



**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Genética y Biología Molecular

**Caracterización de células PC12 Tet-On que sobreexpresan a
la distrofina Dp71ab**

Tesis que presenta

Q.B.P. Irais Erendira Valenzuela Arzeta

Para Obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

En la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Directora de Tesis

Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda

DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE PROYECTO, IRAIS ERENDIRA VALENZUELA ARZETA FUE BECADA POR EL CONSEJO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT) (701036).

EL PROYECTO FUE APOYADO POR EL DONATIVO OTORGADO A LA DOCTORA SILVIA CECILIA IRENE MONTAÑEZ OJEDA; CONACYT CB-2013-222054.

Agradecimientos

A la Doctora Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda por creer en mí, por su confianza y por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A mis asesores el Doctor Luis Marat Álvarez Salas y el Doctor Javier Hernández Sánchez por su disposición y conocimientos compartidos para la realización de este trabajo.

Al doctor Jorge Aragón por su paciencia, por compartir sus conocimientos y amistad.

A los auxiliares Alejandra Sánchez y Víctor Ceja por sus consejos y asesoría.

Al técnico del laboratorio Clemencia Salas por su disposición para proporcionar el material necesario y por su apoyo técnico.

A mis amigos por apoyarme en los buenos y malos momentos, pero sobre todo, por enseñarme el enorme valor que tiene la amistad. ¡Si van, si van!, ¡Los quiero!.

A mi madre, por ser el pilar de la familia, por toda tu fortaleza y tu inmenso apoyo y por ser, de la lista, la primera en creer en mí. No tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí mamá.

A mi hermano, mi mentor y mi ejemplo a seguir, por todo tu esfuerzo en mantener esta familia unida y por enseñarme esos importantes valores.

A Pame, por todas tus porras, por estar siempre al pendiente de mí y por enseñarnos que hablar de lo que sentimos y llorar no es malo.

A mi hermana por enseñarme que una princesa se rescata sola, por todas las risas y lágrimas compartidas y todo el apoyo que me has brindado.

A mis sobrinos Jaen, Alan e Iñaki, ustedes son la luz de mi vida, los amo inmensamente por el simple hecho de existir.

A mi padre, porque no hay día que no te extrañe, porque sé que te hubiera gustado estar aquí y que hiciste todo lo posible para que tu último respiro te permitiera llegar. Ya volveremos a estar juntos papá.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
a. La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)	1
b. La distrofina.....	2
c. Isoformas de la distrofina	5
d. Relevancia de Dp71ab.....	7
e. Línea celular PC12	11
II. JUSTIFICACIÓN	14
III. OBJETIVOS	15
a. Objetivo General.....	15
b. Objetivos Específicos.....	15
IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	16
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
a. Cultivo de células PC12 Tet-On	17
b. Extracción de RNA.....	17
c. Transcripción Reversa acoplada a PCR (RT-PCR).....	17
d. Extracción de proteína	18
e. Western Blot	19
f. Curva de inducción de Myc-Dp71ab	20
g. Inmunofluorescencia.....	20
h. Curva de proliferación.....	21
i. Ensayo de Proliferación con Carboxifluoresceína.....	21
j. Análisis morfométrico	21
VI. RESULTADOS	23
VII. DISCUSIÓN.....	45
VIII. CONCLUSIONES.....	51
VIII. PERSPECTIVAS	52
IX. REFERENCIAS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Complejo distrofina-glicoproteína (DGC).....	2
Figura 2. Proteína distrofina y sus isoformas.....	4
Figura 3. Esquema del gen DMD.....	6
Figura 4. Morfología de células PC12 silvestre, células antisentido-Dp71. Representación de la unión de la Dp71f a la β 1-integrina en el complejo de adhesión	8
Figura 5. Modelo del complejo Dp71ab/DAPs en células PC12 durante la diferenciación con NGF.....	9
Figura 6. Curva de inducción de la clona PC12 Tet-On/Dp71ab-1 con DOX.....	23
Figura 7. Curva de inducción de la clona PC12 Tet-On/Dp71ab-4 con DOX.....	24
Figura 8. Amplificación de los fragmentos de DNA de Dp71ab.....	25
Figura 9. Secuenciación de los fragmentos de DNA de las clonas Dp71ab-1 y Dp71ab-4.	26
Figura 10. Inducción de las clonas PC12 Tet-On/Dp71ab-1 y Dp71ab-4 con DOX.....	27
Figura 11. Localización del péptido Myc en la clona control y tratadas con DOX.....	28
Figura 12. Localización de la proteína Myc/Dp71ab en Dp71ab-Clona 1 y Dp71ab-Clona 4 tratadas con DOX.....	29
Figura 13. Curvas de crecimiento de las clonas de PC12 Tet-On/Dp71ab-4 y la clona control.....	30
Figura 14. Gráficas de proliferación de las clonas de PC12 Tet-On/Dp71ab-4, Dp71a y la clona control.....	32
Figura 15. Expresión de PCNA en las clonas Dp71ab, Dp71ab-4 y la clona control.....	33
Figura 16. Adhesión de células a colágena.....	34
Figura 17. Expresión de FAK en las clonas Dp71ab, Dp71ab-4 y la clona control.....	35

Figura 18. Localización de la proteína FAK en la clona control, Dp71d Δ 71 y Dp71f Δ 71-4 tratadas con DOX en células no diferenciadas.....	37
Figura 19. Diferenciación de células Dp71f Δ 71-4 y la clona control con NGF.....	38
Figura 20. Diferenciación de células Dp71f Δ 71-4 y la clona control con NGF.	39
Figura 21. Expresión de NF-L en las clonas Dp71d Δ 71, Dp71f Δ 71-4 y la clona control.....	40
Figura 22. Expresión de Myc/Dp71 en las clonas Dp71d Δ 71, Dp71f Δ 71-4 y la clona control.....	41
Figura 23. Localización de la proteína Myc/Dp71f Δ 71 en la clona Dp71f Δ 71-4 tratadas con DOX en células no diferenciadas y diferenciadas con NGF.....	42
Figura 24. Localización de la proteína MAP II a en la clona control y Dp71ab-Clona 4 tratadas con DOX en células no diferenciadas y diferenciadas con NGF.....	43
Figura 25. Localización de la proteína Sinaptofisina en la clona control y Dp71ab-Clona 4 tratadas con DOX en células no diferenciadas y diferenciadas con NGF.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

- CB** Buffer de citoesqueleto
- CFSE** Carboxyfluoresceína
- CR** Región rica en cisteína
- CTD** Región carboxilo terminal
- DAPC** Complejo de proteínas acopladas a Distrofina
- Dbr** Distrobrevina
- DG** Distroglicano
- DMD** Distrofia Muscular de Duchenne
- DOX** Doxiciclina
- Erk** Extracellular signal--regulated kinase
- NGF** Factor de crecimiento neuronal
- MAP II** Proteína asociada a microtúbulos 2
- MCS** Sitio de clonación múltiple
- NF-L** Neurofilamento de cadena ligera
- nNOS** Óxido nítrico sintetasa neuronal
- NTD** Región amino terminal
- PBS** Buffer de solución de fosfatos
- PCNA** Antígeno nuclear de proliferación celular
- PCR** Reacción en cadena de la polimerasa
- RT-PCR** Transcripción reversa acoplada a PCR
- SNC** Sistema Nervioso Central
- Syn** Sintrofina
- TBE** Buffer Tris-Borato-EDTA
- tTA** Transactivador controlado por tetraciclina
- Tet** Tetraciclina
- TeR** Elemento de respuesta a Tet

Resumen

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) se caracteriza por la ausencia de una proteína denominada distrofina que está codificada en el gen *DMD*, esta proteína está sujeta a regulación transcripcional y eventos de procesamiento alternativo. Dp71 es el producto del gen de distrofina más abundante en cerebro y su ausencia está relacionada con retraso mental en la DMD. El transcrito de Dp71 sufre procesamientos alternativos en los exones 71-74 y 78 y el intrón 77 dando como resultado diversas isoformas que se clasifican de acuerdo a su C-terminal (CTD). Se ha sugerido que esta región es responsable de la diferencia en localización y función de las diferentes isoformas. Dp71f Δ 71 (Dp71ab) forma parte del grupo de Dp71f, implicado en procesos de adhesión y en consecuencia en diferenciación en presencia de NGF. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la sobreexpresión de la distrofina Dp71f Δ 71 (Dp71ab) en la proliferación y diferenciación de células PC12 Tet-On. Se caracterizaron las clonas PC12 Tet-On/pTRE2pur-Myc/Dp71ab mediante técnicas de RT-PCR, Western Blot, Inmunofluorescencia Indirecta (IF), citometría de flujo y análisis morfométrico. La localización de la proteína recombinante (Myc/Dp71f Δ 71) fue estudiada por inmunofluorescencia indirecta (IF) observándose que esta proteína se encuentra principalmente asociada a membrana y en citoplasma como se reportó en estudios previos en células transfectadas de forma transitoria. Las células que expresan Dp71f Δ 71 (Dp71ab) mostraron una proliferación más lenta en comparación con la clona control PC12 Tet-On transfectada con el vector vacío; por el contrario, en presencia de NGF, se encontró que la sobreexpresión de Myc/ Dp71f Δ 71 provoca una proliferación celular más rápida, un aumento en la producción de neuritas y la expresión de marcadores de diferenciación como MAP-2 y Sinaptofisina. Este estudio demuestra que esta isoforma participa tanto en la proliferación como en la diferenciación de células PC12.

Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a neuromuscular disorder caused by the absence of the dystrophin protein. Dystrophin is encoded by the *DMD* gene, which is subject to transcriptional regulation and splicing events. Dp71 is the most abundant *DMD* gene product in the brain and its absence has been associated with mental retardation. The Dp71 mRNA undergoes alternative splicing into the exons 71-74, 78 and intron 77, generating multiple Dp71 isoforms, which are grouped according to their C-terminal end. It has been suggested that this region is involved in the differential localization and function of the variety of Dp71 isoforms. Dp71f_{Δ71} (Dp71ab) is part of the Dp71f group and has been involved in the process of cell adhesion and differentiation in the presence of the nerve growth factor (NGF). The aim of the present study was the isolation and characterization of stably transfected PC12 Tet-On cells with pTRE2-purMyc/ Dp71f_{Δ71} vector. Stable transfected clones, Dp71f_{Δ71}-1 (Dp71ab-1) and Dp71f_{Δ71}-4 (Dp71ab-4), overexpressing Dp71f_{Δ71} (Dp71ab) were obtained and analyzed by RT-PCR, western blot, indirect immunofluorescence, flow cytometer and morphometric analysis. Recombinant protein Myc/Dp71f_{Δ71} was mainly localized in the cell membrane and cytoplasm of undifferentiated and NGF-differentiated cells. Interestingly, the overexpression of Myc/ Dp71f_{Δ71} stimulates both cell proliferation and NGF-neuronal differentiation of PC12 Tet-On cells in comparison to the control. In addition, expression of differentiation markers MAP-2 and Synaptophysin was evaluated. In conclusion, this study demonstrated the dystrophin Dp71f_{Δ71} (Dp71ab) isoform has an important role on the cell proliferation and neuronal differentiation.

I. INTRODUCCIÓN

a. La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia Muscular de Becker (BMD) son enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X. Mutaciones genéticas en este cromosoma conducen a la ausencia de la proteína denominada distrofina. Esta enfermedad se caracteriza por atrofia músculo-esquelética progresiva en las extremidades proximales y pseudohipertrofia del músculo gastrocnemio. Este padecimiento afecta a individuos de entre 3 y 5 años de edad quienes pierden gradualmente la capacidad de caminar y mueren alrededor de los 20 años de edad debido a fallas respiratorias y/o insuficiencia cardiaca (Liang *et al*, 2015). La BMD tiene una menor incidencia de daño conductual y cognitivo (Mehnlner, 2000)

El cociente intelectual para la población con DMD tiene una media de 80.2, el cuál es más bajo que la media de la población normal. Las distrofias de Becker y de Duchenne están asociadas con un incremento en desórdenes neuropsiquiátricos y de comportamiento incluyendo el espectro del desorden autista (*Autism Spectrum Disorder, ASD*) y el transtorno de hiperactividad con déficit de atención (*Attention Deficit Hyperactivity Disorder ADHD*). La incidencia de dislexia, discalculia y disgrafia aumenta en niños con DMD. La carencia de distrofina también parece estar asociada con un incremento en el número de sinapsis axodendríticas inhibitorias y alteraciones en la organización de densidades post-sinápticas (*Postsynaptic Densities PSDs*) (Waite, Brown and Blake, 2012). Los pacientes también presentan déficit de memoria incluyendo, memoria de trabajo, memoria a corto plazo y memoria a largo plazo (Nichols, Takeda and Yokota, 2015)

La DMD ocurre con una frecuencia de 1:4,000 varones nacidos vivos. Varios grupos están intentando desarrollar tratamientos nuevos, incluyendo varias terapias que se dirigen a subgrupos de pacientes con ciertos tipos de mutaciones (Talsness, Belanto and Ervasti, 2015). Oligonucleótidos que

inducen un salto en determinados exones pueden restaurar el marco de lectura de la distrofina y por lo tanto la producción de la proteína; sin embargo, este tratamiento requiere la administración constante de drogas y puede no generar un salto completo del exón blanco (Osteroud *et al*, 2015).

b. La distrofina

En células de músculo estriado, la contracción de los sarcómeros está acoplada al sarcolema mediante la red de proteínas del costámero, una subestructura de éste, conocida como complejo distrofina-glicoproteína (*Dystrophin-Glycoprotein Complex DGC*), une físicamente el interior de las fibras del músculo con la matriz extracelular, contribuyendo a la integridad de la miofibra durante la contracción y relajación muscular (Talsness *et al*, 2015) (Fig. 1).

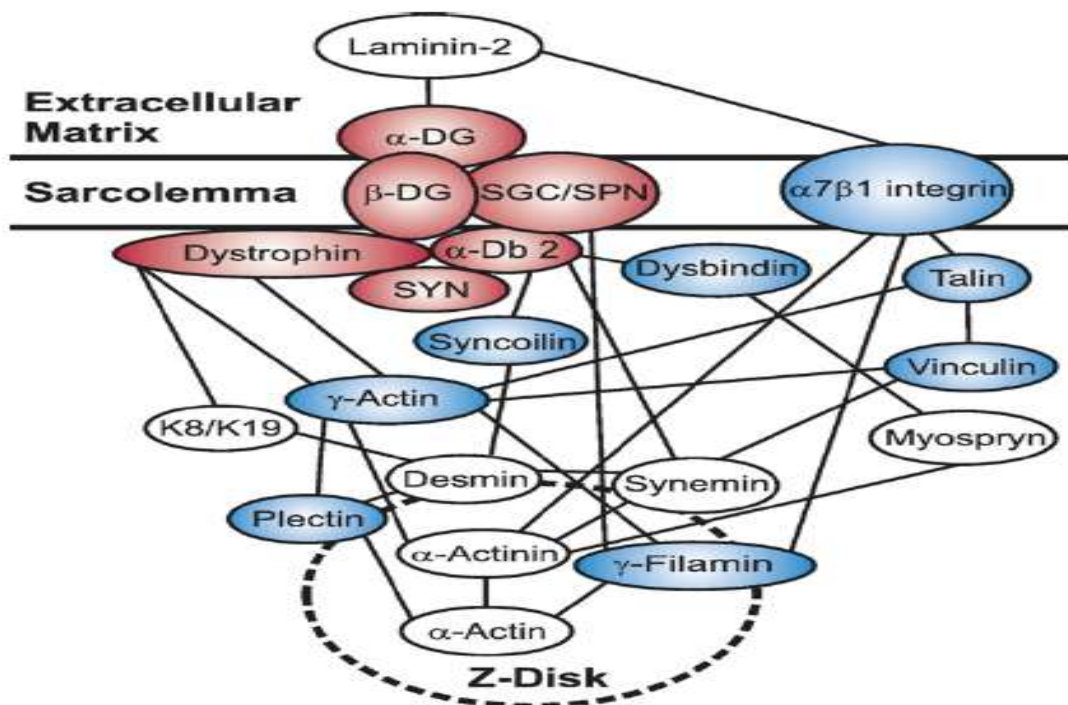


Figura 1. Complejo distrofina-glicoproteína (DGC). Se muestra en rojo los constituyentes que forman parte del núcleo del complejo distrofina-glicoproteína, el cual decrece su abundancia cuando la distrofina está ausente. α -Distroglicano, y β -Distroglicano (α -DG, β -DG); el complejo sarcoglicano (SGC); sarcospan (SPN); α -

distrobrevina-2 (α -Db 2); sintrofina (SYN). Las proteínas mostradas en azul incrementan sus niveles cuando la distrofina está ausente (Ervasti, 2007).

Bioquímicamente el DGC se compone de tres elementos principales como se muestra en la figura 1, (i) α y β distroglicano, (ii) el complejo sarcoglicano (*Sarcoglycan Complex SGC*) y (iii) el subcomplejo citoplasmático compuesto por la familia de proteínas distrofina, distrobrevinas y sintrofinas. El DGC protege al músculo de daño mecánico y mantiene los niveles de Ca^{2+} en las fibras musculares. La pérdida de la distrofina causa una disociación parcial del DGC produciendo necrosis, inflamación y agotamiento de las reservas de células troncales debido al daño muscular y a la regeneración (Waite *et al*, 2012).

El dominio amino terminal de la distrofina contiene un par de regiones homólogas a calponina (CH) que juntas forman un dominio de unión a la actina (ABD) (Figura 2); el dominio central que está compuesto por 24 repetidos tipo espectrina interrumpidos con 4 bisagras ricas en prolina, que le dan a la distrofina una forma de barra alargada y flexible (Ervasti, 2007), Esta región actúa como otro sitio de unión para la actina y para la Sintasa Óxido Nítrico neuronal (*Neuronal Nitric Oxide Synthase nNOS*). Para que la distrofina se pueda unir a la actina ocurre un cambio conformacional en la región CH que conduce a un re-arreglo de la región de unión a la actina (ABS) y a la formación de una superficie de unión a esta proteína, la región CH2 ayuda a incrementar la afinidad entre el dominio de unión de la actina (ABD) y la actina (Liang *et al*, 2015). El tercer dominio es rico en cisteína, presenta dos módulos *EF Hand* delimitados por módulos WW y ZZ (Ervasti, 2007). La región carboxilo terminal se une a la distrobrevina, sintrofina y β -distroglicano, una proteína transmembranal que interactúa con el sarcoglicano y α -distroglicano, el α -distroglicano interactúa con la laminina 2 (Liang *et al*, 2015).

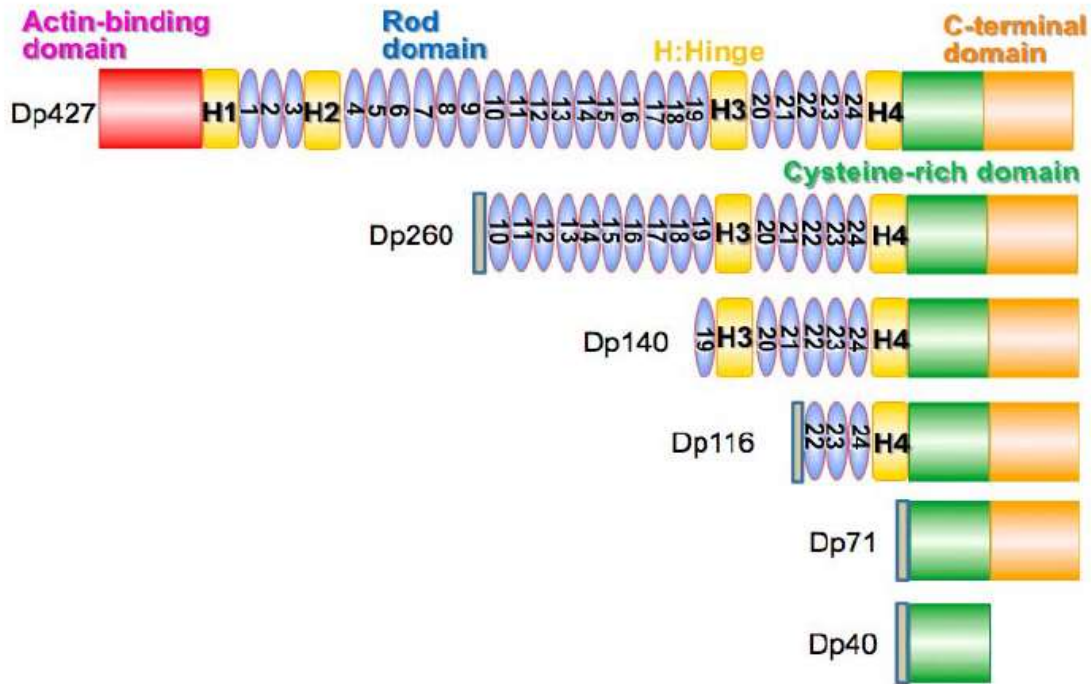


Figura 2. La familia de las distrofinas. El gen DMD produce varias formas de la distrofina. La proteína de longitud completa se denomina Dp427 y tiene una secuencia amino terminal única que es diferente en cada tejido en el que se expresa. De acuerdo al promotor que se activa para su expresión, la proteína de longitud completa recibe el nombre de Dp427m (músculo), Dp427c (neuronas/cortex), Dp427p (células de Purkinje). La Dp427 tiene 24 repetidos tipo espectrina; la Dp260 se expresa en retina, contiene 15 repetidos tipo espectrina; la Dp140 se expresa principalmente durante el desarrollo del cerebro fetal y contiene 6 repetidos tipo espectrina; la Dp116 es específica de las células de Schwann en el nervio periférico; la Dp71 es una forma ubicua y Dp40 es la forma más corta que se conoce, es expresada en neuronas del hipocampo e interactúa con varias proteínas presinápticas (Tosawa et al, 2012, Fujimoto, Itoh and Yaoi, 2014)

La estabilidad de la conformación de la proteína, así como su interacción con otras proteínas se debe en gran parte a sus características hidrofóbicas. La distrofina tiene cuatro regiones hidrofóbicas importantes localizadas entre los residuos 60-132, 1990-2010, 2450-2500, 3150-3300, codificada por los exones 3-6, 42, 51 y 65-68 respectivamente (Liang *et al*, 2015).

El gen *DMD* codifica a la distrofina y está localizado en la región Xp21.1, es el gen humano más largo reportado a la fecha, contiene 79 exones. Se han encontrado muchas mutaciones en este gen, el 65% de ellas son deleciones, del 7 al 10% son duplicaciones, mientras que del 25 al 30% son mutaciones puntuales. Las mutaciones que interrumpen el marco de lectura de la distrofina causan síntomas severos de DMD, aquellas que no interrumpen el marco de lectura, resultan en BMD (Tandom *et al*, 2015). El daño por mutación en regiones de la distrofina, incluidas aquellas mutaciones que alteran el marco de lectura, han mostrado que conducen a la DMD en la mayoría de los casos (Liang *et al*, 2015).

Las excepciones a la regla se deben a mutaciones en la estructura CH que afectan directamente la afinidad entre el ABD y la actina. Mutaciones en la segunda región hidrofóbica, parecen poner en riesgo la estabilidad de la conexión nNOS-sarcolema resultando en una falla de nNOS para anclar el sarcolema, daños en esta conexión podrían ser la causa de la DMD (Liang *et al*, 2015). Investigaciones previas de correlaciones entre el genotipo de la distrofina y el fenotipo cardíaco han encontrado que los exones de la distrofina 45, 48 a 49 y 51 a 52 y el ABD, el dominio rico en cisteína y el dominio carboxilo terminal correlacionan con un comienzo temprano de disfunción cardíaca (Tandom *et al*, 2015).

c. Miembros de la familia de la distrofina

La expresión del gen de *DMD* está sujeta a regulación transcripcional y post-transcripcional que incluye el uso de 7 promotores independientes y eventos de procesamiento alternativo, tres promotores regulan la expresión de las distrofinas de longitud completa (Dp427), compuesta de 79 exones. Estos promotores transcriben las distrofinas en cerebro, músculo estriado y células de Purkinje (Waite *et al*, 2012). Cuatro promotores internos regulan la expresión de las distrofinas llamadas Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 y Dp40. (Aragón *et al*, 2016) (Figura 3).



Figura 3. Esquema del gen DMD. Los tres promotores localizados en el extremo proximal del gen (indicado por flechas rojas, naranjas y amarillas), expresan a la proteína completa Dp427 en cerebro (B), músculo (M) y células de Purkinje (P). Se indican los promotores internos localizados en los intrones 29, 44, 55 y 62 que expresan a las distrofinas Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 y Dp40 (Waite *et al*, 2012).

El promotor de Dp71 localizado dentro del intrón 62 también regula la expresión de Dp40 a su vez. La proteína de Dp71 se expresa en diferentes estructuras del cerebro y tipos de células, incluyendo astrocitos perivasculares, neuronas del hipocampo, en el bulbo olfatorio, astrocitos del cerebro anterior y en la densidad postsináptica *in vivo* (Giocanti-Auregan *et al* 2015).

La deficiencia de Dp71 está asociada con retraso mental, Dp71 se requiere en la organización y estabilización de componentes de DAPs (*dystrophin associated proteins*), canales de potasio y agua y para el mantenimiento de la morfología de la membrana. También existen reportes de que Dp71 juega un papel en la miosinapsis neuronal en cocultivos de células PC12 y miotubos L6, Dp71 es esencial para la adhesión celular, diferenciación neuronal (Aragon *et al*, 2011), proliferación celular (Herrera-Salazar, 2016) y homeostasis de agua en retina (Tadayoni, Rendon, Soria-Jasso and Cisneros, 2012).

Se ha documentado ampliamente que ocurre procesamiento alternativo del mRNA de Dp71 en los exones 71, 71-74, 78 y el intrón 77, estos eventos de procesamiento generan múltiples isoformas que se agrupan de acuerdo con

su extremo carboxilo (Saint Martin, 2012, Aragón *et al*, 2016), que tienen un peso de 70-78 kDa (Acosta *et al*, 2004)

Las isoformas de Dp71 se dividen en tres grandes grupos llamados, de acuerdo a la nueva nomenclatura reportada por Aragón y col. en 2016; grupo Dp71d presenta el exón 78 e incluye a las isoformas Dp71d (Dp71), Dp71d Δ 71 (Dp71a) y Dp71d Δ 71-74 (Dp71c); el grupo Dp71f no tiene exón 78, en este grupo se encuentran las isoformas Dp71f (Dp71b), Dp71f Δ 71 (Dp71ab) y Dp71f Δ 71-74 (Dp71 Δ 110) y el grupo Dp71e que tiene 34 pb del intrón 77 en el extremo 3', contiene a las isoformas Dp71e Δ 71 (Dp71e) y Dp71f Δ 71-74 (Dp71ec) (Saint Martin, 2012, Aragon *et al*, 2016).

Para saber el papel que juegan el exón 78 y 79 en las distintas isoformas se construyó una mutante de Dp71 (Dp71 Δ 78-79) que no tiene dichos exones. Las células PC12 transfectadas con Dp71 Δ 78-79 se diferencian con mayor eficiencia que las células no transfectadas. La localización subcelular de Dp71 Δ 78-79 es en la periferia celular (Aragon *et al*, 2015).

La expresión y localización subcelular de Dp71d y Dp71f son reguladas durante la diferenciación celular de PC12, inducida por NGF (*Nerve Growth Factor*). Dp71d está localizada en el núcleo de células PC12, en el aparato de Golgi y en el retículo endoplásmico y está asociada con la matriz nuclear, esta asociación es modulada durante la diferenciación neuronal de células PC12 con NGF (Marquez *et al*, 2003). Dp71e se encuentra localizada en la periferia y citoplasma de células diferenciadas y no diferenciadas (Aragón *et al*, 2016)

d. Relevancia de Dp71ab

Dp71f Δ 71 forma parte del grupo f de las isoformas de Dp71, carece del exón 78, y el exón 71 (Aragon *et al*, 2016). Dp71f aumenta nueve veces durante la diferenciación de células PC12 con NGF, se localiza en el cuerpo de las células y en las extremidades de las neuritas mientras que en células no diferenciadas se encuentra en el citoplasma y en la periferia de las células

(Marquez *et al* 2003). En 2005 Enríquez-Aragón y colaboradores evaluaron la adhesión y el crecimiento de neuritas en células que expresan mRNA antisentido de Dp71, que inhibe todas las isoformas de Dp71, en diferentes matrices extracelulares, obteniendo como resultado que las células disminuyen su actividad de adhesión en un rango de 23% a 35% y que además estas células presentan una morfología redonda, con pocos o ningún filopodio (Figura 4). Asimismo, se evaluó el potencial de Dp71f, que es la isoforma presente en el citoplasma, con proteínas de adhesión y se describió que Dp71f forma parte del complejo de adhesión de β 1-integrina que modula la adhesión celular y proporciona estabilidad al complejo (Cerna *et al*, 2006).

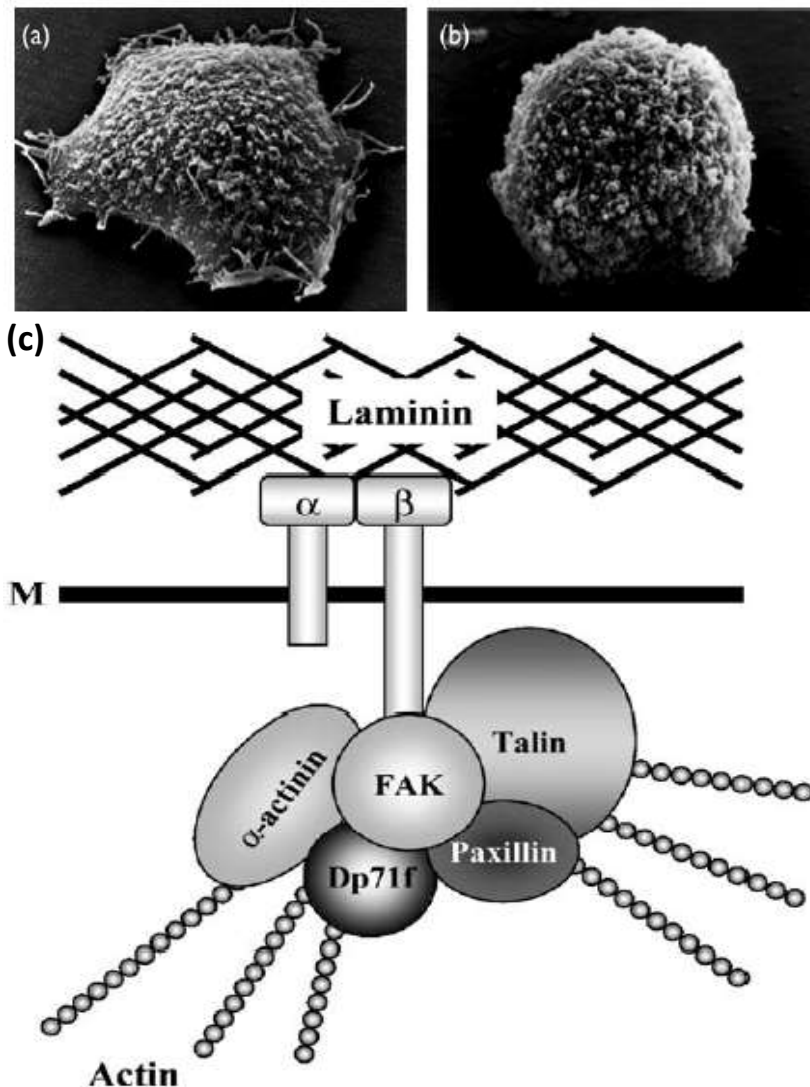


Figura 4. Morfología de células (a) PC12 silvestre (b) células antisentido-Dp71 (Enríquez-Aragón *et al*, 2004). (c) Representación de la unión de la Dp71f a la β 1-integrina en el complejo de adhesión (Cerna *et al*, 2006).

Se ha descrito que Dp71f Δ 71 forma un complejo con β -dístroglicano, α 1-sintrofina, β -dístrobrevina y α -, β - y δ -sarcoglicanos en células PC12 no diferenciadas, mientras que en células diferenciadas ocurren cambios en la composición del complejo, Dp71f Δ 71 está asociada sólo con β -dístroglicano, α 1-sintrofina, β -dístrobrevina y δ -sarcoglicano (Romo-Yañez *et al*, 2007).

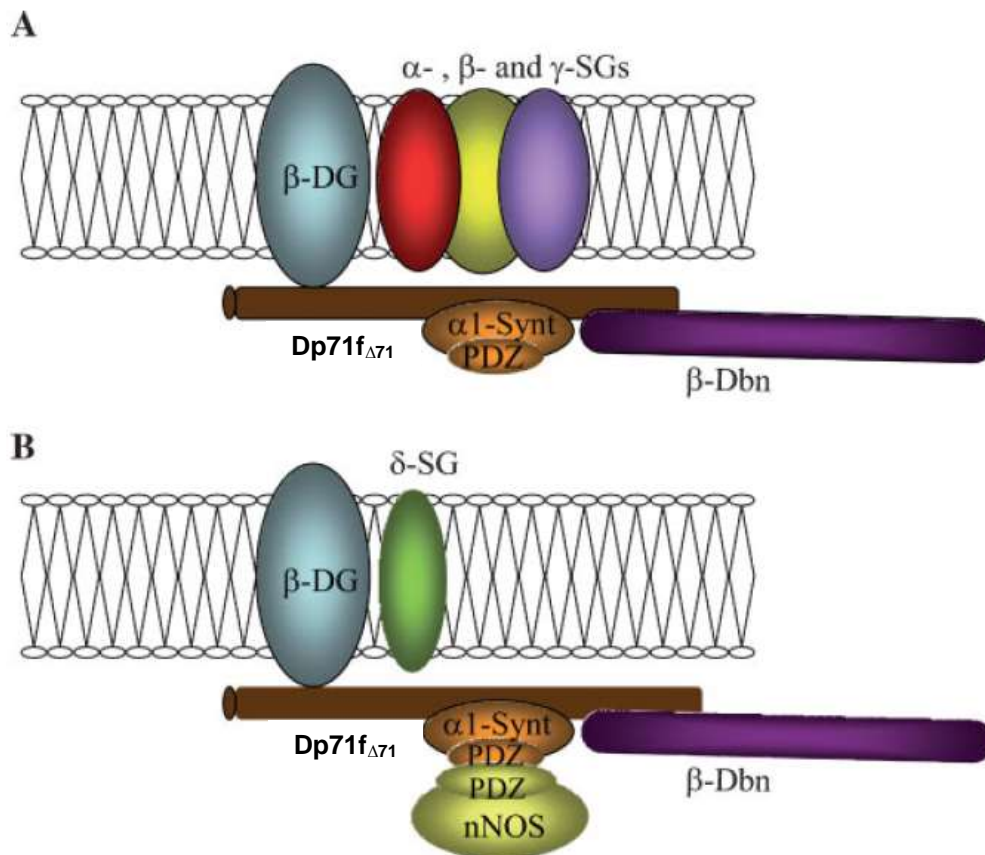


Figura 5. Modelo del complejo Dp71f Δ /DAPs en células PC12 durante la diferenciación con NGF. **A.** En células PC12 no diferenciadas, Dp71ab interactúa con β -dístroglicano (β -DG), α 1-sintrofina (α 1-Synt), β -dístrobrevina (β -Dbn) y α -, β - y δ -sarcoglicanos (-SGs). **B.** En células PC12 diferenciadas Dp71ab interactúa con β -dístroglicano, α 1-sintrofina, β -dístrobrevina y δ -sarcoglicano. La sintrofina tiene un

dominio PDZ que es una secuencia adaptadora que recluta proteínas como canales de agua, receptores y quinasas y la nNOS (Romo-Yañez *et al*, 2007).

El óxido nítrico (*Nitric Oxide NO*) es una molécula de gas lipofílico y difusible, el cual es producido por una clase de enzimas llamadas NOSs. NO es una molécula de señalización implicada en procesos como vasodilatación, neurotransmisión y respuesta inmune, también está involucrado en diferentes vías de señalización, incluyendo respiración, apoptosis y biogénesis mitocondrial (Aquilano, Baldelli, and Ciriolo, 2014).

La α 1-sintrofina interactúa con nNOS en células musculares y neuronas. En células PC12 la expresión de nNOS se prende con la presencia de NGF, células no diferenciadas no expresan nNOS (Romo-Yañez *et al*, 2007). El acoplamiento de la nNOS mediante interacciones específicas con proteínas de andamio como PSD-95 en células neuronales y α -sintrofina en miocitos, aseguran el acoplamiento de la actividad de nNOS al flujo de calcio durante la transmisión glutamatérgica y la contracción del músculo esquelético (Aquilano *et al* 2014).

La nNOS se integra a los complejos Dp71f $_{\Delta 71}$ /DAPs durante el tratamiento con NGF (Romo-Yañez *et al*, 2007). Dp71ab podría estar involucrada en la transducción de señales durante la diferenciación neuronal ya que, en células que sobreexpresan a la mutante Dp71 $_{\Delta 78-79}$ presentan un aumento en el nivel de Dp71ab, y se reclutan proteínas de señalización como Gbr2 y la nNOS, posiblemente aumentando el funcionamiento de la vía NGF y por lo tanto la diferenciación de PC12 (Aragon *et al*, 2011).

Recientemente, se describió que la Dp71f $_{\Delta 71}$ se localiza principalmente en el núcleo de las células HEK293 comparado con la Dp71b que se localiza en el citoplasma (Nishida *et al*, 2016). También se ha reportado que la proteína recombinante Myc-Dp71ab se localiza en el citoplasma de las células no diferenciadas y diferenciadas con NGF (Aragón *et al*, 2016). Estas evidencias sugieren que esta isoforma de Dp71 podría estar participando en procesos celulares diferentes.

e. Línea celular PC12

Desde su aislamiento y caracterización en 1976, la línea celular PC12 de feocromocitoma de rata, es un sistema modelo comúnmente usado para estudios de función y desarrollo neuronal (Teng, Angelastro, Cunningham, and Greene, 2006). El feocromocitoma de rata es un tumor derivado de células cromafines de la médula adrenal de rata (Schimmelpfeng, Weibezahn, and Dertinger, 2004). Las células PC12 son una alternativa conveniente al cultivo de neuronas para el estudio de tropismo y diferenciación inducida por NGF. Cuando estas células se enfrentan a niveles fisiológicos de NGF, dejan de dividirse y se vuelven eléctricamente excitables, extienden neuritas laterales largas y poco a poco adquieren características de neuronas maduras (Teng *et al*, 2006).

El NGF es miembro de las neurotrofinas, actúa sobre neuronas simpáticas y sensoriales y funciona como un factor trópico para distintas poblaciones de neuronas en el sistema nervioso central. La reducción de NGF se ha relacionado con desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, mientras que la sobreexpresión está relacionada con otras enfermedades como la epilepsia, glioma, metástasis tumoral, etc. (Tian *et al*, 2015).

NGF actúa de forma local y nuclear regulando, la motilidad del cono de crecimiento y la expresión de genes que codifican para la biosíntesis de enzimas para neurotransmisores. Las vías reguladas por la activación mediada por neurotrofina de receptores Trk incluye la proliferación y sobrevivencia, el crecimiento axonal y dendrítico, el remodelamiento y ensamblaje del citoesqueleto, tráfico y fusión de membrana, formación de sinapsis y plasticidad. La isoforma Trk A es activada eficientemente por NGF, mientras que el receptor de neurotrofinas pan (p75^{NTR}) regula la respuesta de receptores Trk a neurotrofinas (Huang and Reichardt, 2003).

La unión de NGF al receptor Trk A causa la dimerización y activación del receptor asociado a tirosin-kinasa llevando a la autofosforilación de los

dominios citoplasmáticos en múltiples residuos de tirosina. Tres de éstas Y670, Y674 y Y675 están en el “loop” de activación de dominio de la kinasa, dos residuos de tirosina, Y490 y Y785 quedan fuera del dominio kinasa. Los últimos dos residuos tirosin-kinasa proveen los sitios de unión para Shc y PLC γ respectivamente. La activación de estas moléculas de señalización culmina en eventos río arriba involucrados en la promoción y mantenimiento de la sobrevivencia neuronal y la diferenciación. Shc y PLC γ son moléculas efectoras esenciales para Trk A, la integridad de ambos sitios de unión es requerida para la inducción de la kinasa Ras-MAP (MAPK) por NGF y la diferenciación morfológica de células PC12. La otra molécula efectora, SH2-B, se une con Grb2 mediante la vía Ras/MAP. La asociación de Trk A con SH2-B participa en el desarrollo de las neuronas simpáticas y diferenciación de células PC12 (Koch *et al*, 2000)

La presencia del receptor de neurotrofinas pan (p75^{NTR}) aumenta la especificidad de Trk A por sus ligandos primarios. Mutaciones en tres de las cinco tirosinas restantes han demostrado inhibir el crecimiento de neuritas dependientes de NGF de células PC12 (Huang *et al*, 2003).

La diferenciación de células PC12 puede ser evaluada midiendo el tamaño de las neuritas y contando el número de células con neuritas extendidas que miden más de uno o dos veces el diámetro de la célula, la respuesta de la neurita ha sido adaptada para servir como un ensayo cuantitativo para determinar el efecto de NGF (Schimmelpfeng *et al*, 2004).

La gran diversidad de isoformas de distrofina y utrofina presentes en el cerebro, hace difícil el estudio de las distrofinas en este órgano (Romo-Yañez *et al*, 2007). Por esto las células PC12 se han convertido en un modelo muy útil para el estudio de la Dp71 y Dp40, ya que en éstas células están ausentes las isoformas Dp427, Dp260, Dp140 y Dp116 (Marquez *et al*, 2003) y se han identificado varias isoformas de Dp71 como Dp71d Δ 71, Dp71f Δ 71, Dp71d Δ 71-74, Dp71e Δ 71 y Dp71e Δ 71-74, en células no diferenciadas y diferenciadas con NGF, también se han encontrado isoformas de Dp71 en

neurita y conos de crecimiento (Aragón *et al*, 2016), Dp71e Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 están presentes únicamente en la periferia de células no diferenciadas (Aragón *et al*, 2015) mientras que Dp71d Δ 71 se localiza en el núcleo y se asocia con proteínas de la matriz nuclear (Rodríguez-Munoz *et al*, 2008).

Aunque estas células son un sistema modelo para el estudio del desarrollo y función neuronal, no es sustituto completo de células nerviosas, cualquier resultado obtenido con células PC12 debe ser verificado o comparado con células neuronales (Teng *et al*, 2006).

II. JUSTIFICACIÓN

La red de comunicación entre neuronas depende de mecanismos de señalización que les permite percibir estímulos y responder a ellos, gracias a esta comunicación entre las células se mantiene la funcionalidad de los organismos. Dp71 es el producto del gen de distrofina más abundante en el cerebro, la ausencia de esta proteína está relacionada con retraso mental en la DMD. Dp71f Δ 71 forma parte del grupo de Dp71f y ha sido implicada en procesos de adhesión y en consecuencia en su habilidad de extender neuritas en presencia de NGF. Debido a esto y a la relación de Dp71f Δ 71 con nNOS, es importante caracterizar a esta isoforma en un sistema de sobreexpresión para estudiar el papel que juega durante la proliferación y/o diferenciación neuronal.

III. OBJETIVOS

a. Objetivo General

Estudiar el efecto de la sobreexpresión de la distrofina Dp71f Δ 71 en la proliferación y diferenciación de células PC12 Tet-On.

b. Objetivos Específicos

1. Caracterizar clonas de células PC12 Tet-On que sobreexpresan a la isoforma recombinante Myc/Dp71f Δ 71.
2. Determinar la localización celular de la isoforma de distrofina Myc-Dp71f Δ 71 en transfectantes estables de células PC12 Tet-On.
3. Evaluar la proliferación de las células PC12 Tet-On Myc/Dp71f Δ 71.
4. Analizar la diferenciación de las células PC12 Tet-On Myc/Dp71f Δ 71 inducida por NGF.
5. Evaluar la actividad de adhesión de células PC12 Tet-On Myc/Dp71f Δ 71.

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Previo a este trabajo, se clonó la secuencia de Dp71f Δ 71 produciéndose el vector pTRE2pur-Myc/ Dp71f Δ 71 y se generaron de transfectantes estables. Se seleccionaron con puromicina y geneticina aquellas clonas que tenían el plásmido y que expresaban la distrofina, estas clonas fueron identificadas como Clona 1 y Clona 4. En este proyecto se caracterizaron las clonas PC12 Tet-On/pTRE2pur-Myc/ Dp71f Δ 71 1 y 4 mediante RT-PCR y Western Blot para verificar la expresión de Dp71f Δ 71 y determinar las condiciones óptimas de inducción de su expresión. A continuación, se realizaron estudios de inmunofluorescencia indirecta (IF) y microscopía confocal para determinar la localización de la Dp71f Δ 71 recombinante (Myc/ Dp71f Δ 71) en las células PC12. Posteriormente se determinó la proliferación de las células mediante curvas de crecimiento, el marcador de proliferación PCNA que es una proteína nuclear sintetizada durante la fase G1 temprana y cuya expresión máxima ocurre durante la fase S y ensayos de proliferación con Carboxifluoresceína. Adicionalmente, se analizó la adhesión de las células mediante citometría de flujo, se evaluó la expresión y localización de FAK, involucrada en adhesión. Se analizó el comportamiento de las clonas en presencia de NGF por 9 días utilizando análisis morfométrico el marcador de diferenciación Neurofilamento de Cadena Ligera, asociado a la extensión y estabilización de neuritas durante el proceso de diferenciación, MAP-2 que está asociado al ensamble de microtúbulos un paso esencial en la neurogénesis y Sinaptofisina, una glicoproteína de vesículas presinápticas.



V. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Cultivo de células PC12 Tet-On

Las células PC12 se sembraron en cajas de plástico con medio de crecimiento DMEM (Gibco) complementado con 10% de suero de caballo, 5% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 25 µg/mL de estreptomina, puromicina y geneticina a 37°C con 5% de CO₂. Para los ensayos de diferenciación las cajas se trataron con colágena y se sembraron 4000 células que se dejaron crecer por 24 horas, después de este tiempo se agregó medio con 50 ng/mL de NGF (Invitrogen), el medio se cambió cada tres días.

b. Extracción de RNA

Se removieron las células de las cajas, se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos, se decantó la pastilla de células y se resuspendió en 1 mL de PBS (KH₂PO₄ 15mM, K₂HPO₄ 15 mM, NaCl₂ 154 mM, pH 7.2). La muestra se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de TRIzol (ThermoFisher) dejando a temperatura ambiente por 5 min. Después de éste tiempo se agregaron 200 µL de cloroformo y las muestras se dejaron reposar por 5 minutos, se centrifugaron a 13 000 rpm por 15 minutos y se transfirió la fase acuosa a tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se le agregaron 600 µL de isopropanol y se incubó a TA por 15 min, se centrifugaron las muestras a 13 000 rpm por 15 minutos, se decantaron y por último se agregó 1 ml de Etanol al 75 % se centrifugó a 13 000 rpm por 15 minutos y se almacenaron las muestras a -20 °C para su posterior análisis por RT-PCR.

c. Transcripción Reversa acoplada a PCR (RT-PCR)

El RNA extraído de las células se trató con DNAsa I (Invitrogen) para digerir el DNA de cadena sencilla y doble, se colocó 1 µL de RNA, 1 µL de buffer 10X (200 mM Tris-HCl pH8.4, 20 mM MgCl₂ y 500 mM KCl), 1 µL de DNAsa

1 y 7 μL de agua en tubos Eppendorf de 0.6 mL, se incubó por 25 min a temperatura ambiente y posteriormente se calentó a 65 °C por 10 minutos.

Para realizar la RT-PCR se usó el kit SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen), se colocó 1 μL de “random primers”, 1 μL de dNTPs y 8 μL de RNA tratado con DNasa I, se incubó ésta mezcla a 65 °C por 5 min, se colocaron 2 μL del buffer de RT, 4 μL de MgCl_2 25 mM, 2 μL de DTT 0.1 M, 1 μL de RNasa OUT y 1 μL de SuperScript III RT, se incubó a 50°C por 60 minutos y por último a 85 °C por 5 minutos.

Para el análisis del cDNA se realizó la técnica de PCR para lo cual se colocaron 3 μL del cDNA, 20 μL de agua, 1 μL de primer forward rDp71F (5' ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACG), 1 μL del primer reverse pTRE (3' AACAAATCAAGGGTCCCCAAACT) y 25 μL de Master mix para amplificar Dp71ab, la PCR incluirá 35 ciclos de 95 °C por 30 s y 68 °C, 3 minutos. Para amplificar β -Actina se usaron los primers forward (5' TTGTAACCAACTGGGACGATATGG) y reverse (3' GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG), la PCR incluirá 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C 30 s y 72 °C 30 s.

d. Extracción de proteína

Se removieron las células de las cajas, se recuperaron por centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 1 mL de PBS (KH_2PO_4 15mM, K_2HPO_4 15 mM, NaCl 154 mM, pH 7.2). Se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL, se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregó 120 μL de Buffer de extracción II (Tri 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, Triton X-100 1 %) con inhibidores de proteasas, se dejó 20 minutos a temperatura ambiente, por último, se colocó Buffer de carga 5X (Tris-HCl 75mM, SDS 15%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.001%). La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford, el extracto de proteína se almacenó a -20°C.

e. Western Blot

Se prepararon alícuotas de 60-80 µg de proteína total y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con una intensidad eléctrica de 20 mA durante 18-20 horas, a una temperatura de 4 °C. La membrana de nitrocelulosa con las proteínas se bloqueó con leche descremada al 5% en buffer TBS-T (Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween 0.05%) durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se incubó toda la noche con el anticuerpo primario, diluido en buffer TBS-T. Se utilizaron los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa para la detección del anticuerpo primario, a una dilución de 1:10000 en TBS-T con leche al 5%.

Tabla 1. Anticuerpos			
Anticuerpo	Dilución	Naturaleza	Especificidad
Anti-Myc₁	WB: 1:1000 IF: 1:200 y 1:25	Monoclonal ratón	Aminoácidos 408 – 439
Anti-Actina₂	WB: 1:300	Monoclonal ratón	β-Actina
Anti-PCNA₃	WB: 1:1000	Monoclonal ratón	PCNA
Anti-Fak₁	WB: 1:1000	Policlonal conejo	FAK
Anti-TH₄	WB: 1:200	Monoclonal ratón	Tirosin Hidrosilasa
Anti- NF-L₄	WB: 1:2000	Monoclonal ratón	Neurofilamento
Anti- MAP II₄	IF: 1:200	Policlonal conejo	MAP II
Anti- Sinaptofisina₁	IF: 1:200	Monoclonal ratón	Sinaptofisina

WB: Western Blot. IF: Inmunofluorescencia. Anticuerpos obtenidos de: ¹Santa Cruz Biotechnology, ²Dr. Manuel Hernández (CINVESTAV), ³Cell Signalling Technology. ⁴Abcam.

f. Curva de inducción de Myc-Dp71ab

Se sembraron células para obtener una confluencia del 80%, se agregó doxiciclina en concentraciones de 0 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 500 ng/mL y 1000 ng/mL, 24 horas después se despegaron las células, se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se resuspendieron en PBS para proceder a la extracción de proteínas y se realizó Western Blot para su análisis con el anticuerpo primario Anti-Myc.

g. Inmunofluorescencia

Las células no diferenciadas se cultivaron sobre cubreobjetos pre-tratados con poli-L-lisina a una confluencia del 80%. Para la inducción de Dp71ab se trataron las células con 500 ng/mL de doxiciclina y 24 horas después se continuó con el proceso. Los cubreobjetos se lavaron con buffer de citoesqueleto (CB: MES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, MgCl₂ 5 nM), después las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.4% y paraformaldehído al 4% en buffer CB durante 5 minutos. Posteriormente las células se lavaron tres veces por 5 minutos con buffer CB y se fijaron con paraformaldehído al 4% en buffer CB durante 20 minutos. Después se lavaron con PBS y se bloquearon los sitios inespecíficos con 0.5% de gelatina en PBS durante 40 minutos. Posterior a esto, los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS y se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario Anti-Myc. Al siguiente día los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS para quitar el exceso de anticuerpo y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Alexa 488 diluido 1:300 y Alexa 596 diluido 1:200. Por último, los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS y se montaron sobre portaobjetos con Vectashield. En el caso de las células diferenciadas, se sembraron 4,000 células por cubreobjetos, se indujo la expresión de Dp71f_{Δ71} recombinante con 500 ng/mL de doxiciclina durante 24 horas (sólo en los casos requeridos) y posteriormente se agregó medio de mantenimiento con NGF (50 ng/mL), mismo que fue renovado cada tercer día hasta completar 9 días, después de los cuales se realizó la inmunofluorescencia. Las preparaciones se

analizaron en el microscopio confocal Leica TCS SP8 utilizando el objetivo de 40X. Para estudiar la localización, se tomaron 5-10 campos diferentes por cada condición.

h. Curva de proliferación

Se sembraron 50,000 células en cajas P30, se contaron las células y se realizó una dilución con azul de tripano, se colocaron 10 µL de azul de tripano y 10 µL de la suspensión de células, se mezclaron y se colocaron 10 µL en la cámara de Neubauer, las células se contaron a los días 3, 6 y 9 días de crecimiento. En la cámara de Neubauer se contaron los cuatro cuadros grandes y se obtuvo el número de células por mililitro mediante la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{\text{Número de células}}{4}\right)(2)(10000) = \text{Número de células/mL}$$

i. Ensayo de Proliferación con Carboxifluoresceína

Las células se dejaron incubar por 10 min con 6-Carboxifluoresceína. Posteriormente se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se lavaron con PBS. Después se sembraron 100 000 células en placas P30 y se agregó DOX a las células que serían inducidas. Se midió la fluorescencia de la Carboxifluoresceína mediante citometría de flujo. Como control de proliferación se incubaron durante 3 horas 100, 000 células con 6-Carboxifluoresceína y se midió la fluorescencia. Los datos fueron analizados con el software Kaluza.

j. Análisis morfométrico

Para llevar a cabo la diferenciación celular se utilizaron cajas con colágena en las cuales se sembraron 4000 células con medio de mantenimiento. En el caso de las células tratadas para inducir la expresión de la proteína recombinante Myc-Dp71ab, se adicionaron 500 ng/mL de NGF, el cual fue renovado cada tercer día hasta completar 9 días. Se capturaron 10 diferentes campos al azar de cada una de las cajas a los 0, 3, 6 y 9 días de

diferenciación por medio de un microscopio invertido. Para determinar el porcentaje de diferenciación se midió la neurita más larga de cada célula con una longitud mayor a su cuerpo celular con el programa AxioVision LE Rel. 4.7 (Zeiss). Posteriormente, se contó la totalidad de las células en cada campo y se obtuvieron los porcentajes de células diferenciadas con prolongaciones menores y mayores a un cuerpo celular respecto el número total de células de los 10 campos observados para cada uno de los días analizados

k. Ensayo de Adhesión

Se sembraron 400 000 células en cajas de 24 pozos pre-tratadas con colágena. Después de 4 horas de incubación se lavaron con PBS y se agitaron suavemente por 5 min a 15 Hz, el sobrenadante fue removido y se colocaron 400 μ L de PBS. Se despegaron las células que estaban adheridas y se colocaron 10 μ L de perlas CytoCount™, las células se contaron mediante citometría de flujo y se analizaron con el software Kaluza.

VI. RESULTADOS

a. Caracterización de células PC12 Tet-On que sobreexpresan a la isoforma recombinante Myc-Dp71f Δ 71.

Para poder comprender el papel que tiene la isoforma Dp71f Δ 71 en proliferación, adhesión y diferenciación, se analizó el comportamiento de las clonas PC12 Tet-On transfectadas previamente de manera estable con el vector pTREpurMyc y se caracterizaron dos clonas PC12 Tet-On/ Dp71f Δ 71 Clona 1 y Clona 4 en adelante mencionadas como Dp71f Δ 71-1 y Dp71f Δ 71-4. Para poder establecer la concentración óptima de DOX que permitiera la inducción de la expresión de la proteína recombinante Myc/Dp71f Δ 71 en ambas clonas, se probaron dosis de 0, 50, 100, 200, 500 y 1000 ng/mL de DOX y se determinó la expresión de la proteína recombinante normalizada con la expresión de actina (Fig 6).

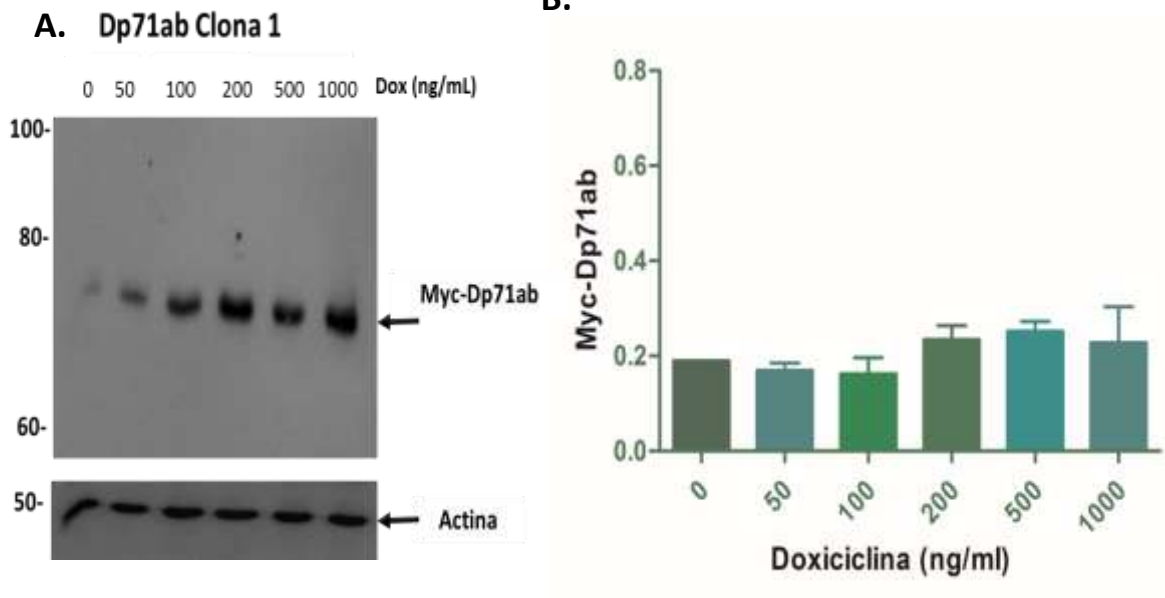


Figura 6. Curva de inducción de la clona PC12 Tet-On/Dp71f_{Δ71} con DOX **A.** Western Blot dónde se identifica a la proteína recombinante Myc/Dp71ab-1 utilizando el anticuerpo anti-Myc. Se observa la banda que corresponde a 71 kDa. Se determinó la expresión de β-actina utilizada como control de carga. A la izquierda se indica el marcador de peso molecular en kilo-daltones **B.** Expresión relativa de proteína recombinante Myc/Dp71f_{Δ71}-1. La gráfica representa tres experimentos independientes ± SD de dichos experimentos.

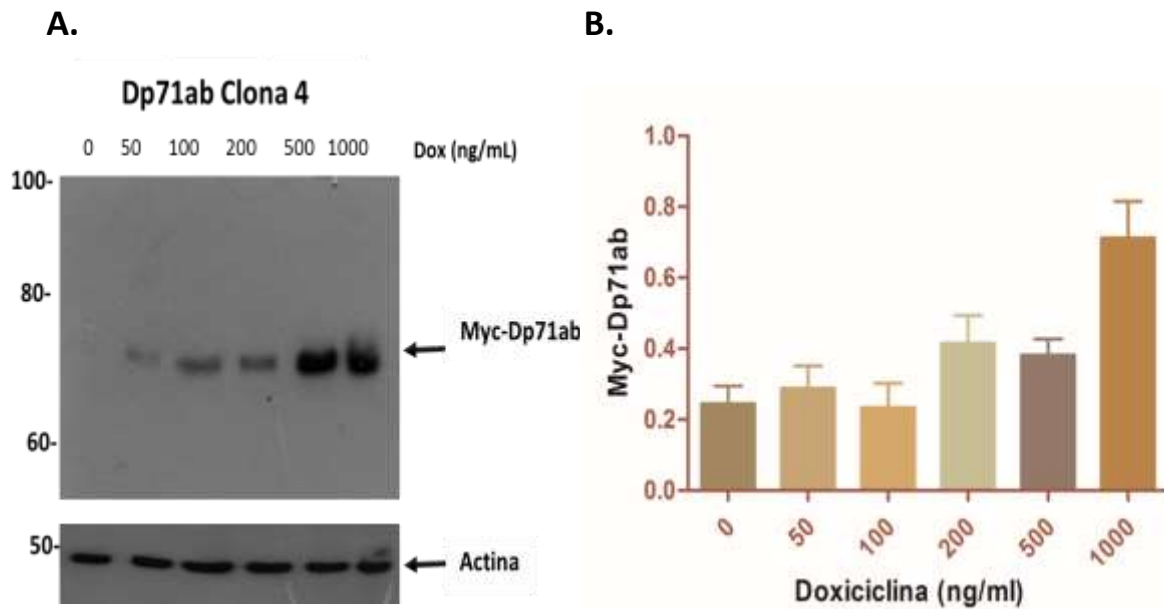


Figura 7. Curva de inducción de la clona PC12 Tet-On/Dp71f_{Δ71}-4 con DOX **A.** Western Blot dónde se identifica a la proteína recombinante Myc/Dp71ab-4 utilizando el anticuerpo anti-Myc. Se observan bandas que corresponden a 71 KDa. Control de carga: β-actina. Se indica el marcador de peso molecular **B.** Expresión de proteína recombinante Myc/Dp71f_{Δ71}-4. No existe diferencia significativa en la expresión de proteína en ninguna de las condiciones. Las imágenes representan tres experimentos independientes, se graficó el promedio ± la desviación estándar de dichos experimentos.

Después de inducir su expresión, se observó que la proteína recombinante Myc/ Dp71f_{Δ71} se incrementa a dosis más grandes de DOX en ambas clonas, la mayor expresión se observa de 200 a 1000 ng/mL de DOX (Figura 6 y 7).

Debido a que existe evidencia de que la DOX es tóxica a partir de concentraciones mayores a 200 ng/mL (Ermak y col., 2003) se estableció 500 ng/mL como la concentración con la que se inducirá la expresión de la proteína.

Para verificar la secuencia correspondiente a Dp71f Δ 71 se extrajo RNA de cada una de las clonas y se realizó RT para obtener el cDNA de acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. Para la PCR se utilizaron los iniciadores que corresponden al Ex77F y pTRE2 3' que abarcan desde el exón 77 hasta una parte del vector pTRE2pur-Myc. Como se muestra en la figura 8 se obtuvo un fragmento de 236 pb correspondiente a Dp71f Δ 71.

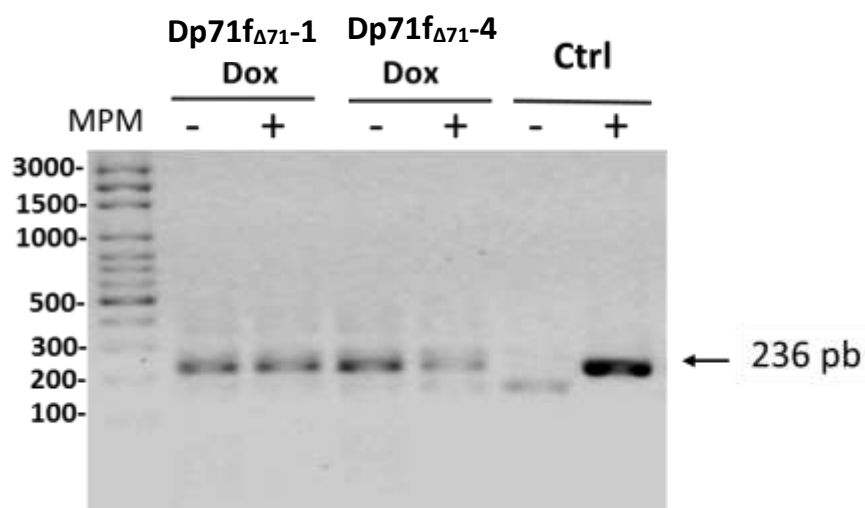


Figura 8. Amplificación de los fragmentos de DNA de Dp71f Δ 71. Las células fueron tratadas con y sin DOX. Para el control negativo de reacción (Ctrl -) no se colocó cDNA, como control positivo (Ctrl +) se utilizó el plásmido pTREpurMyc/Dp71ab. No se obtuvo el fragmento en la clona control negativo y en el control positivo se observa la banda que corresponde al fragmento de Dp71f Δ 71. Se indica el tamaño de los fragmentos amplificados. MPM: Marcador de peso molecular 100 pb-3000pb de Axygen.

Se purificaron y secuenciaron los fragmentos de PCR obtenidos para verificar la secuencia de Dp71f Δ 71 en ambas clonas para lo que se utilizó el oligonucleótido pTRE2 3'. Se realizó el alineamiento de la secuencia teórica del RNA mensajero de Dp71f Δ 71 con la secuencia obtenida a partir de los fragmentos. En la figura 9 se muestra la homología entre la secuencia de los fragmentos de ambas clonas con la secuencia teórica del RNA mensajero de Dp71f Δ 71.

Dp71f Δ 71-1

```

Vec_Dp71lab_VectorNTI   CTGCAGAGGTCAGATAGCAGTCAGCCTATGCTGCTCCGAGTGGTTGGCAGTCAAACCTCA
Dp71                     CTGCAGAGGTCAGATAGCAGTCAGCCTATGCTGCTCCGAGTGGTTGGCAGTCAAACCTCA
*****

Vec_Dp71lab_VectorNTI   GAATCTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTCTCCCCAGGACACAAGCACAGGGTTAGAA
Dp71                     GAATCTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTCTCCCCAGGACACAAGCACAGGGTTAGAA
*****

                               Ex 77           Ex 79
Vec_Dp71lab_VectorNTI   GAAGTGATGGAGCAACTCAACAACCTCCTTCCCTAGTTCAAGAGGACACAATGTAGGAAGC
Dp71                     GAAGTGATGGAGCAACTCAACAACCTCCTTCCCTAGTTCAAGAGGACACAATGTAGGAAGC
*****

Vec_Dp71lab_VectorNTI   CTTTTCCACATGGCAGATGATTTGGGCAGAGCGATGGAGTCCCTTAGTTTCAGTCATGATA
Dp71                     CTTTTCCACATGGCAGATGATTTGGGCAGAGCGATGGAGTCCCTTAGTTTCAGTCATGATA
*****

Vec_Dp71lab_VectorNTI   GATGAAGAAGGAGCAGAAATAATCGATGCGGCCGCGTCGACGATATCTCTAGAGCTGAGAA
Dp71                     GATGAAGAAGGAGCAGAAATAATCGATGCGGCCGCGTCGACGATATCTCTAGAGCTGAGAA
*****

```

Dp71f Δ 71-4

```

Vec_Dp71lab_V   GCTGCAGAGGTCAGATAGCAGTCAGCCTATGCTGCTCCGAGTGGTTGGCAGTCAAACCTTC
Dp71             GCTGCAGAAAAAGATAGCAGTCAGCCTATGCTGCTCCGAGTGGTTGGCAGTCAAACCTTC
*****

Vec_Dp71lab_V   AGAATCTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTCTCCCCAGGACACAAGCACAGGGTTAGA
Dp71             AGAATCTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTCTCCCCAGGACACAAGCACAGGGTTAGA
*****

                               Ex 77           Ex 79
Vec_Dp71lab_V   AGAAGTGATGGAGCAACTCAACAACCTCCTTCCCTAGTTCAAGAGGACACAATGTAGGAAG
Dp71             AGAAGTGATGGAGCAACTCAACAACCTCCTTCCCTAGTTCAAGAGGACACAATGTAGGAAG
*****

Vec_Dp71lab_V   CCTTTTCCACATGGCAGATGATTTGGGCAGAGCGATGGAGTCCCTTAGTTTCAGTCATGAT
Dp71             CCTTTTCCACATGGCAGATGATTTGGGCAGAGCGATGGAGTCCCTTAGTTTCAGTCATGAT
*****

Vec_Dp71lab_V   AGATGAAGAAGGAGCAGAAATAATCGATGCGGCCGCGTCGACGATATCTCTAGAGCTGAGA
Dp71             AGATGAAGAAGGAGCAGAAATAATCGATGCGGCCGCGTCGACG-TA-CTCTAGAGCTGAGA
*****

```

Figura 9. Alineamiento de la secuenciación de los fragmentos de cDNA de las clonas Dp71f $_{\Delta 71-1}$ y Dp71f $_{\Delta 71-4}$ (Vec_Dp71ab_V) con la secuencia teórica de DNA de Dp71f $_{\Delta 71}$ (Dp71). Con letras naranjas se muestra la secuencia final del exón 77 y con letras azules se muestra la secuencia de inicio del exón 79. En amarillo se muestra el oligo pTRE 3', con letra roja el codón de paro y subrayada está la secuencia del sitio de restricción de Not I.

Posteriormente se verificó la expresión de la proteína recombinante después de 24 horas de inducción con 500 ng/mL mediante Western Blot utilizando el anticuerpo anti-Myc. En la figura 10 se observa el tamaño esperado de 71 KDa correspondiente a Dp71f $_{\Delta 71}$. Ambas clonas presentan una expresión basal de la proteína en ausencia de DOX, se observa un incremento significativo de la expresión al inducir con DOX a Dp71f $_{\Delta 71-4}$ en comparación con Dp71f $_{\Delta 71-4}$ no inducida.

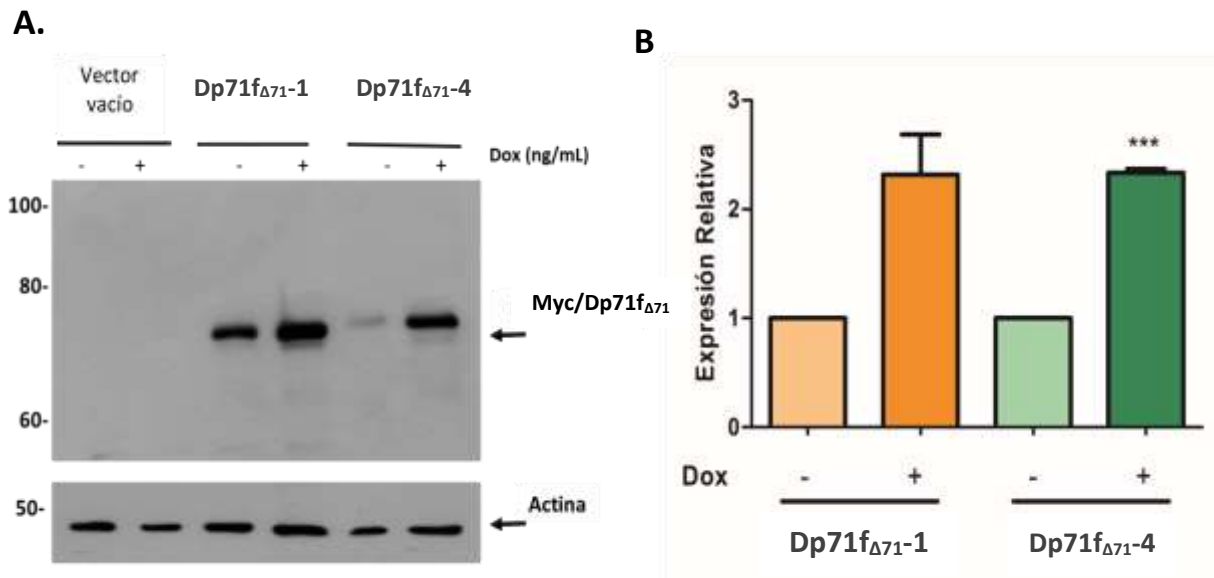


Figura 10. Inducción de la expresión de Myc/Dp71f $_{\Delta 71-1}$ y Myc/Dp71f $_{\Delta 71-4}$ con DOX. Los extractos de células PC12 Tet-On/Dp71f $_{\Delta 71-1}$ y /Dp71f $_{\Delta 71-4}$ se obtuvieron como se indica en materiales y métodos **A.** Western Blot dónde se identifica a la proteína recombinante Myc/Dp71f $_{\Delta 71-1}$ y Myc/Dp71f $_{\Delta 71-4}$ utilizando el anticuerpo anti-Myc, se observan bandas que corresponden a 71 kDa. β -actina se utilizó como control de carga. Se indica el marcador de peso molecular **B.** Expresión relativa de proteína

recombinante Myc/Dp71f $_{\Delta 71-1}$ y Myc/Dp71f $_{\Delta 71-4}$. Las imágenes representan tres experimentos independientes, se graficó el promedio \pm la desviación estándar de dichos experimentos.

b. Localización celular de la isoforma de distrofina Myc-Dp71f $_{\Delta 71}$ en transfectantes estables de células PC12 Tet-On.

El siguiente objetivo fue determinar la localización de la proteína recombinante Myc/Dp71f $_{\Delta 71}$ en transfectantes estables de células PC12 Tet-On, para llevar a cabo éste objetivo se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta de las clonas utilizando el anticuerpo anti c-Myc, que reconoce el epítipo c-Myc en su región N-terminal. Como control se usaron las células transfectadas con el vector vacío, las cuales, sí expresan c-Myc en niveles bajos.

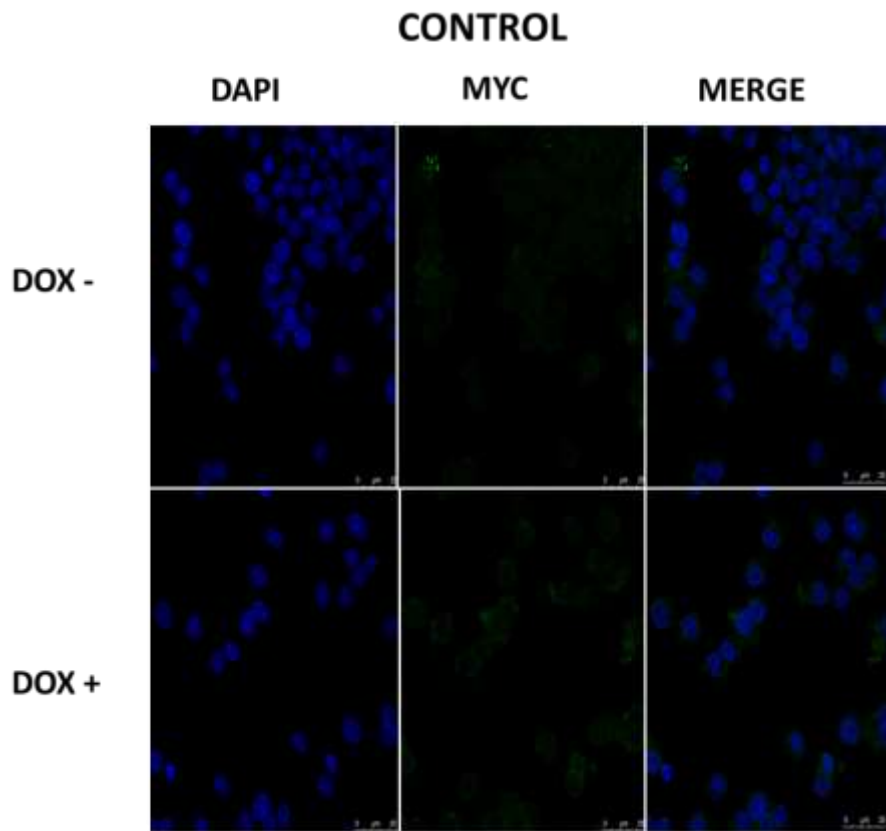


Figura 11. Localización del péptido Myc en la clona control. Las células fueron analizadas por inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo anti-Myc y el anticuerpo secundario Alexa 488 para observar la marca de c-Myc (verde) mientras que los núcleos se tiñeron con Dapi (azúl). Las células fueron analizadas con el microscopio confocal. Se observa la marca de c-Myc en presencia y ausencia de DOX (500 ng/mL). Imágenes de una sección ecuatorial. Figura representativa de dos experimentos independientes.

En la figura 12 se muestra la localización de la proteína Myc/Dp71f Δ 71 en ambas clonas. Esta proteína se encuentra principalmente asociada a la membrana y en el citoplasma en células no diferenciadas. Se utilizaron 500 ng/mL de DOX para inducir la expresión de la proteína. La baja expresión de la proteína Myc/Dp71f Δ 71 es evidente en la clona PC12 TetOn/Dp71ab4 en ausencia de DOX, en donde incluso la mayoría de las células no expresan la proteína.

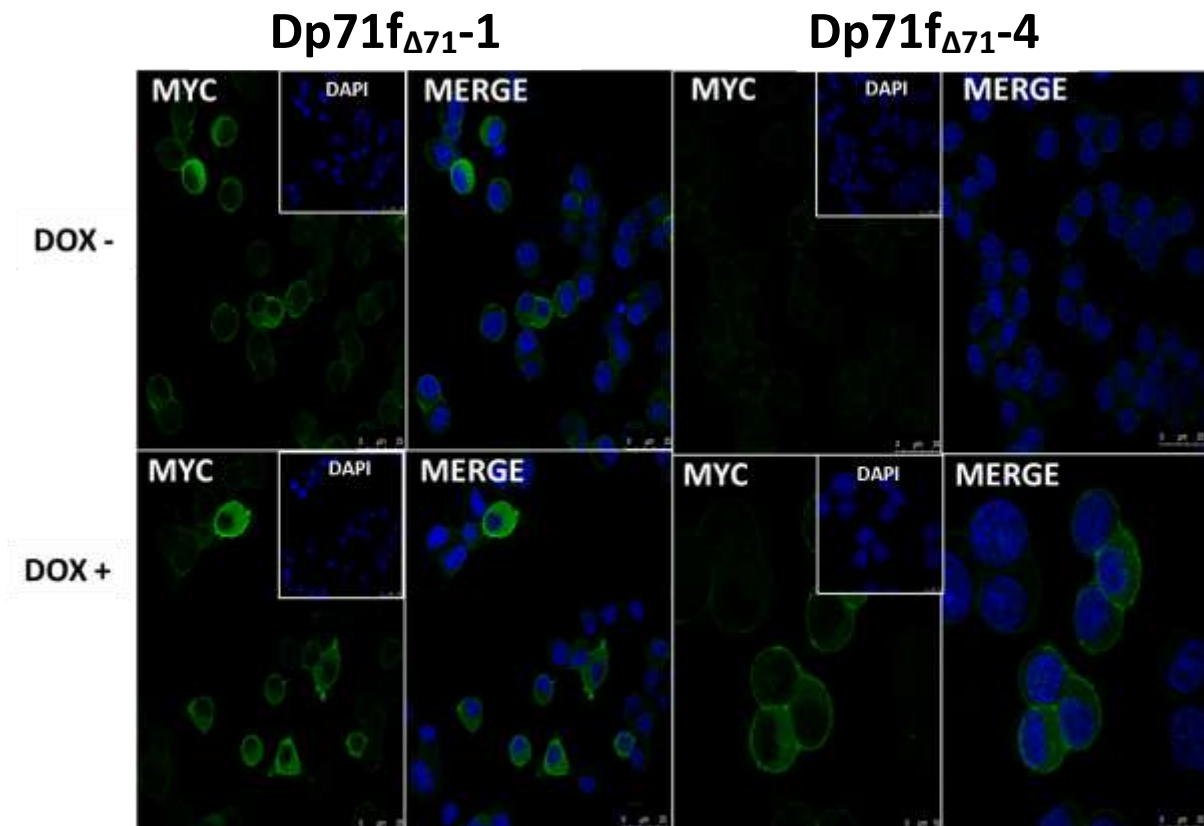


Figura 12. Localización de las proteínas Myc/Dp71f Δ 71. Se analizó la localización de las proteínas recombinantes en células PC12 Tet-On Myc/Dp71f Δ 71-1 y Dp71f Δ 71-4 tratadas con DOX. Se usó el anticuerpo secundario Alexa 488 para observar la marca de c-Myc (verde) y los núcleos se tiñeron con Dapi (azúl). Se observa la marca de c-Myc en presencia y ausencia de DOX. Imágenes de una sección ecuatorial. Las imágenes representan dos experimentos independientes.

Con base en los resultados anteriores se decidió elegir la clona PC12 Tet-On/Dp71f Δ 71-4 para continuar con los siguientes objetivos, debido a que es la clona que presenta una menor fuga. Adicionalmente, para obtener más información sobre las características de las isoformas del grupo F y sus diferencias con el grupo D, se eligió a la isoforma Dp71d Δ 71 para comparar ambos grupos.

c. Proliferación de las células PC12 Tet-On/ Dp71f Δ 71.

Con el fin de conocer el papel de Dp71f Δ 71 en la proliferación de las células PC12 Tet-On se realizaron curvas de proliferación. Cada clona se analizó en ausencia y presencia de DOX, una vez iniciado el experimento, se contaron las células en los días 3, 6 y 9 en cámara de Neubauer y usando azul de tripano para identificar las células vivas. La figura 13 muestra las gráficas obtenidas de los resultados, la adición de DOX no altera la tasa de proliferación y no existe diferencia significativa entre la tasa de proliferación del control y la clona Dp71f Δ 71-4 sin embargo, ésta clona tiende a crecer más lento que el control.

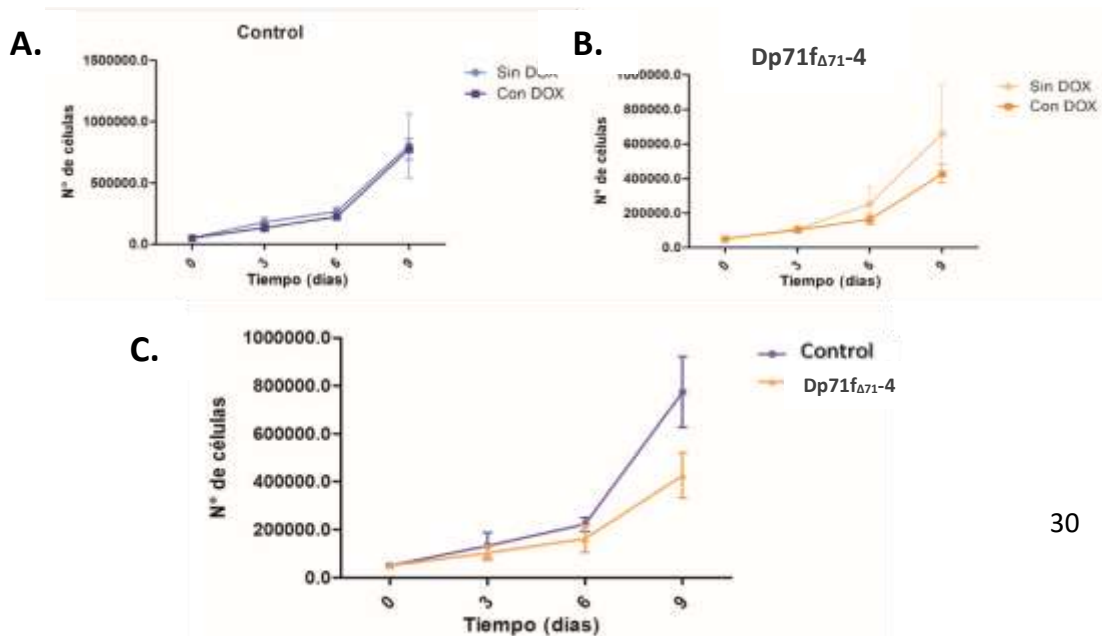


Figura 13. Curvas de crecimiento de las clonas de Dp71f $_{\Delta 71}$ -4 y la clona PC12 Tet-On/VV (control). Se realizó el conteo de células viables con azul de tripano en cámara de Neubauer a los 3, 6, y 9 días para ambas clonas en presencia y ausencia de doxiciclina **A.** Curvas de crecimiento para la clona control en presencia y ausencia de doxiciclina **B.** Curvas de crecimiento para la clona Dp71f $_{\Delta 71}$ -4 en presencia y ausencia de doxiciclina **C.** Curvas de crecimiento de la clona control y la clona Dp71f $_{\Delta 71}$ -4 en presencia de doxiciclina. Las gráficas fueron realizadas con el software GraphPad Prism y representan el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Para tener una mejor cuantificación de la proliferación de las clonas se realizaron ensayos de proliferación mediante citometría de flujo marcando las células con 6-carboxifluoresceína (CFSE) la cual se caracteriza por marcar establemente las células y cada división resulta en una secuencial pérdida de fluorescencia (Zhang L., y col. 2015).

La figura 14 representa las gráficas obtenidas con el porcentaje de células presentes en cada generación, las clonas se incubaron con CFSE y se evaluó la marca de CFSE a los días 2, 4 y 6 con y sin DOX. Adicionalmente, se evaluó la proliferación de la isoforma Dp71d $_{\Delta 71}$ cuya proliferación se ha reportado que es más rápida en comparación con el control. En las gráficas se puede observar que en el caso de la clona Dp71f $_{\Delta 71}$ -4 un 40% de las células se han dividido hasta 3 veces al cuarto día en comparación con el control en el cual se observa un 60% de las células que se han dividido hasta 4 veces en ese mismo tiempo. En cuanto a la clona Dp71d $_{\Delta 71}$ más del 60% de las células se han dividido hasta 4 veces al cuarto día; sin embargo, al agregar DOX en las tres clonas, al cuarto día presentan un mayor porcentaje de células que se han dividido hasta cuatro veces. En el quinto día, la clona

Dp71f Δ 71-4 con DOX y sin DOX, presenta una proliferación más lenta, en comparación con el control

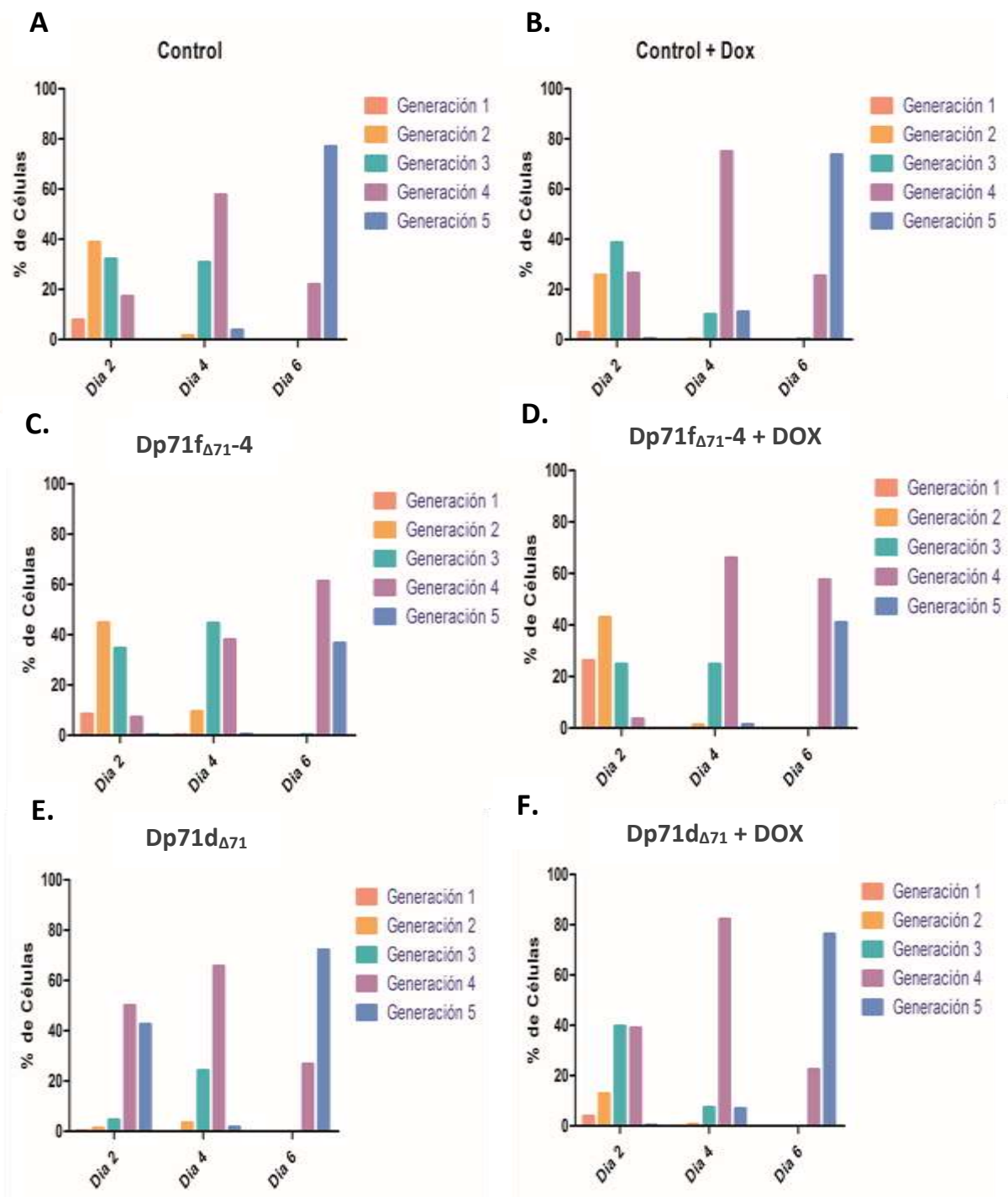


Figura 14. Proliferación de las clonas de Dp71f Δ 71-4, Dp71d Δ 71 y la clona control. Se realizó un ensayo con CSFE mediante citometría de flujo a los 2, 4, y 6 días con y sin doxiciclina **A.** Gráfica de proliferación para la clona control con DOX **B.** Proliferación de la clona control sin DOX. **C.** Gráfica de proliferación para la clona Dp71ab-4 con DOX **D.** Gráfica de proliferación para la clona Dp71f Δ 71-4 sin DOX. **E.** Gráfica de proliferación para la clona Dp71d Δ 71 con DOX **F.** Gráfica de proliferación para la clona Dp71d Δ 71 sin DOX.

También se evaluó la expresión del marcador de proliferación PCNA, el cuál es un cofactor de la DNA polimerasa que se expresa durante la replicación del DNA (Moldoban, 2007). El marcador fue evaluado en células no diferenciadas y diferenciadas a 9 días con NGF, en ambos casis con y sin DOX. Tanto en Dp71a como en Dp71f Δ 71-4 la expresión de PCNA aumenta en presencia de NGF.

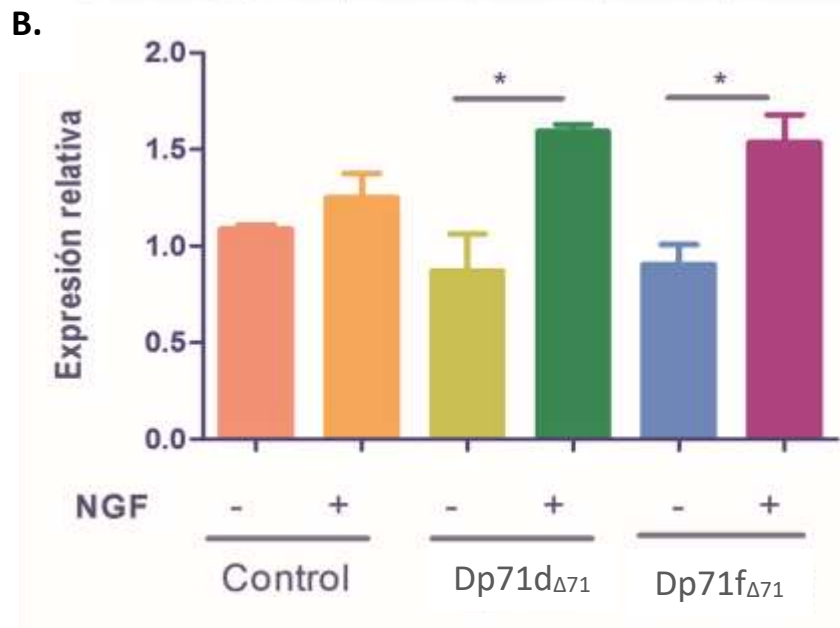
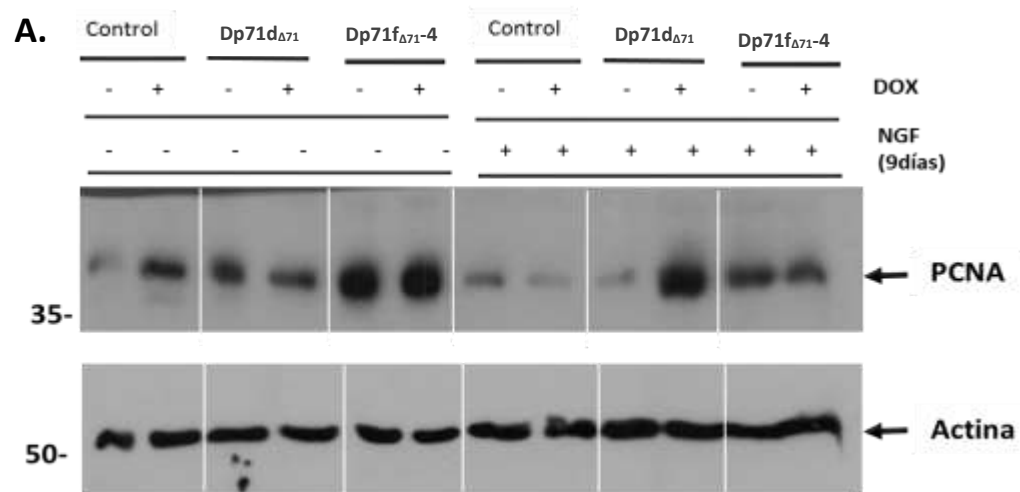


Figura 15. Expresión de PCNA en las clonas Dp71d Δ 71, Dp71f Δ 71-4 y la clona control en células no diferenciadas y diferenciadas. **A.** Western Blot para el análisis de PCNA. **B.** Expresión relativa de la expresión de PCNA. La expresión relativa se obtuvo normalizando con actina. Las imágenes representan dos experimentos independientes, se graficó el promedio \pm la desviación estándar de dichos experimentos.

d. Adhesión de células PC12 Tet-On/Dp71f Δ 71 al sustrato.

El siguiente objetivo fue evaluar la adhesión de las células Dp71f Δ 71-4 a placas pre-tratadas con colágena. Para esto, se sembraron 400 000 células de la clona control, la clona Dp71d Δ 71 y Dp71f Δ 71-4 y se dejaron adherir por 4 horas. Posteriormente se realizó un lavado con PBS para retirar aquellas células que no se adhirieron y las células adheridas fueron contadas en el citómetro de flujo. En la figura 16 se muestra la gráfica representativa del número de células adheridas. En ambas clonas, Dp71d Δ 71 y Dp71f Δ 71-4 se adhirieron un número mayor de células en comparación con la clona control, sin embargo, no existe diferencia significativa en el número de células adheridas entre las clonas Dp71d Δ 71 y Dp71f Δ 71-4.

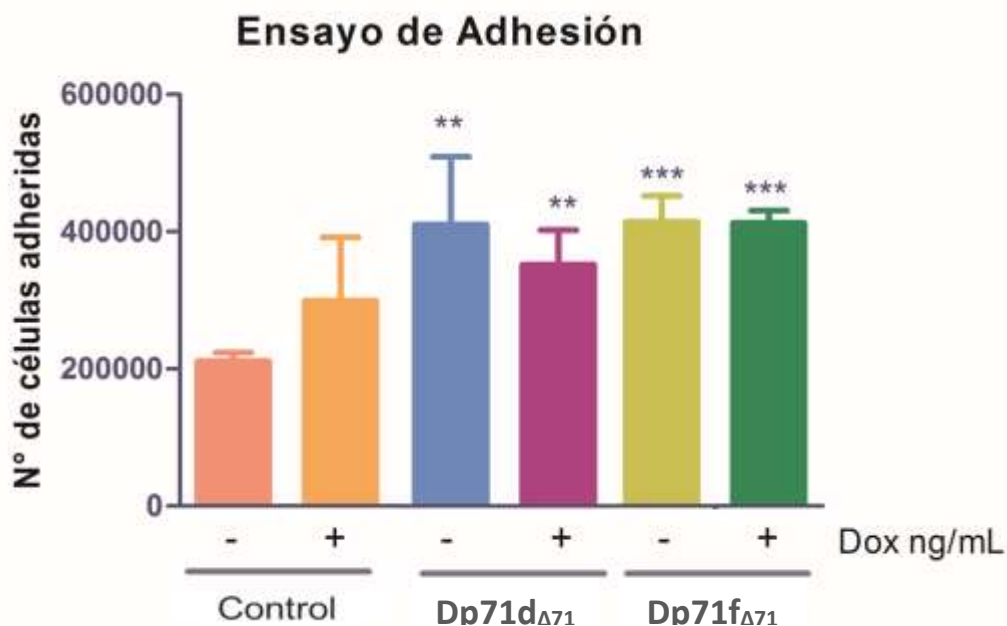


Figura 16. Adhesión de células a colágena. Se sembraron 400 000 células de cada clona en placas de 24 pozos y se dejaron adherir por 4 horas. La gráfica representa dos experimentos independientes, se graficó el promedio \pm la desviación estándar de dichos experimentos.

Como ya se mencionó anteriormente, se tiene el antecedente de que Dp71f forma un complejo con la Kinasa de Adhesión Focal (FAK por sus siglas en inglés *Focal Adhesion Kinase*), por lo que se evaluó la expresión de esta proteína en las tres clones, Dp71d Δ 71, Dp71f Δ 71-4 y la clona control, con y sin DOX y en células no diferenciadas y diferenciadas con NGF a 9 días. En la clona de Dp71f Δ 71-4 la expresión de FAK aumenta en presencia de NGF en comparación con las células Dp71f Δ 71-4 no diferenciadas y en células no diferenciadas y diferenciadas, la expresión de esta proteína es mayor en comparación con el control; sin embargo, en clona Dp71d Δ 71 la expresión de FAK disminuye en presencia de NGF. No existe diferencia en la expresión entre las células sin DOX y aquellas tratadas con DOX.

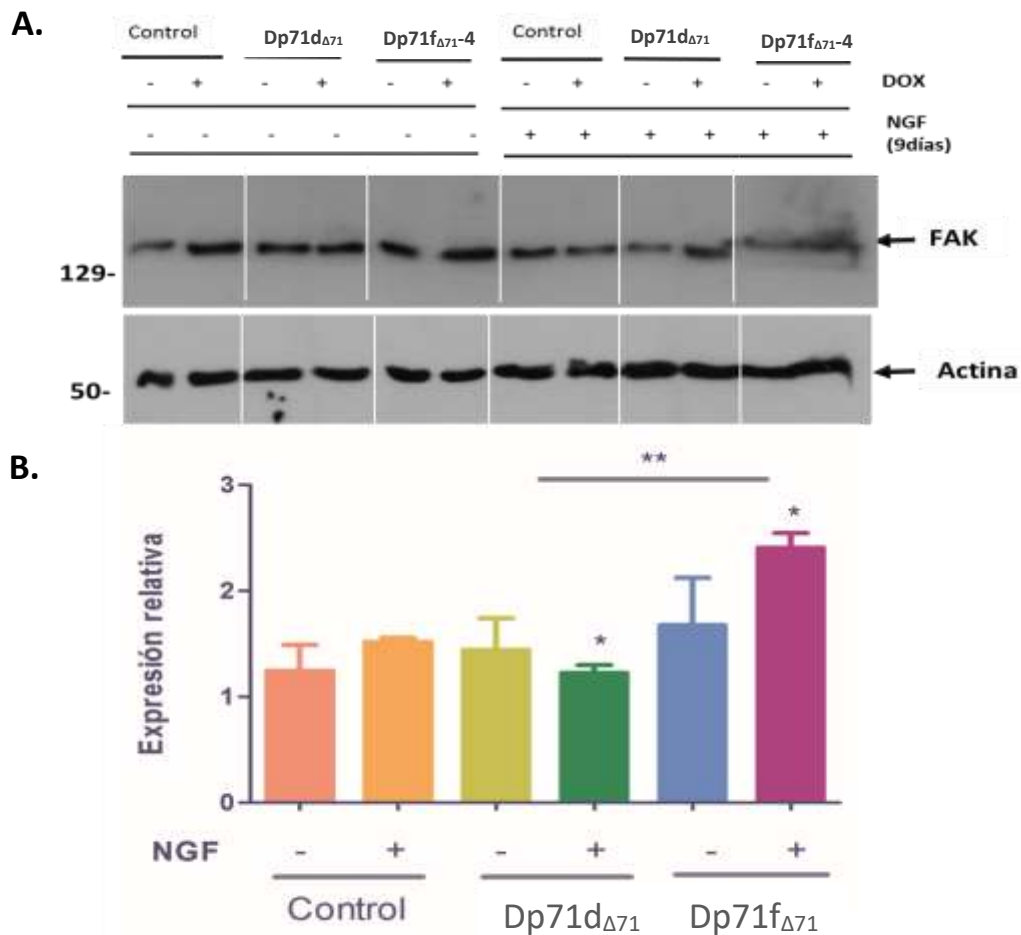
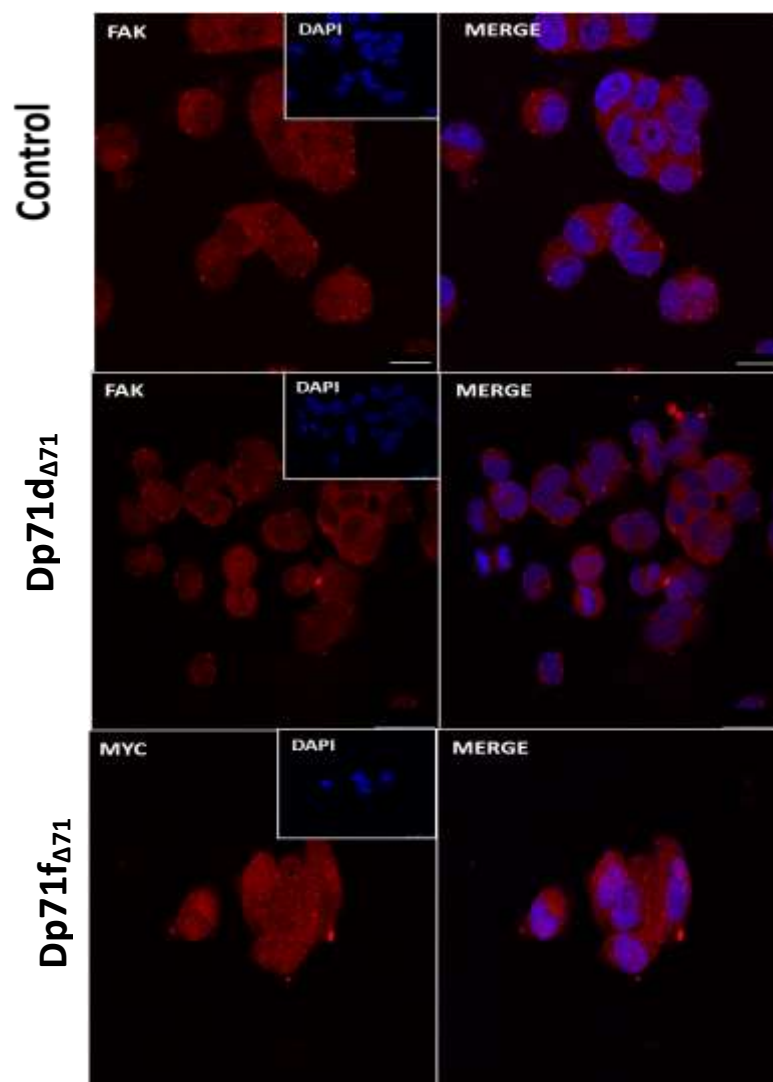


Figura 17. Expresión de FAK en las clonas Dp71ab, Dp71ab-4 y la clona control. **A.** Western Blot para el análisis de FAK. **B.** Expresión relativa de la expresión de FAK. La expresión relativa se obtuvo normalizando con actina. Las imágenes representan dos experimentos independientes, se graficó el promedio \pm la desviación estándar de dichos experimentos.

También se evaluó la expresión de FAK mediante inmunofluorescencia indirecta para determinar la localización de la proteína en células no diferenciadas usando el anticuerpo secundario Alexa 568. Como se observa en la Figura 18, FAK se encuentra asociada a membrana y en el citoplasma, en núcleo se observa en menor cantidad en el caso de las clona control y Dp71a, sin embargo, en la clona Dp71f Δ 71 se encuentra asociada a membrana, en citoplasma y en núcleo se observa en mayor cantidad en



comparación con la clona control y Dp71d Δ 71.

Figura 18. Localización de la proteína FAK en la clona control, Dp71d Δ 71 y Dp71f Δ 71-4 tratadas con DOX en células no diferenciadas. Se usó el anticuerpo secundario Alexa 594 para observar la marca de MAP II (rojo) y los núcleos se tiñeron con Dapi (azúl). Se observa la marca de FAK. Imágenes de una sección ecuatorial. Las imágenes representan dos experimentos independientes. La barra blanca representa la escala de 10 μ m.

e. Diferenciación de las células PC12 Tet-On/ Dp71f Δ 71 inducida por NGF.

La capacidad de adhesión de las células les permite extender sus neuritas durante el proceso de diferenciación (Acosta y col., 2004), el siguiente objetivo fue evaluar la diferenciación de las células Dp71f Δ 71 inducidas con NGF. Como se indica en la sección de métodos, se evaluó la diferenciación de Dp71f Δ 71 y de la clona control en ausencia y presencia de DOX, a una dosis de 500 ng/mL. Se realizó un análisis morfométrico de ambas clonas y se calculó el porcentaje de diferenciación y el promedio de longitud de las neuritas a los días 0, 3, 6 y 9 días de diferenciación con NGF.

En la figura 19 se muestran las imágenes tomadas en el microscopio de campo claro de las clona de Dp71f Δ 71-4 y la clona control inducidas con DOX. Al día 0 de diferenciación la morfología de las células es similar, sin embargo, al día 3 de diferenciación, la morfología de las células que expresan a Dp71f Δ 71-4 comienzan a verse aplanadas y algunas células ya presentan neuritas cortas del tamaño de un cuerpo y hasta dos cuerpos celulares mientras que en la clona control, la mayor parte de las células continúan redondas, al día 6 de diferenciación con NGF se observan células con neuritas que tienen tamaño de más de dos cuerpos celulares.

En la clona Dp71f Δ 71-4, se observan células con morfología que corresponde a neuronas bipolares también se observan neuronas multipolares y estrelladas.

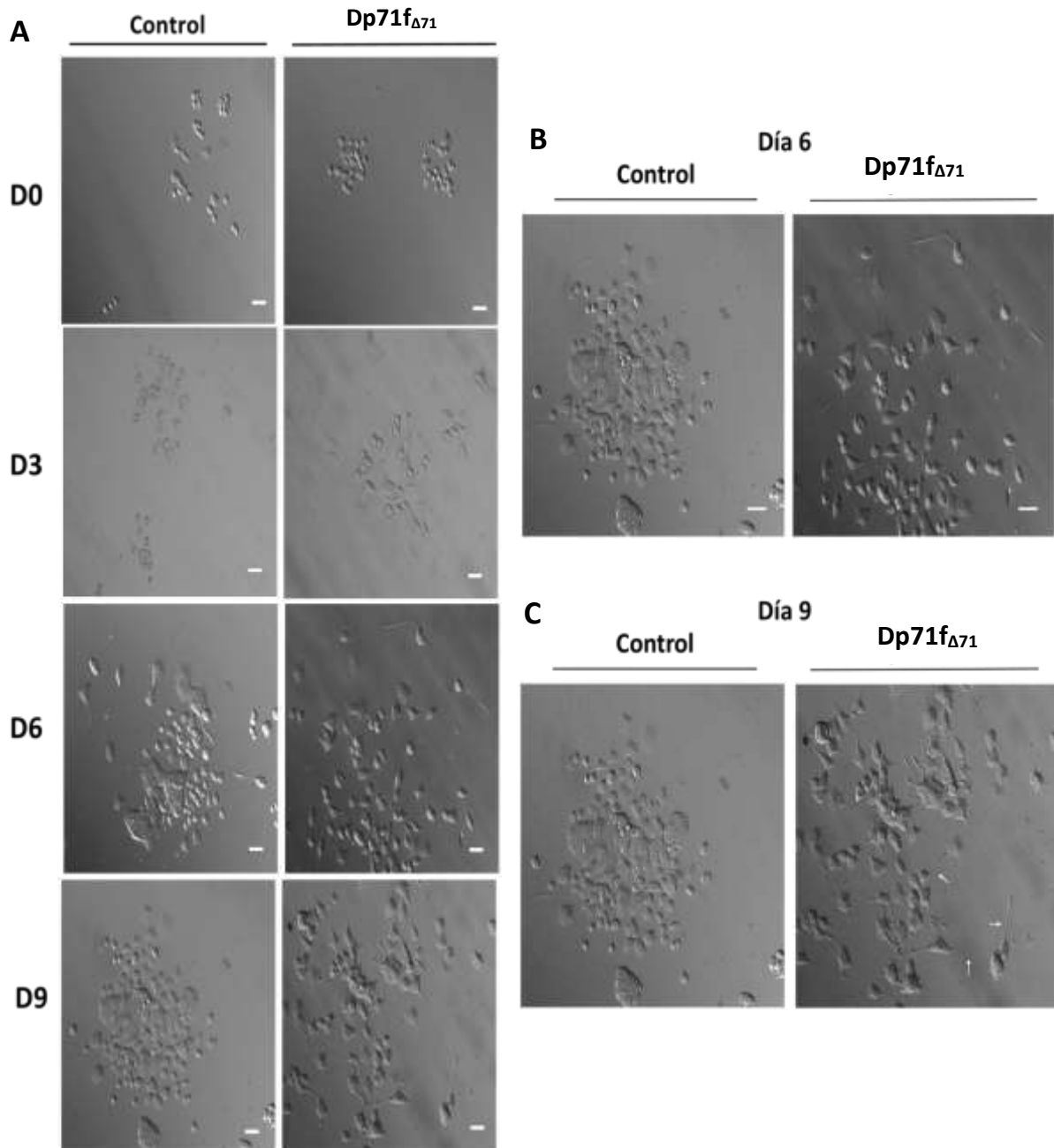


Figura 19. Diferenciación de células Dp71f Δ 71-4 y la clona control con NGF. Se sembraron 30, 000 células en cajas pre-tratadas con colágena, se tomaron imágenes a los días 0, 3, 6 y con el programa AxioVision LE 4.7 **A.** Diferenciación de células Dp71f Δ 71 y la clona control a los 6 días de diferenciación con NGF **B.**

Diferenciación de células Dp71f Δ 71-4 y la clona control a los 9 días de diferenciación con NGF.

El porcentaje de diferenciación se calculó contando las células que presentan neuritas del total de células a los días 3, 6 y 9 de diferenciación y el rango de longitud de neuritas se calculó midiendo la longitud de las neuritas. Aquellas células que presentaban más de una neurita se midió la neurita más larga. En la figura 20 se muestra que la clona Dp71f Δ 71-4 tiene un mayor porcentaje de diferenciación en comparación con la clona control durante los tres días de ensayo, siendo los días 3 y 6 donde presenta el mayor porcentaje de diferenciación.

En el día 3 donde presenta el mayor porcentaje de diferenciación el 20% de células presentan neuritas con longitud que va entre uno y dos cuerpos celulares y el 10% de las células que tienen neuritas con longitud mayor a dos cuerpos celulares en comparación con el control donde el 90% de las células no tienen neuritas o tienen una longitud menor a un cuerpo celular. Sin embargo, en el día 6 parece disminuir el número de células con neuritas con longitud mayor a un cuerpo celular, esto es debido a que una parte de la población de células se sigue dividiendo, provocando que el porcentaje de células no diferenciadas aumente.

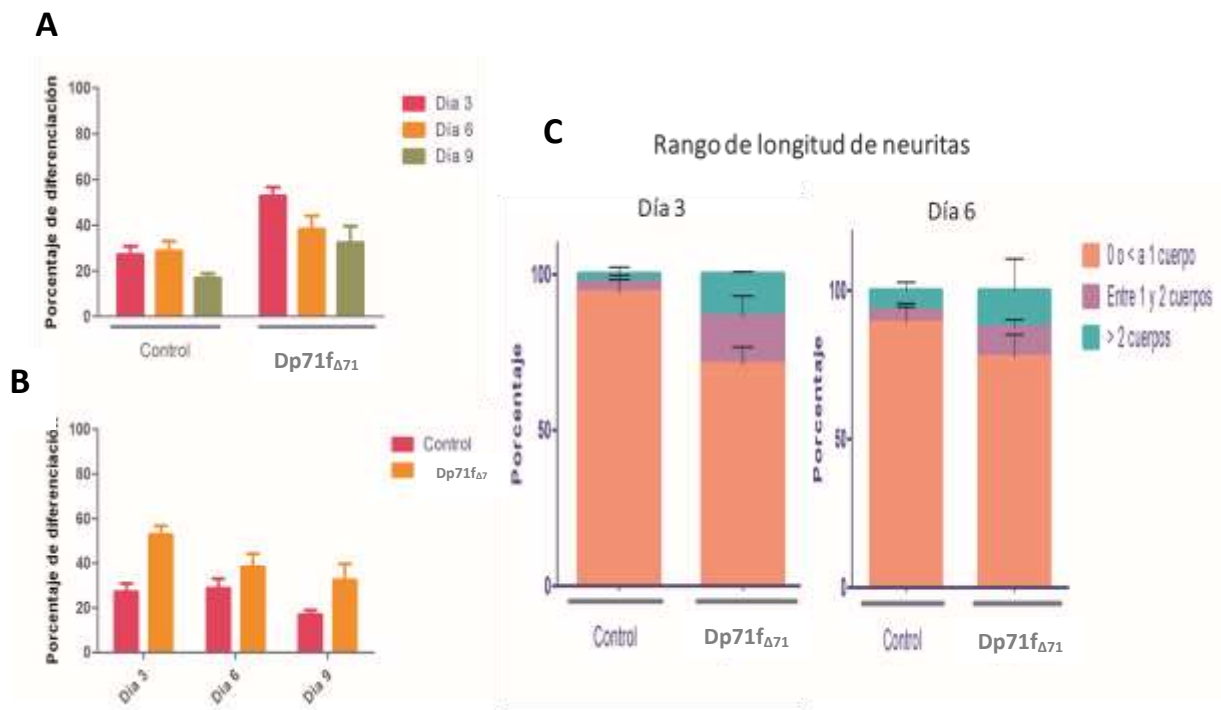


Figura 20. Diferenciación de células Dp71f Δ 71-4 y la clona control con NGF. Se tomaron imágenes de campo claro y se midió la longitud de la neurita con el programa AxioVision LE 4.7. **A.** Porcentaje de diferenciación de células Dp71f Δ 71-4 y la clona control a 9 días de diferenciación con NGF. **B.** Comparación del porcentaje de diferenciación de células Dp71f Δ 71-4 y la clona control a los 9 días de diferenciación con NGF. **C.** Gráfica del rango de longitud de células PC12 Tet-On Dp71f Δ 71-4 y la clona control a los 3 y 6 días de diferenciación con NGF. Las gráficas fueron realizadas con el software GraphPad Prism. Las imágenes representan dos experimentos independientes, se graficó el promedio \pm la desviación estándar de dichos experimentos.

Adicionalmente se evaluó la expresión de Neurofilamento de cadena ligera (NF-L) un marcador de diferenciación que se caracteriza porque contribuye a la extensión y estabilización de neuritas durante el proceso de diferenciación (Schimmelpfeng y col., 2004). En las tres clonas se observa que la expresión de NF-L aumenta cuando las células son diferenciadas con NGF por 9 días.

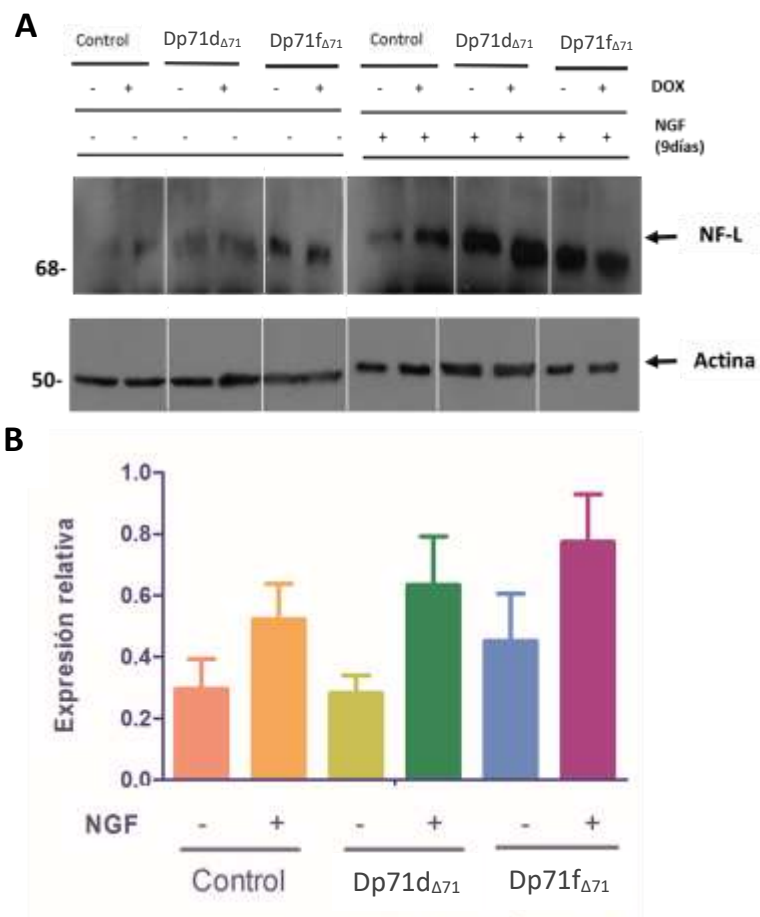


Figura 21. Expresión de NF-L en las clonas Dp71d Δ 71, Dp71f Δ 71-4 y la clona control. **A.** Western Blot para el análisis de NF-L. **B.** Expresión relativa de la expresión NF-L. La expresión relativa se obtuvo normalizando con actina. Las imágenes representan dos experimentos independientes, se graficó el promedio \pm la desviación estándar de dichos experimentos.

También se evaluó la expresión de la proteína recombinante Myc/Dp71d Δ 71 y Myc/Dp71f Δ 71 en células no diferenciadas y diferenciadas con NGF, en ausencia y presencia de DOX. La figura 20 muestra el Western Blot y la gráfica correspondiente a la expresión de Myc/Dp71d Δ 71 y Myc/Dp71f Δ 71 la cual aumenta en células diferenciadas con NGF en ambas clonas, Dp71d Δ 71 y Dp71f Δ 71-4 siendo Dp71f Δ 71-4 la que presenta una mayor expresión en células diferenciadas.

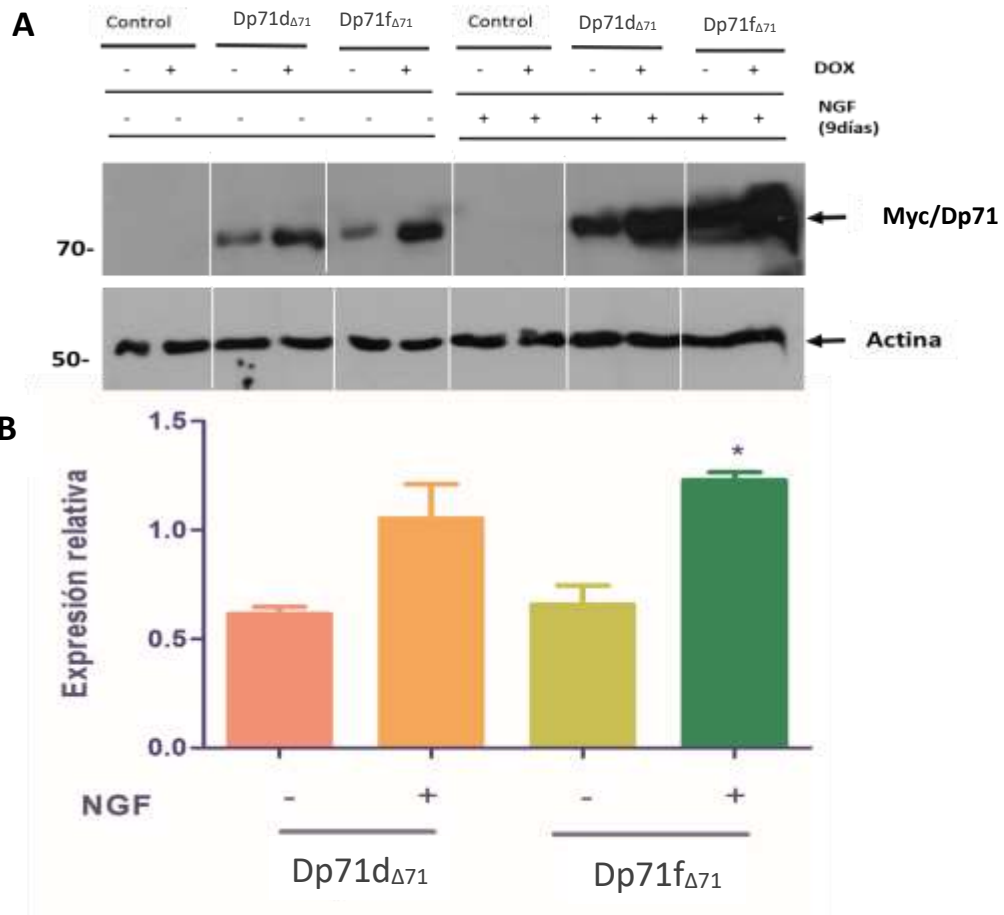


Figura 22. Expresión de Myc/Dp71 en las clonas Dp71d Δ 71, Dp71f Δ 71-4 y la clona control. **A.** Western Blot para el análisis de Myc/Dp71d Δ 71 y Myc/Dp71f Δ 71. **B.** Expresión relativa de la expresión de Myc/Dp71d Δ 71 y Myc/Dp71f Δ 71. La expresión relativa se obtuvo normalizando con actina.

Además de la expresión de Myc/Dp71f Δ 71 es importante evaluar si existen cambios en la localización de la proteína cuando las células son diferenciadas con NGF, para lo cual se realizó inmunofluorescencia indirecta usando el anticuerpo anti Myc. Como se observa en la figura 21, en células no diferenciadas la proteína recombinante Myc/Dp71f Δ 71 está asociada a membrana y en el citoplasma, en núcleo se observa muy poco; sin embargo, cuando las células son diferenciadas con NGF se encuentra en el cuerpo de la célula y en la extensión de la neurita, mientras que, en núcleo se observa en mayor cantidad en comparación con las células no diferenciadas.

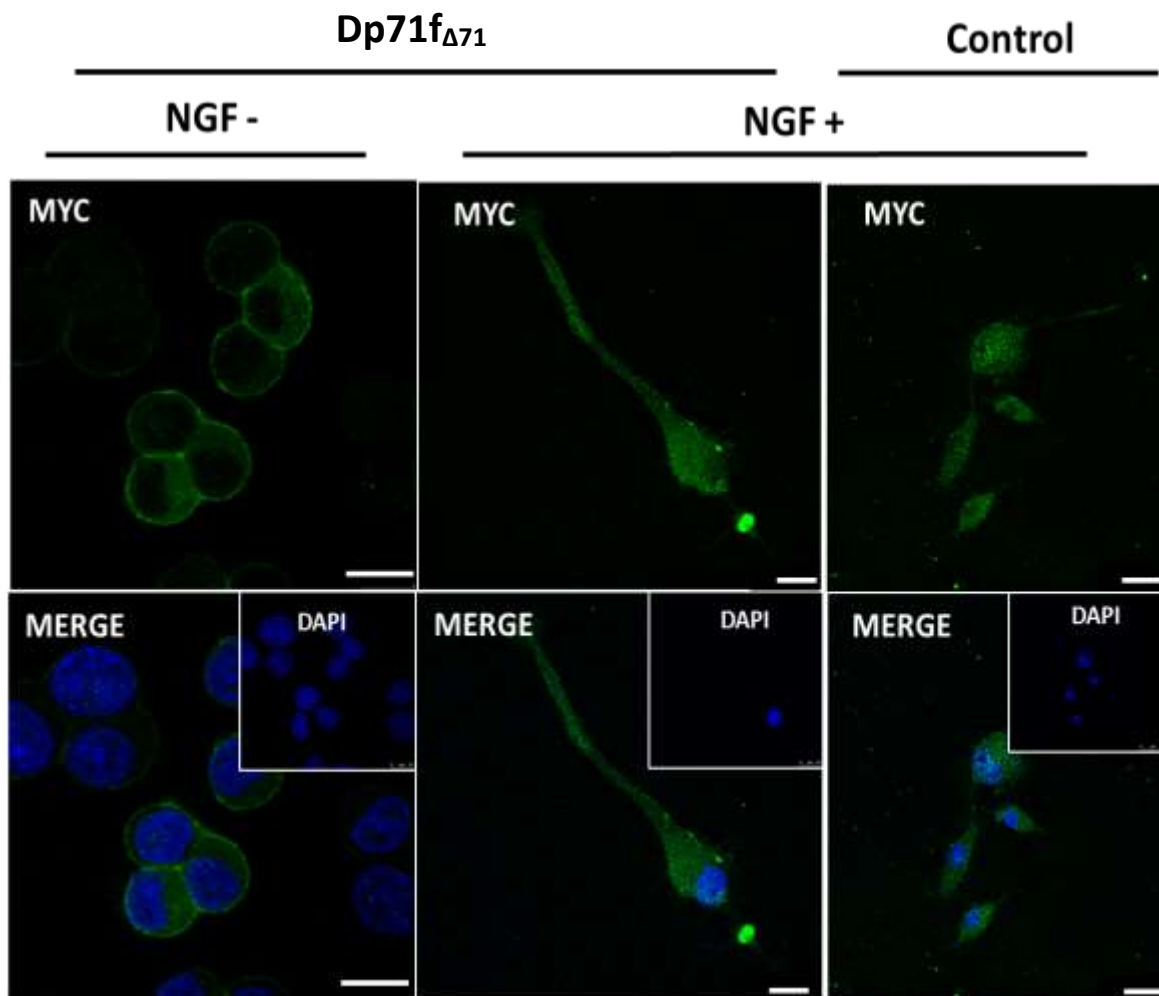


Figura 23. Localización de la proteína Myc/Dp71f Δ 71 en la clona Dp71f Δ 71-4 tratadas con DOX en células no diferenciadas y diferenciadas con NGF. Se usó el anticuerpo secundario Alexa 488 para observar la marca de c-Myc (verde) y los núcleos se tiñeron con Dapi (azúl). Se observa la marca de c-Myc en presencia y ausencia de DOX. Imágenes de una sección ecuatorial. Las imágenes representan dos experimentos independientes. La barra blanca representa la escala de 25 μ m.

Por último, se evaluó la expresión de marcadores de diferenciación como es la Proteína de Asociación a Microtúbulos II (MAP II por sus siglas en inglés *Microtubule Asociation Protein II*) la cual promueve el ensamblaje y la estabilización de microtúbulos en neuronas maduras.

En la Figura 23 se observa que la localización de esta proteína en la clona control y en Dp71f Δ 71-4 está en citoplasma y asociada a membrana en células no diferenciadas y en células diferenciadas su localización es limitada al cuerpo celular; sin embargo, se observa que en Dp71f Δ 71 se encuentra en la extensión de la dendrita.

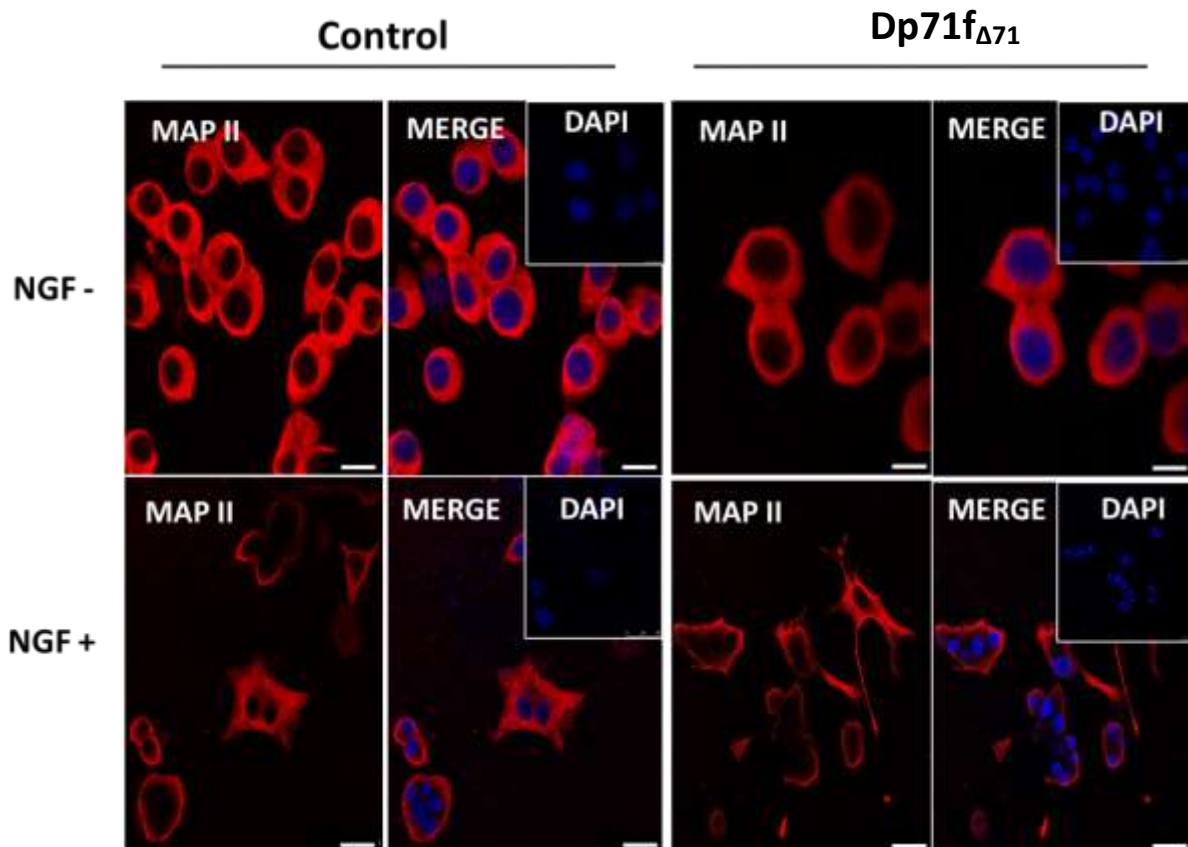


Figura 24. Localización de la proteína MAP II en la clona control y Dp71f Δ 71-4 tratadas con DOX en células no diferenciadas y diferenciadas con NGF. Se usó el anticuerpo secundario Alexa 594 para observar la marca de MAP II (rojo) y los núcleos se tiñeron con Dapi (azúl). Se observa la marca de MAP II en presencia y ausencia de NGF. Imágenes de una sección ecuatorial. Las imágenes representan tres experimentos independientes. La barra blanca representa la escala de 25 μ m.

Otro marcador de diferenciación que también se evaluó fue Sinaptofisina, una glicoproteína integral de membrana presente en vesículas presinápticas de neuronas maduras la cual, como se muestra en la Figura 24, se localiza en el cuerpo de las células y asociado a membrana en células no diferenciadas en la clona control y en Dp71f Δ 71-4 y en células diferenciadas de la clona Dp71f Δ 71-4 se encuentra en el cuerpo de la células y la extensión de la neurita, en el caso de la clona control, no se encontraron células con neuritas con marca de Sinaptofisina.

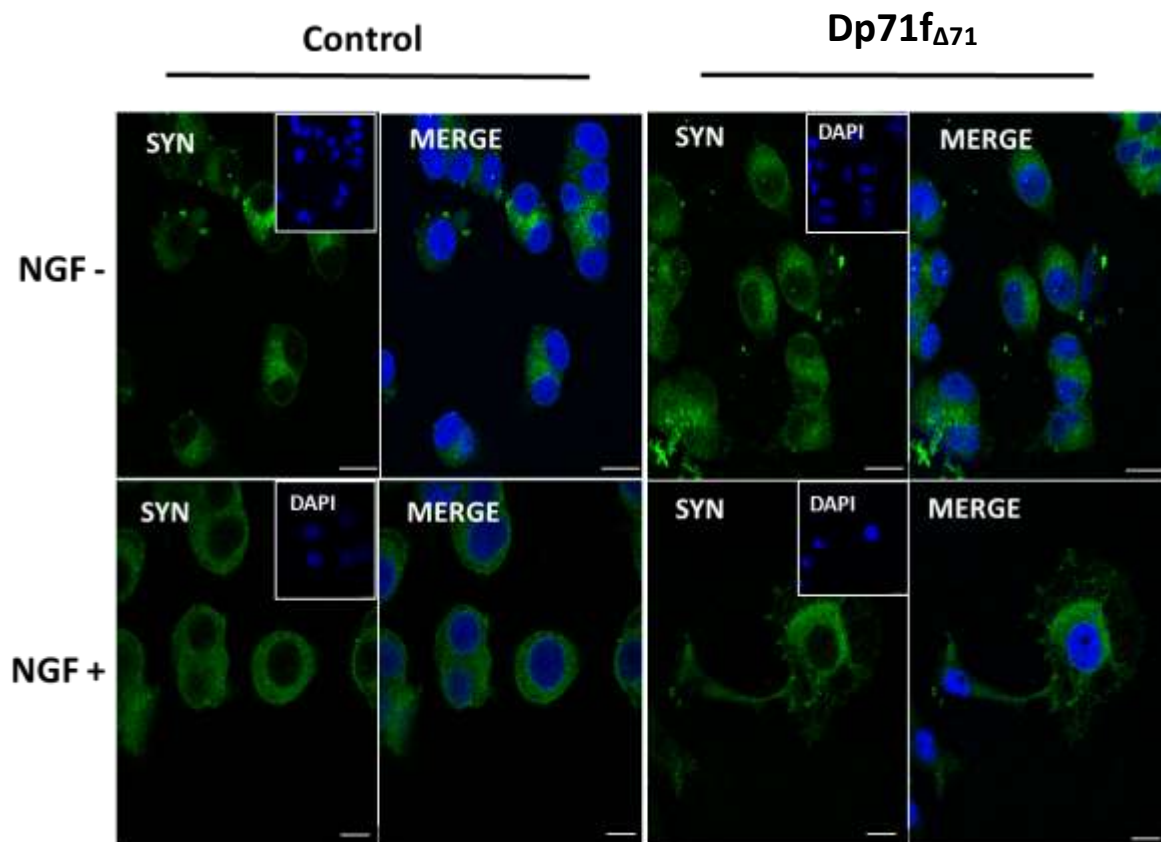


Figura 25. Localización de la proteína Sinaptofisina en la clona control y Dp71f_{Δ71-4} tratadas con DOX en células no diferenciadas y diferenciadas con NGF. Se usó el anticuerpo secundario Alexa 488 para observar la marca de Sinaptofisina (verde) y los núcleos se tiñeron con Dapi (azúl). Se observa la marca de Sinaptofisina en presencia y ausencia de NGF. Imágenes de una sección ecuatorial. Las imágenes representan tres experimentos independientes.

VII. DISCUSIÓN

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad ligada al cromosoma X que se caracteriza por una degeneración muscular debido a la ausencia de la proteína Distrofina, los pacientes presentan una atrofia músculo-esquelética progresiva y una pseudohipertrófia del músculo gastrocnemio, afecta a individuos de entre 3 y 5 años de edad quienes pierden gradualmente la capacidad de caminar y mueren alrededor de los 20 años debido a fallas respiratorias (Nichols *et al*, 2015). Los pacientes también presentan déficit de atención y de memoria a mediano y largo plazo (Liang *et al*, 2015).

El gen *DMD* es el responsable de la expresión de la proteína completa en diferentes tejidos, a lo largo del gen se encuentran los promotores para la expresión de otras isoformas de la distrofina, entre los que se encuentra el promotor presente en el intrón 62 el cual regula la expresión de la isoforma Dp71 (Waite *et al*, 2012). Dp71 es la proteína más abundante en cerebro y su ausencia está relacionada con retraso mental y déficit de atención en la DMD.

El mRNA de Dp71 a su vez, sufre procesamiento alternativo de los exones 71, 71-74 y 78 dando como resultado múltiples isoformas que se clasifican en tres grupos (Aragón *et al*, 20016). Se ha reportado que existe un aumento en la expresión del grupo de Dp71f cuando las células son diferenciadas con NGF, además de que isoformas de este grupo tienen un papel importante en

la adhesión de las células al sustrato y por lo tanto en la capacidad de extender neurita en presencia de NGF (Marquéz *et al*, 2003). Debido a la importancia que se ha descrito sobre la Dp71 y a las múltiples isoformas de esta proteína, es importante caracterizar la isoforma de Dp71f Δ 71 en un sistema de sobreexpresión para identificar el papel que juega en la diferenciación.

Lo primero que se realizó fue establecer la concentración de DOX a la cual se induce una mayor cantidad de proteína recombinante, para esto se realizaron curvas de inducción con DOX con dosis desde 0 hasta 1000 ng/mL. En ambas clonas se observa que la mayor expresión de proteína ocurre a partir de los 200 ng/mL, siendo 500 ng/mL la concentración a la cual existe mayor expresión de proteína en la clona Dp71f Δ 71-1 y 1000 ng/mL en la clona Dp71f Δ 71-4 sin embargo existen evidencia de la toxicidad de la DOX (Emark *et al*, 2003) por lo que se eligió 500 ng/mL la concentración para inducir la expresión de la proteína recombinante en los siguientes ensayos.

Para continuar con los siguientes ensayos fue importante verificar que las células estaban expresando la proteína recombinante de Myc/Dp71f Δ 71. Se extrajo RNA de las clonas Dp71f Δ 71-1 y Dp71f Δ 71-4 y se realizó una RT-PCR para obtener cDNA y verificar que la secuencia clonada en las células PC12 Tet-On Myc/Dp71f Δ 71-1 y Dp71f Δ 71-4 corresponde a la secuencia de Dp71f Δ 71, la PCR se realizó con el oligo 77F y pTRE2 3' con éstos oligos amplificamos únicamente las proteínas clonadas en el vector y no las endógenas, además de que observamos la ausencia del exón 78 correspondiente al grupo de Dp71f.

En la figura 8 se observa que ambas clonas tienen el inserto correspondiente a 236 pb, el cual se secuenció y se comparó la secuencia con la secuencia teórica del mRNA de Dp71f Δ 71, ambas secuencias son homólogas y en la figura 9 se muestra con letras naranjas el final del exón 77 y con letras azules el inicio del exón 79, demostrando la ausencia del exón 78, subrayado se muestra el sitio de corte para Not I donde se insertó la secuencia de

Dp71f Δ 71, en letras rojas se muestra el codón de paro y resaltado de amarillo la secuencia del oligo pTRE2 3´.

Posteriormente se verifico la expresión de la proteína recombinante en ambas clonas, induciendo con 500 ng/mL de DOX, en ambas clonas se observa la expresión de la proteína recombinante, la clona Dp71f Δ 71-1 muestra una expresión basal de la proteína aun cuando no se induce con DOX, la clona Dp71f Δ 71-4 muestra una menor fuga, siendo la diferencia estadísticamente significativo, El comportamiento diferente en ambas clonas puede deberse que el plásmido se insertó en diferentes sitios del genoma de las células. Si la secuencia de Dp71f Δ 71 insertada en el genoma permite la unión de factores de transcripción con mayor facilidad, entonces se requerirán dosis menores de DOX para inducir la expresión de la proteína. Con este resultado se demuestra que las clonas Dp71f Δ 71-1 y Dp71f Δ 71-4 expresan la proteína recombinante Myc/ Dp71f Δ 71.

En 2016 Aragón y colaboradores reportaron la localización de las distintas isoformas de Dp71 en células PC12 transfectadas transitoriamente, donde Dp71f Δ 71 se encuentra en células no diferenciadas principalmente en la membrana de las células y el citoplasma. En este trabajo se analizó la localización de la proteína recombinante en células transfectadas establemente encontrando que la proteína recombinante está principalmente asociada a membrana y en el citoplasma y en menor cantidad en núcleo, coincidiendo con lo reportado en células transfectadas transitoriamente.

En el caso de la clona de PC12 Tet-On Myc/Dp71f Δ 71-4, en ausencia de DOX, se observa un menor número de células con la marca de Myc/Dp71f Δ 71 lo que confirma que existe una menor expresión basal de la proteína en ésta clona, debido a esto se escogió ésta clona para los posteriores ensayos, además. Para poder evaluar las diferencias entre el grupo Dp71f y Dp71d se eligió la clona que expresa la isoforma Dp71d Δ 71. En el grupo de trabajo se reportó que la clona PC12 Tet-On Myc/Dp71d Δ 71 tiene una mayor proliferación y una menor diferenciación en comparación con la clona control.

Se ha reportado que Dp71 participa durante la proliferación, formando un complejo con β -dístroglicano en el centrómero durante la mitosis (Tayadoni *et al*, 2011). Adicionalmente en nuestro grupo de trabajo se reportó que la clona PC12 Tet-On Myc/Dp71d Δ 71 tiene una mayor proliferación y una menor diferenciación en comparación con la clona control.

Considerando esta información, se evaluó la proliferación de la clona PC12 Tet-On Myc/Dp71f Δ 71 haciendo curvas de proliferación. Las células que expresan la proteína recombinante proliferan menos que la clona control en la cual al día 9 llegan hasta 800 millones de células mientras que en la clona Dp71f Δ 71-4 únicamente hasta 400 millones. No se observa diferencias en la proliferación de las células en presencia de DOX, sugiriendo que la concentración usada no afecta la proliferación de las células, sin embargo, aun cuando se observa una menor proliferación de la clona que expresa la proteína recombinante, no existe diferencia significativa.

Para tener una mayor certeza del papel de la proteína en la proliferación, se realizó el ensayo mediante citometría de flujo marcando las células con CFSE. La CFSE presenta dos grupos acetato, los cuales hacen que la molécula sea permeable y pase por la membrana de las células, una vez dentro de las células las esterasas intracelulares remueven ambos grupos de las moléculas, haciendo este compuesto impermeable, quedando atrapado dentro de las células. Además, proteínas presentes en el citoplasma reaccionan con la CFSE, haciéndola más estable, la marca puede permanecer por meses en la misma célula (Quah *et al*, 2007), sin embargo, cuando ésta se divide la marca disminuye lo que nos permite tener la certeza del número de generaciones que ocurren en un determinado tiempo.

En células no inducidas, se puede observar que en la clona Dp71f Δ 71-4 hay un menor número de generaciones, al día 4, 40% de las células se han dividido 4 y 5 veces y en el día 6 el 60% de las células se ha dividido 4 veces, en comparación con la clona control que en el día 4 el 60% de las células ya se dividió 4 veces y al día 6 más del 60% de las células se dividieron 5

veces, lo contrario ocurre con la clona Dp71d Δ 71 cuya proliferación es mayor y que desde el día 2 el 50% de las células ya se dividió 4 veces similar a lo reportado anteriormente en el grupo de trabajo.

Cuando las células son inducidas con DOX, las tres clonas presentan al día 4 un aumento en la proliferación que no puede ser atribuido a la expresión de la proteína ya que el mismo efecto se observa en la clona control.

Por lo que se evaluó también la expresión de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) una proteína accesoria de la DNA polimerasa alfa, la cual se eleva durante la fase G1/S del ciclo celular (Sánchez- Acuña *et al*, 2013). Existe una marcada diferencia en la expresión de PCNA cuando se agrega NGF en las clonas de Dp71d Δ 71 y Dp71f Δ 71-4. En el grupo de trabajo se evaluó la proliferación de las células que expresan la proteína mutante Dp71 Δ 78-79 en presencia de NGF, aun cuando las células presentaban un alto grado de diferenciación, éstas no dejaban de dividirse, se probaron distintas concentraciones de suero y se dejaron por tres días antes de agregar NGF y en todas las condiciones probadas la densidad de células seguía aumentando en presencia de NGF.

Antes de evaluar la diferenciación de las células, es importante determinar la capacidad de adhesión de estas, para lo cual se realizaron ensayos de adhesión a placas pre-tratadas con colágeno, un mayor número de células en ambas clonas, Dp71d Δ 71 y Dp71f Δ 71-4, se adhieren al sustrato en comparación con la clona control, siendo Dp71ab-4 la que más se adhiere. Cerna y colaboradores reportaron en 2006 que Dp71 forma un complejo con FAK que recluta a β -integrina quién modula la adhesión a sustratos como laminina y colágena, por lo que también se evaluó la expresión de FAK en la clona control y en las dos clonas Dp71d Δ 71 y Dp71f Δ 71-4, Dp71f Δ 71-4 presenta una mayor expresión de FAK cuando las células son diferenciadas con NGF en comparación con el control, se ha propuesto el dominio WW como un sitio de probable interacción con FAK (Cerna *et al*, 2006), lo contrario ocurre con Dp71d Δ 71, la cual en presencia de NGF disminuye su expresión de FAK.

Esta deficiencia en la adhesión de las células control puede estar relacionada con los resultados obtenidos en el ensayo de diferenciación, donde se observó que el porcentaje de diferenciación de la clona Dp71f Δ 71-4 es mayor que en la clona control, el mayor porcentaje de diferenciación lo presenta al día 3 y a partir del día 6 disminuye, esto ocurre debido a que las células no dejan de dividirse, similar a lo observado con la proteína mutante Dp71 Δ 78-79 donde a partir del día 6 con NGF se observa que las células continúan dividiéndose.

La clona Dp71f Δ 71-4 presenta un mayor porcentaje de células con neuritas largas de entre uno y dos cuerpos celulares y con más de dos cuerpos celulares de longitud al día 3 de diferenciación en comparación con la clona control, sin embargo, al día 6 de diferenciación este porcentaje disminuye debido que las células se siguen dividiendo y por ende, aumenta el porcentaje de células no diferenciadas.

Similar a lo reportado por Marquéz en 2003, existe un aumento en la expresión de Dp71ab cuando las células son diferenciadas con NGF, no obstante, también se observa un aumento en la expresión de Dp71d Δ 71 que forma parte del grupo de Dp71d en células diferenciadas con NGF.

La localización de la proteína recombinante en células es principalmente asociada a la membrana, en el cuerpo de la célula y en núcleo, lo contrario a lo reportado por Aragón y colaboradores en 2016, donde en células diferenciadas transfectadas transitoriamente se encuentra en menor cantidad en núcleo, esto puede deberse a que la expresión de la proteína recombinante aumenta cuando las células son diferenciadas con NGF, lo que provoca que la membrana y citoplasma de la célula se saturen de la proteína por lo que también se encuentra en el núcleo.

Por último, se evaluó la localización de marcadores de diferenciación como Sinaptofisina, una glicoproteína presente en membranas presinápticas de neuronas maduras (Chapman and Kwon, 2011) y MAP II quien promueve el ensamblaje y la estabilización de microtúbulos en neuronas maduras (Seger

and Ribinfeld, 2005), ambos marcadores se encuentran principalmente asociados a membrana y en citoplasma, en la clona Dp71f Δ 71-4 y la clona control, en el caso de Sinaptofisina, no se observaron células diferenciadas con la marca de proteína. Esto nos indica que las células que expresan la proteína recombinante Myc/Dp71d Δ 71 diferenciadas con NGF expresan marcadores de diferenciación.

VIII. CONCLUSIONES

- La clona PC12 TetOn/Dp71f Δ 71-4 expresa la isoforma de Dp71f Δ 71 tanto a nivel de mRNA como de proteína.
- En células no diferenciadas, la proteína recombinante Myc/Dp71f Δ 71 se localiza principalmente en el citoplasma y asociada a membrana y en menor cantidad en núcleo. A 9 días de diferenciación su localización es principalmente en el cuerpo de la célula y a lo largo de la neurita.
- La adhesión de la clona PC12 TetOn/Dp71f Δ 71-4 y Dp71d Δ 71 es significativamente mayor que el control.
- La sobreexpresión de Myc/ Dp71f Δ 71 conduce a una proliferación menor en comparación con la clona control, mientras que la sobreexpresión de Myc/Dp71d Δ 71 causa una proliferación mayor que la clona control.
- El porcentaje de diferenciación en células que sobreexpresan la proteína Dp71f Δ 71 es mayor que en la clona control.
- La isoforma Dp71f Δ 71 tiene un papel durante la proliferación y diferenciación de las PC12 Tet-ON.

IX. PERSPECTIVAS

- Evaluar la proliferación de las clonas PC12 TetOn/ Dp71f Δ 71-4 y Dp71d Δ 71 en presencia de NGF.
- Evaluar la proliferación y diferenciación de las clonas PC12 TetOn/ Dp71f Δ 71-4 y Dp71d Δ 71 en un cultivo sincronizado.
- Determinar las proteínas que forman complejos con las isoformas Dp71f Δ 71 para conocer más acerca de su posible función.
- Evaluar la expresión de marcadores adicionales de proliferación y diferenciación
- Evaluar otras clonas de Dp71f Δ 71 para verificar que su comportamiento sea similar a las ya caracterizadas.
- Usar un activador de la vía de señalización de NGF corriente abajo del receptor para observar si hay reversión del efecto en proliferación.
- Evaluar la expresión de integrina, encargada de modular la adhesión.
- Colocalizar a Dp71f Δ 71 con FAK e integrina, por ser proteínas involucradas en adhesión.

IX. REFERENCIAS

- Acosta, R., Montañez, C., Fuentes-Mera, L., Gonzalez, E., Gómez, P., Quintero-Mora L., Mornet, D., Álvarez-Salas, L., & Cisneros, B., (2004). **Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells**, *Experimental Cell Research*, 296, 265–275.
- Aquilano, K., Baldelli, S., & Ciriolo, M. R. (2014). **Nuclear Recruitment of Neuronal Nitric-oxide Synthase by α -Syntrophin Is Crucial for the Induction of Mitochondrial biogenesis**, *Journal of Biological Chemistry*, 289(1), 365–378.
- Aragón, J., Martínez-Herrera, A., Romo-Yáñez, J., Ceja, V., Azotla-Vilchis, C., Siqueiros-Márquez, L., Raggi-Soid, G., Herrera-Salazar, A., Montañez, C. (2015). **Identification of Dp71 Isoforms Expressed in PC12 Cells: Subcellular Localization and Colocalization with β -Dystroglycan and α 1-Syntrophin**. *Journal of Molecular Neuroscience*.
- Aragón, J., Romo-Yanez J., Martinez-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*. 119:697–707.
- Cerna, J., Cerecedo, D., Ortega, A., García-Sierra, F., Centeno, F., Garrido, E., Mornet, D., Cisneros, B. (2006). **Dystrophin Dp71f Associates with the β 1-Integrin Adhesion Complex to Modulate PC12 Cell Adhesion**, *J. Mol. Biol* 362:954–965.
- Enríquez-Aragón, J., Cerna-Cortes, J., Bermúdez de León, M., García-Sierra, F., González, E., Mornet D., Cisneros, B. (2004). **Dystrophin Dp71 in PC12 cell adhesion**, *Molecular Neuroscience*, 16(3), 235–238.
- Ermak G., Cancasci V., Davies K. (2003). **Cytotoxic effect of doxycycline and its implications for Tet-on gene expression systems**, *Analytical Biochemistry* 318, 152–154.
- Ervasti, J. M. (2007). **Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy**, *Biochimica et Biophysica Acta*, 108–117.
- Fujimoto, T.; Itoh, K.; Yaoi, T.; Fushiki, S. (2014) **Somatodendritic and excitatory postsynaptic distribution of neuron-type dystrophin isoform, Dp40, in hippocampal neurons**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 452, 79–84.

Giocanti-Auregan, A., Vacca, O., Bernard, R., Cao, S., Siqueiros, L., Montañez, C., Paques, M., Sennlaub, F., Guillonneau X., Rendon, A., & Tadayoni R., (2015). **Altered Astrocyte Morphology and Vascular Development in Dystrophin-Dp71-Null Mice.** *Glia*.64. 716-729.

Herrera-Salazar, A., García-Villegas, R., Aragón, J., Sánchez-Trujillo, A., Ceja, V., Martínez-herrera, A., Merino-Jiménez, C., Montañez, C. (2016). **Overexpression of mutant dystrophin Dp71 Δ 78-79 stimulates cell proliferation,** *Cellular, molecular and developmental neuroscience*, 27, 6–11.

Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2003). **Trk Receptors: Roles In Neuronal Signal Transduction,** *Annual Review of Biochemistry*, 72, 609–642.

Koch, A., Mancini, A., Stefan, M., Niedenthal, R., Niemann, H., & Tamura, T. (2000). **Direct interaction of nerve growth factor receptor, TrkA, with non-receptor tyrosine kinase, c-Abl , through the activation loop,** *FEBS Letters*, 469, 72–76.

Liang, Y., Chen, S., Zhu, J., Zhou, X., Yang, C., Yao, L., & Zhang, C. (2015.). **Dystrophin hydrophobic regions in the pathogenesis of Duchenne and Becker muscular dystrophies.** *Bosnian Journal Basic Medical Sciences*, 15, 42-49.

Marquez, F. G., Cisneros, B., Garcia, F., Ceja, V., Velázquez, F., Depardón, F., Cervantes L., Rendón A., Mornet, D., Rosas-Vargas, H., Mustre, M., Montañez, C. (2003). **Differential Expression And Subcellular Distribution Of Dystrophin Dp71 Isoforms During Differentiation Process,** *Neuroscience*, 118, 957–966.

Mehler, M. F. (2000). **Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation.** *Brain Reserch Reviews*, 32, 277-307.

Nichols, B., Takeda, S., & Yokota, T. (2015). **Nonmechanical Roles of Dystrophin and Associated Proteins in Exercise, Neuromuscular Junctions, and Brains,** 5, 275–298.

Nishida, A., Yasuno, S., Takeuchi, A., & Awano, H. (2016). **HEK293 cells express dystrophin Dp71 with nucleus - specific localization of Dp71ab.** *Histochemistry and Cell Biology*.

Ousterout, D. G., Kabadi, A. M., Thakore, P. I., Perez-Pinera, P., Brown, M. T., Majoros, W. H., Timothy E. R., & Gersbach, C. A. (2015). **Correction of Dystrophin Expression in Cells From Duchenne Muscular Dystrophy Patients Through Genomic Excision of Exon 51 by Zinc Finger Nucleases,** *The American Society of Gene & Cell Therapy*, 23, 523–532.

Sánchez-Acuña G., Bologna-Molina R., Mosqueda-Taylor A., Molina-Frechero N., Mori-Estevez A., (2013). **Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors**, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 18 (2), 174-9.

Schimmelpfeng, J., Weibezahn, K.-F., Dertinger, H., (2004) **Quantification of NGF dependent neuronal differentiation of PC-12 cells by means of neurofilament-L mRNA expression and neuronal outgrowth**. *Journal of neuroscience methods*, 139, 299-306.

Romo-Yañez, J., Ceja, V., Ilarraza-Lomelí, R., Coral-Vázquez, R., Velázquez, F., Mornet, D., Rendón, A., & Montañez, C., Mornet, D., (2007). **Dp71ab / DAPs Complex Composition Changes During the Differentiation Process in PC12 Cells**, *Journal of Cellular Biochemistry*, 102, 82–97.

Schimmelpfeng, J., Weibezahn, K., & Dertinger, H. (2004). **Quantification of NGF-dependent Neuronal Differentiation of PC-12 Cells by means of neurofilament-L mRNA expression and neuronal outgrowth**, *Journal of Neuroscience Methods*, 139, 299–306.

Talsness, D. M., Belanto, J. J., & Ervasti, J. M. (2015). **Disease-proportional proteasomal degradation of missense dystrophins**, *PNAS*, 112, 12414–12419.

Tandon, A., Jefferies, J. L., Villa, C. R., Hor, K. N., Wong, B. L., Ware, S. M., Gao, Z., Towbin, A. J., Mazur, W., Fleck, R. J., Sticka, J. J., Benson, W., & Taylor, M. D. (2015). **Dystrophin Genotype e Cardiac Phenotype Correlations in Duchenne and Becker Muscular Dystrophies Using Cardiac Magnetic Resonance Imaging**. *The American Journal of Cardiology*, 115, 967–971.

Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B. (2012). **Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene**. *Mol Neurobiol*, 45, 43–60.

Teng, K.K., Angelastro, J. M., Cunningham, M. E., & Greene, L. A., (2006) **Cultured for Neuronal PC12 Cells: A Model Function, Differentiation and Survival**, *Cell Biology*, 21, 172-176.

Tian, X., Yue, R., Zeng, H., Li, H., Shan, L., He, W., Shen, Y. & Zhang, W., (2015). **Distinctive effect on nerve growth factor-induced PC12 cell neurite outgrowth by two unique neolignan enantiomers from *Illicium merrillianum***, *Scientific Reports*, 5, 1–9.

Tozawa, T.; Itoh, K.; Yaoi, T.; Tando, S.; Umekage, M.; Dai, H.; Hosoi, H.; Fushiki, S. (2012). **The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts**

with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain. *Mol. Neurobiol.* 45, 287–297

Waite, A., Brown, S. C., & Blake, D. J. (2012). **The dystrophin – glycoprotein complex in brain development and disease. *Trends in Neurosciences*, 35, 487–496.**

Zhang L., Chen J., Huo J., Jia Z., Song Y., Li Y. (2015), **Effects of atrazine on the proliferation and cytotoxicity of murine lymphocytes with the use of carboxyfluorescein succinimidyl ester-based flow cytometric approaches, *Food and Chemical Toxicology*, 76, 61–69.**