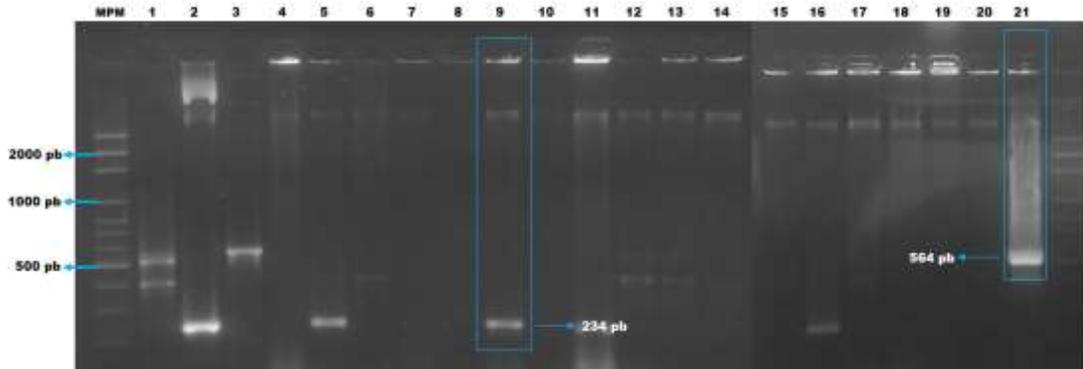


Figura 23. Productos de la reacción de PCR de colonia. La identificación de las isoformas de Dp71 se realizó utilizando los oligonucleótidos Ex69F y Ex75R (Tabla 2). Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. Carril 1 - 2: controles positivos de Dp71d y Dp71d Δ 71-74, respectivamente. Carriles 3 - 21: Colonias transformadas con pGEM-Teasy- Dp71d/Dp71d Δ 71-74.

Para determinar si los fragmentos clonados eran correctos, se seleccionaron la colonia 6 positiva para Dp71d Δ 71-74 y la colonia 11 positiva para Dp71d para analizarlas por secuenciación (Fig. 24). Una vez obtenidas las secuencias (Fig. 24a y b), se realizó el alineamiento para compararlas con las secuencias reportadas de Dp71d y de Dp71d Δ 71-74 de rata (*Rattus norvegicus*, XM_008773253.2 y NM_001005246.1, respectivamente). En el alineamiento se

observó que la secuencia de la colonia seleccionada para Dp71d Δ 71-74 no presenta las 331 pb correspondientes a los exones del 71 al 74 (Fig. 24c). Por otro lado, la secuencia seleccionada para Dp71d si presenta estos exones (Fig. 24d).

a)

```
>Dp71d $\Delta$ 71-74(co16)
AGTAGAATTCACATGAGGGGAACACCTCAAAGGCCACGAGACCCAAACAACCTGTGGGGACCATCCCAAAATGACAGAGCTCTACCAAGTCT
TTAGCTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTG
AGCCTGTCAGCTGCATGTGACGCCCTTGGACCAGCACAACTCAAGCAAAATGATCAGCCATGGATATCCTGCAGATAAATTAAGTGTGG
ACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACAACAATTTGGTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAAT
GTTTATGATACGGGACGAACAGGGAGGATCCGTGCTCTCTTTTAAACTGGCATCTTCTCTGTGTAAAGCACACTTGGAAAGACAAG
TACAGATACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGGCTTTTGTGACCAGCGTAGACTGGGCTCTTCTTGCATGATTCTATTCAAATC
CCAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCCCTCTTTGGGGGAGTAACTTGAAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTTCCAGTTTGGCAATAAACAACCT
GAGATTGAAGCCGCTCTCTTCTTGGACTGGATGCGTCTGGAACCCAGTCTATGGTGTGGCTGCCGGTCTTGCACAGAGTGGCTGCTGCT
GAACAGCCAAGCATCAGGCCAAGTGTAACTCTGTAAAGGAGTGTCCAATCTTGGATTACAGGTACAGAAGCTGAACACTTTAATTAT
GACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTCTGGCCGAGTGTCTAAGGGCCATAAAATGCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACA
TCTGGAGAAGATGTTCTGTGACTTTGCCAAGGTAAGTGAACAACTTGAACCAAAAGGTAATTTTGCAGAGCATCCCGAATGGGCTAC
CTTCCAGTGCAGACTGTGTAGAGGGGGACAACTGGAACAACTTGCAGCAAGTATGATGCTGGAAGCAGCAGCATGAGCAATAA
GGCTGTGCCCCACTGCCGCTCTCTCTGAGATGATGCCACCTCTCCCCAGAGTCCCAGGGATGCTGAATCAATTGCTGAGGCCAAGCTA
CTGCGCCAACACAAAGGACGCTGGAAGCCAGGATGCAAACTCTGGAAGACCAATAAACAACCTGGAGTCTCAGTTACATAGACTGAGG
CAGCTCTCGGACCAACCCAGGCTGAGGCCAAGGTGAATGGCACACAGGTGCTCTCTCTTCTACCTGCTGCAGAGGTCAGATAGCAGT
CAGCTATGCTGCTCCGAGTGGTGGCAGTCAAACTCAGAAATCTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTCTCCCCAGGACACAAGCAC
GGGTAGAAAGTATGGAGCAACTCAACAACCTCTTCCCTAGTTCAAGAGGAAGAAATGCCCTTGGAAAGCAATGAGAGAGGACACA
ATGTAGCGGCCGCTAGATCAATC
```

b)

```
>Dp71d(co111)
AGTAGAATTCACATGAGGGGAACACCTCAAAGGCCACGAGACCCAAACAACCTGTGGGGACCATCCCAAAATGACAGAGCTCTACCAAGTCT
TTAGCTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTG
AGCCTGTCAGCTGCATGTGACGCCCTTGGACCAGCACAACTCAAGCAAAATGATCAGCCATGGATATCCTGCAGATAAATTAAGTGTGG
ACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACAACAATTTGGTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAAT
GTTTATGATACGGGACGAACAGGGAGGATCCGTGCTCTCTTTTAAACTGGCATCTTCTCTGTGTAAAGCACACTTGGAAAGACAAG
TACAGATACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGGCTTTTGTGACCAGCGTAGACTGGGCTCTTCTTGCATGATTCTATTCAAATC
CCAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCCCTCTTTGGGGGAGTAACTTGAAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTTCCAGTTTGGCAATAAACAACCT
GAGATTGAAGCCGCTCTCTTCTTGGACTGGATGCGTCTGGAACCCAGTCTATGGTGTGGCTGCCGGTCTTGCACAGAGTGGCTGCTGCT
GAAACAGCCAAGCATCAGGCCAAGTGTAACTCTGTAAAGGAGTGTCCAATCATTGGATTACAGGTACAGAAGCTGAACACTTTAATTAT
GACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTCTGGCCGAGTGTCTAAGGGCCATAAAATGCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACA
TCTGGAGAAGATGTTCTGTGACTTTGCCAAGGTAAGTGAACAACTTGAACCAAAAGGTAATTTTGCAGAGCATCCCGAATGGGCTAC
CTTCCAGTGCAGACTGTGTAGAGGGGGACAACTGGAACAACTCCGTTACTCTGATCAACTTCTGGCCAGTAGATTCTGCGCTGCCTCG
TCCCCCAGCTTTCACACGATGATCTCATCTACGATTGAGCATTATGCTAGCAGGCTAGCAGAAATGGAAACAGCAATGGATCTTAT
CTAAATGATAGCATCTCTCTAATGAGAGCATAGATGATGAACATTTGTTAATCCAGCATTACTGCCAAAGTTTGAACAGGACTCCCCC
CTGAGCCAGCTCGTAGTCTGCCAGATCTTGATTTCTTAAAGAGTGGAAAGAGGGGAGCTAGAGAGAATCTAGCAGATCTTGAG
GAAGAAAACAGAAATCTCAAGCAGAATATGATGCTGTAAGCAGCAGCATGAGCATAAAGGCCGTGCCCTGCTGCTGCTCCGAGTGGTGG
ATGATGCCACCTCTCCCCAGAGTCCCAGGGATGCTGAACCTATTGCTGAGGCCAAGCTACTGCGCCAACACAAGGACGCTTGGAAAGCC
AGGATGCAAACTCTGGAAGACCAATAAACAACCTGGAGTCTCAGTTACATAGACTGAGGCAGCTCTGGAGCAACCCAGGCTGAGGCC
AAGGTGAATGGCACCACGGTGTCTCTCTTCTACCTCGCTGAGAGGTCAGATAGCAGTCAAGCTATGCTGCTCCGAGTGGTGGCAGT
CAAACCTCAGAATCTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTCTCCCCAGGACACAAGCAGGGTTAGAAAGAGTATGGAGCAACTCAAC
AACTCTTCCCTAGTTCAAGAGGAAGAAATGCCCTTGGAAAGCAATGAGAGAGGACACAATGTAGCGGCCGCTAGATCAATCA
```

c)



d)

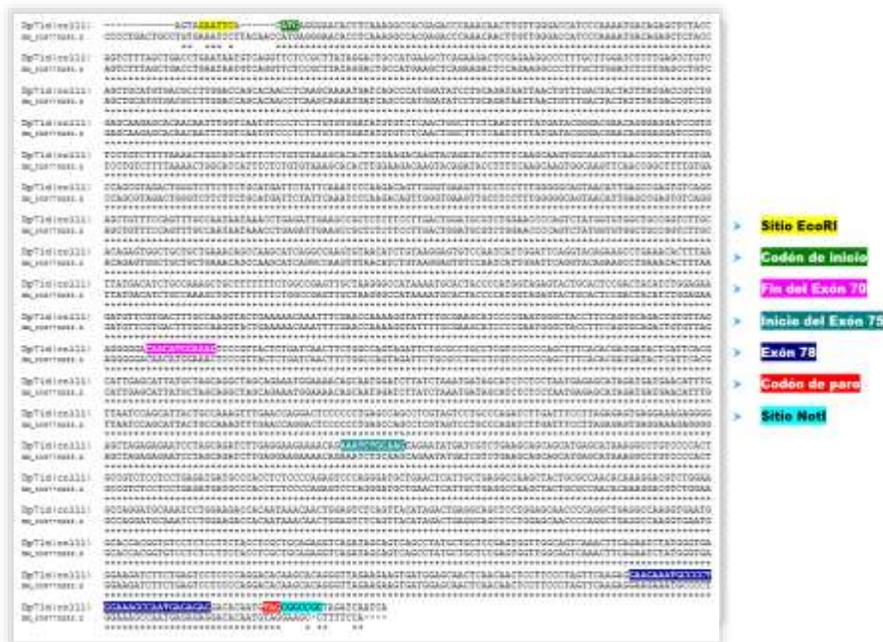


Figura 24. Secuencia de los fragmentos Dp71d Δ 71-74 y Dp71d. Se seleccionaron colonias obtenidas por transformación en las que se amplificaron fragmentos que corresponden a las isoformas de Dp71. Se extrajo y se purificó el plásmido para proceder con la secuenciación del inserto. **a)** Secuencia obtenida mediante secuenciación automática de Dp71d Δ 71-74. **b)** Secuencia obtenida mediante secuenciación automática de Dp71d. **c)** Alineamiento de la secuencia completa Dp71d Δ 71-74 obtenida con la secuencia reportada para Dp71d Δ 71-74 (NM_001005246.1). **d)** Alineamiento de la secuencia completa Dp71d con la secuencia reportada para Dp71d (XM_008773253.2).

Una vez que se determinó que las secuencias de las isoformas clonadas eran correctas se realizó una digestión enzimática con las enzimas EcoRI y NotI, como se describe en la sección de materiales y métodos, con el fin de liberar los

fragmentos del vector de tránsito pGEM-Teasy. Los fragmentos obtenidos (Fig. 25) fueron purificados por electroelución y ligados al vector de expresión pCMV-myc, el cual contiene una región codificante para β -lactamasa que permitió la selección de células competentes DH5 α transformadas mediante su crecimiento en medio de cultivo LB con ampicilina (100 μ g/ml). En la Tabla 4 se encuentran las eficiencias de transformación calculadas como se indica en materiales y métodos y a partir de la cuenta de colonias transformadas con el vector vacío pCMVmyc, así como con cada uno de los vectores pCMVmyc/Dp71d y pCMVmyc/Dp71d Δ 71-74.

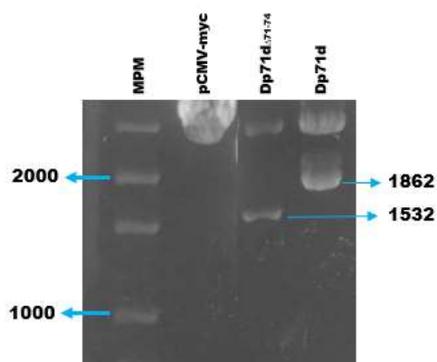


Figura 25. Restricción enzimática de los vectores pCMV-myc, pGEM-Teasy/Dp71d Δ 71-74 y pGEM-Teasy/Dp71d con EcoRI y NotI. Los plásmidos pCMV-myc, pGEM-Teasy/Dp71d Δ 71-74 y pGEM-Teasy/Dp71d fueron digeridos y se liberaron los fragmentos utilizando las enzimas EcoRI y NotI. Los fragmentos se visualizaron mediante electroforesis en gels de agarosa al 0.8 %.

Tabla 3. Eficiencias de transformación de las células DH5α	
Vector	Eficiencia de transformación
pCMV-myc	3.51×10^5
pCMV-myc/Dp71d	1.8×10^5
pCMV-myc/Dp71d Δ 71-74	4.16×10^4

Para identificar a las colonias que fueron transformadas con cada una de las isoformas de Dp71 se empleó un ensayo de PCR para amplificar las secuencias completas. En ambos casos se utilizaron los oligonucleótidos que amplifican desde la región 5'UTR (Exon1) hasta el último exón de la secuencia (Exón 79).

Con este par de oligonucleótidos (Tabla 2) se amplifica la secuencia que corresponde a 1,862 pb y 1,532 pb para Dp71d y Dp71d Δ 71-74, respectivamente. Después de realizar el ensayo de PCR, se llevó a cabo una electroforesis en geles de agarosa para visualizar los productos obtenidos en la reacción. En la Fig. 26 se muestran las dos isoformas de Dp71 amplificadas a partir de la selección de colonias, cuyos fragmentos corresponden a 1,862 pb y 1,532 pb.

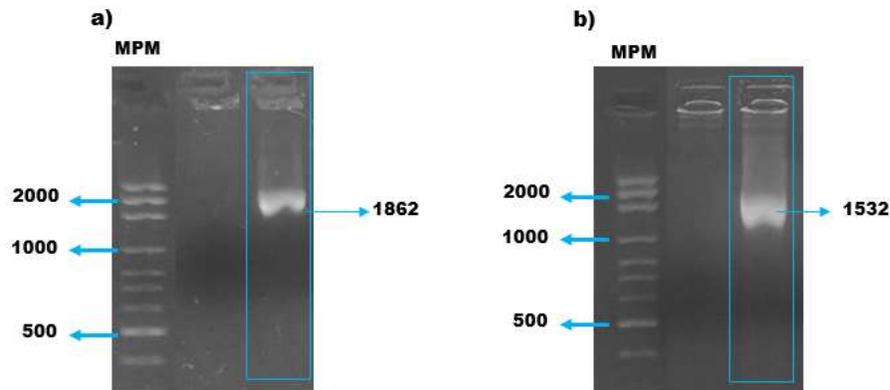


Figura 26. Gel de electroforesis de la PCR colonia. La identificación de las isoformas de Dp71 se realizó a partir de los oligonucleótidos Exon1 y Ex79R (Tabla 2). Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. a) PCR en colonia de células competentes transformadas con pCMV-myc/Dp71d. b) PCR en colonia de células competentes transformadas con pCMV-myc/Dp71d Δ 71-74.

Se seleccionó la colonia 2 positiva para Dp71d y la colonia 14 positiva para Dp71d Δ 71-74 para realizó una caracterización de los vectores por digestión enzimática con la enzima PstI. En la Fig. 27 se pueden observar los patrones de bandeo de pCMV-myc/Dp71d y pCMV-myc/Dp71d Δ 71-74 obtenidos después de la digestión con la enzima PstI, siendo para ambos vectores de 4 fragmentos: 2665, 1410, 1113 y 432 pb para el primero; 2665, 1113, 1080 y 432 pb para el segundo. La digestión del vector vacío generó únicamente dos fragmentos de 2665 y 1126 pb. Los tamaños fueron verificados por el programa Vector NTI.

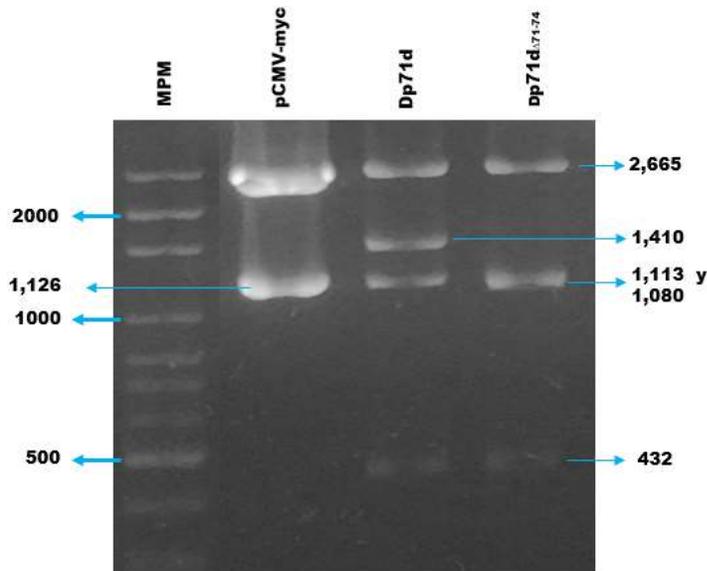


Figura 27. Caracterización de los plásmidos pCMV-myc, pCMV-myc/Dp71d Δ 71-74 y pCMV-myc/Dp71d por digestión enzimática con PstI. Los fragmentos se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % y los tamaños fueron verificados con el programa Vector NTI.

Para determinar si las secuencias eran correctas, las colonias seleccionadas se analizaron por secuenciación (Fig. 28). Una vez obtenidas las secuencias (Fig. 28a y b), se realizó el alineamiento para compararlas con las secuencias reportadas de Dp71d y de Dp71d Δ 71-74 de rata (*Rattus norvegicus*, XM_008773253.2 y NM_001005246.1, respectivamente). En el alineamiento se observó que la secuencia de la colonia analizada para Dp71d si presenta las 331 pb correspondientes a los exones del 71 al 74 (Fig. 28c). Por otro lado, la secuencia analizada para Dp71d Δ 71-74 si presenta estos exones (Fig. 28d). Adicionalmente, se verificó la presencia del tag Myc (Fig. 28c-d).

a)

```
>Dp71d71-74(col14)
CATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTCTAGTAGAATTCACATGAGGGAAACACCTCAAAGGCCACGAGACCCAAACAA
CTTGTGGGACATCCCAAATGACAGAGCTCTACCACCTACCGGCTTTAGCTGACCTGAATAATGTGAGGTTCTCCGCTTATAGGACT
GCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGAGCCTGTCAAGCTGATGTGACGCTTGGACCAAGCAAACTC
AAGCAAAATGATCAGCCCATGGATATCCTGCAGATAAATAACTGTTTGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACAAATTTG
GTCATTTCTCTCTTTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATACGGGACGAACAGGGAGGATCCGTTCTCTGTCT
TTTAAAACTGGCATCATTCTCTGTGTAAGCACACTTGGAAAGACAAGTACAGATAACCTTTTCAAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGGCTTT
TGTGACCAGCGTAGACTGGGCTCTTCTTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCCCTCTTTGGGGCAGTAAC
ATTGAGCCGAGTGTCAAGACTGTTTCAGTTGCCAATAATAAACCCTGAGATTGAAGCCGCTCTCTCTTCTGACTGGATGCGTCTGGAACCC
CAGCTATGGTGTGGCTGCCGGTCTTGACAGAGAGGCTGCTGCTGAAACAGCCAAGCATCAGGCCAAGTGTAAACATCTGTAAGGAGTGT
CCAATCATTGGATTAGGTACAGAAGCCTGAAACACTTAAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTCTGGCCGAGTTGCTAAGGGC
CATAAAATGCACTACCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATCTGGAGAAGATGTTCTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAACAA
TTTTGAAACCCAAAAGGTATTTTGGCAAGCATCCCGAATGGGCTACCTTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGACAACATGGAACAA
ATCTGCAAGCAGAATATGATCGTCTGAAGCAGCAGCATGAGCATAAAGGCCGTGCCCACTGCCGCTCTCTCTGAGATGATGCCACCT
CTCCCCAGAGTCCCAGGGATGCTGAACCTATTGCTGAGGCCAAGCTACTGCGCAACACAAAGGACGCTGGAAGCCAGGATGCAAACTC
TGGAAAGACCACAATAAACAACTGGAGTCTCAGTTACATAGACTGAGGCAGCTCCTGGAGCAACCCAGGCTGAGGCCAAGGTGAATGGCA
CCACGGTGTCTCTCTCTACCTCGCTGCAGAGGTAGATAGCAGTCAAGCTATGCTGCTCCGAGTGGTGGCAGTCAAACCTTCAGAA
CTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTCTCCCAAGGACACAAGCACAGGTTAGAAGAAGTATGGAGCAACTCAACAACTCTTCCCTA
GTTCAAGAGGAAGAAATGCCCTGGAAAGCCAATGAGAGAGGACACAATGTAGCGGCCGCTAGATCAATCACTAG
```

b)

```
>Dp71d(col12)
CCATGGCATCAATGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGCTTATGGCCATGGAGGCCGGAATTCACATGAGGGAAACACCTCAAAGGCC
ACGAGACCCAAACAACTTGTGGGACCATCCCAAATGACAGAGCTCTACCACTCTTTAGCTGACCTGAATAATGTGAGGTTCTCCGCTT
ATAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGAGCCTGTCAAGCTGATGTGACGCTTGGACCAAG
ACAACCTCAAGCAAAATGATCAGCCCATGGATATCCTGCAGATAAATAACTGTTTGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACA
ACAATTTGGTCAATGTCCCTCTCTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATACGGGACGAACAGGGAGGATCCGTG
TCCTGTCTTTTAAAACTGGCATCATTCTCTGTGTAAGCACACTTGGAAAGACAAGTACAGATACTTTTCAAAGCAAGTGGCAAGTTCAA
CCGGCTTTTGTGACCAGCGTAGACTGGGCTCTTCTTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCCCTCTTTGGGG
CGAGTAACATTGAGCCGAGTGTCAAGAGCTGTTCCAGTTTGGCAATAATAAACCCTGAGATTGAAGCCGCTCTCTCTTCTGACTGGATGC
GTCTGGAACCCCAAGTCTATGGTGTGGCTGCCGGTCTTGACAGAGTGGCTGCTGCTGAAACAGCCAAGCATCAGGCCAAGTGTAAACATCT
GTAAGGAGTGTCCAATCATTGGATTAGGTACAGAAGCCTGAAACACTTAAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTCTGGCCGAG
TTGCTAAGGGCCATAAAATGCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATCTGGAGAAGATGTTCTGACTTTGCCAAGGTAC
TGAAAACAAATTTGAAACAAAAGGTATTTTGGCAAGCATCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACA
TGGAAACTCCCGTTACTCTGATCAACTTCTGGCCAGTAGATTCTGCGCTGCTCTGCTCCCCCAGCTTTCACACGATGATACTCATTAC
GCATTGAGCATTATGCTAGCAGGCTAGCAGAAATGGAAAACAGCAATGGATCTTATCTAAATGATAGCATCTCTCTAATGAGAGCATAG
ATGATGAACATTTGTTAATCCAGCATTACTGCCAAAGTTTGAACCAGGACTCCCCCTGAGCCAGCCTCGTAGTCTCTGCCAGATCTTGA
TTTTCTTAGAGAGTGAAGAAAGAGGGAGCTAGAGAGAATCTAGCAGATCTTGAGGAAGAAAACAGAAATCTGCAAGCAGAATATGATC
GTCTGAAGCAGCAGCATGAGCATAAAGCCCTGTCCCCACTGCCGCTCTCTCTCTGAGATGATGCCACCTCTCCCCAGAGTCCCAGGGATG
CTGAACCTATTGCTGAGGCCAAGCTACTGCGCAACACAAGGACGCTGGAAGCCAGGATGAAAATCTTGGAAAGACCACAATAAACAA
TGGAGTCTCAGTTACATAGACTGAGGCAGCTCCTGGAGCAACCCAGGCTGAGGCCAAGGTGAATGGCACCCAGGTTCTCTCTCTCTA
CCTCGCTGCAGAGGTCAGATAGCAGTCAAGCTATGCTGCTCCGAGTGGTGGCAGTCAAACCTCAGAACTATGGGTGAGGAAGATCTTC
TGAGTCTCCCCAGGACACAAGCACAGGGTTAGAAGAAGTATGGAGCAACTCAACAACTCTTCCCTAGTTCAAAGAGGAAGAAATGCC
CTGGAAGGCCAATGAGAGAGGACACAATGTAGCGGCCGCTAGATCAATCA
```

c)

```

Dp71dΔ71-74 (col14) CCATGTCATCAATGCGAAGCTGATGTCGAGAGGAGGACCTTTATGGCCATGGAGGCCGAATTCACATGAGGGAAACCTCAAAGGCCACGAGACCCAAAC
NM_001005246.1 -----CTTACACCATGAGGGAAACCTCAAAGGCCACGAGACCCAAAC
Dp71dΔ71-74 (col14) AACCTGTTGGGACCATCCAAAATGACAGAGCTCTACCAGTCTTACGTGACCTGAATAATGTCAAGTTCCTCCGCTTAGAGACTGCCATGAAGCTCAGAAAG
NM_001005246.1 AACCTGTTGGGACCATCCAAAATGACAGAGCTCTACCAGTCTTACGTGACCTGAATAATGTCAAGTTCCTCCGCTTAGAGACTGCCATGAAGCTCAGAAAG
Dp71dΔ71-74 (col14) CTCAGAGAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGGACCTGTCACTGCAATGTGACGCCCTTGGACCAGCACAACTCAAGCAAATGATCAGCCCATGGATATCCTGTC
NM_001005246.1 CTCAGAGAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGGACCTGTCACTGCAATGTGACGCCCTTGGACCAGCACAACTCAAGCAAATGATCAGCCCATGGATATCCTGTC
Dp71dΔ71-74 (col14) AGATAAATAACTGTTTACTACTATTATGACCGTCTGGAGCAGAGCACAACAATTTGGTCAATGTCCCTCTCTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCT
NM_001005246.1 AGATAAATAACTGTTTACTACTATTATGACCGTCTGGAGCAGAGCACAACAATTTGGTCAATGTCCCTCTCTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCT
Dp71dΔ71-74 (col14) CAATGTTTATGATACGGGACGAAACAGGGAGATCCGTGTCTGCTTTTAAACCTGGCATCATTTCTGTGTAAAGCACACTTGGAAACAAATGATCAGATAC
NM_001005246.1 CAATGTTTATGATACGGGACGAAACAGGGAGATCCGTGTCTGCTTTTAAACCTGGCATCATTTCTGTGTAAAGCACACTTGGAAACAAATGATCAGATAC
Dp71dΔ71-74 (col14) CTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCACACGGCTTTTGTGACCAGCTAGACTGGGTCTTCTTCTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTGGGTGAAGTTG
NM_001005246.1 CTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCACACGGCTTTTGTGACCAGCTAGACTGGGTCTTCTTCTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTGGGTGAAGTTG
Dp71dΔ71-74 (col14) CCTCCTTTGGGGGAGTAAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTTCCAGTTTGCCTAATAAACCCTGAGATTGAAGCCGCTCTCTCTGTCAGTGGATGCG
NM_001005246.1 CCTCCTTTGGGGGAGTAAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTTCCAGTTTGCCTAATAAACCCTGAGATTGAAGCCGCTCTCTCTGTCAGTGGATGCG
Dp71dΔ71-74 (col14) TCTGAAACCCAGCTCTATGGTGTGGCTGCCGCTTTCACAGAGTGGCTGTGCTGTAACAGCCAGCATCAGCCAAAGTGTAACTGTGTAAGGATGTCCA
NM_001005246.1 TCTGAAACCCAGCTCTATGGTGTGGCTGCCGCTTTCACAGAGTGGCTGTGCTGTAACAGCCAGCATCAGCCAAAGTGTAACTGTGTAAGGATGTCCA
Dp71dΔ71-74 (col14) ATCATTGGATTCAAGTACAGAAGCCTGAAACACTTTAATATGACATCTGCCAAGCTGCTTTTTTCTGGCCGAGTGTCTAAGGGCCATAAAATGCATACC
NM_001005246.1 ATCATTGGATTCAAGTACAGAAGCCTGAAACACTTTAATATGACATCTGCCAAGCTGCTTTTTTCTGGCCGAGTGTCTAAGGGCCATAAAATGCATACC
Dp71dΔ71-74 (col14) CCATGGTAGAGTACTGCACCTCCGACTACATCTGGAGAAGATGTTCTGACTTGGCAAGTACTGAAAACAAATTTGAAACAAAAGGATTTTTGCGAAGCA
NM_001005246.1 CCATGGTAGAGTACTGCACCTCCGACTACATCTGGAGAAGATGTTCTGACTTGGCAAGTACTGAAAACAAATTTGAAACAAAAGGATTTTTGCGAAGCA
Dp71dΔ71-74 (col14) TCCCCGAATGGGCTACCTCCAGTGCAGACTGTGTAGAGGGGGAAGCATGGAAACAATTCGAAGCAGAATATGATCGTCTGAAGCAGCAGCATGAGCAT
NM_001005246.1 TCCCCGAATGGGCTACCTCCAGTGCAGACTGTGTAGAGGGGGAAGCATGGAAACAATTCGAAGCAGAATATGATCGTCTGAAGCAGCAGCATGAGCAT
Dp71dΔ71-74 (col14) AAGGCCCTGTCCCACTGCCCTCTCTCTGATGATGCCCACTCTCCCAAGTCCCGAGGATGCTGAACCTATTGCTGAGGCCAAGTACTGCGCCAAAC
NM_001005246.1 AAGGCCCTGTCCCACTGCCCTCTCTCTGATGATGCCCACTCTCCCAAGTCCCGAGGATGCTGAACCTATTGCTGAGGCCAAGTACTGCGCCAAAC
Dp71dΔ71-74 (col14) ACAAGAGAGCTGTGGAGCCAGGATGCAAAATCCTGGAAGACCAATAAACAACCTGGAGTCTCAGTTACATAGACTGAGGCAGCTCCTGGAGCAACCCCAAGC
NM_001005246.1 ACAAGAGAGCTGTGGAGCCAGGATGCAAAATCCTGGAAGACCAATAAACAACCTGGAGTCTCAGTTACATAGACTGAGGCAGCTCCTGGAGCAACCCCAAGC
Dp71dΔ71-74 (col14) TGAGCCCAAGGTTGAATGGCACCAGGCTGCTCTCTCTCTACCTGCTGCAAGGTCAGATAGCAGTCAAGCTATGCTGCTCCAGTGGTGGAGTCAAACT
NM_001005246.1 TGAGCCCAAGGTTGAATGGCACCAGGCTGCTCTCTCTCTACCTGCTGCAAGGTCAGATAGCAGTCAAGCTATGCTGCTCCAGTGGTGGAGTCAAACT
Dp71dΔ71-74 (col14) TCAGAACTCTATGGTGGAGAAATCTTCTGAGTCTCCCAAGCACAAGCAGGGTTAGAAAGATGATGGAGCAACTCAACAACCTCTTCCCTAGTTCAA
NM_001005246.1 TCAGAACTCTATGGTGGAGAAATCTTCTGAGTCTCCCAAGCACAAGCAGGGTTAGAAAGATGATGGAGCAACTCAACAACCTCTTCCCTAGTTCAA
Dp71dΔ71-74 (col14) GAGGAAAGAAATGCCCTGGAAAGCCAAATGAGAGAGGACACAATTAAGCGGCTGATGATCAATC-----
NM_001005246.1 GAGGAAAGAAATGCCCTGGAAAGCCAAATGAGAGAGGACACAATTAAGCGGCTGATGATCAATC-----

```

d)

```

Dp71d (col2) CCATGTCATCAATGCGAAGCTGATGTCGAGAGGAGGACCTTTATGGCCATGGAGGCCGAATTCACATGAGGGAAACCTCAAAGGCCACGAGACCCAAAC
XM_008773253.2 -----CTTACACCATGAGGGAAACCTCAAAGGCCACGAGACCCAAAC
Dp71d (col2) AACCTGTTGGGACCATCCAAAATGACAGAGCTCTACCAGTCTTACGTGACCTGAATAATGTCAAGTTCCTCCGCTTAGAGACTGCCATGAAGCTCAGAAAG
XM_008773253.2 AACCTGTTGGGACCATCCAAAATGACAGAGCTCTACCAGTCTTACGTGACCTGAATAATGTCAAGTTCCTCCGCTTAGAGACTGCCATGAAGCTCAGAAAG
Dp71d (col2) CTCAGAGAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGGACCTGTCACTGCAATGTGACGCCCTTGGACCAGCACAACTCAAGCAAATGATCAGCCCATGGATATCCTGTC
XM_008773253.2 CTCAGAGAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGGACCTGTCACTGCAATGTGACGCCCTTGGACCAGCACAACTCAAGCAAATGATCAGCCCATGGATATCCTGTC
Dp71d (col2) AGATAAATAACTGTTTACTACTATTATGACCGTCTGGAGCAGAGCACAACAATTTGGTCAATGTCCCTCTCTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCT
XM_008773253.2 AGATAAATAACTGTTTACTACTATTATGACCGTCTGGAGCAGAGCACAACAATTTGGTCAATGTCCCTCTCTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCT
Dp71d (col2) CAATGTTTATGATACGGGACGAAACAGGGAGATCCGTGTCTGCTTTTAAACCTGGCATCATTTCTGTGTAAAGCACACTTGGAAACAAATGATCAGATAC
XM_008773253.2 CAATGTTTATGATACGGGACGAAACAGGGAGATCCGTGTCTGCTTTTAAACCTGGCATCATTTCTGTGTAAAGCACACTTGGAAACAAATGATCAGATAC
Dp71d (col2) CTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCACACGGCTTTTGTGACCAGCTAGACTGGGTCTTCTTCTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTGGGTGAAGTTG
XM_008773253.2 CTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCACACGGCTTTTGTGACCAGCTAGACTGGGTCTTCTTCTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTGGGTGAAGTTG
Dp71d (col2) CCTCCTTTGGGGGAGTAAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTTCCAGTTTGCCTAATAAACCCTGAGATTGAAGCCGCTCTCTCTGACTGGATGCG
XM_008773253.2 CCTCCTTTGGGGGAGTAAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTTCCAGTTTGCCTAATAAACCCTGAGATTGAAGCCGCTCTCTCTGACTGGATGCG
Dp71d (col2) TCTGAAACCCAGCTCTATGGTGTGGCTGCCGCTTTCACAGAGTGGCTGTGCTGTAACAGCCAGCATCAGCCAAAGTGTAACTGTGTAAGGATGTCCA
XM_008773253.2 TCTGAAACCCAGCTCTATGGTGTGGCTGCCGCTTTCACAGAGTGGCTGTGCTGTAACAGCCAGCATCAGCCAAAGTGTAACTGTGTAAGGATGTCCA
Dp71d (col2) ATCATTGGATTCAAGTACAGAAGCCTGAAACACTTTAATATGACATCTGCCAAGCTGCTTTTTTCTGGCCGAGTGTCTAAGGGCCATAAAATGCATACC
XM_008773253.2 ATCATTGGATTCAAGTACAGAAGCCTGAAACACTTTAATATGACATCTGCCAAGCTGCTTTTTTCTGGCCGAGTGTCTAAGGGCCATAAAATGCATACC
Dp71d (col2) CCATGGTAGAGTACTGCACCTCCGACTACATCTGGAGAAGATGTTCTGACTTGGCAAGTACTGAAAACAAATTTGAAACAAAAGGATTTTTGCGAAGCA
XM_008773253.2 CCATGGTAGAGTACTGCACCTCCGACTACATCTGGAGAAGATGTTCTGACTTGGCAAGTACTGAAAACAAATTTGAAACAAAAGGATTTTTGCGAAGCA
Dp71d (col2) TCCCCGAATGGGCTACCTCCAGTGCAGACTGTGTAGAGGGGGAAGCATGGAAACAATTCGAAGCAGAATATGATCGTCTGAAGCAGCAGCATGAGCAT
XM_008773253.2 TCCCCGAATGGGCTACCTCCAGTGCAGACTGTGTAGAGGGGGAAGCATGGAAACAATTCGAAGCAGAATATGATCGTCTGAAGCAGCAGCATGAGCAT
Dp71d (col2) TCGTCCCCCAGCTTTCACACGATGATACTCATTCAAGCATTGAGCATTATGCTAGCAGGCTAGCAGAAATGGAAACAGCAATGGATCTTATCTAAATGATA
XM_008773253.2 TCGTCCCCCAGCTTTCACACGATGATACTCATTCAAGCATTGAGCATTATGCTAGCAGGCTAGCAGAAATGGAAACAGCAATGGATCTTATCTAAATGATA
Dp71d (col2) GCATCTCTCTAATGAGAGCATAGATGATCAACATTTGTATTCAGCACTTCTGCCAAGTGTGAACCCAGGACTCCCCCTGAGCCAGCCTCGTAGTCTCTG
XM_008773253.2 GCATCTCTCTAATGAGAGCATAGATGATCAACATTTGTATTCAGCACTTCTGCCAAGTGTGAACCCAGGACTCCCCCTGAGCCAGCCTCGTAGTCTCTG
Dp71d (col2) CCAAGTCTTGATTCCTTAGAGAGTGGAGAAAGGGGAGCTAGAGAAATCTAGCAGATCTTGGAGAAAGAACAGCAATGTCGAGGAGCAGATATGATCGT
XM_008773253.2 CCAAGTCTTGATTCCTTAGAGAGTGGAGAAAGGGGAGCTAGAGAAATCTAGCAGATCTTGGAGAAAGAACAGCAATGTCGAGGAGCAGATATGATCGT
Dp71d (col2) CTGAAGCAGCAGCATGAGCATAAAGGCCCTGCCCCACTGCCCTCTCTCTGATGATGCCCACTCTCCCAAGTCCCGAGGATGCTGAACCTATTGCTG
XM_008773253.2 CTGAAGCAGCAGCATGAGCATAAAGGCCCTGCCCCACTGCCCTCTCTCTGATGATGCCCACTCTCCCAAGTCCCGAGGATGCTGAACCTATTGCTG
Dp71d (col2) AGGCCAAGCTACTGGCCAAACAAAGGAGCTGTGGAAGCCAGGATGCAAAATCCTGGAAGACCAATAAACAACCTGGAGTCTCAGTTACATAGACTGAGGCA
XM_008773253.2 AGGCCAAGCTACTGGCCAAACAAAGGAGCTGTGGAAGCCAGGATGCAAAATCCTGGAAGACCAATAAACAACCTGGAGTCTCAGTTACATAGACTGAGGCA
Dp71d (col2) GCTCCTGGAGCAACCCAGGCTGAGGCCAAGGTTGAATGGCACCAGGCTGCTCTCTCTCTACCTGCTGCAAGGTCAGATAGCAGTCAAGCTATGCTGCTC
XM_008773253.2 GCTCCTGGAGCAACCCAGGCTGAGGCCAAGGTTGAATGGCACCAGGCTGCTCTCTCTCTACCTGCTGCAAGGTCAGATAGCAGTCAAGCTATGCTGCTC
Dp71d (col2) CGATGGTGGGAGTCAAACTTCAGAACTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTCTCCCAAGGACCAAGCAGAGGGTTAGAAAGATGATGGAGCAACTCA
XM_008773253.2 CGATGGTGGGAGTCAAACTTCAGAACTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTCTCCCAAGGACCAAGCAGAGGGTTAGAAAGATGATGGAGCAACTCA
Dp71d (col2) ACAACTCTCTCCCTAGTTCAGAGAGGAGAAATGCCCTGGAAAGCCAAATGAGAGAGGACACAATTAAGCGGCTGATGATCAATC-----
XM_008773253.2 ACAACTCTCTCCCTAGTTCAGAGAGGAGAAATGCCCTGGAAAGCCAAATGAGAGAGGACACAATTAAGCGGCTGATGATCAATC-----

```

Figura 28. Secuencia de los fragmentos de Dp71d_{Δ71-74} y Dp71d. Se seleccionaron colonias obtenidas por transformación en las que se amplificaron fragmentos que corresponden a las isoformas de Dp71. Se extrajo y se purificó el plásmido para proceder con la secuenciación del inserto. **a)** Secuencia obtenida mediante secuenciación automática de Dp71d_{Δ71-74}. **b)** Secuencia obtenida mediante secuenciación automática de Dp71d. **c)** Alineamiento de la secuencia completa Dp71d_{Δ71-74} obtenida con la secuencia reportada de Dp71d_{Δ71-74} (NM_001005246.1). **d)** Alineamiento de la secuencia completa Dp71d obtenida con la secuencia reportada de Dp71d (XM_008773253.2). Myc-tag color verde.

Finalmente, para comprobar que los vectores contruidos expresan a las proteínas de manera correcta, se transfectaron células PC12 Tet-On de acuerdo con lo descrito en la sección de materiales y métodos. Pasadas las 24 horas de transfección, se hizo extracción de proteína total para llevar a cabo un ensayo de Western Blot utilizando el anticuerpo contra el tag de myc (Fig. 29). El resultado mostró la detección de las dos proteínas recombinantes myc/Dp71d y myc/Dp71d Δ 71-74 con un peso de 71 y 58 kDa, respectivamente.

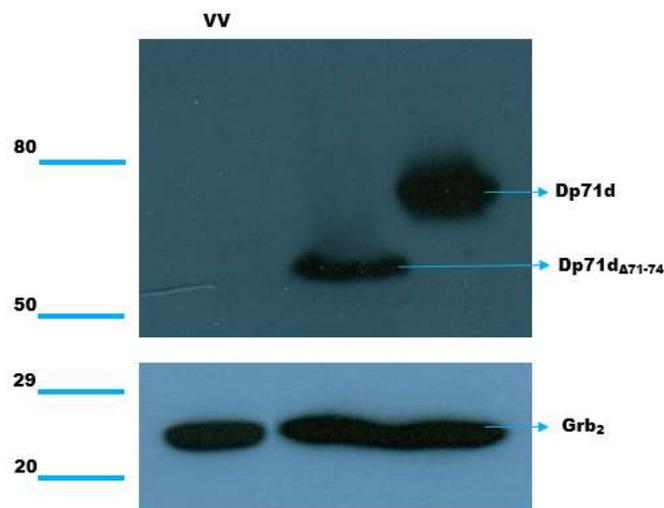


Figura 29. Expresión de las proteínas recombinantes myc/Dp71d y myc/Dp71d Δ 71-74 en las célula PC12 Tet-On. Las células PC12 Tet-On fueron transfectadas con los plásmidos de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Se realizó la extracción de proteínas y se llevó a cabo un western-blot utilizando anticuerpo anti-myc. Se observan bandas al peso correspondiente de 71 y 58 kDa, respectivamente. Control de carga: Grb2. Los números indican kDa. VV: Vector vacio pCMV-myc.

Una vez comprobado que las células transfectadas con Dp71d y Dp71d Δ 71-74 tienen la capacidad de expresar a las proteínas recombinantes, se procedió a comprobar su localización y colocalización con β -dístroglicano mediante la inmunodetección de Myc y β -dístroglicano. La marca de las proteínas recombinantes myc/Dp71d y myc/Dp71d Δ 71-74 se muestra en verde, β -dístroglicano en rojo y los núcleos se tiñeron con DAPI en azul.

En las células PC12 Tet-On/Dp71d, myc/Dp71d se encuentra distribuida de manera uniforme en el citoplasma y periferia, en donde colocaliza con β -dístroglicano (Fig. 30a). La distribución de la proteína myc/Dp71 Δ_{71-74} en las células es mayormente en la periferia y se observa colocalización con β -dístroglicano (Fig. 30b). Lo anterior coincide con lo que se ha descrito anteriormente por el grupo de trabajo de la Dra. Cecilia Montañez.

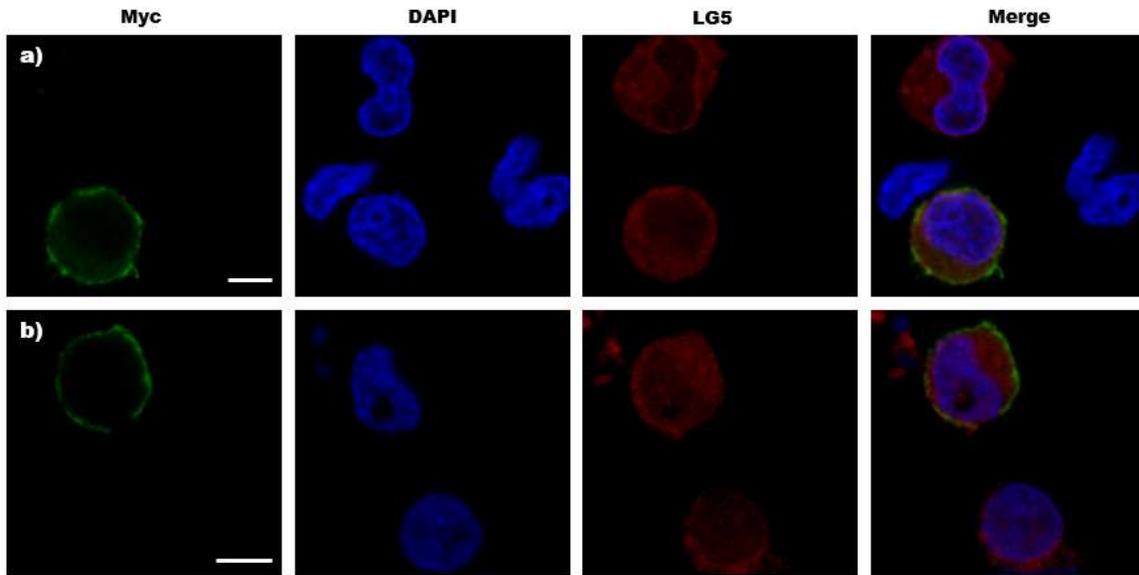


Figura 30. Localización de las proteínas recombinantes myc/Dp71d y myc/Dp71d Δ_{71-74} en células PC12 Tet-On no diferenciadas. Las células PC12 Tet-On, crecidas en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina fueron fijadas y marcadas para la inmunodetección de myc/Dp71d, myc/Dp71d Δ_{71-74} y β -dístroglicano con los anticuerpos anti myc y LG5 respectivamente. En los paneles de la izquierda se observa la localización de myc/Dp71d, myc/Dp71d Δ_{71-74} (verde), en los centrales la localización de β -dístroglicano (rojo) y en los últimos el “Merge” de ambas marcas con tinción de DAPI (azul) para el núcleo. Imágenes de una sola sección ecuatorial Z. **a)** Localización de myc/Dp71d en las células PC12 Tet-On. **b)** Localización de myc/Dp71d Δ_{71-74} en las células PC12 Tet-On. La barra blanca representa la escala de 10 μ m, amplificación a la cual fueron tomadas las fotografías.

5.4. Nucleofección del cultivo de CTPN con los vectores pCMV-myc/Dp71d y pCMV-myc/Dp71d Δ_{71-74}

La nucleofección se realizó de acuerdo con lo descrito en la sección de materiales y métodos, utilizando los vectores pCMV-myc/Dp71d y pCMV-myc/Dp71d Δ_{71-74} , además de un control de transfección sin DNA y el control negativo que corresponde al vector vacío pCMV-myc. Pasadas las 24 hrs de nucleofección se realizó inmunodetección de myc y nestina en los cultivos de 0 días de diferenciación. Se observó expresión fuerte de myc en las células

transfectadas con los vectores construidos y expresión débil en los controles (Fig. 31). Las células expresaron ambas isoformas, sin embargo, únicamente se observaron elongaciones que podrían ser neuritas en las células que expresan la isoforma Dp71d.

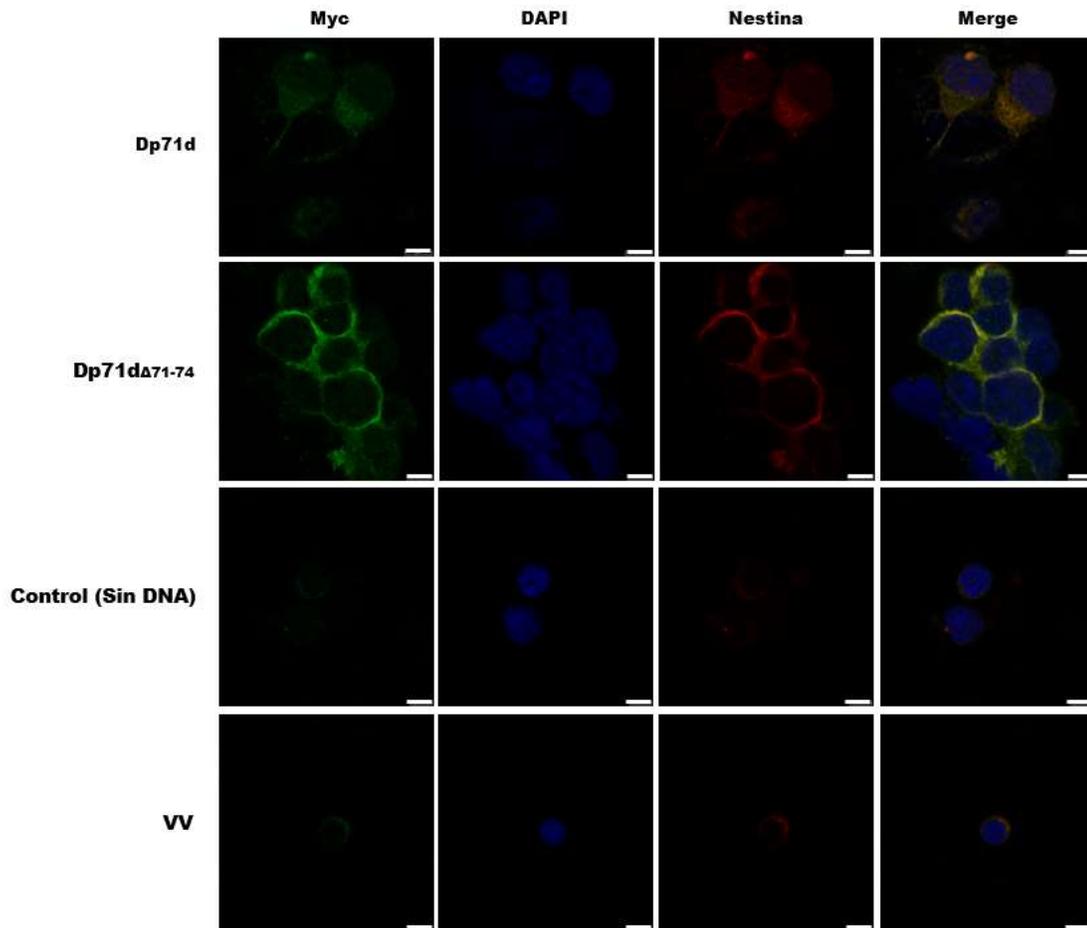


Figura 31. Inmunodetección de las proteínas recombinantes Myc/Dp71d y Myc/Dp71d Δ 71-74 en cultivo de CTPN sin diferenciar. Las células, crecidas en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina, fueron fijadas y marcadas para la inmunodetección de Myc/Dp71d, Myc/Dp71d Δ 71-74 y nestina con los anticuerpos anti myc y Nestina respectivamente. En los paneles de la izquierda se observa la localización de Myc/Dp71d, Myc/ Dp71d Δ 71-74 (verde), en los centrales la localización de nestina (rojo) y en los últimos el “Merge” de ambas marcas con tinción de DAPI (azul) para el núcleo. Imágenes de una sola sección ecuatorial Z. VV: Vector vacío pCMV-myc. La barra blanca representa la escala de 5 μ m, amplificación a la cual fueron tomadas las fotografías.

Nestina es una proteína de filamentos intermedios de precursores neurales y se localiza en el citoplasma. Como puede observarse en la imagen, la detección de nestina se localiza de manera correcta, adicionalmente, las imágenes en campo claro muestran un cambio morfológico de las células

causado por el daño ocasionado por los pulsos de voltaje de la técnica de nucleofección (Fig. 32).

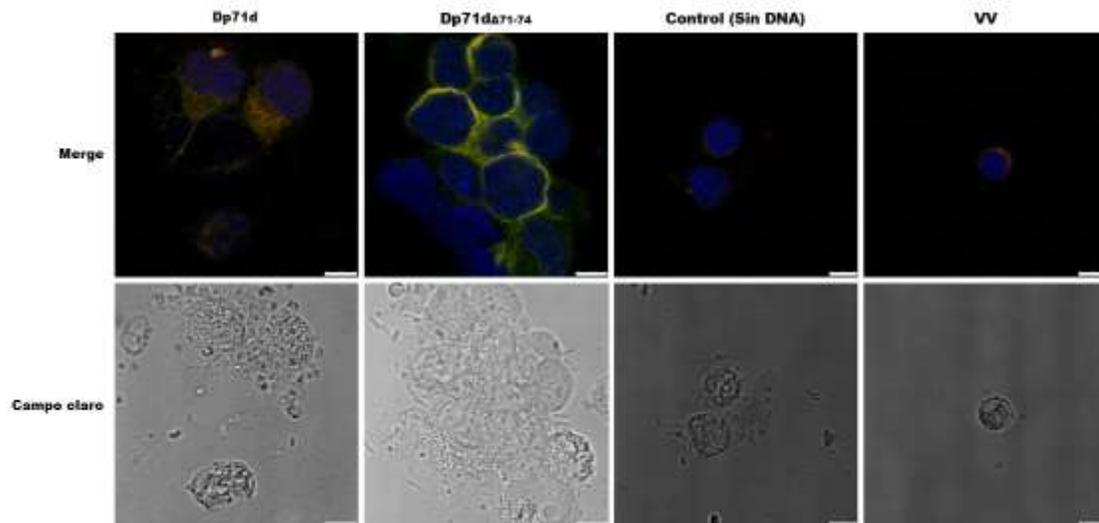


Figura 32. Cambios en la morfología del cultivo de CTPN transfectado y sin diferenciar. El primer panel corresponde a células que expresan Dp71d, el segundo panel a la izquierda corresponde a células que expresan Dp71d Δ 71-74, el siguiente panel corresponde a células del control (Sin DNA) y el último panel corresponde a células del Vector Vacío. En cada panel se compara el "Merge" de la inmunodetección de myc, nestina y DAPI con las fotografías de campo claro. Imágenes de una sola sección ecuatorial Z. VV: Vector vacío. La barra blanca representa la escala de 10 μ m, amplificación a la cual fueron tomadas las fotografías.

6. DISCUSIÓN

Para poder profundizar en el papel que tienen las isoformas de Dp71 en el desarrollo del SNC, es necesario analizar su participación en la diferenciación del cultivo primario de CTPN, mediante la sobreexpresión de las isoformas Dp71d Δ 71-74 y Dp71d. Se eligieron estas isoformas debido a que han sido asociadas a los procesos de diferenciación en células PC12 en estudios previos (León-Moreno, 2016; Paúl-González, 2014). Con el propósito anterior se planteó el presente proyecto que permitió determinar las condiciones para obtener un cultivo de CTPN en suspensión, establecer las condiciones para la transfección de las isoformas Dp71d Δ 71-74 y Dp71d mediante la técnica de nucleofección para finalmente poder expresar éstas en el cultivo de CTPN.

Las células fueron capaces de proliferar, autorrenovarse y diferenciarse como puede observarse en la Fig. 13b, c y d, respectivamente. La idea detrás de este ensayo es que las células capaces de formar neuroesferas probablemente sean CTPN y esto se analizó por la capacidad de estas células para auto renovarse y diferenciarse en los tres linajes presentes en el SNC. Este ensayo fue utilizado para aislar células tanto de tejido embrionario como adulto (Reynolds & Weiss, 1992) y desde entonces ha sido una herramienta para estudiar las características de estas células *in vitro* debido a la simplicidad y reproducibilidad del método. Sin embargo, con este ensayo es difícil distinguir la multipotencialidad de las células, por lo que se sugiere realizar una caracterización de los cultivos en diferenciación mediante una Inmunodetección de los marcadores moleculares de cada uno de los linajes del SNC.

Se utilizan distintos métodos para la disociación de las neuroesferas, incluyendo métodos mecánicos y enzimáticos. A la fecha, no existen muchos estudios que comparen ambos métodos y su efecto en la disociación de las neuroesferas, por lo que en este proyecto se evaluó la eficiencia de ambos a través de la proliferación relativa de las células disociadas (Fig. 14). Con el método mecánico fue posible observar una pérdida de 0.8 veces el número de células con respecto al P0 y aunque es el método original, su eficiencia varía

ya que puede causar muerte y daño celular significativos. Lo anterior es descrito por Sen, Kallos & Behie en 2004, quienes observaron por citometría de flujo mayor formación de restos celulares resultantes de la disociación mecánica (Sen, Kallos, & Behie, 2004). En contraste, con el uso de Accutase[®], que contiene enzimas proteolíticas y colagenolíticas, se observó un incremento en el número de células que al ser subcultivadas exhibieron un periodo de latencia menor que aquellas que fueron disociadas mecánicamente. Esto sugiere que las células que sobrevivieron requirieron de un menor tiempo para recuperarse del daño que experimentaron durante el proceso de disociación. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Jager *et al.* (2016), donde la viabilidad celular del cultivo tratado con Accutase[®] es mayor al de aquellas que fueron disociadas mecánicamente.

Es importante hacer énfasis en que el número de neuroesferas en cultivo no representa el número de células troncales, ya que las neuroesferas pueden derivarse tanto de células troncales auténticas como de células progenitoras más restringidas (Reynolds & Rietze, 2005). Adicionalmente, la heterogeneidad de las neuroesferas es inherente a su estructura tridimensional, demostrado por la tendencia a generar células diferenciadas en el centro de las neuroesferas (Campos *et al.*, 2004). En contraste, los cultivos en monocapa han demostrado minimizar la diferenciación espontánea, favoreciendo la expansión de poblaciones homogéneas (Conti *et al.*, 2005; Goffredo *et al.*, 2008; Spiliotopoulos *et al.*, 2009). Sin embargo, la estructura de las neuroesferas está enriquecida con β 1 integrinas, receptores del EGF y cadherinas (Campos *et al.*, 2004; Jacques *et al.*, 1998; Lobo *et al.*, 2003), sugiriendo que los contactos célula-célula iniciales se retienen durante la división en este tipo de cultivo, creando así un nicho que es fisiológicamente más relevante y que posiblemente responda preguntas que no puedan ser abordadas en otros sistemas.

Existen diversos métodos para la transferencia de genes hacia células de mamíferos, sin embargo, el uso de CTPN genéticamente diseñadas para

propósitos de investigación se ha visto obstaculizado por las bajas eficiencias de transfección obtenidas con vectores no virales o por cuestiones de seguridad cuando se utilizan virus modificados genéticamente. La tecnología de Nucleofección es un método no viral que se basa en dos componentes: 1) un dispositivo que proporciona parámetros eléctricos únicos y 2) soluciones específicas al tipo celular en las cuales las células se encuentran suspendidas durante el programa eléctrico. Se ha demostrado que la nucleofección mejorar la eficiencia de transferencia de genes hasta un 20% en comparación a cualquier otro método de electroporación estándar (Martinet, Schrijvers, & Kockx, 2003). Sin embargo, el tratamiento agresivo de disociación en combinación con la aplicación de electricidad a las células provoca daños irreparables en éstas y una alta mortalidad.

La eficiencia de transferencia de genes depende de distintos factores, entre ellos el tipo de células, el número de células y la cantidad de DNA utilizado. Debido a que no se encontró un estudio previo como antecedente directo para el cultivo de CTPN, se llevó a cabo un ensayo con distintas concentraciones del vector pmaxGFP para determinar la mejor condición. Se observó que la mejor eficiencia de transfección (14.2%, Fig. 19) se obtuvo utilizando 4 μ g del vector. Porcentajes similares se han descrito en otros estudios donde la técnica ha demostrado capacidad para transfectar distintos tipos de células (Gresch *et al.*, 2004; Hamm, Krott, Breibach, Blindt, & Bosserhoff, 2002) incluyendo células troncales embrionarias de humano (hES, Cao *et al.*, 2010). La eficiencia de transfección aumenta de manera no lineal conforme incrementa la concentración de DNA utilizada, por lo que se decidió probar 10 μ g del vector esperando observar una eficiencia mayor al 14.2% obtenido con 4 μ g; sin embargo, la eficiencia obtenida con 10 μ g es comparable a utilizar únicamente 2 μ g. Al utilizar una concentración intermedia (7 μ g) se obtuvo menor eficiencia de transfección comparada con 4 μ g, pero mayor a la obtenida con 10 μ g (12.2%, Fig. 19). Los resultados anteriores sugieren que existe una inhibición de la transferencia del gen y aunque no existen suficientes reportes sobre inhibición debida a altas concentraciones del DNA,

podría deberse a una saturación en la interacción específica que se lleva a cabo entre el DNA y los componentes de los reactivos del proveedor, cuya composición es desconocida, y que es la responsable de formar complejos con el DNA para que pueda ser introducido al núcleo de las células. En el 2004, Gresch y colaboradores observaron que el incremento del DNA plasmídico introducido en cultivos primarios de condrocitos mostró un incremento en la eficiencia de transfección, sin embargo, el incremento fue muy poco entre el uso de 5 y 7.5 µg sugiriendo que se alcanzaban niveles de saturación con la última concentración (Gresch *et al.*, 2004). Por otro lado, en otros estudios se pueden observar diferencias significativas en la concentración de DNA óptima, siendo de 10-15 µg para fibroblastos embrionarios porcinos (PEF, Nakayama *et al.*, 2007) y mucho más baja (2-5 µg) para células hES (Siemen *et al.*, 2005). Puesto que la concentración de DNA óptima parece depender del tipo de células a transfectar, es importante considerar la realización de una curva para establecer la concentración necesaria para obtener la mejor eficiencia de transfección para las CTPN.

En el cultivo de células diferenciadas en ausencia de FGF2, 7 días después de la nucleofección, se encontraron células diferenciadas que continuaban expresando la proteína GFP sin alterar su potencial normal para diferenciarse, tampoco se observaron alteraciones morfológicas evidentes. Lo anterior en correspondencia con lo que observaron Aluigi *et al.* (2006), tras nucleofectar células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea de humano, estas no mostraron deterioro de su inmunofenotipo, potencial de diferenciación o capacidad inmunorreguladora. Resultados similares se han alcanzado en este (Hamm *et al.*, 2002) y otros cultivos primarios “difíciles de transfectar” de distintos tipos celulares, incluyendo condrocitos (Gresch *et al.*, 2004), células troncales embrionarias murinas (Lorenz, Harnack, & Morgenstern, 2004) y células PEF (Nakayama *et al.*, 2007).

La expansión del cultivo sometido a la nucleofección utilizando el plásmido que expresa la GFP durante 6 días de diferenciación, mostró una disminución en

la expresión de la GFP como consecuencia de la degradación por nucleasas del DNA foráneo o su dilución después de varias divisiones celulares, lo anterior por tratarse de una expresión transitoria. Sin embargo, a los 6 días aún podía detectarse un porcentaje significativo de CTPN que expresaban GFP. En contraste con otras técnicas de transfección no viral, la nucleofección permite una transfección eficiente para este tipo de células.

Está reportado que se pueden obtener mejores tasas de transfección con vectores lentivirales (Gropp *et al.*, 2003; Ma, Ramezani, Lewis, Hawley, & Thomson, 2003), sin embargo, la transducción viral plantea sus propios problemas. Además de los problemas de seguridad, el empaquetado viral de cada transgén es laborioso y costoso.

La construcción de los vectores pCMV-myc/Dp71d pCMV-myc/Dp71d Δ 71-74 se evaluó por secuenciación y por expresión de las proteínas recombinantes a través de la transfección de células PC12 Tet-On. Las secuencias obtenidas por secuenciación fueron comparadas por alineamiento con las secuencias reportadas en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). En la Fig. 30, se observa la localización de las proteínas recombinantes en las células PC12 Tet-On, la cual corresponde a lo reportado por Aragón *et al.* (2016), donde la proteína Dp71c (Dp71d Δ 71-74) se localiza en la periferia celular. La localización de la proteína Dp71d, en citoplasma y periferia celular, no había sido observada en estas células por lo que representa un resultado nuevo; sin embargo González *et al.* (2000) observó que la localización de esta proteína en células HeLa era principalmente nuclear. Nuestros resultados sugieren que la localización subcelular de Dp71d es dependiente del tipo celular.

La nucleofección de las CTPN utilizando los vectores construidos mostró la misma localización subcelular que la obtenida en las células PC12 Tet-On para cada una de las proteínas recombinantes; sin embargo, se observaron cambios morfológicos en la mayoría de las células correspondientes a un daño celular considerable (Fig. 32), sugiriendo que el pulso eléctrico que se usa para la nucleofección conduce a la muerte celular. Adicional a lo anterior, no se

encontró expresión de myc en las células transfectadas con 3 y 6 días de diferenciación, sugiriendo que el vector dejó de expresarse. Como consecuencia del daño provocado y de la pérdida de expresión, no fue posible evaluar el efecto de las proteínas recombinantes en la diferenciación de las CTPN.

Se observó la formación de estructuras celulares que corresponden a neuritas en las células con 0 días de diferenciación que fueron transfectadas con la isoforma Dp71d (Fig. 31). Siendo así que la expresión de Dp71d estimula la diferenciación del cultivo de CTPN, aun cuando las células están siendo estimuladas para proliferar por la adición de FGF2. De acuerdo con lo reportado por Paúl-González (2014), la isoforma Dp71d tiene una frecuencia de expresión mayor a las demás isoformas en cultivos de CTPN en proliferación y diferenciación, siendo las frecuencias de 38.24% y 43.7%, respectivamente (Paúl-González, 2014). Lo anterior corresponde con el trabajo realizado por Alemán *et al.* (2001), que tras analizar la localización subcelular de las isoformas de Dp71 en cultivos de neuronas y astrocitos de ratas neonatas, observaron mayor expresión en ambos tipos celulares de las isoformas del grupo Dp71d. Adicionalmente se reportó que en células PC12 diferenciadas a neuronas por inducción con NGF, se encontraba una proporción similar entre isoformas del grupo Dp71d y Dp71f (Márquez *et al.*, 2003), y en 2017, Aragón y colaboradores observaron una mayor expresión de isoformas del grupo Dp71d respecto al Dp71f en tejido de cerebro de ratas adultas (Aragón *et al.*, 2018); los resultados anteriores sugieren que la expresión de las isoformas no es un proceso aleatorio, sino un proceso regulado. Por lo tanto, el efecto de generación de neuritas que observamos con la expresión de la isoforma Dp71d en cultivos en proliferación sugiere que esta isoforma participa activamente durante la diferenciación celular, sin embargo, estos resultados deben ser reproducidos.

7. CONCLUSIONES

- Las neuroesferas obtenidas en los cultivos de CTPN son capaces de proliferar, autorrenovarse y diferenciarse; por lo tanto, se trata de células troncales/progenitoras neurales.
- El uso de Accutase para disociar a las neuroesferas en cultivo incrementó el número de células para el pasaje 2 hasta 2.3 veces; a diferencia del método de disociación mecánica que disminuyó el número de células hasta 0.8 veces.
- La viabilidad promedio 24 horas después de la nucleofección, utilizando el programa de nucleofección HV fue del 35.7%, que corresponde a 5 veces más que la viabilidad promedio utilizando el programa de HE.
- La nucleofección utilizando 4 µg del vector pmaxGFP® tiene una eficiencia de transfección del 14.2%, siendo la mejor eficiencia obtenida en este trabajo. La expresión de GFP se mantiene a los 6 días de la diferenciación.
- Las construcciones pCMV-myc/Dp71d y pCMV-myc/Dp71d_{Δ71-74} expresan proteínas del tamaño correcto y la proteína Dp71d_{Δ71-74} se localizan en las células PC12 Tet-On en la periferia celular, como se ha descrito previamente. La localización subcelular de la proteína Dp71d se observa mayormente en el citoplasma y en la periferia celular.
- Las proteínas recombinantes myc/Dp71d y myc/Dp71d_{Δ71-74} se expresan en el cultivo de CTPN sin diferenciar. La sobreexpresión de la isoforma Dp71d en el cultivo de CTPN con 0 días de diferenciación generó la formación de estructuras neuríticas.
- El tratamiento de nucleofección genera daño celular considerable, por lo que no se pudo realizar un análisis morfológico adecuado en las células tratadas. El vector pCMV-myc no se expresó después de los 4 días de nucleofección.

8. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de la sobreexpresión de isoformas de Dp71 en los cultivos de CTPN en proliferación y diferenciación, utilizando el sistema de expresión lentiviral ya disponible en el laboratorio.
- Caracterizar el cultivo *in vitro* en suspensión mediante inmunodetección de marcadores de células progenitoras y de diferenciación.
- Producción de sistemas de expresión lentiviral para el resto de las isoformas y poder caracterizar sus funciones en el cultivo de CTPN.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, R., Montañez, C., Fuentes-Mera, L., Gonzalez, E., Gómez, P., Quintero-Mora, L., ... Cisneros, B. (2004). Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Experimental Cell Research*, 296(2), 265–275.
- Alemán, V., Osorio, B., Chavez, O., & Rendon, A. (2001). Subcellular localization of Dp71 dystrophin isoforms in cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes. *Histochemistry and Cell*, 115(April), 243–254.
- Aluigi, M., Fogli, M., Curti, A., Isidori, A., Gruppioni, E., Chiodoni, C., ... Lemoli, R. M. (2006). Nucleofection Is an Efficient Nonviral Transfection Technique for Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 24(2), 454–461.
- Anand, A., Tyagi, R., Mohanty, M., Goyal, M., Ranil D De Silva, K., & Wijekoon, N. (2015). *Dystrophin induced cognitive impairment: Mechanisms, models and therapeutic strategies*. *Annals of Neurosciences* (Vol. 22).
- Annese, T., Corsi, P., Ruggieri, S., Tamma, R., Marinaccio, C., Picocci, S., ... Nico, B. (2016). Isolation and characterization of neural stem cells from dystrophic mdx mouse. *Experimental Cell Research*, 343(2), 1–18.
- Aragón, J., González-Reyes, M., Romo-Yañez, J., Vacca, O., Aguilar-González, G., Rendón, A., ... Montañez, C. (2018). Dystrophin Dp71 Isoforms Are Differentially Expressed in the Mouse Brain and Retina: Report of New Alternative Splicing and a Novel Nomenclature for Dp71 Isoforms. *Molecular Neurobiology*, 1–11.
- Aragón, J., Martínez-Herrera, A., Romo-Yañez, J., Ceja, V., Azotla-Vilchis, C., Siqueiros-Márquez, L., ... Montañez, C. (2016). Identification of Dp71 Isoforms Expressed in PC12 Cells: Subcellular Localization and Colocalization with β -Dystroglycan and α 1-Syntrophin. *Journal of Molecular Neuroscience*, 58(2), 201–209.
- Aragón, J., Romo-Yañez, J., Martínez-Herrera, A., Ceja, V., Rendon, A., & Montañez, C. (2011). Characterization of Dp71 Δ 78-79, a novel dystrophin mutant that stimulates PC12 cell differentiation. *Journal of Neurochemistry*, 119(4), 697–707.
- Austin, R. C., Howard, P. L., Souza, V. N. D., Klamut, H. J., & Ray, P. N. (1995). Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Human Molecular Genetics*, 4(9), 1475–1483.
- Austin, R. C., Morris, G. E., Howard, P. L., Klamut, H. J., & Ray, P. N. (2000). Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain. *Neuromuscular Disorders*, 10, 187–193.
- Bar, S., Barnea, E., Levy, Z., Neuman, S., Yaffe, D., & Nudel, U. (1990). A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J*, 272(2), 557–560.

- Bernardino, L., Agasse, F., Silvia, B., Ferreira, R., Grade, S., & Malva, J. O. (2008). Tumor Necrosis Factor- α Modulates Survival, Proliferation, and Neuronal Differentiation in Neonatal Subventricular Zone Cell. *Stem Cells*, 26, 2361–2371.
- Blake, D. J., & Kröger, S. (2000). The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle?, 23(3), 92–99.
- Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., & Davies, K. E. (2002). Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. *Physiological Reviews*, 82(2), 291–329.
- Bushby, K., et al. (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *The Lancet Neurology*, 9(1), 77–93.
- Calderilla-Barbosa, L., Ortega, A., & Cisneros, B. (2006). Phosphorylation of dystrophin Dp71d by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II modulates the Dp71d nuclear localization in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 98(3), 713–722.
- Campos, L. S., Leone, D. P., Relvas, J. B., Brakebusch, C., Fassler, R., Suter, U., & French-Constant, C. (2004). α 1 integrins activate a MAPK signalling pathway in neural stem cells that contributes to their maintenance. *Development*, 131(14), 3433–3444.
- Cao, F., Xie, X., Gollan, T., Zhao, L., Narsinh, K., Lee, R. J., & Wu, J. C. (2010). Comparison of gene-transfer efficiency in human embryonic stem cells. *Molecular Imaging and Biology*, 12(1), 15–24.
- Ceccarini, M., Rizzo, G., Rosa, G., Chelucci, C., Macioce, P., & Petrucci, T. C. (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.
- Cerna, J., Osuna-Castro, J. A., Muniz, J., Mornet, D., Garcia-Sierra, F., & Cisneros, B. (2009). Dystrophin Dp71f associates with components of the beta1-integrin adhesion complex in PC12 cell neurites. *Acta Neurol Belg*, 109(2), 132–135.
- Chang, M. Y., Park, C. H., Lee, S. Y., & Lee, S. H. (2004). Properties of cortical precursor cells cultured long term are similar to those of precursors at later developmental stages. *Developmental Brain Research*, 153(1), 89–96.
- Cisneros, B., Rendon, A., Genty, V., Aranda, G., Márquez, F., Mornet, D., & Montafiez, C. (1996). Expression of dystrophin Dp71 during PC 12 cell differentiation. *Neuroscience Letters*, 213, 107–110.
- Conti, L., et al. (2005). Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biology*, 3(9), 1594–1606.
- Cotton, S., Voudouris, N. J., & Greenwood, K. M. (2001). Intelligence and Duchenne muscular dystrophy: Full-Scale, Verbal, and Performance intelligence quotients. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 43(7), 497–501.
- Daoud, F., et al. (2009). Role of Mental Retardation-Associated Dystrophin-Gene Product

- Dp71 in Excitatory Synapse Organization, Synaptic Plasticity and Behavioral Functions. *PLoS ONE*, 4(8).
- Darras, B. T., Menache-Starobinski, C. C., Hinton, V., & Kunkel, L. M. (2015). Dystrophinopathies. In *Neuromuscular Disorders of Infancy, Childhood, and Adolescence* (Second Edi, pp. 551–592). Elsevier Inc.
- Desguerre, I., *et al.* (2009). Clinical heterogeneity of Duchenne muscular dystrophy (DMD): Definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up. *PLoS ONE*, 4(2).
- Enriquez-Aragón, J. A., Cerna-Cortes, J., Bermudez de Leon, M., Garcia-Sierra, F., Gonzalez, E., Mornet, D., & Cisneros, B. (2005). Dystrophin Dp71 in PC12 cell adhesion. *Neuroreport*, 16(3), 235–238.
- Ervasti, J. M. (2007). Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1772(2), 108–117.
- Ervasti, J. M., & Campbell, K. P. (1991). Membrane Organization of the Dystrophin-Glycoprotein Complex. *Cell*, 66(Figure 1), 1121–1131.
- Ervasti, J. M., Kahl, S. D., & Campbell, K. P. (1991). Purification of dystrophin from skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 266(14), 9161–9165.
- Ervasti, J. M., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., Gaver, M. G., & Campbell, K. P. (1990). Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature*, 345, 315–319.
- Fuentes-Mera, L., Rodríguez-Muñoz, R., González-Ramírez, R., García-Sierra, F., González, E., Mornet, D., & Cisneros, B. (2006). Characterization of a novel Dp71 dystrophin-associated protein complex (DAPC) present in the nucleus of HeLa cells: Members of the nuclear DAPC associate with the nuclear matrix. *Experimental Cell Research*, 312(16), 3023–3035.
- Gage, F. H. (2000). Mammalian Neural Stem Cells. *Science*, 287(February), 1433–1439.
- García-Tovar, C. G., *et al.* (2002). Dystrophin isoform Dp71 is present in lamellipodia and focal complexes in human astrocytoma cells U-373 MG. *Acta Histochemica*, 104(3), 245–254.
- Gilyarov, A. V. (2008). Nestin in central nervous system cells. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 38(2), 165–169.
- Goffredo, D., *et al.* (2008). Setting the conditions for efficient, robust and reproducible generation of functionally active neurons from adult subventricular zone-derived neural stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 15(12), 1847–1856.
- González, E., Montañez, C., Ray, P. N., Howard, P. L., García-Sierra, F., Mornet, D., & Cisneros, B. (2000). Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS Letters*, 482(3), 209–14.
- Goslin, K., Schreyer, D. J., Skene, J. H., & Banker, G. (1988). Development of neuronal

- polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones. *Nature*, 336(6200), 672–674.
- Greenberg, D. S., Schatz, Y., Levy, Z., Pizzo, P., Yaffe, D., & Nudel, U. (1996). Reduced levels of dystrophin associated proteins in the brains of mice deficient for Dp71. *Human Molecular Genetics*, 5(9), 1299–1303.
- Greene, N. D. E., & Copp, A. J. (2009). Development of the vertebrate central nervous system : formation of the neural tube. *Prenatal Diagnosis*, 29(4), 303–311.
- Gresch, O., *et al.* (2004). New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods*, 33(2), 151–163.
- Gropp, M., Itsykson, P., Singer, O., Ben-Hur, T., Reinhartz, E., Galun, E., & Reubinoff, B. E. (2003). Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors. *Molecular Therapy*, 7(2), 281–287.
- Hamm, A., Krott, N., Breibach, I., Blindt, R., & Bosserhoff, A. K. (2002). Efficient Transfection Method for Primary Cells. *Tissue Engineering*, 8(2), 235–245.
- Herrera-Salazar, A., Garcia-Villegas, R., Aragón, J., Sanchez-Trujillo, A., Ceja, V., Martinez-Herrera, A., ... Montanez, C. (2016). Overexpression of mutant dystrophin Dp71 Δ 78-79 stimulates cell proliferation. *Neuroreport*, 27(1), 6–11.
- Hoffman, E. P., Brown, R. H., & Kunkel, L. M. (1987). Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51(6), 919–928.
- Hugnot, J. P., Gilgenkrantz, H., Vincent, N., Chafey, P., Morris, G. E., Monaco, A. P., ... Kahn, A. (1992). Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(16), 7506–10.
- Imamura, M., & Ozawa, E. (1998). Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyryl-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6139–44.
- Jacques, T. S., Relvas, J. B., Nishimura, S., Pytela, R., Edwards, G. M., Streuli, C. H., & French-Constant, C. (1998). Neural precursor cell chain migration and division are regulated through different beta1 integrins. *Development (Cambridge, England)*, 125(16), 3167–3177.
- Jager, L. D., Canda, C. M. A., Hall, C. A., Heilingoetter, C. L., Huynh, J., Kwok, S. S., ... Jensen, M. B. (2016). Effect of enzymatic and mechanical methods of dissociation on neural progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells. *Advances in Medical Sciences*, 61(1), 78–84.
- Jessberger, S., Toni, N., Jr, G. D. C., Ray, J., & Gage, F. H. (2008). Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nature Neuroscience*, 11(8), 888–893.

- Johe, K. K., Hazel, T. G., Muller, T., Dugich-Djordjevic, M. M., & McKay, R. D. G. (1996). Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes & Development*, *10*, 3129–3140.
- Jung, D., Filliol, D., Metz-Boutigue, M. H., & Rendon, A. (1993). Characterization and subcellular localization of the dystrophin-protein 71 (Dp71) from brain. *Neuromuscular Disorders*, *3*(5–6), 515–518.
- Kalyani, A. J., & Rao, M. S. (1998). Cell lineage in the developing neural tube. *Biochem Cell Biol*, *76*(6), 1051–1068.
- Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C., & Kunkel, L. M. (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), 509–517.
- Koenig, M., Monaco, A. P., & Kunkel, L. M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, *53*(2), 219–228.
- Lapidos, K. A., Kakkar, R., & McNally, E. M. (2004). The Dystrophin Glycoprotein Complex: Signaling Strength and Integrity for the Sarcolemma. *Circulation Research*, *94*(8), 1023–1031.
- 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. *Human Molecular Genetics*, *2*(11), 1883–1888.
- León-Moreno, L. (2016). *Estudio del efecto de la sobreexpresión de las distrofinas Dp71a y Dp71c en las células PC12*. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Lobo, M. V. T., Alonso, F. J. M., Redondo, C., López-Toledano, M. A., Caso, E., Herranz, A. S., ... Bazán, E. (2003). Cellular characterization of epidermal growth factor-expanded free-floating neurospheres. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *51*(1), 89–103.
- Lorenz, P., Harnack, U., & Morgenstern, R. (2004). Efficient gene transfer into murine embryonic stem cells by nucleofection, *3*, 1589–1592.
- Louis, S. A., Rietze, R. L., Deleyrolle, L., Wagey, R. E., Thomas, T. E., Eaves, A. C., & Reynolds, B. A. (2008). Enumeration of Neural Stem and Progenitor Cells in the Neural Colony-Forming Cell Assay. *Stem Cells*, *26*(4), 988–996.
- Ma, Y., Ramezani, A., Lewis, R., Hawley, R. G., & Thomson, J. A. (2003). High-Level Sustained Transgene Expression in Human Embryonic Stem Cells Using Lentiviral Vectors. *Stem Cells*, *21*, 111–117.
- Márquez, F. G., *et al.* (2003). Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience*, *118*(4), 957–966.
- Martinet, W., Schrijvers, D. M., & Kockx, M. M. (2003). Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells. *Biotechnology Letters*, *25*(13), 1025–

1029.

- Merino-Jiménez, C., Aragón, J., Ceja, V., Rodríguez-Martínez, G., Cázares-Raga, F. E., Chardonnet, S., ... Montañez, C. (2016). Dp71Δ 78-79 dystrophin mutant stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via upregulation and phosphorylation of HspB1. *Proteomics*, 16(9), 1331–1340.
- Miranda, R., Nudel, U., Laroche, S., & Vaillend, C. (2011). Altered presynaptic ultrastructure in excitatory hippocampal synapses of mice lacking dystrophins Dp427 or Dp71. *Neurobiology of Disease*, 43(1), 134–141.
- Monaco, A., Neve, R., Colletti-Feener, C., Bertelson, C., Kurnit, D., & Kunkel, L. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*, 323, 646–650.
- Morales-Lázaro, S. L., González-Ramírez, R., Gómez, P., Tapia-Ramírez, V., De León, M. B., & Cisneros, B. (2010). Induction of dystrophin Dp71 expression during neuronal differentiation: Opposite roles of Sp1 and AP2α in Dp71 promoter activity. *Journal of Neurochemistry*, 112(2), 474–485.
- Morris, G. E., Simons, C., & Nguyen. (1995). Apo-Dystrophins (Dp140 and Dp71) and Dystrophin splicing isoforms in developing brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 215(1), 361–367.
- Nakayama, A., Sato, M., Shinohara, M., Matsubara, S., Yokomine, T., Akasaka, E., ... Takao, S. (2007). Efficient Transfection of Primarily Cultured Porcine Embryonic Fibroblasts Using the Amaxa Nucleofection System™. *Cloning and Stem Cells*, 9(4), 523–534.
- Paúl-González, S. (2014). *Caracterización De Isoformas De Dp71/Dp40 En Células Troncales/Progenitoras Neurales*. Centro De Investigación Y De Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional.
- Paxinos, G. (2004). *The Rat Nervous System*. (G. Paxinos, Ed.) (3rd Editio). Elsevier Academic Press.
- Pevny, L., & Rao, M. S. (2003). The stem-cell menagerie. *Trends in Neurosciences*, 26(7), 351–359.
- Ramos, J., & Chamberlain, J. S. (2015). Gene Therapy for Duchenne muscular dystrophy Julian. *Expert Opin Orphan Drugs*, 3(11), 1255–1266.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(30), 21289–21292.
- Rapaport, D., Greenberg, D. S., Tal, M., Yaffe, D., & Nudel, U. (1993). Dp71, the nonmuscle product of the Duchenne muscular dystrophy gene is associated with the cell membrane. *FEBS Lett*, 328(1–2), 197–202.
- Reynolds, B. A., & Rietze, R. L. (2005). Neural stem cells and neurospheres - Re-evaluating the relationship. *Nature Methods*, 2(5), 333–336.

- Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Nervous System Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Science*, *255*(5052), 1707–1710.
- Ricotti, V., Ridout, D. A., Scott, E., Quinlivan, R., Robb, S. A., Manzur, A. Y., & Muntoni, F. (2013). Long-term benefits and adverse effects of intermittent versus daily glucocorticoids in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *84*(6), 698–705.
- Romo-Yáñez, J., Ceja, V., Ilaraza-Lomelí, R., Coral-Vázquez, R., Velázquez, F., Mornet, D., ... Montañez, C. (2007). Dp71ab/DAPs complex composition changes during the differentiation process in PC12 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *102*(1), 82–97.
- Saint Martín, A., Aragón, J., Depardon-Benítez, F., Sánchez-Trujillo, A., Mendoza-Hernández, G., Ceja, V., & Montañez, C. (2012). Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy-terminal end. *FEBS Journal*, *279*(1), 66–77.
- Sarig, R., Mezger-Lallemand, V., Gitelman, I., Davis, C., Fuchs, O., Yaffe, D., & Nudel, U. (1999). Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: Differential activity of the Dp71 promoter during development. *Human Molecular Genetics*, *8*(1), 1–10.
- Sen, A., Kallos, M. S., & Behie, L. a. (2004). New tissue dissociation protocol for scaled-up production of neural stem cells in suspension bioreactors. *Tissue Engineering*, *10*(5–6), 904–13.
- Siemen, H., Nix, M., Endl, E., Koch, P., Itskovitz-Eldor, J., & Brüstle, O. (2005). Nucleofection of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development*, *14*(4), 378–383.
- Spiliotopoulos, D., Goffredo, D., Conti, L., Di Febo, F., Biella, G., Toselli, M., & Cattaneo, E. (2009). An optimized experimental strategy for efficient conversion of embryonic stem (ES)-derived mouse neural stem (NS) cells into a nearly homogeneous mature neuronal population. *Neurobiology of Disease*, *34*(2), 320–331.
- Suárez-Sánchez, R., *et al.* (2014). Nucleocytoplasmic shuttling of the Duchenne muscular dystrophy gene product dystrophin Dp71d is dependent on the importin α/β and CRM1 nuclear transporters and microtubule motor dynein. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1843*(5), 985–1001.
- Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, K. A., & Gage, F. H. (2007). In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, *8*(3), 573–579.
- Tadayoni, R., Rendon, A., Soria-Jasso, L. E., & Cisneros, B. (2012). Dystrophin Dp71: The smallest but multifunctional product of the duchenne muscular dystrophy gene. *Molecular Neurobiology*, *45*(1), 43–60.
- Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature*, *414*(6859), 112–117.
- Tinsley, J. M., Blake, D. J., & Davies, K. E. (1993). Apo-dystrophin-3: A 2.2kb transcript from

- the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Human Molecular Genetics*, 2(5), 521–524.
- Tozawa, T., *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. *Molecular Neurobiology*, 45(2), 287–297.
- Tropepe, V., Sibilio, M., Ciruna, B. G., Rossant, J., Wagner, E. F., & van der Kooy, D. (1999). Distinct Neural Stem Cells Proliferate in Response to EGF and FGF in the Developing Mouse Telencephalon. *Developmental Biology*, 208(1), 166–188.
- 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).
- 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. *Neurochemical Research*, 35(3), 366–373.
- Wagner, K. R., Lechtzin, N., & Judge, D. P. (2007). Current treatment of adult Duchenne muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1772(2), 229–237.
- Zecevic, N. (2004). Specific characteristic of radial glia in the human fetal telencephalon. *Glia*, 48(1), 27–35.