



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

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Identificación de las isoformas de la distrofina Dp40 que
se expresan durante la diferenciación de las células
PC12”**

TESIS

Que presenta:

IBQ. IVONNE SAGRARIO ROMERO FLORES.

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS.

En la especialidad de:

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.

Directora de tesis:

Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda.

Ciudad de México

Agosto 2021

DURANTE EL DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO LA ALUMNA IVONNE SAGRARIO ROMERO FLORES FUE BECARIA DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) CON NÚMERO DE REGISTRO 936666. ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR LOS PROYECTOS CB-2017-2018 A1-S-24868 y ECOS-NORD- ANUIES-CONACYT 276330.

AGRADECIMIENTOS

Al CINVESTAV y al Departamento de Genética y Biología Molecular por aceptarme en su programa de posgrado.

A todos los profesores del Departamento por sus enseñanzas y conocimiento que me permitieron formarme como Maestra en Ciencias. En especial a la Doctora Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda, directora de mi proyecto de tesis, a quién le agradezco mucho su apoyo, comprensión, guía y conocimientos que me brindó durante todo el desarrollo de este trabajo. También por nutrir y ayudarme a mejorar el trabajo en cada revisión.

A mi comité tutorial, la Doctora Rosa María Bermúdez Cruz, por el apoyo que me brindó para la realización de parte de mi trabajo experimental y al Doctor Luis Yoshio Kameyama Kawabe por sus aportaciones para el mejoramiento de mi trabajo y su disposición.

A la Dra. Dulce Ma. Delgadillo Álvarez, de la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabólica, perteneciente al Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE-Cinvestav), por la realización de los análisis de secuenciación.

Al grupo de trabajo de la Doctora Cecilia Montañez, de la que forman parte el Doctor Jorge Aragón, a quien le agradezco infinitamente por su apoyo incondicional para la realización de mi proyecto, enseñanza y paciencia en cada explicación. Y por su amistad, ya que con cada plática aparte de aprender, mi estancia en el laboratorio era más confortable. Y al auxiliar Víctor Ceja, que siempre me brinda su ayuda, asesoría y tiempo.

Al Doctor Javier Hernández Sánchez, por el apoyo que me brindó para que pudiera realizar la secuenciación de mis muestras.

DEDICATORIA

Primeramente, a Dios, por haberme permitido lograr concluir con éxito esta etapa de mi vida.

A mi mamá, una mujer extraordinaria, en una palabra, una guerrera, que con su ejemplo me ha enseñado a nunca rendirme, a luchar siempre por mis sueños, a ver cada día como una nueva oportunidad para mejorar y aprender de mis errores, y que las mejores armas para enfrentar la vida con éxito son la constancia, perseverancia y audacia.

A mi abuelita Eva, que a pesar que ya no se encuentra a mi lado, siempre la llevaré en mi corazón y mente, y a mis tíos Deya, Liz y Gali que siempre me han alentado a superarme cada día, ser audaz y no tener miedo de aceptar nuevos retos.

ÍNDICE

ÍNDICE	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Distrofia muscular de Duchenne	1
1.2. Distrofina: gen y proteína	1
1.3. Composición de la proteína distrofina	2
1.4. Familia de distrofinas	3
2. ANTECEDENTES	7
2.1. Distrofina Dp71	7
2.2. Distrofina Dp40	8
2.2.1. Posibles funciones de Dp40	9
2.3. Modelo de estudio: células PC12.....	13
2.4. Proceso de diferenciación de células PC12 con NGF.....	14
2.5. Marcadores de diferenciación	15
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	19
5.1. Objetivo general.....	19
5.2. Objetivos específicos	19
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS	22
7.1. Materiales	22
7.1.1. Línea celular	22
7.1.2. Plásmido	22
7.1.3. Anticuerpos.....	22
7.2. Métodos	23
7.2.1. Cultivo de células PC12.....	23

7.2.2. Ensayo de proliferación celular	24
7.2.3. Diferenciación celular.....	24
7.2.4. Ensayo de western blot.....	24
7.2.5. Extracción de RNA total.....	25
7.2.6. Síntesis de cDNA.....	26
7.2.7. Ensayo de PCR	27
7.2.8. Purificación de los productos de PCR.....	29
7.2.9. Clonación de Dp40-T0 y Dp40-T12 en un vector y su transformación en bacterias competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5α.....	30
7.2.10. Extracción de DNA plasmídico.....	31
7.2.11. Secuenciación de las isoformas de Dp40	32
8. RESULTADOS	33
8.1. Curva de crecimiento de las células PC12.....	33
8.2. Caracterización de las células PC12 durante el proceso de diferenciación	34
8.3. Análisis de la expresión de marcadores de proliferación y diferenciación celular, así como proteínas relacionadas con la proteína de distrofina.....	35
8.3.1. Cuantificación de las proteínas mediante método de Bradford.....	35
8.3.2. Marcador de proliferación: PCNA	36
8.3.3. Marcador de diferenciación temprana: ERK 1/2	37
8.3.4. Marcadores de diferenciación tardía: NSE y NF-L.....	38
8.3.5. Proteínas relacionadas: β-distroglicano y FAK	40
8.4. Identificación de isoformas de Dp40 que se expresan en células PC12 no diferenciadas y diferenciadas.....	42
8.4.1. Extracción del RNA de las muestras.....	42
8.4.2. Amplificación de la distrofina Dp40 mediante PCR.....	44
8.4.3. Análisis de las isoformas de Dp40 expresadas en células PC12 no diferenciadas	46
8.4.4. Isoformas de Dp40 expresadas en células PC12 diferenciadas	59
9. DISCUSIÓN	75
10. CONCLUSIONES.....	81
11. PERSPECTIVAS.....	82
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización genómica del gen DMD ubicado en Xp21.....	5
Figura 2. Composición de los dominios de la familia de distrofinas.	5
Figura 3. Estructura de la proteína Dp40.	9
Figura 4. Vía de señalización para la diferenciación de células PC12 activada por NGF.....	15
Figura 5. Esquema de la posición que ocupan los iniciadores para llevar a cabo la amplificación del gen de la distrofina Dp40.	28
Figura 6. Condiciones de PCR para llevar la amplificación de la secuencia del RNA de Dp40.....	28
Figura 7. Condiciones de PCR para el análisis de las colonias transformadas.....	30
Figura 8. Curva de crecimiento de células PC12 no diferenciadas.	33
Figura 9. Morfología de las células PC12 durante el proceso de diferenciación. ...	35
Figura 10. Curva de calibración con BSA para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	36
Figura 11. Análisis de la expresión de PCNA en células PC12.....	37
Figura 12. Análisis de la expresión de ERK 1/2 fosforilados en células PC12	38
Figura 13. Análisis de la expresión de NSE en células PC12.	39
Figura 14. Análisis de la expresión de NF-L en células PC12.....	40
Figura 15. Análisis de la expresión de β -distroglicano en células PC12.	41
Figura 16. Análisis de la expresión de FAK en células PC12.....	42
Figura 17. Extracción de RNA total de las células PC12 no diferenciadas y diferenciadas.....	43
Figura 18. Estandarización de las condiciones de la PCR para la amplificación de Dp40.....	45
Figura 19. Productos purificados por electroelución correspondientes a los cDNA de Dp40 de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas.	46
Figura 20. Análisis de 56 clonas positivas de Dp40 de las células PC12 no diferenciadas (T0).	49
Figura 21. Análisis de 91 clonas positivas de Dp40 de las células PC12 no diferenciadas (T0).	50
Figura 22. Análisis de la expresión de fragmentos de menor tamaño presentes en células PC12 no diferenciadas.....	51
Figura 23. Alineamiento de las secuencias del cDNA de las clonas #28, 106, 149, 158 y 171.....	54

Figura 24. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las clonas #28, 106, 149, 158 y 171.....	55
Figura 25. Predicción de señales de exportación nuclear de la isoforma Dp40 Δ 68	56
Figura 26. Dominios conservados en la isoforma Dp40 Δ 68.....	58
Figura 27. Análisis de 40 clonas positivas de Dp40 de las células PC12 diferenciadas (T12).	60
Figura 28. Análisis de 83 clonas positivas de Dp40 de las células PC12 diferenciadas (T12).	61
Figura 29. Análisis de la expresión de fragmentos de menor tamaño presentes en células PC12 diferenciadas.	62
Figura 30. Alineamiento de la secuencia del cDNA de la clona 35	64
Figura 31. Alineamiento de la secuencia del cDNA de la clona 68	66
Figura 32. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la clona 35.	68
Figura 33. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la clona 68	69
Figura 34. Predicción de señales de exportación nuclear de las isoformas Dp40 Δ p67-70 y Dp40 Δ p65-p67	71
Figura 35. Dominios conservados en las isoformas Dp40 Δ p67-70 y Dp40 Δ p65-p67	72
Figura 36. Frecuencia de expresión de las isoformas de Dp40 en las células PC12 no diferenciadas y diferenciadas	73
Figura 37. Isoformas de Dp40 encontradas en células PC12 no diferenciadas y diferenciadas.	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Vector utilizado para la clonación de los productos de PCR de Dp40.....	22
Tabla 2. Características de los diferentes anticuerpos primarios empleados en el ensayo de western blot.	23
Tabla 3. Condiciones de PCR para llevar a cabo la síntesis de cDNA de las células PC12 no diferenciadas y diferenciadas.	26
Tabla 4. Condiciones de PCR para llevar a cabo la síntesis de actina.	27
Tabla 5. Secuencia de los iniciadores empleados en los ensayos de PCR.	29
Tabla 6. Curva de crecimiento de células PC12 no diferenciadas.	34
Tabla 7. Concentraciones del RNA de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas.	43

ABREVIATURAS

aa´s	Aminoácidos
BMD	Distrofia muscular de Becker
BSA	Albúmina de suero bovino
DAPC	Complejo proteico asociado a la distrofina
DGC	Complejo de distrofina- glucoproteína
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
Dp	Proteína de distrofina
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
FAK	Cinasa de adhesión focal
h	Horas
LB	Luria Bertani
min	Minutos
NF-L	Neurofilamento de cadena ligera
NGF	Factor de crecimiento neural
ns	No significativo
NSE	Enolasa específica de neurona
pb	Pares de bases
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
RNA	Ácido ribonucleico
s	Segundos
SD	Desviación estándar
SNAP25	Proteína asociada al sinaptosoma
T0	Células PC12 no diferenciadas
T12	Células PC12 diferenciadas
U	Unidades
v	Volts
VAMP2	Proteína 2 de membrana asociada a vesículas ()
°C	Grados centígrados
µL	Microlitros
µg	Microgramos

RESUMEN

La distrofia muscular de Duchenne (DMD), es una enfermedad causada por mutaciones en el gen DMD que codifica para la distrofina, algunos pacientes presentan deterioro cognitivo (DG), presentando mutaciones específicamente en los exones 63-69, lo que influye en la expresión de la distrofina Dp40. Dp40 es la distrofina más corta, su mRNA está compuesto de los exones 63 al 70. Recientemente, se describió la presencia de procesamientos alternativos en el mRNA de la distrofina Dp40 en cultivo primario de células troncales/progenitoras neurales. Es por ello que, para conocer más sobre la función de Dp40 en el sistema nervioso central (SNC), en este proyecto se empleó la línea celular PC12, un modelo para el estudio de las células neuronales, para identificar las isoformas de esta distrofina que se expresan durante la diferenciación neuronal. Primero, se realizó la caracterización del proceso de diferenciación de estas células, mediante un análisis morfológico, observando que este se caracteriza por un aplanamiento, crecimiento del cuerpo celular y neuritas. Posteriormente, se confirmó el proceso de diferenciación mediante el uso de marcadores de diferenciación neuronal temprana (ERK 1/2) y tardía (NSE y NF-L) que permitieron aseverar que las células se encontraban diferenciadas. Una vez realizada esta caracterización, se procedió a llevar a cabo la identificación de isoformas de Dp40, utilizando el aislamiento del RNA, síntesis del cDNA, su amplificación por PCR y secuenciación. Se obtuvo una nueva isoforma en el 3.4% de las clonas, expresada en las células PC12 no diferenciadas; Dp40 Δ 68 cuyo cDNA es de 1046pb, el cual codifica para una proteína de 208 aa's y 23.9kDa, con posible localización nuclear. En las células PC12 diferenciadas se encontraron dos nuevas isoformas: Dp40 Δ p67-70 de 759pb que se presentó en el 0.8% de las clonas aisladas. Esta isoforma genera una proteína de 167 aa's de 19.3kDa y Dp40 Δ p65-p67 de 919pb, presente en el 0.8% de las clonas, que codifica una proteína de 242 aa's de 27.9kDa, ambas con posible localización nuclear. Los resultados de esta investigación establecen las bases sobre el estudio de la expresión de isoformas de Dp40 en la línea celular PC12 durante el proceso de diferenciación, y permitirán dilucidar la función de estas isoformas en el SNC, y si estas están involucradas en el (DG) de los pacientes con DMD.

ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a disease caused by mutations in the DMD gene that encodes dystrophin, some patients show cognitive impairment (CI), presenting mutations specifically in exons 63-69, which influences the expression of dystrophin Dp40. Dp40 is the shortest dystrophin, its mRNA is composed of exons 63 to 70. Recently, the presence of alternative splicing in Dp40 mRNA in primary culture of neural stem / progenitor cells was described. In order to understand about the function of Dp40 in the central nervous system (CNS), this project used the PC12 cell line, a model for the study of neuronal cells, to analyze the Dp40 isoforms that are expressed during neuronal differentiation. Initially, morphological description of the differentiation process of the cells was carried out, first by a morphological description, finding that it's characterized by flattening, growth of the cell body and neurites. Subsequently, the differentiation process was confirmed by using early and late neuronal differentiation markers as ERK 1/2, NSE and NF-L that made possible to assert that PC12 cells were completely differentiated. Once this characterization was carried out, the expression of Dp40 isoforms was evaluated, using RNA isolation, cDNA synthesis, its amplification by PCR and sequencing. A new isoform was isolated in undifferentiated PC12 cells; Dp40 Δ 68 present in 3.4% of the Dp40 clones analyzed, of 1046bp, which encodes a protein of 208 amino acids of 23.9kDa. with possible nuclear localization. While two new isoforms Dp40 Δ p67-70 of 759 bp, present in 0.8% of the clones and Dp40 Δ p65-p67 of 919 bp and isolated in 0.8% of the clones were found in differentiated PC12 cells. The first cDNA generates a protein of 167 amino acids of 19.3kDa and the second encodes for 242 amino acids of 27.9kDa, both with possible nuclear localization in the cell. All these results establish the bases for the expression analysis of Dp40 isoforms in the PC12 cell line during the differentiation process, and for future research to elucidate the function of these isoforms in the CNS and its relation with the (CI) of patients with DMD.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Distrofia muscular de Duchenne

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad severa, progresiva, ligada al cromosoma X. Este padecimiento es causado por mutaciones en el gen DMD que codifica para la distrofina. Provoca degeneración muscular, afectando así a 1 de cada 3500 a 5000 niños (Ahn & Kunkel, 1993 y Emery et al., 2015). Los niños con DMD muestran signos de debilidad muscular en la infancia temprana, entre 2 y 7 años de edad, y pierden la capacidad de caminar en la pubertad, también, pueden presentar retraso de las habilidades motoras, como sentarse, caminar y hablar (Gao & McNally, 2011). Aproximadamente, un tercio de los pacientes con DMD manifiestan grados variables de deterioro cognitivo, el cual no es de naturaleza progresiva y no se relaciona con la gravedad de la enfermedad muscular (Wicksell et al., 2004 y Emery et al., 2015). Un estudio neuropsicológico detallado mostró que los niños con este trastorno presentan dificultades de aprendizaje, exhibiendo puntajes más bajos en la memoria verbal y retraso en la lectura y el aprendizaje (Billard et al., 1992).

Una forma menos grave de la enfermedad es la distrofia muscular de Becker (BMD), que comparte signos y síntomas similares con los niños con DMD, pero con un inicio posterior, en general ambas enfermedades están caracterizadas por una degeneración muscular progresiva y la presencia de deterioro cognitivo (Blake et al., 2002).

1.2. Distrofina: gen y proteína

El gen DMD (Figura 1) es el gen humano más grande conocido, contiene 79 exones y su secuencia genómica es de 2.5 Mb (aproximadamente el 0.1% del genoma completo) (Gao & McNally, 2011), codifica una proteína en forma de barra del citoesqueleto de 427 kDa, llamada distrofina, que se localiza en la membrana plasmática de las células musculares (Emery et al., 2015). Su mRNA de 14 kb de longitud completa se transcribe a partir del locus DMD, la expresión de esta proteína

está dada principalmente en el músculo esquelético y cardíaco, con cantidades más pequeñas en el cerebro (Monaco et al., 1992).

La identificación del gen en el cromosoma X fue el primer triunfo de la clonación posicional, que abrió una nueva era en la investigación de DMD (Koenig et al., 1987). El gen se localizó en el brazo corto del cromosoma X en la región 2 banda 1 (Xp21) y se identificó en una paciente con una gran deleción que sufría de cuatro fenotipos ligados al cromosoma X, incluido DMD (Boyd & Buckle, 1986).

1.3. Composición de la proteína distrofina

La distrofina es miembro de la familia de proteínas β -espectrina/ α -actinina. Esta familia se caracteriza por un dominio de unión a actina en el extremo amino, seguido de un número variable de unidades repetitivas, conocidas como repeticiones de tipo espectrina (Koenig et al., 1987). La distrofina se organiza en cuatro dominios, separados según las homologías de secuencia y las capacidades de unión a proteínas, los cuales son: el dominio amino terminal, el dominio central tipo barra, el dominio rico en cisteína y el dominio carboxilo terminal que se asocia con un complejo de glucoproteínas transmembranales y proteínas citoplasmáticas para formar el complejo proteico asociado a la distrofina (DAPC) (Suzuki et al., 1992 y Blake et al., 2002).

El dominio amino terminal y una región en el dominio de la barra central de la distrofina se unen directamente a actina citoesquelética (Rybakova et al., 1996). El dominio más grande y central está compuesto por 24 unidades repetitivas que son similares a las repeticiones helicoidales triples de la espectrina. Posteriormente, el tercer dominio rico en cisteínas alberga un dominio WW, dos motivos EF-hand y un dominio de dedos de zinc (ZZ). El dominio WW se une a sustratos ricos en prolina de manera homóloga al dominio SH3 (src homology-3), esta región media la interacción entre β -dístroglicano y distrofina, debido a que el dominio citoplasmático de β -dístroglicano es rico en prolina. Sin embargo, Rosa y cols. (1996) señalan que parece no requerirse todo el dominio WW de la distrofina para la interacción con el

β -dystroglicano porque la distrofina Dp71 que sólo contiene una parte del dominio WW, se une a β -dystroglicano. Los motivos EF-hand pueden unirse al Ca^{2+} intracelular, el dominio ZZ también es parte del dominio rico en cisteína y contiene varios residuos de cisteína conservados que forman los sitios de coordinación para cationes metálicas divalentes como Zn^{2+} , este es similar a muchos dedos de zinc y se encuentra tanto en proteínas nucleares como citoplasmáticas. También este mismo dominio puede unirse a calmodulina de una manera dependiente de Ca^{2+} , por lo tanto representa un sitio de unión a calmodulina funcional y puede tener implicaciones para la unión de calmodulina a otras proteínas relacionadas con la distrofina (Koenig et al., 1988). Finalmente, el cuarto dominio, el extremo carboxilo terminal de la distrofina contiene dos tramos de polipéptidos que forman una doble α -hélice. Este dominio es nombrado CC (coiled coil), ya que forma el sitio de unión para la distrobrevina y puede modular la interacción entre la sintrofina y otras proteínas asociadas a la distrofina (Blake et al., 2002).

1.4. Familia de distrofinas

El gen DMD codifica para la expresión del transcrito de distrofina de longitud completa (Dp427) (Figura 1), que está controlada por tres promotores regulados independientemente: promotor de cerebro (B), músculo (M) y células de Purkinje (P) (Chelly et al., 1990). Los nombres de estos promotores corresponden al órgano o células en donde ocurre la expresión principal de las distrofinas. El promotor B, controla la expresión principalmente en las neuronas corticales y el hipocampo del cerebro, mientras que el promotor P se expresa en las células de Purkinje así como en el músculo esquelético. El promotor M produce altos niveles del transcrito y proteína en músculo esquelético y cardiomiocitos y bajos niveles en algunas células gliales del cerebro. Estos tres promotores están situados dentro de un intervalo genómico de aproximadamente 400 kb (Górecki et al., 1992 y Chelly et al., 1990).

Además de los promotores anteriores, el gen también contiene otros cuatro promotores internos independientes que dan lugar a transcripciones de distrofina cortas que carecen de la región amino terminal. Estos promotores internos se

denominan retinal (R), cerebro-3 (B3), célula de Schwann (S) y general (G). Cada uno de estos promotores utiliza un primer exón único fusionado a los exones 30, 45, 56 y 63 respectivamente, para generar productos proteicos de 260 kDa (Dp260), 140 kDa (Dp140), 116 kDa (Dp116), 71 kDa (Dp71) y 40 kDa (Dp40) respectivamente (Figura 2) (Blake et al., 2002). El procesamiento alternativo en el extremo 3' del mRNA de la distrofina genera un número mayor de isoformas de cada proteína. Estas variantes no sólo afectan a la distrofina de longitud completa, sino que también se encuentran en las isoformas más cortas como Dp71 y Dp40 (Boyce et al., 1991).

La distrofina de longitud completa se denomina Dp427. Dp260 es una distrofina carboxilo terminal, expresada por un promotor alternativo ubicado en el intrón 29 del gen DMD, se expresa principalmente en retina, y contiene 15 repeticiones similares a la espectrina en el dominio de barra. Dp140 es una distrofina carboxilo terminal, que se expresa principalmente durante el desarrollo del cerebro fetal con un promotor alternativo en el intrón 44, contiene 6 repeticiones similares a la espectrina en el dominio de barra, y la pérdida de Dp140 se asocia con un mayor riesgo de deterioro cognitivo en DMD y BMD. Dp116 es un producto proteico corto de distrofina, específico para las células de Schwann en el nervio periférico. Dp71 es una proteína ubicua de distrofina, expresada con un promotor alternativo ubicado en el intrón 62. Dp40 es el producto proteico de distrofina más corto conocido, se expresa en la neurona del hipocampo (Figura 2) (Nichols et al., 2015).

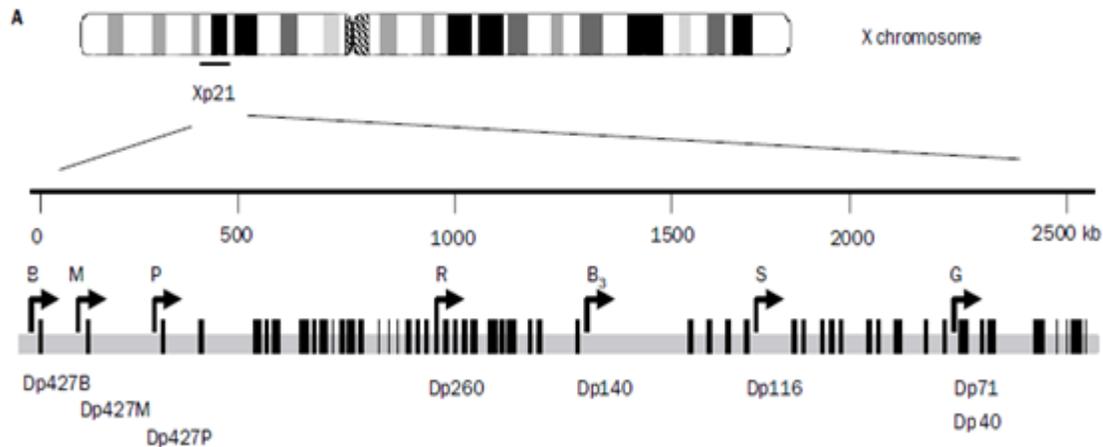


Figura 1. Organización genómica del gen DMD ubicado en Xp21. Las líneas verticales negras representan los 79 exones del gen DMD distribuidos en aproximadamente 2.5 millones de bases. Las flechas indican los 7 promotores que: se expresan en cerebro (B), músculo (M) y células de Purkinje (P); R, B₃, S y G representan los promotores para Dp260 (retina), Dp140 (cerebro), Dp116 (células de Schwann) y Dp71 (general) (Muntoni et al., 2003).

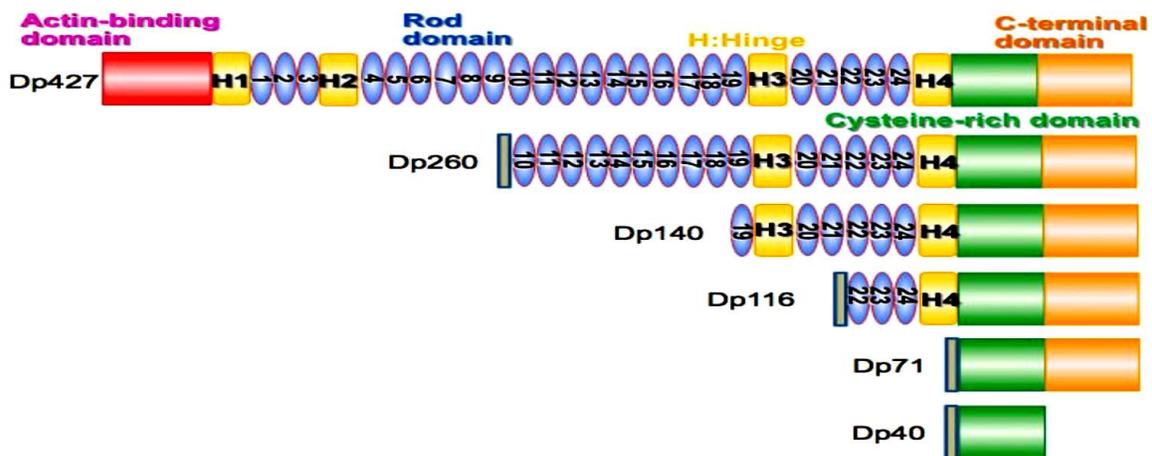


Figura 2. Composición de los dominios de la familia de distrofinas. La proteína distrofina está compuesta por cuatro dominios: el primer dominio es el amino terminal (barra de color rojo), seguido por el dominio central, el cual está formado por 24 repetidos tipo espectrina (círculos de color azul), lo cuales están interrumpidos por 4 estructuras tipo bisagra ricas en prolina (cuadrados amarillos). El tercer dominio es el dominio rico en cisteína (barra de color verde) y el cuarto dominio es el carboxilo terminal (barra de color naranja) (Nichols et al., 2015).

Dp71 se detecta en la mayoría de los tejidos no musculares, incluidos cerebro (se encuentra tanto en las neuronas como en la glía, y se expresa en niveles altos en astrocitos perivasculares (Blake & Kröger, 2000)), riñones, hígado y pulmones. Las mutaciones en la región que codifica para Dp71 están estrechamente relacionadas con el deterioro cognitivo observado en pacientes con DMD (Moizard et al., 2000 y ^a Daoud et al., 2009).

Algunos reportes sugirieron que la deficiencia de Dp71 se asocia con déficit cognitivo en una subpoblación de pacientes con DMD (Moizard et al., 2000 y Daoud et al., 2009). Aunando a lo anterior, también se ha descrito que los pacientes con déficit cognitivo grave tienen mutaciones que influyen en la expresión no sólo de Dp71 sino también de Dp40 (Daoud et al., 2009). Esta observación lleva a plantear la hipótesis de que Dp40 podría tener una participación relevante en la función cognitiva (Tozawa et al., 2012).

En 2009 ^aDaoud y colaboradores demostraron que los complejos proteicos asociados con Dp71 interactúan con andamios modulares especializados que permiten que los receptores de glutamato se agrupen y se organicen cascadas de señalización en densidades postsinápticas. Los autores también observaron que los ratones Dp71 nulos mostraron una organización sináptica anormal y una maduración *in vivo*, es decir, una transmisión de glutamato anormalmente mejorada y una plasticidad sináptica alterada en el área CA₁ del hipocampo. Dado que los ratones Dp71 nulos eran deficientes no solo en Dp71 sino también en Dp40, la alteración en la liberación de glutamato podría deberse a la pérdida de ambas proteínas (Sarig et al., 1999).

Lo anterior denota la importancia del estudio de la proteína Dp40, sobre la cual hasta el momento existe poca información, aunado el hecho de que el estudio sobre su expresión se ha visto limitado, debido a la falta de un anticuerpo específico. Por lo cual, se requieren más estudios para comprender las funciones moleculares de la proteína Dp40.

2. ANTECEDENTES

2.1. Distrofina Dp71

La proteína Dp71 es la distrofina más abundante en el sistema nervioso central. Actualmente se han descrito varias isoformas de esta distrofina, por lo cual Aragón y colaboradores en 2018 propusieron una nueva nomenclatura para la familia de las distrofinas de Dp71. Para nombrar a las diferentes isoformas, se mantuvo la nomenclatura de los grupos basada en la secuencia del carboxilo terminal de cada variante: el grupo Dp71d lo integran los transcritos que contienen al exón 78, el grupo Dp71f contiene a aquellos cuya secuencia carece del exón 78 y conservan el exón 79 y en el grupo Dp71e se integran los transcritos que mantienen parte del intrón 77 y carecen de los exones 78 y 79.

Estudios recientes han mostrado la importancia y función que tiene Dp71 en el SCN, como Daoud et al., (2009) quienes observaron que la expresión de Dp71d en neuronas está relacionada con la regulación de la organización y función de las sinapsis glutamatérgicas, lo que podría explicar que la pérdida de esta proteína y otras isoformas conduzcan a un mayor grado de retraso mental. Además, también encontraron que en la estructura presináptica excitatoria cerebral de ratones que carecen de Dp71d se altera la organización y el tamaño de las vesículas sinápticas y el ancho de la hendidura sináptica (Miranda et al., 2011).

Aunado a lo anterior, el estudio de García-Cruz et al., (2019) demostró que la sobreexpresión de Dp71e Δ 71 estimula la diferenciación neuronal en células PC12 Tet-On tratadas con NGF, al observarse un aumento en el porcentaje de células con neuritas, así como en su longitud. Además, un análisis proteómico mostró que Dp71e Δ 71 aumenta la expresión de proteínas que tienen funciones importantes en el proceso de diferenciación, como las proteínas: HspB1, S100A6 y K8 involucradas en la estructura citoesquelética y la proteína HCNP involucrada en la síntesis de neurotransmisores. Y de igual manera observaron que la expresión del marcador neuronal TH también se reguló positivamente.

2.2. Distrofina Dp40

Dp40 también denominada Apo-distrofina-3, es la distrofina más corta de la familia de las distrofinas, fue identificada mediante secuenciación de un clon de cDNA aislado de una biblioteca de Schwannoma de rata. Su RNA se transcribe desde el promotor de Dp71, ubicado dentro del intrón 62, y la región 3'-UTR codifica en el intrón 70. Su mRNA está compuesto de los exones 63-70 y codifica para una proteína de 340 aminoácidos con un peso molecular de 40 kDa (Figura 3) (Tinsley et al., 1993). El extremo 5'-UTR y la secuencia de los primeros siete aminoácidos son idénticos a los del mRNA de 4.8 kb que codifica Dp71. La distrofina Dp40 es única porque carece del dominio carboxilo terminal de la familia de distrofinas (aminoácidos 3409-3685 de la Dp427). Los siete aminoácidos amino terminales están fusionados con el dominio rico en cisteína (la mitad del dominio WW, los dominios EF1, EF2 y ZZ) y los primeros 48 aminoácidos del dominio carboxilo terminal de distrofina (Tinsley et al., 1993).

La localización subcelular de la proteína Dp40 se ha logrado demostrar mediante herramientas de bioinformática como PSORT II, con la cual se predijo como una proteína citoplasmática. Además, se identificaron señales de exportación nuclear putativas en la secuencia de aminoácidos de Dp40, con el servidor NetNES 1.1. Aunado a lo anterior, Martínez-Herrera et al., (2015) al realizar un análisis detallado de las secuencias de aminoácidos T87 a C106 y C110 a L230 de Dp40, sugirió que los aminoácidos ⁹³LEQEHNNLV¹⁰¹ y ¹⁶⁸LLLHDSIQI¹⁷⁶ podrían funcionar como secuencias NES (secuencia de exporte nuclear).

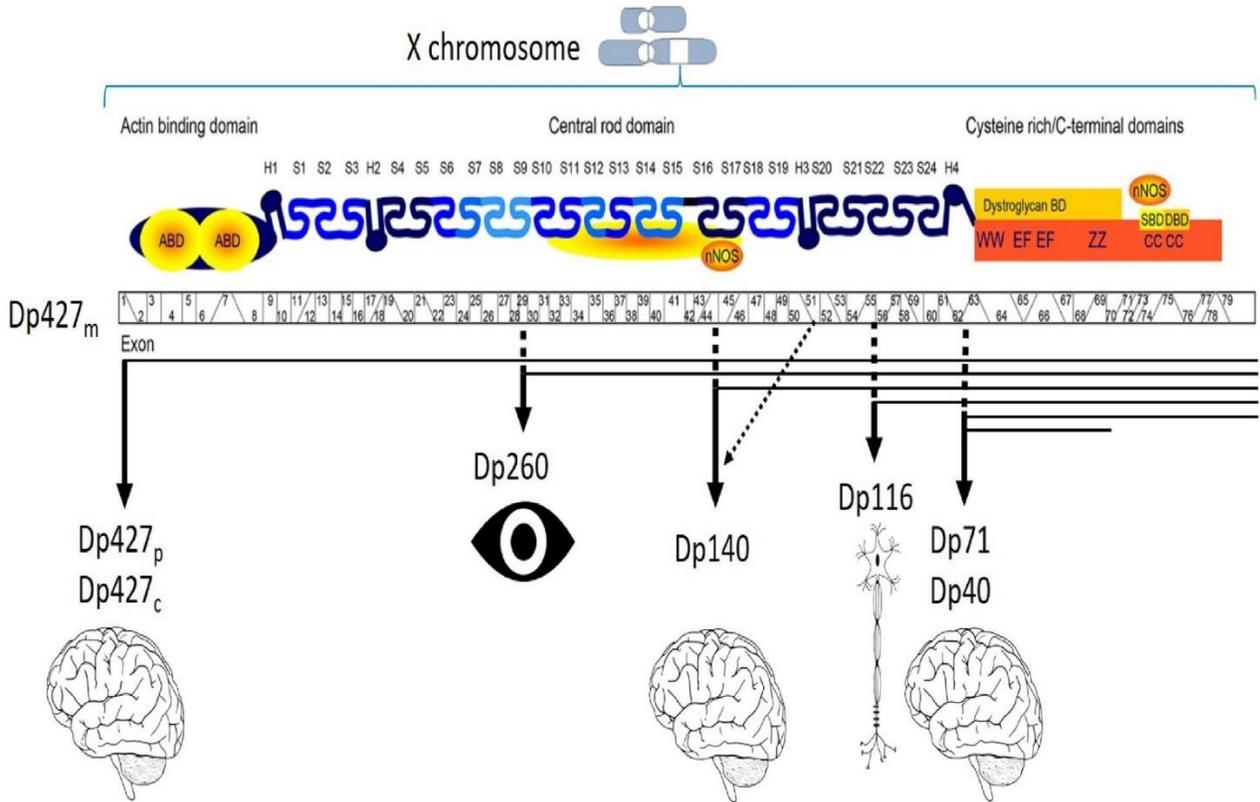


Figura 3. Estructura de la proteína Dp40. Se muestra una ilustración de la proteína de distofina de longitud completa (Dp427), con dominios de unión a actina (ABD), de sintasa de óxido nítrico neuronal (nNos) y de distroglicano (BD). También se observan las posiciones relativas de los primeros exones que codifican del gen DMD. La expresión de las distrofinas Dp427_p, Dp427_c, Dp427_m, Dp140 y Dp71/40 es principalmente en el cerebro. Dp260 se expresa predominantemente en la retina y Dp116 se expresa en el nervio periférico. La distrofina Dp40 es la distrofina más corta, su secuencia de los primeros siete aminoácidos es idéntica a la del mRNA de 4.8 kb que codifica para Dp71, pero carece del extremo carboxilo terminal normal de Dp427 (aminoácidos 3409-3685) (Doorenweerd, N., 2020).

2.2.1. Posibles funciones de Dp40

En 2012, Tozawa y cols. obtuvieron un anticuerpo policlonal para los primeros 15 aminoácidos de Dp71 y Dp40, es decir, las secuencias amino terminal comunes para ambas isoformas. Al utilizar este nuevo anticuerpo en células y tejidos, encontraron que Dp40 se expresaba de manera muy abundantemente en el cerebro y en la fracción de vesículas sinápticas. Además, demostraron dos características

bioquímicas de esta distrofina: Dp40 es insoluble en digitonina, pero soluble en n -dodecil- β -D-maltopiranosido (DDM) y TritonX-100; y también observaron que Dp40 no interacciona con β -dystroglicano en el dominio rico en cisteína. Lo anterior llevó a Tozawa y cols. a plantear la hipótesis de que Dp40 podría formar un nuevo complejo proteico diferente del complejo de distrofina-glucoproteína (DGC). Mediante un análisis por cromatografía de afinidad y LC-MS/MS demostraron que Dp40 formaba un complejo con un grupo de proteínas presinápticas: sintaxina-1A, proteína asociada al sinaptosoma (SNAP25) y la proteína 2 de membrana asociada a vesículas (VAMP2) conocidas por participar en la exocitosis de vesículas sinápticas en neuronas, sugiriendo que esta distrofina podría desempeñar un papel crucial en las funciones presinápticas en el cerebro.

Aunado a los hallazgos anteriores, para investigar el perfil de expresión bioquímica de Dp40 en cerebros de ratones, Fujimoto y colaboradores (2014) generaron un anticuerpo policlonal contra la región amino terminal que es común entre Dp71 y Dp40, mediante la inmunización de una proteína Dp40 recombinante en un conejo. Los autores encontraron que el anticuerpo contra Dp40 generado era capaz de detectar la expresión de la proteína Dp40 endógena en los cerebros de los ratones. Al examinar la expresión de esta proteína en las distintas regiones del cerebro observaron que esta proteína se expresaba en cantidades similares en la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo; y al usar cerebros en diferentes etapas del desarrollo descubrieron que Dp40 no se expresaba en etapas embrionarias del cerebro, sino que se expresa desde las primeras etapas neonatales hasta la edad adulta, con una expresión preferencial en las neuronas del hipocampo, específicamente en el núcleo. Estos resultados sugieren que Dp40 tiene un rasgo característico como Dp de tipo neuronal y funciona durante la maduración neuronal después del nacimiento, así como en las neuronas maduras. Además, al analizar la distribución subcelular de esta distrofina en neuronas del hipocampo, demostraron que se localiza en el área somatodendrítica, acumulándose en la región subplasmalemal de las dendritas en neuronas del hipocampo y en los sitios postsinápticos excitatorios, sugiriendo así, que esta proteína puede desempeñar papeles críticos en las funciones dendríticas y sinápticas en el cerebro.

Por otra parte, Aragón y colaboradores (2015) describieron la expresión de mRNA de Dp40 durante la diferenciación neuronal de las células PC12. Encontraron que el transcrito de esta proteína se expresaba en células PC12 no diferenciadas y diferenciadas al ser inducidas con factor de crecimiento neural (NGF). La expresión de la proteína Dp40 recombinante (Xpress-Dp40) mostró una localización principalmente periférica/citoplásmica en las células no diferenciadas, mientras que en las células diferenciadas también se localizó en el núcleo. Mediante un análisis *in silico*, identificaron que las prolinas 93 y 170, ubicadas dentro de los dominios EF1 (exón 65) y EF2 (exón 67) hand, estaban involucradas en la localización nuclear de Dp40. Esto también fue confirmado por mutagénesis sitio dirigida, además, demostraron que Dp40 colocaliza con β -dístroglicano. De esta forma los ensayos anteriores sugieren que los dominios EF-hand regulan la localización celular periférica/citoplasmática o nuclear de Dp40, así como su interacción con β -dístroglicano.

Estudios recientes en nuestro grupo de trabajo han encontrado que la distrofina Dp40 se expresa en diferentes líneas celulares, en cultivo primario de células troncales/progenitoras neurales y en tejidos de cáncer de mama. Por ejemplo, la investigación de Cubas-García, D. (2020), basada en el hecho de que se ha encontrado que el gen DMD tiene mutaciones importantes en pacientes con algún tipo de cáncer, y que sus productos pueden tener una función en el proceso de tumorigénesis, evaluó la expresión de las distrofinas Dp71 y Dp40 en líneas celulares derivadas de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231), al igual que en muestras de cáncer de mama obtenidas por biopsia (muestras M11, M16, M19 y M21) y en la línea celular HEK-293. La expresión de Dp40 sólo fue detectada en la línea MCF-7, sugiriendo que la segunda línea celular no la expresa debido a que contiene más mutaciones en el gen que le pudieran impedir su expresión normal. Los análisis posteriores confirmaron que la muestra M19 expresa la Dp40 completa con una frecuencia del 80% y una isoforma que carece del exón 68, Dp40 Δ 68 la cual se encontró con una frecuencia del 20%. Mediante un análisis *in silico* de su traducción se reveló que esta isoforma codifica para una proteína de 208 aminoácidos que carece del dominio ZZ. Las células MCF-7 mostraron la expresión

de la Dp40 completa con una frecuencia del 75%, la isoforma Dp40 Δ 68 con una frecuencia del 23% y un 2% del resto de los transcritos analizados correspondió a la isoforma Dp40 Δ 66,68, la cual no contiene el exón 66 ni el 68, que genera una proteína teórica de 132 aminoácidos, sin el dominio ZZ, ni tampoco el motivo EF-hand. Finalmente, cuando realizó un análisis de los transcritos de Dp40 en células HEK-293, encontró con una frecuencia del 22% y 2% a las isoformas Dp40 Δ 68 y Dp40 Δ 66,68 respectivamente, y el 3% del resto de los transcritos correspondió a otra nueva isoforma Dp40 Δ i63 Δ 68. En esta última isoforma se encontró la inserción de 75 pb en el intrón 63, y la ausencia del exón 68, expresando una proteína teórica de 192 aminoácidos, que no presentaría el dominio ZZ, su extremo amino sería diferente y perdería el segmento WW de la Dp40 silvestre. De esta manera, esta investigación pretendió generar hallazgos acerca del estado de Dp71 y Dp40 en el cáncer de mama, con la finalidad de establecer un modelo de estudio de estas distrofinas en la tumorigénesis del cáncer de mama y contribuir a la comprensión de las bases moleculares de esta enfermedad.

Recientemente, García-Cruz y cols., (2021 enviado para su publicación) crearon células PC12 Tet-on que sobreexpresan de manera inducible y estable a Dp40 y a la mutante Dp40^{L170P}, esta mutante presenta un cambio en el residuo 170 de leucina a prolina, que promueve una localización exclusivamente nuclear en células PC12. Estas células fueron analizadas por el efecto de sobreexpresión de estas proteínas en el proceso de crecimiento de las neuritas a través de un análisis morfométrico. Los autores encontraron que la expresión de Dp40 promueve un aumento en el porcentaje de células con neuritas, mientras que la expresión de la mutante las disminuye. También demostraron que Dp40^{L170P} modifica el perfil de expresión de proteínas de las células PC12 Tet-on, incrementando la expresión de proteínas involucradas en la reorganización del citoesqueleto y proteínas estructurales como α -internexina y S100a6. Por otra parte, durante la diferenciación neuronal, señalaron que la sobreexpresión de Dp40 aumenta la expresión de VAMP al contrario de la mutante, que la disminuye. Además, al observar la baja expresión de HspB1 en células PC12-Dp40 diferenciadas, sugiere que Dp40 promueve el crecimiento de neuritas con una vía diferente a la distrofina. Estos resultados

demuestran que la interrupción de Dp40 altera el crecimiento de neuritas, lo cual podría contribuir con el déficit cognitivo presente en pacientes con DMD con mutaciones en el residuo 170 de la distrofina Dp40.

Recientemente Paúl-González et al., (2021) para estudiar más a fondo las funciones de Dp40 durante la proliferación celular y la diferenciación neuronal, analizó la expresión de Dp40 a nivel de mRNA mediante ensayos de RT-PCR para identificar la presencia de algún procesamiento alternativo, empleando como modelo cultivo primario de células madre/progenitoras neurales de rata, encontrando por primera vez dos isoformas de Dp40 en este modelo: Dp40 Δ 63,64 y Dp40 Δ 64-67.

2.3. Modelo de estudio: células PC12

La línea celular PC12 deriva de un feocromocitoma de rata, un tumor que surge de las células cromafines de la médula suprarrenal aislado en 1976. Es un modelo útil para estudiar la señalización celular porque hay pocos factores de crecimiento, neurotrofinas y hormonas, a los que no responde. Estas células presentan distintas respuestas de diferenciación, proliferación y supervivencia que se pueden evaluar de forma independiente (Vaudry et al., 2002), sintetizan y almacenan dopamina y noradrenalina que se liberan después de la despolarización de una manera dependiente de Ca²⁺. Las células PC12 poseen grandes vesículas de núcleo denso (LDCV) que contienen catecolaminas, mientras que la acetilcolina se almacena en pequeñas vesículas claras (Greene & Tischler, 1976).

Las células PC12 se asemejan al fenotipo de las neuronas ganglionares simpáticas tras la diferenciación con NGF y pueden cultivarse indefinidamente, se han utilizado ampliamente para el análisis de la transducción de señales de neurotrofina. Después del tratamiento con NGF, las células extienden los procesos o forman varicosidades neuronales (regiones bulbosas, 1-2 μ m de diámetro) (Westerin & Ewing, 2008), el mantenimiento fenotípico de las células PC12 requieren una exposición continua al NGF (Chang et al., 2003).

2.4. Proceso de diferenciación de células PC12 con NGF

Durante el desarrollo de las células PC12, el NGF tiene efectos en la diferenciación y supervivencia de subconjuntos de neuronas en los sistemas nervioso periférico y central. Estos efectos están mediados por la activación del receptor TrkA, mediante su fosforilación, que inicia una cascada de eventos de señalización que incluye la activación de varias proteínas cinasas y factores de transcripción río abajo. El nivel basal de actividad que se alcanza de TrkA después del primer día de tratamiento con NGF es biológicamente relevante para activar y mantener la expresión génica en las células PC12 diferenciadas (Henderson C. E., 1996).

NGF activa las tirosinas cinasas receptoras (RTK), TrkA, comenzando así una cascada de eventos que implican la activación de la proteína Ras, que estimula una cascada de cinasas que consiste en Raf-1, B-raf, MAP cinasa, MEK, y cinasas reguladas por señal extracelular (ERK 1 y ERK 2), cuya activación sostenida por NGF es suficiente para la neuritogénesis en células PC12 (Figura 4). ERK 1/2 fosforilado se transloca al núcleo y activa la expresión génica que conduce al crecimiento de neuritas (Halegoua et al., 1991). Aunado con esto, estudios previos señalan que se requiere una actividad sostenida de ERK 1/2 y/o PI3K para mantener la supervivencia de las células PC12 diferenciadas. La activación dependiente de NGF de ERK 1/2 se activa inicialmente por Ras, y luego se mantiene la actividad prolongada por Rap 1 (Dikic et al., 1994). Las respuestas inmediatas al tratamiento con NGF son: el cese de la división celular y la inducción de ERK 1/2 debida a su fosforilación en treonina 183 y tirosina 185. NGF logra una reorganización estable del citoesqueleto por mecanismos dependientes de la síntesis de RNA (Chang et al., 2003).

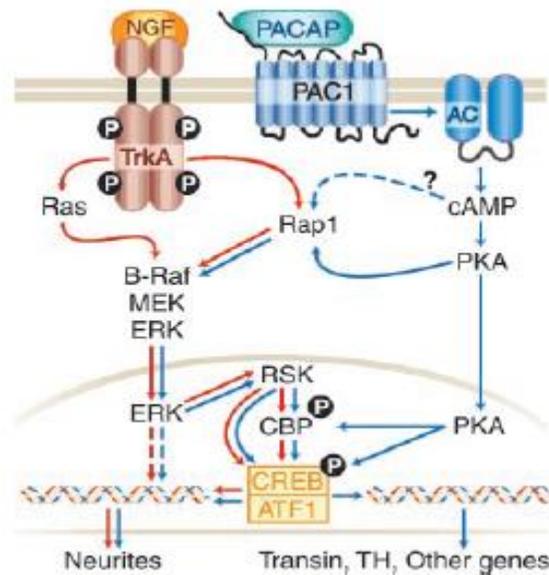


Figura 4. Vía de señalización para la diferenciación de células PC12 activada por NGF. La señalización dependiente de NGF está indicada mediante flechas rojas y la vía de diferenciación dependiente de PACAP está indicada en flechas azules. Las vías TrkA y PACAP activan varios componentes de señalización celular comunes, pero sus efectos finales sobre la transcripción génica y el fenotipo celular difieren sustancialmente. Abreviaturas: AC, adenilato ciclasa; ATF1, factor de transcripción dependiente de cAMP 1; CBP, proteína de unión a CREB; CREB, cAMP proteína de unión a elemento de respuesta; ERK, cinasa regulada por señal extracelular; MEK, proteína cinasa activada por mitógeno; NGF, factor de crecimiento neural; PACAP, polipéptido de la adenilato ciclasa de la pituitaria; PAC1, receptor preferido de PACAP tipo 1; PKA, proteína cinasa A; RSK, proteína cinasa ribosómica S6; TH, tirosina (Vaudry et al., 2002).

2.5. Marcadores de diferenciación

La ruta de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno/cinasa 1/2 (MEK/ERK 1 y ERK 2) regulada por señal extracelular generalmente está relacionada con la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células. Estudios previos han demostrado un papel mecanicista para MEK/ERK 1 y ERK 2 en la regulación del alargamiento de neuritas: la duración de la activación de ERK determina el cambio de la proliferación a la diferenciación (Zhang et al., 2018). De acuerdo a un estudio realizado por Chang y colaboradores (2003) señalaron que en células PC12 expuestas a NGF, la activación de ERK 1/2, detectada usando un anticuerpo específico para ERK fosforilado en treonina 183 y tirosina 185, logró

alcanzar su punto máximo a los 5 minutos después de la adición de NGF y se mantuvo en niveles relativamente altos hasta 6h después del tratamiento.

La enolasa específica de neurona (NSE) es una enzima que se encuentra sólo en las neuronas y las células neuroendocrinas. Su presencia se correlaciona con la diferenciación neuronal. Debido a que las células PC12 son células neoplásicas capaces de diferenciarse a neuronas al ser inducidas con NGF, se puede predecir que los niveles de NSE deberían aumentar a medida que la célula se diferencia. En un estudio realizado por Viores y colaboradores (1982), observaron que al tratar células PC12 con NGF durante un periodo de 5 días, desde el primer día observaron un incremento en los niveles de NSE.

Aunado a lo anterior los neurofilamentos son los principales constituyentes del citoesqueleto de las células neuronales, dándole soporte estructural a las células, en las dendritas, el soma y los axones. Se expresan en el sistema nervioso central y están ubicados principalmente en los axones de las neuronas y en el citoplasma. Existen tres clases de neurofilamentos, los de cadena pesada, de cadena media y de cadena ligera (NF-L), estas tres proteínas se unen para formar un heteropolímero el cual la forma madura del neurofilamento (Gaetani et al., 2019). De acuerdo a diversos estudios, se ha observado que en células PC12 tratadas con NGF los niveles de expresión de NF-L son muy altos, es por ello que pueden ser utilizados como un marcador de diferenciación tardía, ya que su alta expresión representa una evidencia de su función durante el proceso de diferenciación neuronal (Lee et al., 1982).

3. JUSTIFICACIÓN

Estudios previos han demostrado que los pacientes con DMD que presentan déficit cognitivo severo tienen mutaciones en los exones 63 al 69, estas mutaciones afectan tanto a la distrofina Dp71 como a la Dp40. Por ello, el estudio de la Dp40 y sus isoformas, que se expresan durante la diferenciación neuronal de la línea celular PC12, contribuirá a ampliar los conocimientos sobre la función de esta proteína en los diferentes procesos neuronales y en el deterioro cognitivo.

4. HIPÓTESIS

Las células PC12 expresan isoformas de la distrofina Dp40 durante la diferenciación neuronal.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

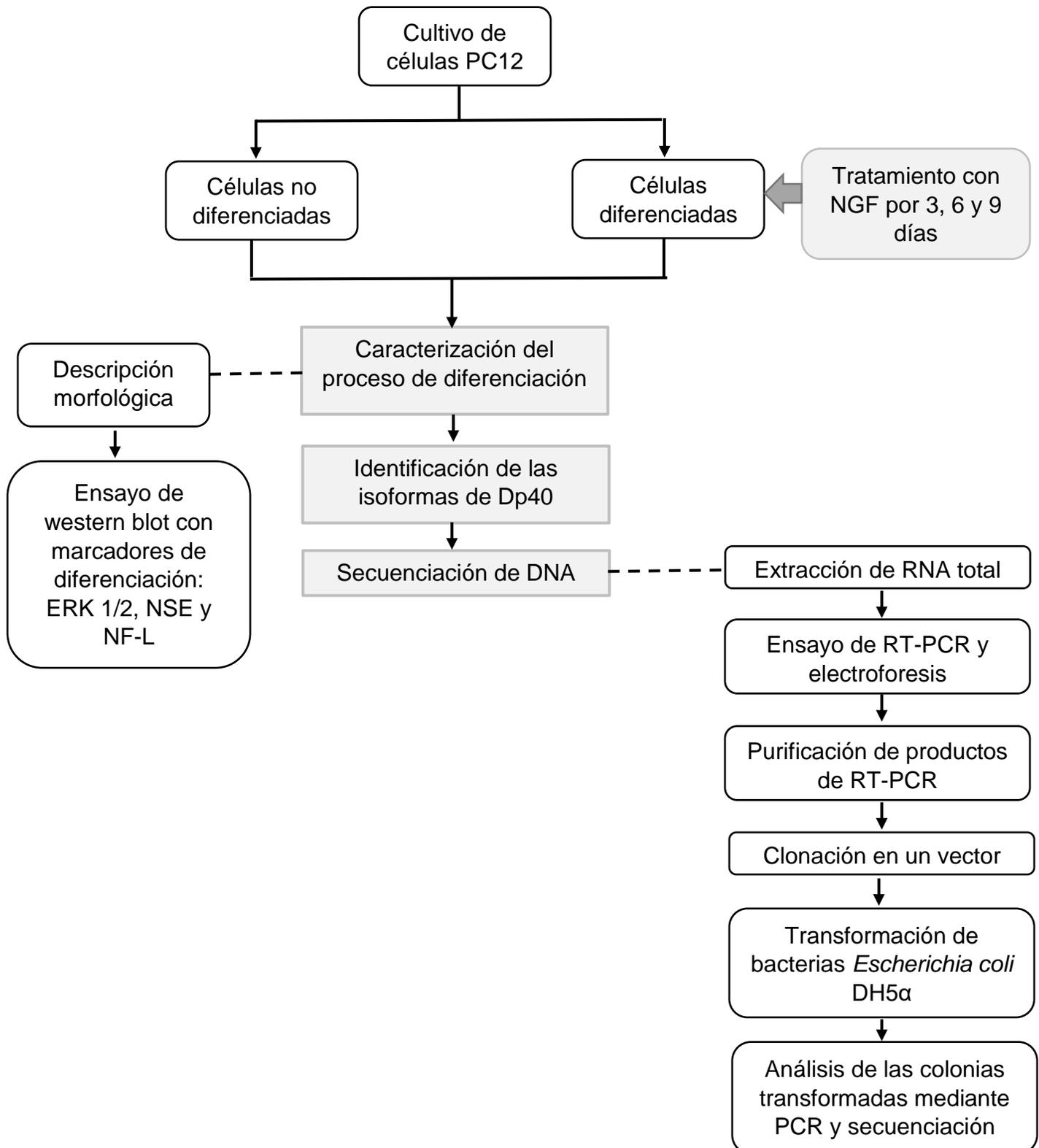
Identificar a las isoformas de la distrofina Dp40 que se expresan durante la diferenciación de las células PC12 inducida por NGF.

5.2. Objetivos específicos

- Evaluar el proceso de diferenciación de las células PC12 mediante descripción morfológica.
- Caracterizar el proceso de diferenciación de las células PC12 por la expresión de marcadores de diferenciación: ERK 1/2, NSE y NF-L.
- Identificar a las isoformas de la distrofina Dp40 mediante ensayos de RT-PCR en células PC12 no diferenciadas y diferenciadas.
- Analizar las isoformas de Dp40 que se expresan en las células PC12 no diferenciadas y diferenciadas mediante secuenciación del cDNA.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En el siguiente esquema se ejemplifica el diseño de la estrategia experimental:



La estrategia experimental del proyecto consistió primero en realizar el cultivo de las células PC12, para posteriormente poder inducir su diferenciación mediante NFG de acuerdo a las condiciones mencionadas en la parte de materiales y métodos.

La segunda etapa consistió en realizar la caracterización del proceso de diferenciación de las células PC12, mediante dos tipos de análisis: utilizando la caracterización morfológica de las células y con ensayos de western blot con el propósito de identificar diferentes marcadores de diferenciación neuronal (ERK 1/2, NSE y NF-L) y de proliferación (PCNA).

Posteriormente, ya establecido que las células se encontraban diferenciadas, la tercera etapa fue realizar la extracción del RNA total de las células no diferenciadas y diferenciadas, para generar DNA mediante un ensayo de RT-PCR, y así poder realizar la amplificación de la distrofina Dp40, para lo cual se utilizaron los iniciadores 5'UTR-Dp71 y 3'UTR-Dp40, que permitieron la amplificación del transcrito de Dp40 de longitud completa. Para poder identificar las isoformas generadas por procesamiento alternativo, los productos de PCR se purificaron después de correrlos en un gel por electroelución, se ligaron al vector pGEM-T Easy, y los plásmidos se utilizaron para transformar células de *E. coli DH5α*. Las colonias transformadas se analizaron mediante ensayos de PCR diseñados para determinar el tamaño del RNA de Dp40.

La cuarta etapa consistió en identificar mediante secuenciación del DNA todas las isoformas que se expresan en células PC12 diferenciadas y no diferenciadas, y realizar una comparación con el transcrito de Dp40 de longitud completa.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Materiales

7.1.1. Línea celular

La línea celular PC12 (ATCC® CRL-1721™) se utilizó como modelo celular para llevar a cabo la diferenciación a células tipo neuronas y poder así realizar la identificación de isoformas de la distrofina Dp40 durante este proceso. Las células PC12, provienen de un feocromocitoma de la glándula adrenal de *Rattus norvegicus* de género masculino, su forma es pequeña e irregular y crecen en forma de agregados flotantes con algunas células adjuntas, bajo las condiciones de 37°C de temperatura, 95% aire y 5% CO₂. En presencia de NGF la morfología de estas células cambia, presentan un aplanamiento, crecimiento del cuerpo celular y de neuritas.

7.1.2. Plásmido

El vector pGEM®-T Easy fue empleado para realizar la clonación del cDNA de Dp40 correspondiente a las células no diferenciadas (T0) y diferenciadas (T12) (Tabla 1).

Tabla 1. Vector utilizado para la clonación de los productos de PCR de Dp40.

Vector	Inserto	Origen del inserto
pGEM®-T Easy	cDNA Dp40-T0	<i>Rattus norvegicus</i>
	cDNA Dp40-T12	

7.1.3. Anticuerpos

En la Tabla 2, se presentan las características de los anticuerpos que fueron empleados en el análisis de Western blot para evaluar la expresión de marcadores de diferenciación y proliferación en las células PC12.

Tabla 2. Características de los diferentes anticuerpos primarios empleados en el ensayo de western blot.

Anticuerpo	Marca	Tipo	Proteína detectada (kDa)	Nombre de la proteína que detectada	Dilución empleada
Anti-enolasa	Santa Cruz Biotechnology	Policlonal	47.3	Enolasa	1:50
Anti NF-L	Abcam	Monoclonal	68	Fibra de neurofilamentos	1:500
Anti p-ERK 1/2	Santa Cruz Biotechnology	Monoclonal	ERK 1: 44 ERK 2: 42	ERK 1/2 fosforilado	1:200
Anti ERK 1/2	Santa Cruz Biotechnology	Policlonal		ERK 1/2	1:1000
Anti PCNA	Santa Cruz Biotechnology	Monoclonal	29.3	Ciclo de progresión celular	1:200
Anti β -dístroglicano	Abcam	Policlonal	43	β -dístroglicano	1:100
Anti FAK	Santa Cruz Biotechnology	Policlonal	125	FAK	1:100
Anti Actina	Santa Cruz Biotechnology	Monoclonal	43	Actina	1:200

7.2. Métodos

7.2.1. Cultivo de células PC12

Las células PC12 se cultivaron en placas de cultivo P100 en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco™) suplementado con suero de caballo al 10% inactivado por calor (Gibco™, Rockville, MD, EE. UU.), suero fetal bovino al 5% (Gibco™), 100 U/mL de penicilina (Gibco™), 1 mg/mL de estreptomina (Gibco™),

y 0.25 µg/mL de micostatina, a una temperatura de 37°C en una atmósfera de aire con CO₂ al 5%. El medio de crecimiento se cambió cada tercer día.

7.2.2. Ensayo de proliferación celular

Las células PC12 se cultivaron en placas de plástico P60, en medio DMEM (Gibco™) suplementado con suero de caballo al 10% inactivado por calor (Gibco™, Rockville, MD, EE. UU.). El número de células se determinó por cuenta directa de estas, durante un periodo de 0, 1, 2, 3, 5, 7 y 9 días usando una cámara de Neubauer y una solución de azul de tripano que permitió teñirlas para poder distinguir las células vivas de las muertas.

7.2.3. Diferenciación celular

Para la diferenciación, las células PC12 se cultivaron hasta que presentaron 60-80% de confluencia en placas de cultivo P100 recubiertas con colágeno de rata, en medio DMEM (Gibco™) con suero de caballo al 1% inactivado por calor (Gibco™, Rockville, MD, EE. UU.) y 50 ng/mL de 2.5S NGF (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Las células se incubaron a una temperatura de 37°C en una atmósfera de aire con CO₂ al 5%. El medio de diferenciación se cambió cada tercer día, la diferenciación de las células se llevó a cabo hasta por un periodo tiempo de 12 días.

7.2.4. Ensayo de western blot

La cantidad total de proteínas se obtuvo del cultivo de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas. Para lo cual se removieron las células de su placa de cultivo, se lavaron con una solución de PBS 1X y se resuspendieron en buffer de extracción de proteínas (50 mM Tris-HCl pH=7.4, 150 mM NaCl, Tritón X-100 1%, Inhibidores de proteasas 25X).

Después los lisados se normalizaron para el contenido de proteína usando el ensayo de Bradford, se cargaron cantidades iguales de proteína en geles de

poliacrilamida desnaturalizantes al 8% y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se lavaron en solución de TBS-T 1X durante 10 minutos, para después realizar el bloqueo en solución de leche en polvo sin grasa al 5% durante 2 horas, se retiró la membrana y se volvió a lavar en solución de TBS-T 1X por 5 minutos. Posteriormente se llevó a cabo una incubación durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios (Tabla 2). Los anticuerpos primarios empleados fueron diluidos en solución de TBS-T 1X.

Posteriormente, las membranas fueron lavadas tres veces en solución de TBS-T 1X con una duración de 10 minutos cada lavado, y se incubaron con los anticuerpos secundarios (anti-mouse y anti-rabbit) (Tabla 2), durante 90 minutos en agitación. Los anticuerpos secundarios empleados fueron diluidos en solución de leche en polvo sin grasa al 5%. Las bandas reactivas se detectaron utilizando quimioluminiscencia, el porcentaje de cada proteína se calculó utilizando a actina como control de carga.

7.2.5. Extracción de RNA total

A una caja P100 de las células diferenciadas y no diferenciadas se les retiró el medio de cultivo, se lavaron con PBS y las células fueron desprendidas por pipeteo. Posteriormente, se recuperó el líquido en un tubo Falcon y se centrifugó a 5000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se decantó. Nuevamente se adicionó 1 mL de PBS 1X al tubo, se centrifugó en las mismas condiciones y se decantó. Se adicionó 1 mL de Trizol a la pastilla obtenida, se resuspendió y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se adicionaron 200 µL de cloroformo, se agitó en el vortex 30 segundos, dejando reposar 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Posteriormente, se recuperó la fase acuosa en un tubo Eppendorf de 1.5 y se le adicionó 0.5 mL de isopropanol, mezclando por inversión, dejando reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 15 minutos y se decantó.

Se adicionó 1 mL de etanol al 75% y se agitó en el vortex. Nuevamente se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 15 minutos y se decantó todo el sobrenadante. La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente, el RNA obtenido se resuspendió en 20 µL de agua destilada y esterilizada, fue cuantificado en un espectrofotómetro NanoDrop y su integridad se evaluó por corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio.

7.2.6. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó tomando 2.0 µg de RNA por reacción de 20 µL, la cual se realizó en tres etapas como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de PCR para llevar a cabo la síntesis de cDNA de las células PC12 no diferenciadas y diferenciadas.

	Componentes de la reacción	Condiciones de PCR
1° Etapa	1 µL de hexámeros random 1 µL de dNTP mix 2.0 µg de RNA T0 y T12 Agua destilada y esterilizada para ajustar el volumen a 13 µL	<div style="text-align: center;">1 ciclo</div>
2° Etapa	4 µL del Buffer 5X 1 µL de DTT 0.1M 1 µL de RNaseOUT 1 µL de SuperScript® III RT	<div style="text-align: center;">1 ciclo</div>
3° Etapa	1 µL de RNasa H	<div style="text-align: center;">1 ciclo</div>

Este procedimiento fue realizado de acuerdo a lo sugerido por el proveedor del kit “SuperScript III First-Strand Synthesis” (Invitrogen™).

Por otra parte, para evaluar la correcta síntesis y cantidad de cDNA, se realizó PCR del gen de actina, usando los iniciadores Actina 1 forward y Actina 2 reverse (Tabla 5), de acuerdo a las condiciones mostradas en la Tabla 4. Después de la reacción, se corrió 5 μ L del producto en un gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio.

Tabla 4. Condiciones de PCR para llevar a cabo la síntesis de actina.

	Componentes de la reacción	Condiciones de PCR
Actina	25 μ L Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific™) 1 μ L iniciadores forward y reverse de actina 2.5 μ L de cDNA Agua destilada y esterilizada para ajustar el volumen a 50 μ L	<p>1 ciclo 35 ciclos 1 ciclo</p> <p>98°C 55°C 72°C</p> <p>5 min 30 s 30 s 30 s 7 min 10°C</p> <p>Desnaturalización Alineamiento Extensión</p>

7.2.7. Ensayo de PCR

Para la amplificación de las secuencias de RNA de Dp40 para las células no diferenciadas y diferenciadas fueron empleados los iniciadores “forward” 5’UTR-Dp71 y “reverse” 3’UTR-Dp40 (Tabla 5), los cuales se unen a la región 5’UTR y 3’UTR de la proteína Dp40, como se muestra en la Figura 5.

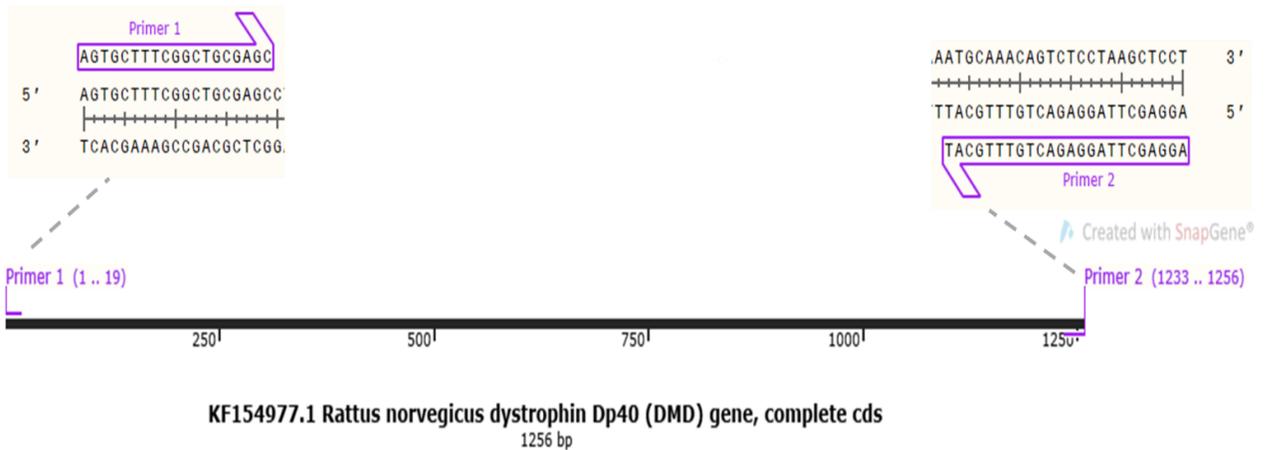


Figura 5. Esquema de la posición que ocupan los iniciadores para llevar a cabo la amplificación del gen de la distrofina Dp40.

Las condiciones de la PCR fueron: 38 ciclos de 98°C/5 minutos, 68°C/2 minutos, 72°C/7 minutos (Figura 6). Los reactivos se utilizaron en las siguientes concentraciones: 25 µL Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific™), 1 µL de cada iniciador, agua destilada y esterilizada para ajustar el volumen a 50 µL, el cDNA se colocó en una proporción 1:10.

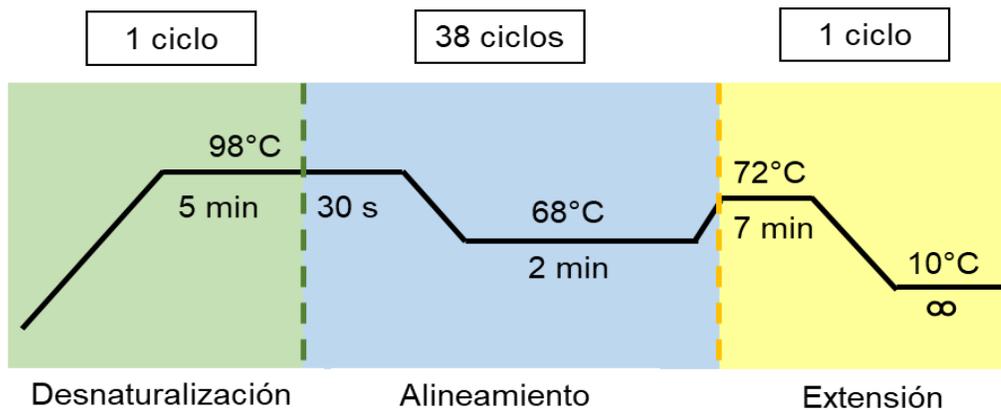


Figura 6. Condiciones de PCR para llevar a cabo la amplificación de la secuencia del RNA de Dp40. Para llevar a cabo la amplificación de la secuencia del RNA de la distrofina Dp40 se utilizaron las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización 98°C/5 minutos, alineamiento 68°C/2 minutos y extensión 72°C/7 minutos, realizando 38 ciclos.

Un volumen de 5 μ L del producto de PCR se colocó en un gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio y fue observado en un transiluminador. El tamaño de los amplificadores fue comparado con el marcador de talla molecular pGEM® DNA Marker 2645 pb (Promega).

Tabla 5. Secuencia de los iniciadores empleados en los ensayos de PCR.

Nombre de los iniciadores	Secuencia (5'→3')
5'UTR-Dp71	AGTGCTTTCGGCTGCGAGC
3'UTR-Dp40	AGGAGCTTAGGAGACTGTTTGCAT
Actina 1 Forward	TTGTAACCAACTGGGACGATATGG
Actina 2 Reverse	GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG

7.2.8. Purificación de los productos de PCR

Un volumen de 50 μ L del producto de PCR de las células no diferenciadas y diferenciadas fueron corridos en un gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio. La banda correspondiente a la distrofina Dp40 fue cortada y purificada por electroelución, para lo cual se emplearon 200 μ L de buffer de electroelución, aplicando una corriente de 100 v durante 1 hora y media. Al término de ese tiempo, el fragmento fue recuperado en un volumen de 400 μ L en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, al cual se le adicionó 1 mL de etanol absoluto frio. La mezcla se dejó precipitando a -70°C durante 15 minutos, se centrifugó a 13000 rpm a 4°C por 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó con 1 mL de etanol al 75%. Nuevamente, las muestras se volvieron a centrifugar en las condiciones anteriores y se les retiró el sobrenadante cuidadosamente usando una micropipeta. Las muestras se dejaron secando a temperatura ambiente por 5 minutos y fueron resuspendidas en 20 μ L de agua destilada y esterilizada. Una vez homogenizadas, se visualizó 1 μ L del producto purificado en un gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio y se cuantificó usando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000.

7.2.9. Clonación de Dp40-T0 y Dp40-T12 en un vector y su transformación en bacterias competentes de *Escherichia coli* DH5 α

Posteriormente, se tomó un volumen de 8.25 μ L del producto de RT-PCR purificado correspondiente a Dp40-T0 y Dp40-T12, al cual se le adicionaron 3.75 μ L del Master mix de GoTaq $^{\text{®}}$ (10 μ L Buffer 5X, 0.25 μ L GoTaq $^{\text{®}}$ DNA Polymerase, 1 μ L dNTPs, 3.5 μ L MgCl $_2$ para una reacción de 50 μ L). Esta mezcla fue sometida a 72 $^{\circ}$ C por 20 minutos para llevar a cabo la adenilación de los extremos del amplicón. Una vez adenilados, los fragmentos se ligaron al vector de expresión pGEM $^{\text{®}}$ -T Easy (Promega) con una relación radio molar inserto:vector de 6:1 de acuerdo a las recomendaciones del protocolo de pGEM $^{\text{®}}$ -T Easy Vector Systems (Promega).

La reacción de ligación se llevó a cabo para poder realizar la transformación de un cultivo de bacterias competentes de *Escherichia coli* DH5 α , que fueron sembradas en medio Luria Bertani (LB) con ampicilina (100 μ g/mL) y posteriormente fueron analizadas por PCR con los iniciadores 5'UTR-Dp71 y 3'UTR-Dp40, de acuerdo a las condiciones mostradas en la Figura 7.

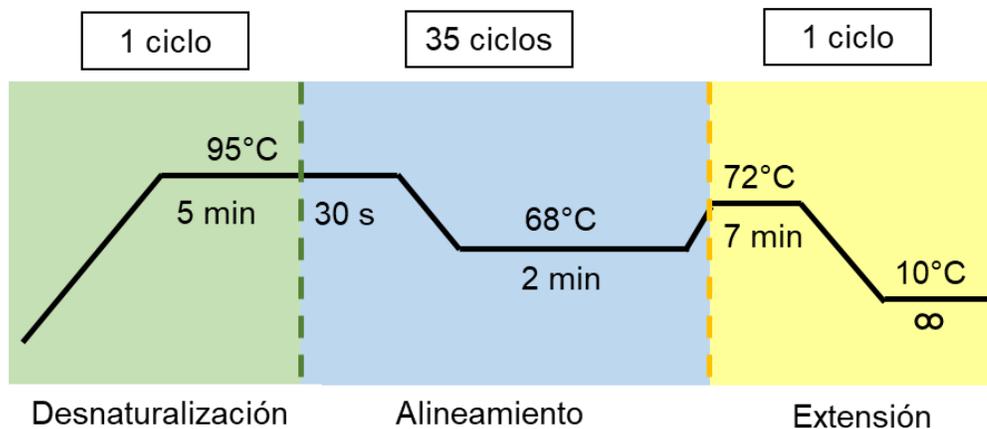


Figura 7. Condiciones de PCR para el análisis de las colonias transformadas. Para llevar a cabo el análisis de las colonias transformadas se utilizaron las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización 95 $^{\circ}$ C/5 minutos, alineamiento 68 $^{\circ}$ C/2 minutos y extensión 72 $^{\circ}$ C/7 minutos, realizando 35 ciclos.

Para comprobar la presencia de los insertos correspondientes a esta distrofina, se corrieron 5 μ L de las reacciones de amplificación en un gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio y la presencia de las isoformas se corroboró al comparar la migración de los fragmentos con el marcador de talla molecular pGEM® DNA Marker 2645 pb (Promega).

7.2.10. Extracción de DNA plasmídico

Las colonias transformadas de *Escherichia coli* DH5 α que contenían diferentes isoformas de Dp40-T0 y Dp40-T12, lo cual se verificó cuando se realizó un corrimiento electroforético, se cultivaron en 5 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) por 18 horas a 37°C, en agitación.

Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 5000 rpm a temperatura ambiente por 5 minutos, y se decantó el sobrenadante. La pastilla se pasó a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, y se le adicionó 200 μ L de solución I (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA, 6.6 μ L RNAsa A (20mg/mL)), se mezcló por pipeteo y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se le adicionaron 400 μ L de la solución II (200 mM NaOH, 1% SDS), mezclando por inversión 4-6 veces y dejando en incubación por 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se le adicionaron 400 μ L de la solución III (3 M de acetato de potasio pH 5.5 ajustado con ácido acético glacial) y se mezcló por inversión de 4-6 veces, dejando en incubación a -70°C durante 10 minutos. Después, se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 15 minutos, para poder transferir el sobrenadante, sin tomar la pastilla, a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL, a la cual se le adicionaron 600 μ L de isopropanol, y se mezcló por inversión, dejando en incubación por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se volvió a centrifugar a 13000 rpm a 4°C durante 15 minutos, se decantó y la pastilla se resuspendió en 200 μ L de agua destilada y esterilizada, una vez incorporado, se le adicionó 500 μ L de etanol absoluto frío, y se dejó incubando a -70°C por 20 minutos. Finalmente, se volvió a centrifugar bajo las condiciones mencionadas anteriormente y se decantó el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida en 20 μ L de agua destilada y esterilizada.

Para evaluar la integridad y limpieza del DNA plasmídico, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio.

7.2.11. Secuenciación de las isoformas de Dp40

Los fragmentos de PCR de Dp40 que se expresan en células PC12 no diferenciadas y diferenciadas y que fueron identificados por una migración electroforética diferente a los fragmentos de Dp40 silvestres, fueron caracterizadas por secuenciación. Se utilizó el kit de secuenciación BigDye™ Terminator v3.1 (Applied Biosystems), siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante. Las muestras fueron analizadas en el secuenciador ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Una vez que se obtuvieron las secuencias, se procedió a compararlas con la secuencia completa de la distrofina Dp40 de *Rattus norvegicus* (GenBank: KF154977.1), para lo cual se realizó un alineamiento utilizando la herramienta bioinformática de Clustal Omega.

8. RESULTADOS

8.1. Curva de crecimiento de las células PC12

La evaluación del crecimiento y viabilidad de las células PC12, se llevó a cabo realizando una curva de crecimiento (Figura 8), en la cual se contaron las células utilizando una cámara de Neubauer. El número inicial de células a 0 días, del cual se partió fue de 400 000 células/mL, en el día 1 se observó un decremento en el número de células (322 500 células/mL) en comparación con el número inicial. Esto ocurre como resultado del proceso de adaptación al medio de cultivo en el que se encuentran las células, pero posterior a este periodo de tiempo, es decir del día 2 hasta el día 9, se observó un crecimiento normal con un comportamiento exponencial, alcanzando un total de 2 80 2500 células/mL al final del tiempo analizado (Tabla 6).

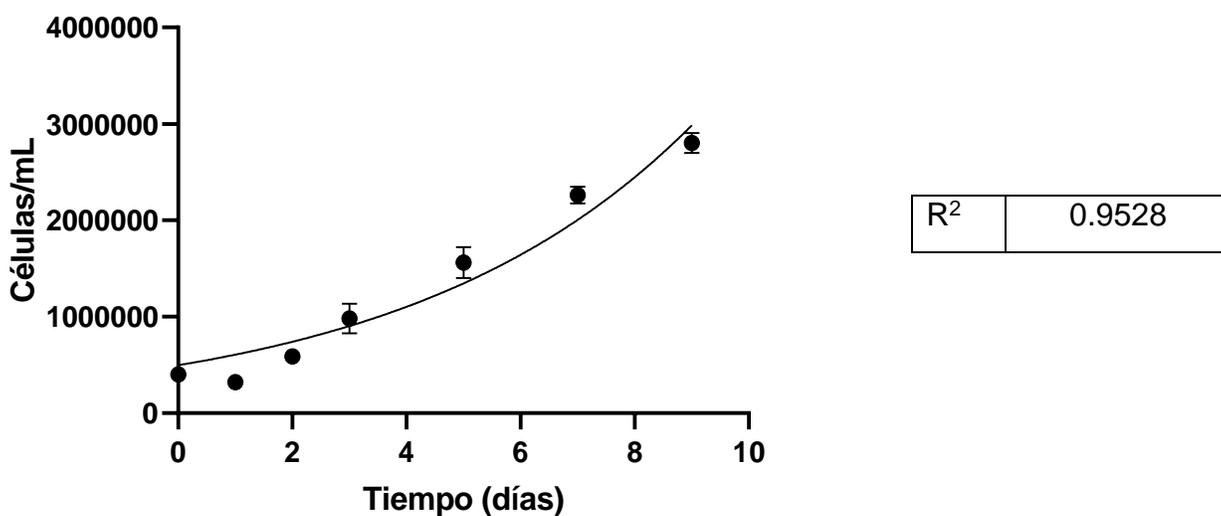


Figura 8. Curva de crecimiento de células PC12 no diferenciadas. El conteo de las células PC12 se realizó utilizando una cámara de Nuebauer durante el periodo de tiempo de 0 hasta 9 días, observandose un crecimiento exponencial a partir del día 2.

Tabla 6. Curva de crecimiento de células PC12 no diferenciadas.

Día	Células/mL		Promedio (células/ mL)
	Experimento #1	Experimento #2	
0	400000	400000	400000
1	305000	340000	322500
2	625000	550000	587500
3	1090000	870000	980000
5	1445000	1675000	1560000
7	2325000	2200000	2262500
9	2875000	2730000	2802500

8.2. Caracterización de las células PC12 durante el proceso de diferenciación

Después de observar que la viabilidad y crecimiento de las células era normal, se llevó a cabo su diferenciación mediante el uso de NGF, de acuerdo a lo descrito en el apartado de materiales y métodos. En la Figura 9, se observan las imágenes que muestran cambios en la morfología de las células como resultado del proceso de diferenciación, las cuales fueron obtenidas utilizando un microscopio de contraste de fases. En la Figura 9a, se observa la morfología de las células no diferenciadas, la cual se caracteriza por presentar células redondas que crecen en pequeños grupos. Las Figuras 9b, c, d y e corresponden a las células diferenciadas durante un periodo de tiempo de 3, 6, 9 y 12 días, respectivamente. A partir del tercer día, se observa que la morfología de las células comienza a modificarse, presentando un ligero aplanamiento y crecimiento de neuritas de longitud corta, pero a partir del día 6 hasta el día 12 hay un aumento considerable del cuerpo celular, y la longitud de las neuritas es más extensa, mostrando así que las células se encuentran diferenciadas, ya que estos cambios morfológicos son característicos de este proceso.

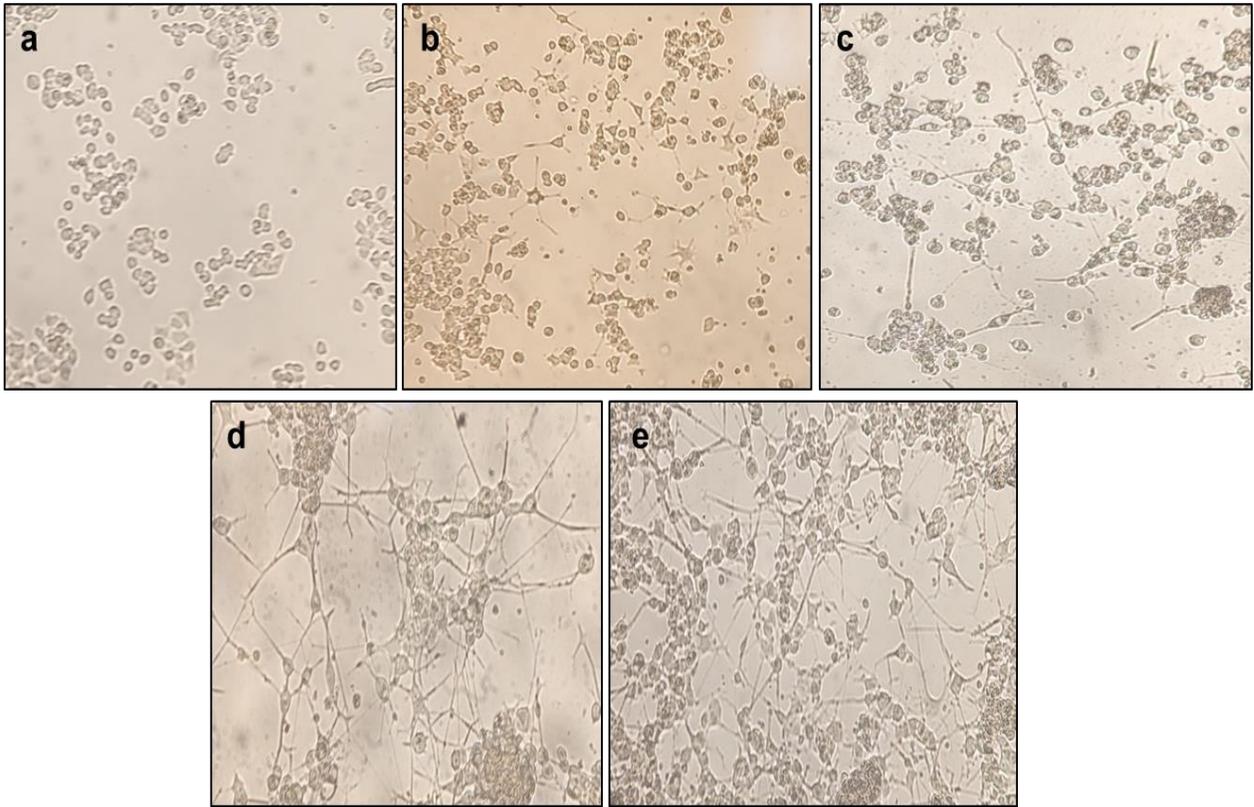


Figura 9. Morfología de las células PC12 durante el proceso de diferenciación. a) Células a los 0 días, muestran una morfología redonda y crecimiento en pequeños grupos, b) a los 3 días de diferenciación se observa el crecimiento de neuritas de longitud corta, c) células a los 6 días de diferenciación muestran aplanamiento del cuerpo celular y mayor extensión de las neuritas, d) y e) células a los 9 y 12 días de diferenciación, respectivamente, se observa un aumento del cuerpo celular y la extensión de las neuritas es mayor, formando interconexiones entre las células.

8.3. Análisis de la expresión de marcadores de proliferación y diferenciación celular, así como proteínas relacionadas con la proteína de distrofina

8.3.1. Cuantificación de las proteínas mediante método de Bradford

De acuerdo al apartado de materiales y métodos, después de realizar la extracción de proteínas de las células no diferenciadas y diferenciadas, se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Figura 10), para interpolar la absorbancia y determinar la cantidad de proteína presente en las muestras, y obtener su concentración (μg proteína/ μL).

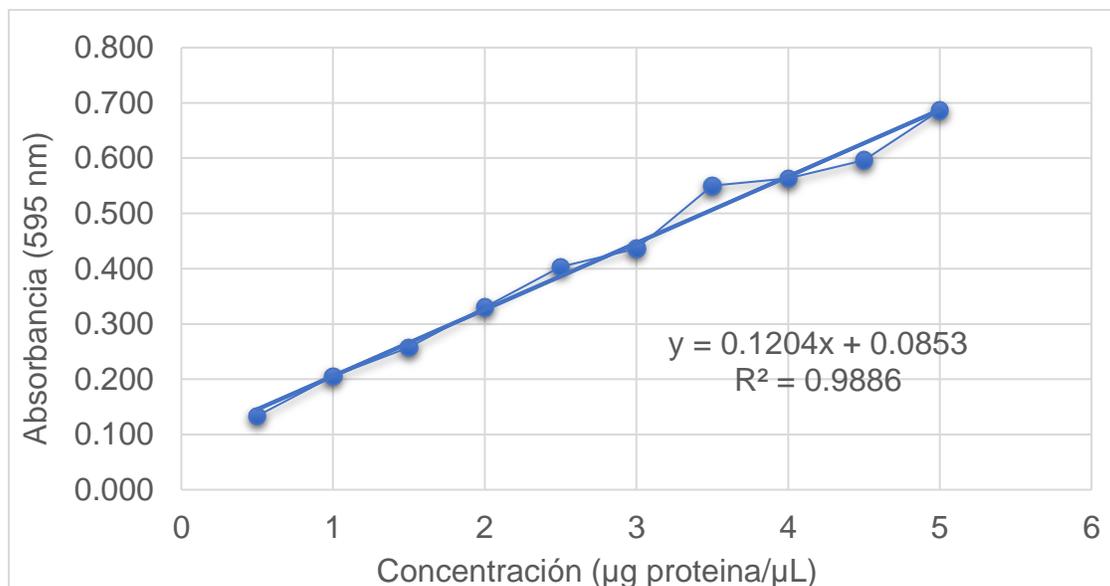


Figura 10. Curva de calibración con BSA para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Esta curva se realizó empleando diferentes cantidades de albúmina de suero bovino (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 y 5 µg), cuya cuantificación se realizó mediante el método de Bradford a una longitud de onda de 595 nm, como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

Al conocer la concentración de proteína de las muestras, se realizó el ensayo de western blot con el propósito de poder evaluar la expresión de diferentes marcadores de diferenciación como ERK 1/2, NSE y NF-L, para corroborar que la línea celular PC12 se diferenció en presencia de NGF con las condiciones utilizadas.

8.3.2. Marcador de proliferación: PCNA

El marcador de proliferación celular que se utilizó fue el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), la cual es una proteína nuclear sintetizada específicamente en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular, este marcador fue utilizado porque cuando las células PC12 están en proceso de diferenciación la división celular disminuye, es decir que la expresión de PCNA en células diferenciadas es menor. En el western blot, se observa que PCNA se expresa de manera abundante (96%) únicamente en las células que no se encuentran en proceso de diferenciación

(0 días), pero en cambio cuando las células están diferenciadas (12 días), su presencia disminuye hasta un valor de 17% de expresión relativa (Figura 11a).

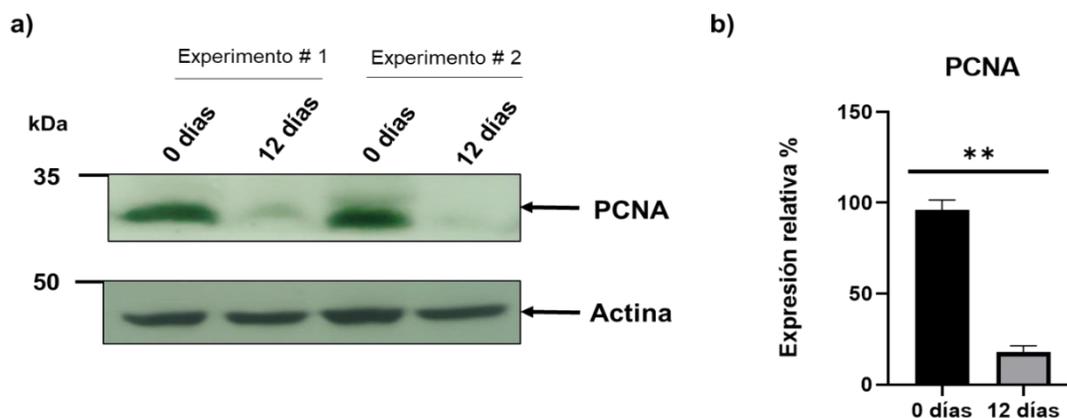


Figura 11. Análisis de la expresión de PCNA en células PC12. Se emplearon células PC12 no diferenciadas y tratadas con NGF por un periodo de 12 días para lograr su diferenciación y los extractos de proteína total de ambas fueron analizados por western blot. a) Detección por western blot de PCNA. La detección de actina se utilizó para normalizar la cantidad de proteína. b) Expresión relativa de PCNA. Los porcentajes de la expresión relativa de PCNA se expresan como un aumento de veces sobre los valores del control de carga, se obtuvieron mediante la cuantificación de la intensidad de las bandas utilizando el programa *ImageJ*. En las células PC12 a 0 días de tratamiento con NGF, la expresión de PCNA es del 96%, en contraste con las células diferenciadas en las cuales su expresión disminuye significativamente con un valor de 17% de expresión relativa. La gráfica muestra el promedio de 2 experimentos independientes, \pm SD. Los asteriscos denotan una diferencia significativa entre ambas muestras ($P=0.0034$).

8.3.3. Marcador de diferenciación temprana: ERK 1/2

Se analizó la expresión de ERK 1/2 fosforilado debido a que es un marcador de diferenciación temprana, permitiendo evaluar la activación de la vía de señalización. La activación de estas proteínas permite su translocación al núcleo, iniciando así una nueva expresión génica que conduce al crecimiento de neuritas. En la Figura 12a, se muestra el western blot, en el que se evaluaron diferentes tiempos de inducción de la vía de señalización en la que intervienen ERK 1/2 fosforilado, desde 5 minutos hasta 6 horas después de la adición del NGF. La activación óptima de la vía se observó a los 10 minutos, ya que en este tiempo se observa un 99% de

fosforilación relativa y después de ese tiempo inicia la disminución de la cantidad de ERK 1/2 fosforilados hasta un 14% de expresión (Figura 12b).

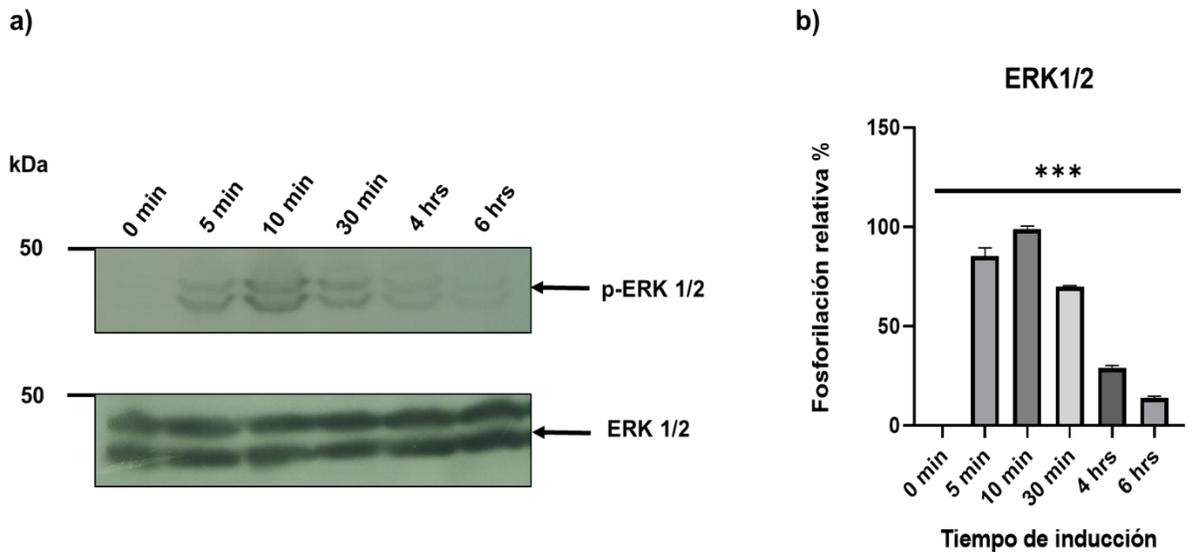


Figura 12. Análisis de la expresión de ERK 1/2 fosforilados en células PC12. Las células PC12 fueron tratadas con NGF a diferentes tiempos y los extractos de proteína total fueron analizados por western blot. a) Detección por western blot de ERK 1/2 fosforilado. La detección de ERK 1/2 no fosforilado se usó para normalizar la cantidad de proteína. b) Fosforilación relativa de ERK 1/2. Los porcentajes relativos de fosforilación de la proteína se expresan como un aumento de veces sobre los valores de la proteína no fosforilada. La actividad máxima de la proteína se observa a los 10 minutos con un 99% de fosforilación relativa, y en el tiempo máximo de exposición, es decir a las 6 horas su expresión disminuyó significativamente con un valor del 14% de fosforilación. La fosforilación se obtuvo mediante la cuantificación de la intensidad de las bandas utilizando el programa *ImageJ*. La gráfica muestra el promedio de 2 experimentos independientes, \pm SD. Los asteriscos denotan diferencias significativas ($P < 0.0001$).

8.3.4. Marcadores de diferenciación tardía: NSE y NF-L

El segundo marcador de diferenciación neuronal que se evaluó fue NSE, la cual es una proteína que se encuentra en las células neuronales, específicamente en las neuritas, por lo cual se le correlaciona con la diferenciación y maduración funcional de las células neuronales en el cerebro de rata.

En la Figura 13a, se muestra el western blot que denota que la enzima NSE, se encuentra en niveles elevados en las células que se encuentran diferenciadas (12 días) con un 86% de expresión, en contraste con las células no diferenciadas a 0 días de tratamiento en las cuales su expresión es del 3.5%. Al realizar la cuantificación de las bandas, se observa que hay una diferencia significativa entre ambas muestras, denotando que su máxima expresión es únicamente en las células diferenciadas (Figura 13b).

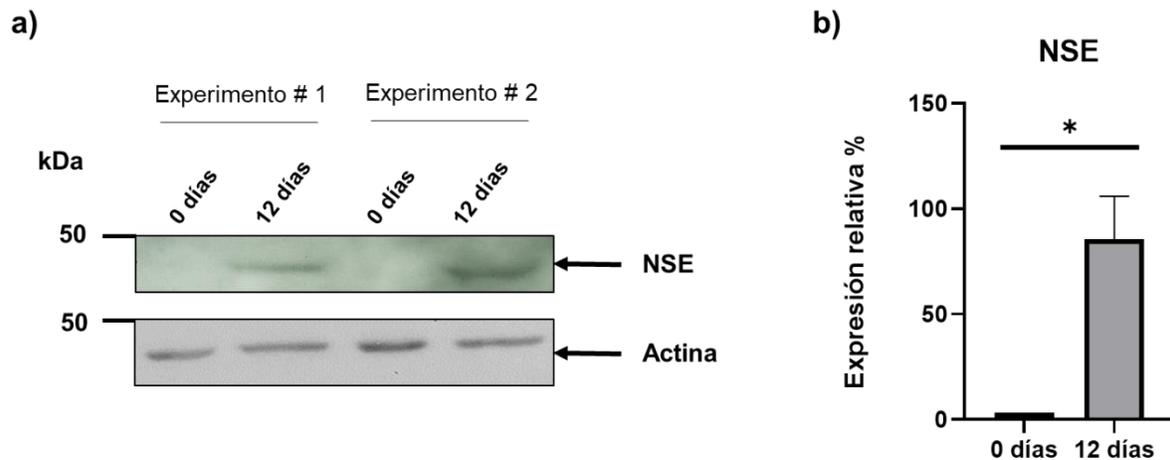


Figura 13. Análisis de la expresión de NSE en células PC12. Se emplearon células PC12 no diferenciadas y tratadas con NGF por un periodo de 12 días para lograr su diferenciación y los extractos de proteína total de ambas fueron analizados por western blot. a) Detección por western blot de NSE. La detección de actina se utilizó para normalizar la cantidad de proteína. b) Expresión relativa de NSE. Los porcentajes de la expresión relativa de NSE se expresan como un aumento de veces sobre los valores del control de carga, se obtuvieron mediante la cuantificación de la intensidad de las bandas utilizando el programa *ImageJ*. En las células PC12 diferenciadas, la expresión de NSE es del 86%, en contraste con las células no diferenciadas en las cuales su expresión disminuye significativamente con un valor del 3.5% de expresión relativa. La gráfica muestra el promedio de 2 experimentos independientes, \pm SD. El asterisco denota una diferencia significativa entre las muestras ($P=0.0288$).

El último marcador de diferenciación celular que se empleó fue NF-L, debido a que es una proteína que se encuentra en las neuritas. Su expresión únicamente se observó en las células diferenciadas (Figura 14a) con un valor del 99% y la

cuantificación de las bandas (Figura 14b), demostró que existe una diferencia significativa entre ambas muestras.

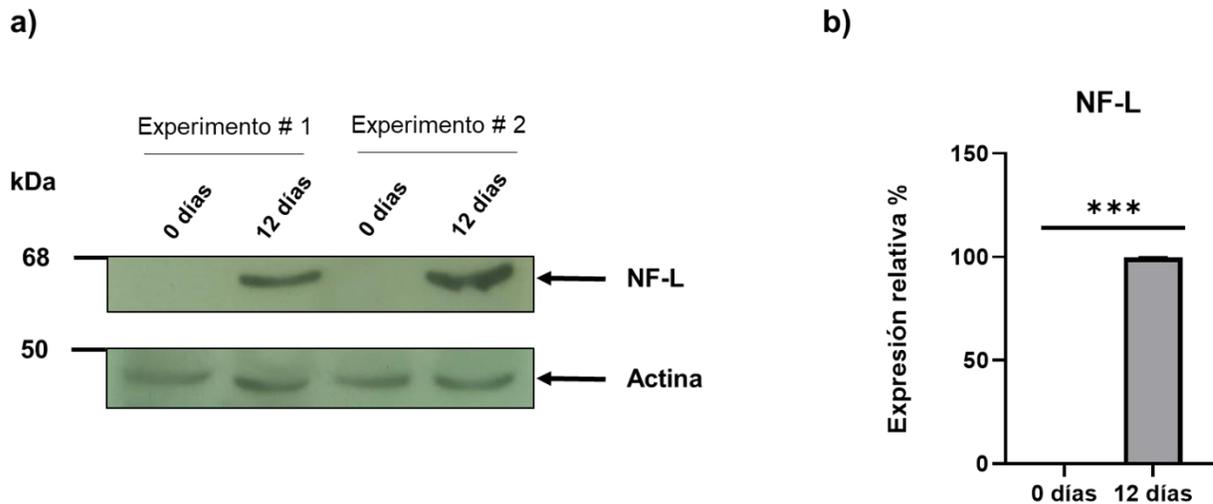


Figura 14. Análisis de la expresión de NF-L en células PC12. Se emplearon células PC12 no diferenciadas y tratadas con NGF por un periodo de 12 días para lograr su diferenciación y los extractos de proteína total de ambas fueron analizados por western blot. a) Detección por western blot de NF-L. La detección de actina se utilizó para normalizar la cantidad de proteína. b) Expresión relativa de NF-L. Los porcentajes de la expresión relativa de NF-L se expresan como un aumento de veces sobre los valores del control de carga, se obtuvieron mediante la cuantificación de la intensidad de las bandas utilizando el programa *ImageJ*. En las células PC12 diferenciadas, la expresión de NF-L es del 99%, en contraste con las células no diferenciadas en las cuales no se observó su expresión. La gráfica muestra el promedio de 2 experimentos independientes, \pm SD. Los asteriscos denotan una diferencia significativa entre ambas muestras ($P < 0.0001$).

8.3.5. Proteínas relacionadas: β -dístroglicano y FAK

Otras proteínas cuyos niveles se analizaron fueron proteínas que se ha descrito su asociación con la proteína distrofina, como son: β -dístroglicano y FAK. Los niveles de expresión de β -dístroglicano, se evaluaron para examinar si la diferenciación de las células PC12 altera la estabilidad del complejo proteico asociado a la distrofina (DAPC), observando así en la Figura 15b, que cuando las células PC12 no se encuentran diferenciadas la expresión de β -dístroglicano es del 95%, mientras que cuando las células están diferenciadas su expresión es del 84%, no existiendo así

una diferencia significativa en la expresión relativa de ambas muestras (0 y 12 días). Por otra parte, la cinasa de adhesión focal (FAK), se analizó para comprender la capacidad de respuesta de las células, ya que esta proteína está relacionada con la adhesión celular y transmisión de señales de receptores transmembrana, y de igual manera no se observó una diferencia significativa en sus niveles de expresión en ambas muestras, ya que en las células no diferenciadas la expresión de FAK fue del 80%, mientras que en las células diferenciadas su expresión fue del 74%, no existiendo así una diferencia significativa entre los valores de ambas muestras (Figura 16b).

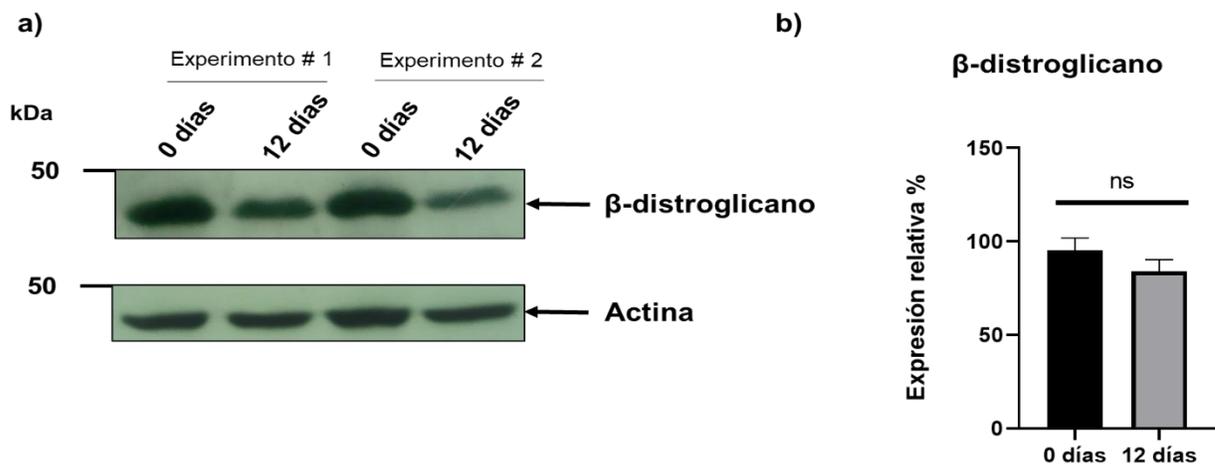


Figura 15. Análisis de la expresión de β -dístroglicano en células PC12. Se emplearon células PC12 no diferenciadas y tratadas con NGF por un periodo de 12 días para lograr su diferenciación y los extractos de proteína total de ambas fueron analizados por western blot. a) Detección por western blot de β -dístroglicano. La detección de actina se utilizó para normalizar la cantidad de proteína. b) Expresión relativa de PCNA. Los porcentajes de la expresión relativa de β -dístroglicano se expresan como un aumento de veces sobre los valores del control de carga, se obtuvieron mediante la cuantificación de la intensidad de las bandas utilizando el programa *ImageJ*. En las células PC12 a 0 días de tratamiento con NGF, la expresión de β -dístroglicano es del 95%, mientras que en las células diferenciadas su expresión es del 84%, no existiendo así una diferencia significativa en la expresión relativa de ambas muestras. La gráfica muestra el promedio de 2 experimentos independientes, \pm SD. ns: No existe diferencia significativa entre ambas muestras ($P=0.2150$).

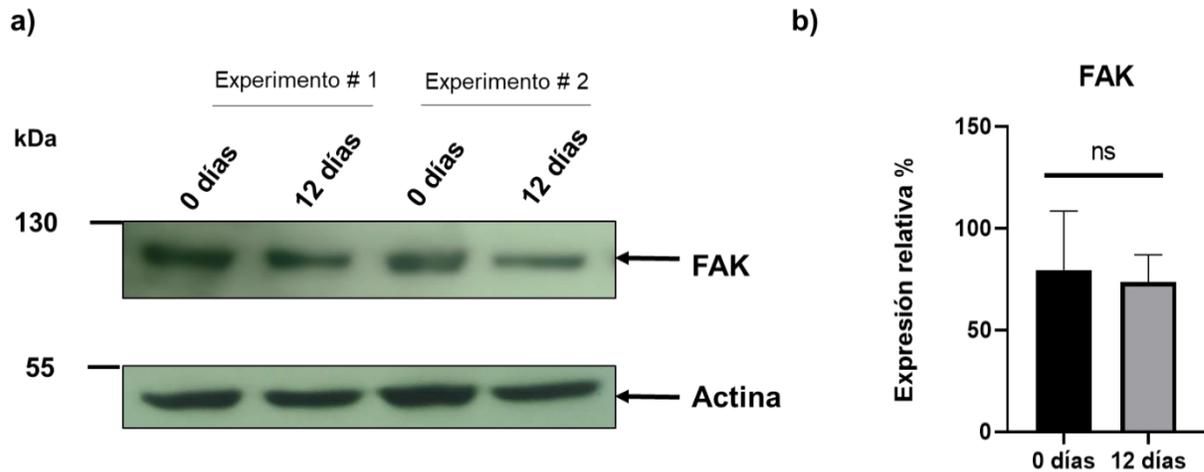


Figura 16. Análisis de la expresión de FAK en células PC12. Se emplearon células PC12 no diferenciadas y tratadas con NGF por un periodo de 12 días para lograr su diferenciación y los extractos de proteína total de ambas fueron analizados por western blot. a) Detección por western blot de FAK. La detección de actina se utilizó para normalizar la cantidad de proteína. b) Expresión relativa de FAK. Los porcentajes de la expresión relativa de FAK se expresan como un aumento de veces sobre los valores del control de carga, se obtuvieron mediante la cuantificación de la intensidad de las bandas utilizando el programa *ImageJ*. En las células PC12 a 0 días de tratamiento con NGF, la expresión de FAK es del 80%, mientras que en las células diferenciadas su expresión es del 74%, no existiendo así una diferencia significativa en la expresión relativa de ambas muestras. La gráfica muestra el promedio de 2 experimentos, \pm SD. ns: No existe diferencia significativa entre ambas muestras ($P=0.8153$).

8.4. Identificación de isoformas de Dp40 que se expresan en células PC12 no diferenciadas y diferenciadas

8.4.1. Extracción del RNA de las muestras

La extracción del RNA de las muestras correspondientes a las células PC12 no diferenciadas y diferenciadas se realizó por duplicado, como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. La evaluación de la integridad del RNA aislado se llevó a cabo por corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio, como se muestra en la Figura 17, en donde se pueden observar claramente las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28S y 18S. En la Tabla 7, se muestran las concentraciones del RNA extraído de las muestras,

obtenidas al realizar su cuantificación, cuya concentración en promedio oscila en 741 $\mu\text{g/mL}$ para las células PC12 no diferenciadas, y 600 $\mu\text{g/mL}$ para las células diferenciadas.

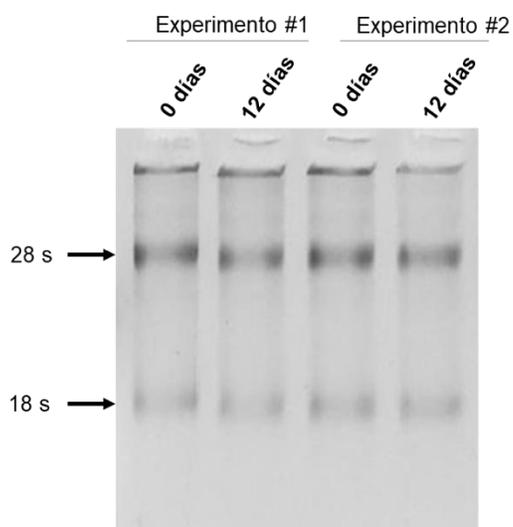


Figura 17. Extracción de RNA total de las células PC12 no diferenciadas y diferenciadas. El RNA extraído a partir de las células se corrió en un gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio. El carril 1 y 3 corresponde a las células no diferenciadas, mientras que los carriles 2 y 4 a las células diferenciadas por 12 días en presencia de NGF. La integridad de las bandas correspondientes al RNA ribosomal 28S y 18S se observa en todos los carriles.

Tabla 7. Concentraciones del RNA de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas.

Muestra	Concentración
0 días	714.3 $\mu\text{g/mL}$
12 días	714.3 $\mu\text{g/mL}$
0 días	769.2 $\mu\text{g/mL}$
12 días	500 $\mu\text{g/mL}$

8.4.2. Amplificación de la distrofina Dp40 mediante PCR

Para realizar la amplificación del RNA mensajero de Dp40, se emplearon los iniciadores 5'UTR-Dp71 y 3'UTR-Dp40 como se menciona en el apartado de Materiales y Métodos, y como se muestra en la Figura 18. Para realizar la estandarización de las condiciones de las PCR se utilizaron dos temperaturas de alineamiento: 64°C y 68°C, las cuales ya han sido reportadas previamente en nuestro grupo de trabajo (Cubas-Gracia, D., 2020 y Aragón et al., 2018). En el gel de la Figura 18, se puede observar que al ser utilizada la temperatura de extensión de 64°C/2 minutos, se obtuvieron bandas muy tenues del amplificado de Dp40 en ambas muestras, es decir tanto en las células no diferenciadas y diferenciadas. Por el contrario, cuando se utilizó la temperatura de 68°C/2 minutos, se visualizó una mayor intensidad de las bandas. Es por ello, que se decidió utilizar la temperatura de alineamiento/extensión de 68°C/2 minutos para la PCR, además de que a esta temperatura se observan menos bandas inespecíficas en el gel. En estas condiciones la banda esperada para la secuencia de Dp40 presenta un tamaño de 1256 pb.

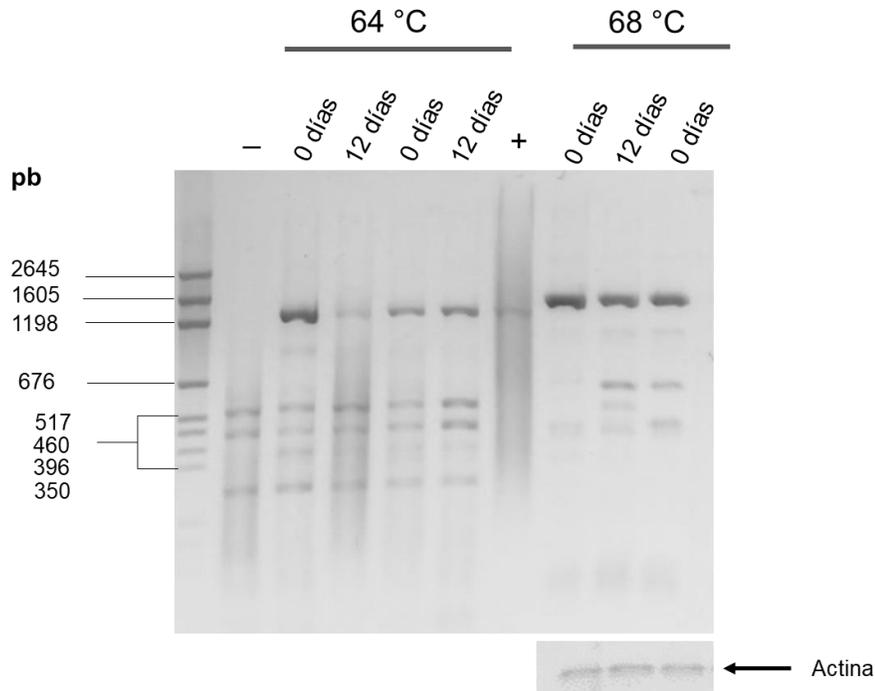


Figura 18. Estandarización de las condiciones de la PCR para la amplificación de Dp40. En el primer carril se muestra el marcador del tamaño de los fragmentos de 2645 pb, en el segundo carril el control negativo, en los carriles tercero y quinto el cDNA de Dp40 de las células PC12 no diferenciadas y en los carriles cuarto y sexto el fragmento de cDNA Dp40 de las células PC12 diferenciadas a los 12 días, con las condiciones de amplificación de una temperatura de alineamiento/extensión de 64°C/2 minutos. El séptimo carril es el control positivo correspondiente al transcrito de Dp40 silvestre. En los carriles octavo y décimo el cDNA de Dp40 de las células no diferenciadas y en el noveno carril el cDNA de Dp40 de las células diferenciadas con las condiciones de amplificación de una temperatura de alineamiento/extensión de 68°C/2 minutos. En la parte inferior se observa un gel con la expresión de actina.

Después de realizar la purificación mediante electroelución de los cDNA de Dp40 de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas, se procedió a correr un gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio para verificar su pureza. Se observó que el tamaño de los cDNA de Dp40 de células no diferenciadas y diferenciadas es correcto y corresponde a 1256 pb (Figura 19).

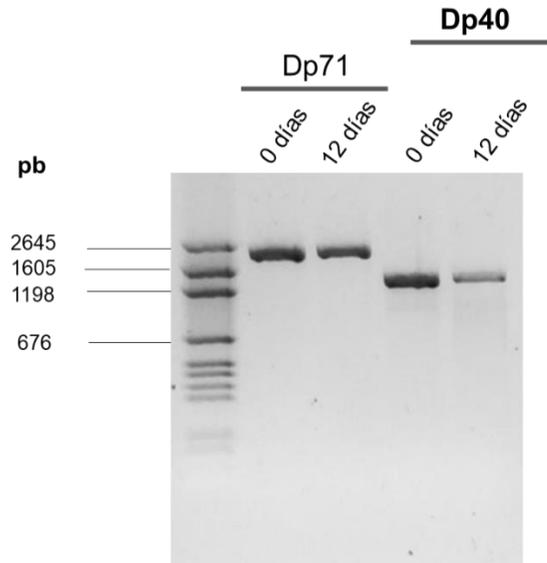


Figura 19. Productos purificados por electroelución correspondientes a los cDNA de Dp40 de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas. En el carril 1 marcador de 2645 pb, carriles 1 y 2 el cDNA purificado de Dp71 utilizado como control; carriles 4 y 5 el cDNA purificado de Dp40 con un tamaño esperado de 1256 pb.

8.4.3. Análisis de las isoformas de Dp40 expresadas en células PC12 no diferenciadas

Se realizó la amplificación de Dp40 a partir del cDNA de las células PC12 no diferenciadas, los fragmentos se analizaron por electroforesis. Las bandas que correspondieron a un tamaño aproximado de 1256 pb, se recortaron del gel para purificarlas mediante electroelución y los purificados de los productos de cDNA de Dp40 se ligaron en el vector pGEM-T Easy. Estos productos se utilizaron para transformar bacterias competentes de *Escherichia coli* DH5 α y las colonias transformantes fueron analizadas por PCR para determinar la presencia de los insertos de interés.

Se analizaron 192 colonias que resultaron de la transformación con los amplificadores de Dp40 de las células no diferenciadas, obteniéndose 147 colonias positivas para la síntesis del fragmento de Dp40, que presentaron un tamaño de 1256 pb, lo que indica que un 77% de las células transformadas contienen el inserto de Dp40. En el

compendio de geles de agarosa que se observan en las Figuras 20 y 21 se muestran las colonias positivas, pero cabe destacar que también se observan bandas que presentan un menor tamaño a 1256pb en comparación con las bandas del fragmento de tamaño completo. Por ejemplo, en las colonias ubicadas en los carriles número 28, 106, 149, 158 y 171 el tamaño de los fragmentos amplificados se observa por debajo de 1198 pb, lo cual sugiere la presencia de isoformas de Dp40 que se expresan en estas células no diferenciadas. Además, también se observó que algunos carriles presentaron dos bandas como se muestra en los carriles número: 67, 109, 114, 172, 174, 176, 177, 183, 185, 187, 189, 191. Debido a esto se decidió realizar una segunda purificación de estas colonias realizando un estriado de cada una en una placa de LB con ampicilina (100 µg/mL). Sin embargo, se observó que, a pesar de realizar una purificación adicional, al repetir la reacción de PCR y correr las muestras en el gel de agarosa, para verificar la presencia del inserto, se siguieron observando dobles bandas en los geles.

En la Figura 22, se muestra la recopilación de las colonias que presentaron fragmentos de menor tamaño en comparación con el fragmento completo de Dp40. Para confirmar que las bandas de las colonias #28, 106, 149, 158 y 171 correspondían a nuevas isoformas de Dp40, se aislaron estas colonias y se les extrajo DNA plasmídico, el cual fue utilizado para llevar a cabo la determinación de su secuencia. El resultado del análisis de secuenciación mostró que las cinco colonias presentaban diferentes tamaños: la colonia #28 1036 pb, la colonia #106 1047 pb, la colonia #149 1049 pb, la colonia #158 1049 pb y la colonia #171 1051pb, pero de manera interesante, después de realizar el alineamiento de las secuencias de nucleótidos mediante el programa Clustal Omega con la secuencia de Dp40 silvestre (GenBank:KF154977.1), se observó que todas las colonias correspondieron a una misma isoforma de Dp40 no reportada previamente para las células PC12. En la Figura 23, se observa la carencia del exón 68 en todas las colonias, denominándose a esta nueva isoforma Dp40 Δ 68. Al llevarse a cabo la traducción y el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cinco clonas, *in silico*, utilizando el programa Clustal Omega se observó que la isoforma Dp40 Δ 68 codifica para una secuencia de 208 aminoácidos. En la Figura 24, se muestra el

alineamiento de las secuencias de aminoácidos para las cinco clonas y la Dp40 silvestre. En dicha imagen se observa que las cinco clonas muestran la delección del exón 68 y el corrimiento en el marco de lectura, lo que genera la aparición de un codón de paro prematuro localizado en el exón 69. Posterior a los 201 aminoácidos que corresponden a la traducción hasta el exón 67, se traducen 7 nuevos aminoácidos del exón 69, los cuales se encuentran localizados antes de la aparición del codón de paro prematuro, que provoca la generación de una proteína trunca. Se realizó la predicción del peso molecular de esta isoforma mediante el programa ExPASy, dando como resultado 23.9 kDa.

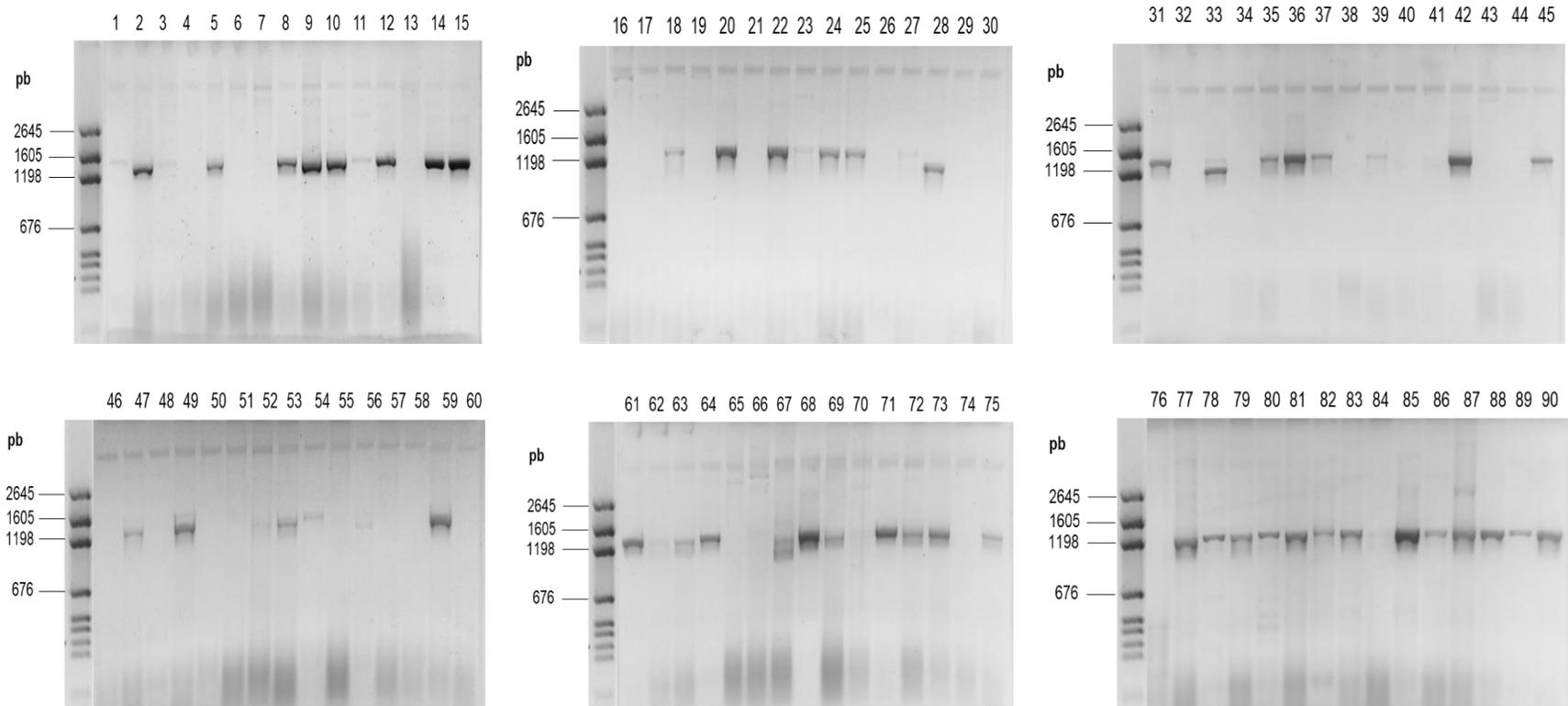


Figura 20. Análisis de 56 clonas positivas de Dp40 de las células PC12 no diferenciadas (T0). El amplificado de Dp40 de las células PC12 no diferenciadas, se ligó al vector pGEM-T Easy, y se transformó en bacterias competentes de *Escherichia coli* DH5 α . Se analizaron mediante PCR un total de 192 colonias transformantes, utilizando los iniciadores 5' UTR-Dp71 y 3' UTR-Dp40, de las cuales se obtuvieron 147 colonias positivas para Dp40, que presentaron un tamaño de 1256 pb. Los productos de las PCR se compararon con el marcador, identificando así algunas bandas que presentan un menor tamaño en comparación con el DNA de tamaño completo (1256 pb). Dichas bandas se observan en el carril número 28. El carril número 15 es el control positivo, que corresponde al fragmento de Dp40 silvestre.

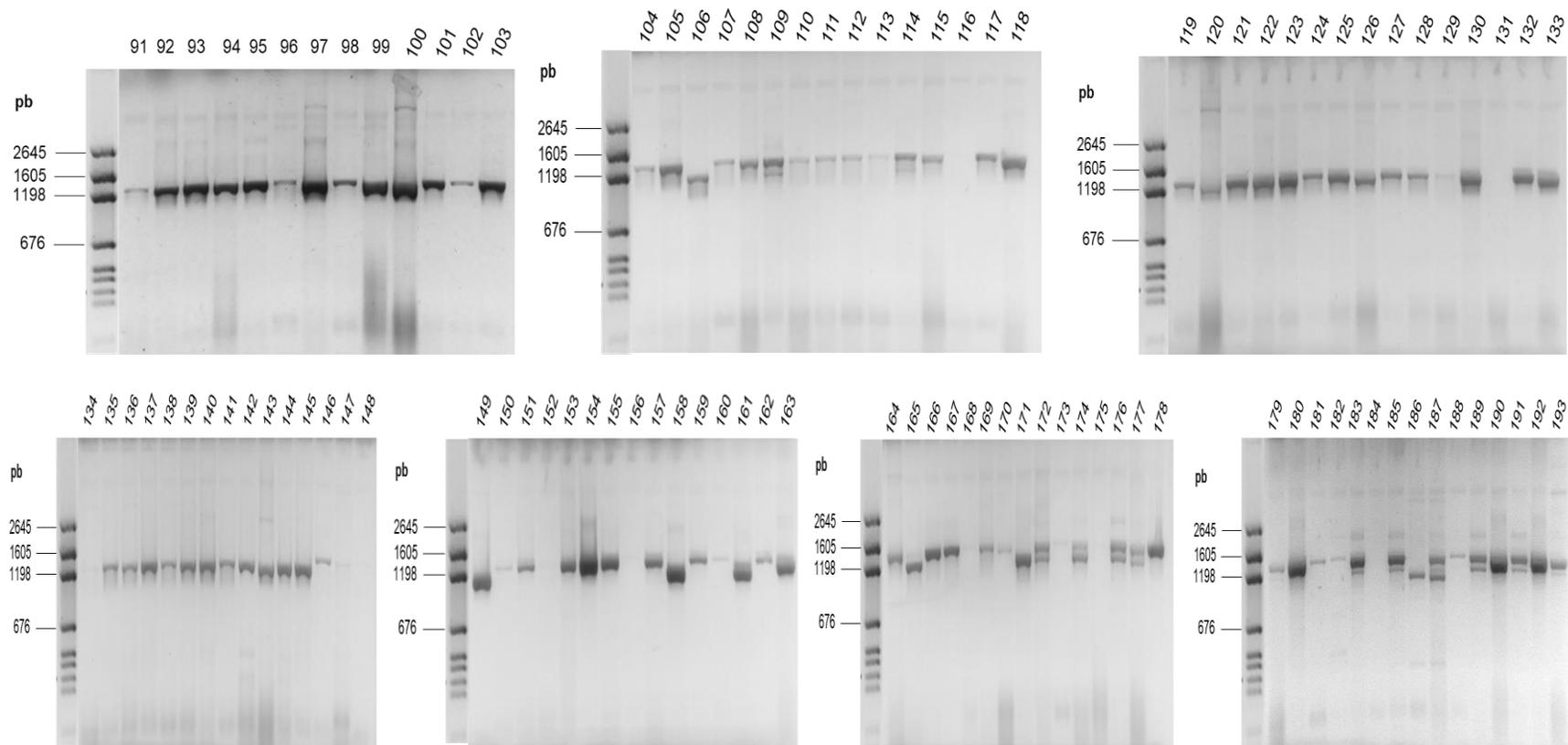


Figura 21. Análisis de 91 clonas positivas de Dp40 de las células PC12 no diferenciadas (T0). El amplificado de Dp40 de las células PC12 no diferenciadas, se ligó al vector pGEM-T Easy, y se transformó en bacterias competentes de *Escherichia coli* DH5 α . Se analizaron mediante PCR un total de 192 colonias transformantes, utilizando los iniciadores 5' UTR-Dp71 y 3' UTR-Dp40, de las cuales se obtuvieron 147 colonias positivas para Dp40, que presentaron un tamaño de 1256 pb. Los productos de las PCR se compararon con el marcador, identificando así bandas que presentan un menor tamaño en comparación con el DNA de tamaño completo (1256 pb). Dichas bandas se observan en los carriles número: 106, 149, 158 y 171 (continuación Figura 20).

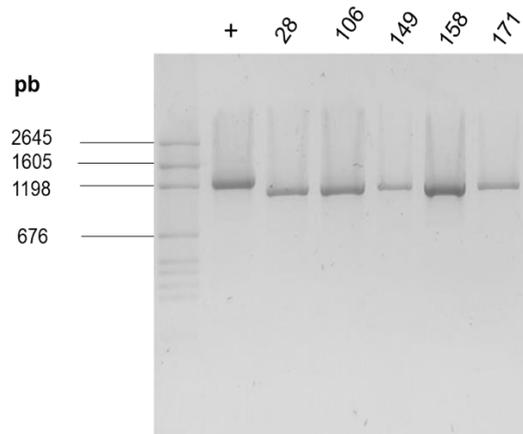


Figura 22. Análisis de la expresión de fragmentos de menor tamaño presentes en células PC12 no diferenciadas. Las colonias #28, 106, 149, 158 y 171, expresan fragmentos de menor tamaño, los cuales fueron analizados mediante PCR. El primer carril es el control positivo (fragmento de Dp40 silvestre), en los demás carriles se muestran las bandas con un menor tamaño en comparación con el control positivo correspondientes a las colonias analizadas, cuyo tamaño oscila en menos de 1198 pb

	Exón 1	Exón 63	
Dp40wt	CATGAGGGAACACCTCAAAGG	CCACGAGACCCAAACAACCTTGTGGGACCATCCCAAAAT	180
Clona 28	CATGAGGGAACACCTCAAAGG	CCACGAGACCCAAACAACCTTGTGGGACCATCCCAAAAT	176
Clona 106	CATGAGGGAACACCTCAAAGG	CCACGAGACCCAAACAACCTTGTGGGACCATCCCAAAAT	164
Clona 149	CATGAGGGAACACCTCAAAGG	CCACGAGACCCAAACAACCTTGTGGGACCATCCCAAAAT	170
Clona 158	CATGAGGGAACACCTCAAAGG	CCACGAGACCCAAACAACCTTGTGGGACCATCCCAAAAT	170
Clona 171	CATGAGGGAACACCTCAAAGG	CCACGAGACCCAAACAACCTTGTGGGACCATCCCAAAAT	167

	Exón 64		
Dp40wt	GACAGAGCTCTACCAGTCTTTAG	CTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGAC	240
Clona 28	GACAGAGCTCTACCAGTCTTTAG	CTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGAC	236
Clona 106	GACAGAGCTCTACCAGTCTTTAG	CTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGAC	224
Clona 149	GACAGAGCTCTACCAGTCTTTAG	CTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGAC	230
Clona 158	GACAGAGCTCTACCAGTCTTTAG	CTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGAC	230
Clona 171	GACAGAGCTCTACCAGTCTTTAG	CTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGAC	227

	Exón 65		
Dp40wt	TGCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCT	TGGATCTCTTGAGCCTGTCAGC	300
Clona 28	TGCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCT	TGGATCTCTTGAGCCTGTCAGC	296
Clona 106	TGCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCT	TGGATCTCTTGAGCCTGTCAGC	284
Clona 149	TGCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCT	TGGATCTCTTGAGCCTGTCAGC	290
Clona 158	TGCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCT	TGGATCTCTTGAGCCTGTCAGC	290
Clona 171	TGCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCT	TGGATCTCTTGAGCCTGTCAGC	287

Dp40wt	TGCATGTGACGCCTTGGACCAGCACAACCTCAAGCAAATGATCAGCCCATGGATATCCT		360
Clona 28	TGCATGTGACGCCTTGGACCAGCACAACCTCAAGCAAATGATCAGCCCATGGATATCCT		356
Clona 106	TGCATGTGACGCCTTGGACCAGCACAACCTCAAGCAAATGATCAGCCCATGGATATCCT		344
Clona 149	TGCATGTGACGCCTTGGACCAGCACAACCTCAAGCAAATGATCAGCCCATGGATATCCT		350
Clona 158	TGCATGTGACGCCTTGGACCAGCACAACCTCAAGCAAATGATCAGCCCATGGATATCCT		350
Clona 171	TGCATGTGACGCCTTGGACCAGCACAACCTCAAGCAAATGATCAGCCCATGGATATCCT		347

Dp40wt	GCAGATAATTAACCTGTTTGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACAACAATTT		420
Clona 28	GCAGATAATTAACCTGTTTGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACAACAATTT		416
Clona 106	GCAGATAATTAACCTGTTTGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACAACAATTT		404
Clona 149	GCAGATAATTAACCTGTTTGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACAACAATTT		410
Clona 158	GCAGATAATTAACCTGTTTGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACAACAATTT		410
Clona 171	GCAGATAATTAACCTGTTTGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACAACAATTT		407

Dp40wt	GGTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATAC		480
Clona 28	GGTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATAC		476
Clona 106	GGTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATAC		464
Clona 149	GGTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATAC		470
Clona 158	GGTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATAC		470
Clona 171	GGTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATAC		467

	Exón 66		
Dp40wt	GGGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCTCTTTTAAAACCTGGCATCATTTCTCTGTGTAA		540
Clona 28	GGGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCTCTTTTAAAACCTGGCATCATTTCTCTGTGTAA		536
Clona 106	GGGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCTCTTTTAAAACCTGGCATCATTTCTCTGTGTAA		524
Clona 149	GGGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCTCTTTTAAAACCTGGCATCATTTCTCTGTGTAA		530
Clona 158	GGGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCTCTTTTAAAACCTGGCATCATTTCTCTGTGTAA		530
Clona 171	GGGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCTCTTTTAAAACCTGGCATCATTTCTCTGTGTAA		527

	Exón 67		
Dp40wt	AGCACACTTGAAGACAAGTACAGAT	ACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGGCTT	600
Clona 28	AGCACACTTGAAGACAAGTACAGAT	ACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGGCTT	596
Clona 106	AGCACACTTGAAGACAAGTACAGAT	ACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGGCTT	584
Clona 149	AGCACACTTGAAGACAAGTACAGAT	ACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGGCTT	590
Clona 158	AGCACACTTGAAGACAAGTACAGAT	ACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGGCTT	590
Clona 171	AGCACACTTGAAGACAAGTACAGAT	ACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGGCTT	587

Dp40wt TTGTGACCAGCGTAGACTGGGTCTTCTTCTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTT 660
 Clona 28 TTGTGACCAGCGTAGACTGGGTCTTCTTCTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTT 656
 Clona 106 TTGTGACCAGCGTAGACTGGGTCTTCTTCTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTT 644
 Clona 149 TTGTGACCAGCGTAGACTGGGTCTTCTTCTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTT 650
 Clona 158 TTGTGACCAGCGTAGACTGGGTCTTCTTCTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTT 650
 Clona 171 TTGTGACCAGCGTAGACTGGGTCTTCTTCTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTT 647

Dp40wt GGGTGAAGTTGCCTCCTTTGGGGGCAGTAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTTCCA 720
 Clona 28 GGGTGAAGTTGCCTCCTTTGGGGGCAGTAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTTCCA 716
 Clona 106 GGGTGAAGTTGCCTCCTTTGGGGGCAGTAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTTCCA 704
 Clona 149 GGGTGAAGTTGCCTCCTTTGGGGGCAGTAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTTCCA 710
 Clona 158 GGGTGAAGTTGCCTCCTTTGGGGGCAGTAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTTCCA 710
 Clona 171 GGGTGAAGTTGCCTCCTTTGGGGGCAGTAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTTCCA 707

Exón 68

Dp40wt GTTTGCCAATAATAAACCTGAGATTGAAGCCGCTCTTCTTCTGACTGGATGCGTCTGGA 780
 Clona 28 GTTTG----- 721
 Clona 106 GTTTG----- 709
 Clona 149 GTTTG----- 715
 Clona 158 GTTTG----- 715
 Clona 171 GTTTG----- 712

Dp40wt ACCCCAGTCTATGGTGTGGCTGCCGGTCTTGCACAGAGTGGCTGCTGCTGAAACAGCCAA 840
 Clona 28 ----- 721
 Clona 106 ----- 709
 Clona 149 ----- 715
 Clona 158 ----- 715
 Clona 171 ----- 712

Exón 69

Dp40wt GCATCAGGCCAAGTGTAAACATCTGTAAGGAGTGCCAATCATTGGATTGAGTTACAGAAG 900
 Clona 28 -----TACAGAAG 729
 Clona 106 -----TACAGAAG 717
 Clona 149 -----TACAGAAG 723
 Clona 158 -----TACAGAAG 723
 Clona 171 -----TACAGAAG 720

Dp40wt CCTGAAACACTTTAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTAA 960
 Clona 28 CCTGAAACACTTTAAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTAA 789
 Clona 106 CCTGAAACACTTTAAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTAA 777
 Clona 149 CCTGAAACACTTTAAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTAA 783
 Clona 158 CCTGAAACACTTTAAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTAA 783
 Clona 171 CCTGAAACACTTTAAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTAA 780

Exón 70

Dp40wt GGGCCATAAAATGCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATCTGGAGAAGA 1020
 Clona 28 GGGCCATAAAATGCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATCTGGAGAAGA 849
 Clona 106 GGGCCATAAAATGCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATCTGGAGAAGA 837
 Clona 149 GGGCCATAAAATGCAC-ACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATCTGGAGAAGA 842
 Clona 158 GGGCCATAAAATGCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATCTGGAGAAGA 843
 Clona 171 GGGCCATAAAATGCAC-ACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATCTGGAGAAGA 839

Dp40wt TGTTTCGTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAAACAAATTTGGAACCAAAGGTATTTTGCAGAA 1080
 Clona 28 TGTTTCGTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAAACAAATTTGGAACCAAAGGTATTTTGCAGAA 909
 Clona 106 TGTTTCGTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAAACAAATTTGGAACCAAAGGTATTTTGCAGAA 897
 Clona 149 TGTTTCGTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAAACAAATTTGGAACCAAAGGTATTTTGCAGAA 902
 Clona 158 TGTTTCGTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAAACAAATTTGGAACCAAAGGTATTTTGCAGAA 903
 Clona 171 TGTTTCGTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAAACAAATTTGGAACCAAAGGTATTTTGCAGAA 899

Dp40wt	GCATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAAAC	1140
Clona 28	GCATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAAAC	969
Clona 106	GCATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAAAC	957
Clona 149	GCATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAAAC	962
Clona 158	GCATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAAAC	963
Clona 171	GCATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAAAC	959

	3' UTR	
Dp40wt	GTGAGTAGTGGCAAAGCAAAGCAAACCTTTAAACTTTCATTTGCTATATCCTTGGACCCC	1200
Clona 28	GTGAGTAGTGGCAAAGCAAAGCAAACCTTTAAACTTTCATTTGCTATATCCTTGGACCCC	1029
Clona 106	GTGAGTAGTGGCAAAGCAAAGCAAACCTTTAAACTTTCATTGAC-ATATCCTTGGACCCC	1016
Clona 149	GTGAGTAGTGGCAAAGCAAAGCAAACCTTTAAACTTTCATTGAT-ATATCCTTGGACCCC	1021
Clona 158	GTGAGTAGTGGCAAAGCAAAGCAAACCTATAAACAAACATTTCAT--ATAT-CCAGGACCCC	1020
Clona 171	GTGAGTAGTGGCAAAGCAAAGCAAACCTTTAAACTTTCATTGCTAATCCT---GGACCCC	1015
	***** ** * * * * *	
Dp40wt	CTCCCAACCAAAAAACCGTCCTTCGCTCTCAAATGCAAACAGTCTCCTAAGCTCCT	1256
Clona 28	CTCCCAA-----	1036
Clona 106	CTCCCAACCAAAAAACCGTTCCGTTTCCTAA-----	1047
Clona 149	CTCCCAACCAAAAAACCGTCATCGTTTC-----	1049
Clona 158	GCCCAACCAAAAAACCGTCCTCGGCTAT-----	1049
Clona 171	CCCCAACCAAAAAACCGCCTCGCTTCAACGTCTCA-----	1051

Figura 23. Alineamiento de las secuencias del cDNA de las clonas #28, 106, 149, 158 y 171. Los amplificados de Dp40 de las células PC12 no diferenciadas fueron tratados como se indica en materiales y métodos. Las colonias de *E. coli* DH5 α transformadas fueron analizadas mediante un ensayo de PCR utilizando los iniciadores 5'UTR-Dp71 y 3'UTR-Dp40. Se identificaron cinco clonas (#28, 106, 149, 158 y 171) con productos de amplificación de menor tamaño en comparación con el amplificado de Dp40 silvestre, los cuales fueron secuenciados. Se muestran las secuencias a partir del exón 1 hasta la región 3'UTR de Dp40. Los exones 63 al 70 que codifican a Dp40 están señalizados con diferentes colores, los asteriscos debajo de las secuencias señalan la posición de las bases con 100% de identidad en las cinco clonas. La línea de color negro indica el codón de paro de las cinco clonas y la línea de color rojo señala la localización del codón de paro correspondiente a Dp40 silvestre.

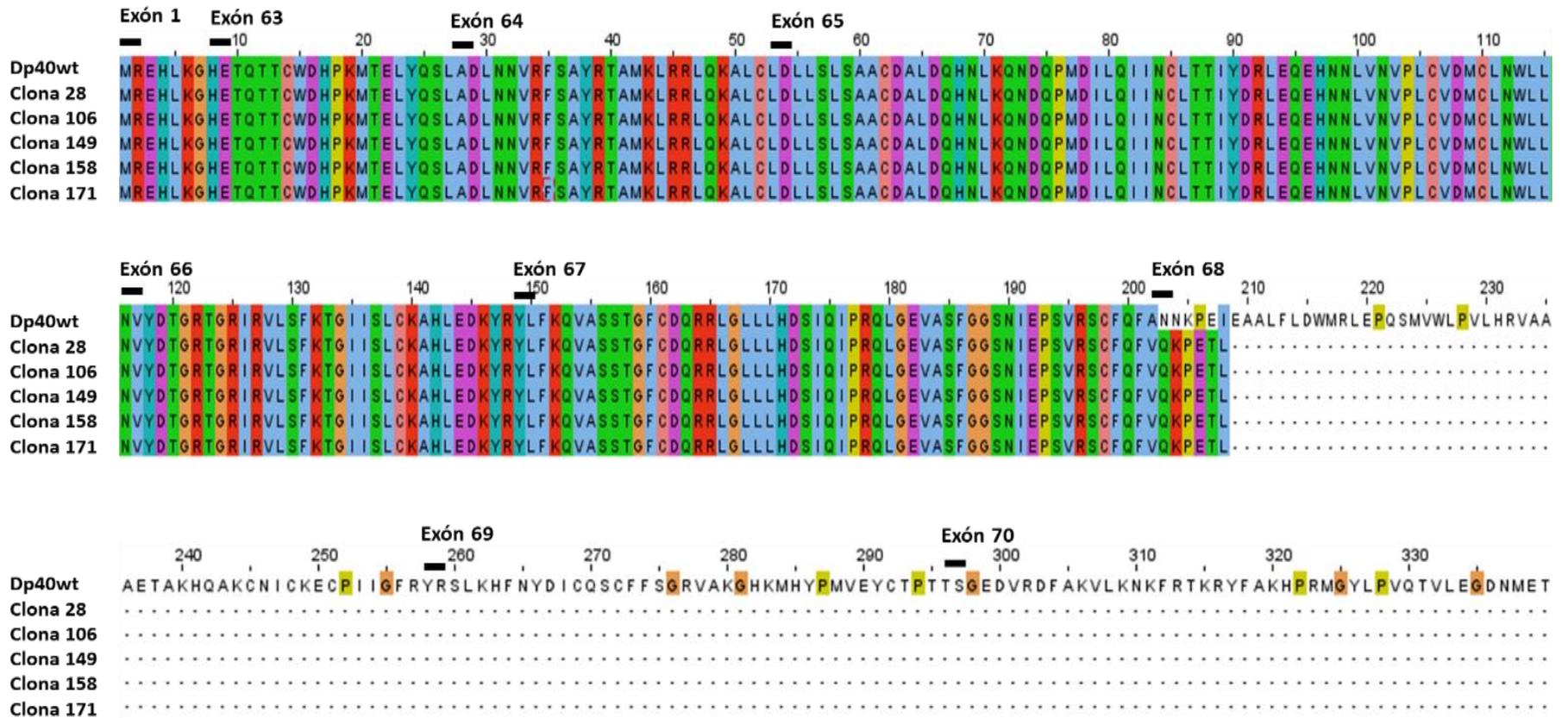
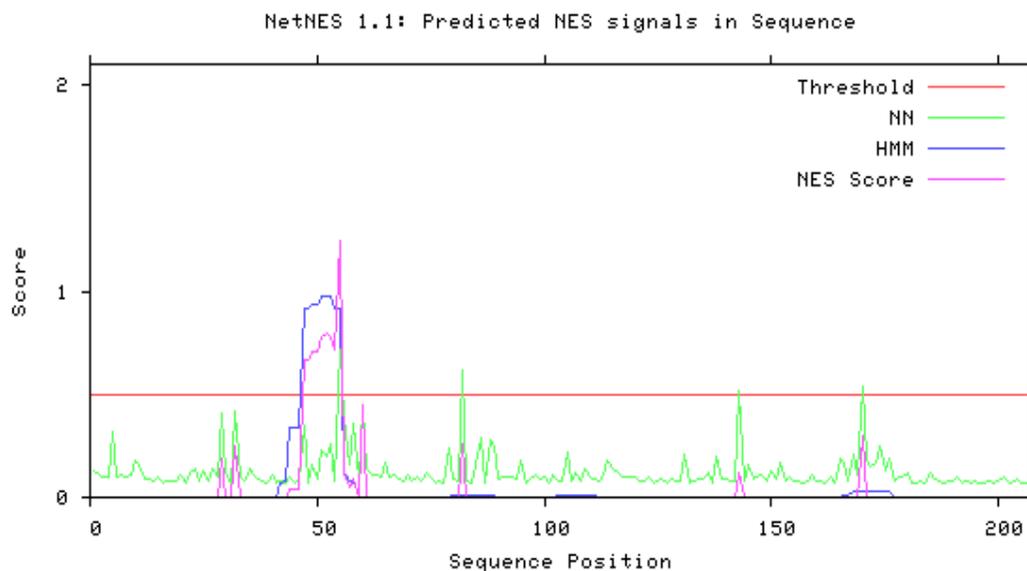


Figura 24. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las clonas #28, 106, 149, 158 y 171. Se realizó una traducción *in silico* de las secuencias de nucleótidos de las clonas #28, 106, 149, 158 y 171, que corresponden a la nueva isoforma Dp40 Δ 68. Las secuencias de aminoácidos obtenidos fueron alineadas mediante el programa Clustal Omega y visualizadas mediante el programa Jalview. Las secuencias de las cinco clonas fueron comparadas con la secuencia completa de Dp40 silvestre (GenBank: KF154977.1), observando así que carecen del exón 68, por lo que se genera una proteína de 208 aminoácidos. En la parte superior de las secuencias se encuentra señalado la ubicación de los exones.

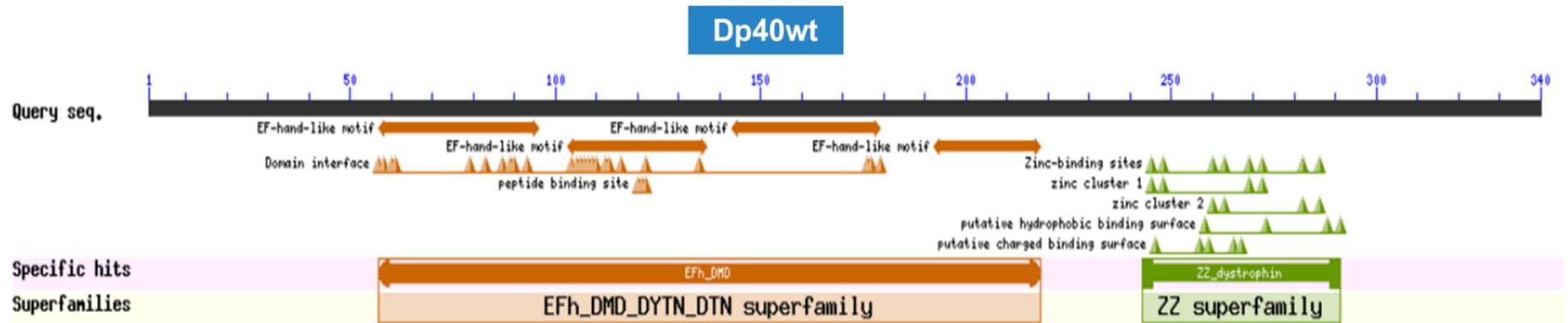
Para predecir la localización subcelular de esta isoforma, su secuencia de aminoácidos se analizó mediante el software PSORT II, resultando así que esta proteína presentaba un 65.2% de probabilidad de tener una localización nuclear en la célula. Debido a su posible localización subcelular, se llevó a cabo un análisis para la identificación de señales de exportación nuclear, utilizando el servidor NetNES 1.1, y de acuerdo a este análisis se encontró que los aminoácidos ⁴⁷LQKALCLDL⁵⁵ podrían funcionar como una secuencia NES (Figura 25). La delección del exón 68 que presenta esta isoforma no modifica la secuencia NES, debido a que los aminoácidos que la constituyen se encuentran ubicados en el exón 64 el cual está completo.



#Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
Sequence-47-L	0.347	0.920	0.672	Yes
Sequence-48-Q	0.074	0.920	0.670	Yes
Sequence-49-K	0.164	0.939	0.707	Yes
Sequence-50-A	0.085	0.939	0.704	Yes
Sequence-51-L	0.224	0.979	0.774	Yes
Sequence-52-C	0.198	0.977	0.795	Yes
Sequence-53-L	0.256	0.977	0.778	Yes
Sequence-54-D	0.080	0.917	0.719	Yes
Sequence-55-L	0.725	0.917	1.246	Yes

Figura 25. Predicción de señales de exportación nuclear de la isoforma Dp40 Δ 68. Se realizó el análisis de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la isoforma Dp40 Δ 68 mediante el servidor NetNES 1.1. Se identificó una señal de exportación de nuclear (NES) en los aminoácidos ⁴⁷LQKALCLDL⁵⁵. ANN, NeuralNetwork; HMM, HiddenMarkovModel.

También se realizó la búsqueda de los dominios conservados de la isoforma Dp40 Δ 68 utilizando la plataforma de NCBI. La Figura 26 muestra el esquema que ejemplifica los dominios conservados correspondientes a la Dp40 silvestre y la isoforma Dp40 Δ 68, con lo cual se observa que la isoforma mantiene los dominios EF-hand, pero la delección del exón 68 generan la pérdida del dominio ZZ.



Clonas 28, 106, 149, 158, 171 (Isoforma Dp40Δ68)



Figura 26. Dominios conservados en la isoforma Dp40 Δ 68. Posterior a la traducción *in silico* de las secuencias de nucleótidos, las secuencias de aminoácidos obtenidas para las cinco clonas (#28, 106, 149, 158, 171), de la isoforma Dp40 Δ 68, fueron analizadas en la plataforma de NCBI para la búsqueda de dominios conservados. En la parte superior de la imagen se observan los dominios de EF-hand y ZZ presentes en la distrofina Dp40 silvestre y en la parte inferior se observan los dominios presentes en la isoforma Dp40 Δ 68, que mantiene los dominios EF-hand, pero carece del dominio ZZ.

8.4.4. Isoformas de Dp40 expresadas en células PC12 diferenciadas

Por otra parte, los amplificadores de Dp40 de las células diferenciadas, se analizaron en experimentos por duplicado siguiendo la misma estrategia descrita para las células no diferenciadas. En el experimento #1, se analizaron un total de 104 colonias transformadas, de las cuales se obtuvieron 40 colonias positivas para el fragmento de Dp40, con un tamaño de 1256 pb, lo que indica que 38.5% de las células contienen el inserto de Dp40. Mientras, que para el experimento #2, se analizaron 101 colonias resultantes de la transformación, de las cuales se obtuvieron un total de 83 colonias positivas, es decir 82% de las células contienen el inserto de Dp40, en ambos experimentos se obtuvieron un total de 123 colonias positivas. Interesantemente en el experimento #1, en el carril número 68 se observa una banda que presenta un menor tamaño en comparación con el fragmento completo, ya que se observa la banda en una posición por debajo de 1198 pb (Figura 27). Aunado a lo anterior, en el experimento #2, en el carril número 35 se observa una banda con un tamaño de alrededor de 676 pb, ambos resultados sugieren la presencia de isoformas de Dp40 para las células diferenciadas (Figura 28).

a) Experimento 1

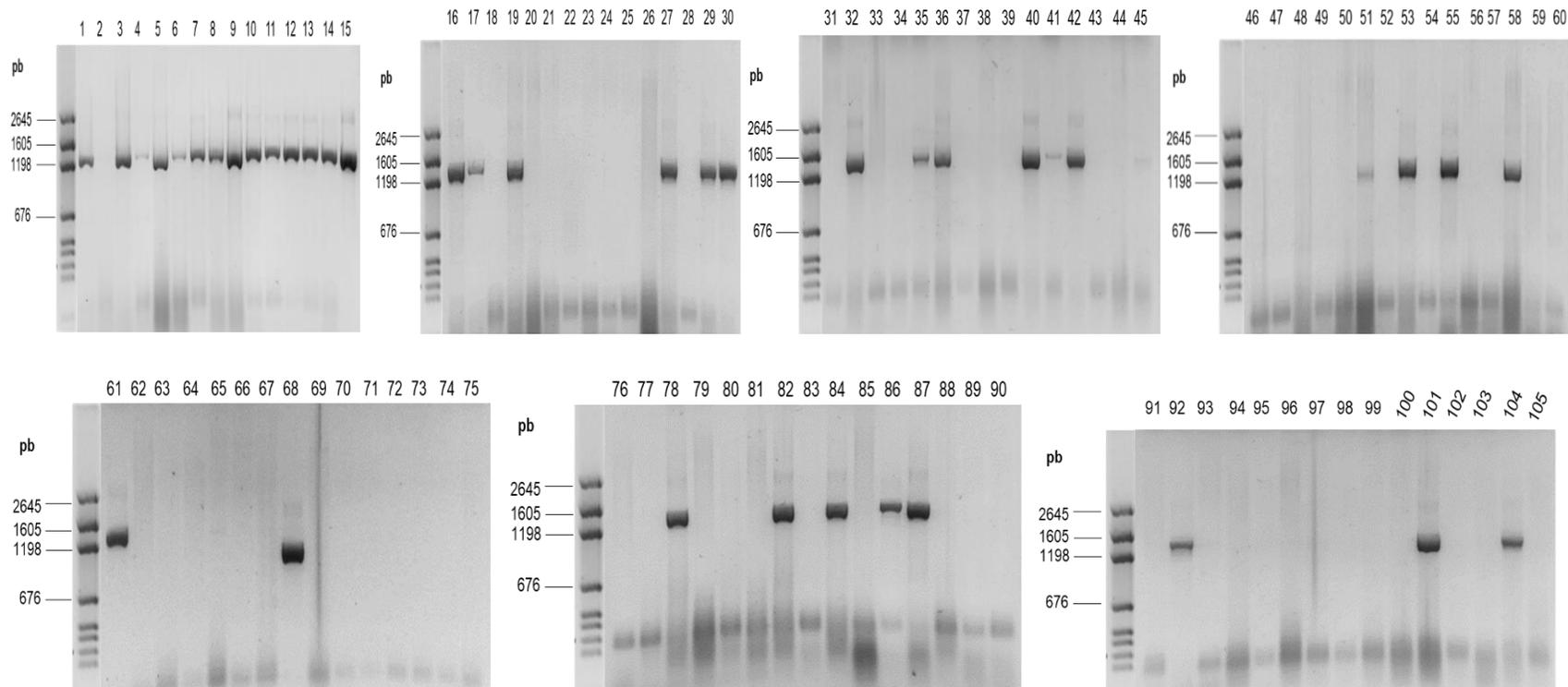


Figura 27. Análisis de 40 clones positivos de Dp40 de las células PC12 diferenciadas (T12). El amplificado de Dp40 de las células PC12 diferenciadas, se ligó al vector pGEM-T Easy, y se transformó en bacterias competentes de *Escherichia coli* DH5 α , este análisis se realizó por duplicado. Se analizaron mediante PCR, utilizando los iniciadores 5' UTR-Dp71 y 3' UTR-Dp40. a) Experimento 1. El carril 15 corresponde al control positivo, que corresponde al fragmento Dp40 silvestre con un tamaño de 1256 pb. Se analizaron 104 colonias transformantes, de las cuales se obtuvo un total de 40 colonias positivas para Dp40. Los productos de las PCR se compararon con el marcador, identificando así una banda que presentan un menor tamaño en comparación con el DNA completo (1256 pb). Dicha banda se observa en el carril número 68, con un tamaño aproximado menor a 1198 pb.

b) Experimento 2.

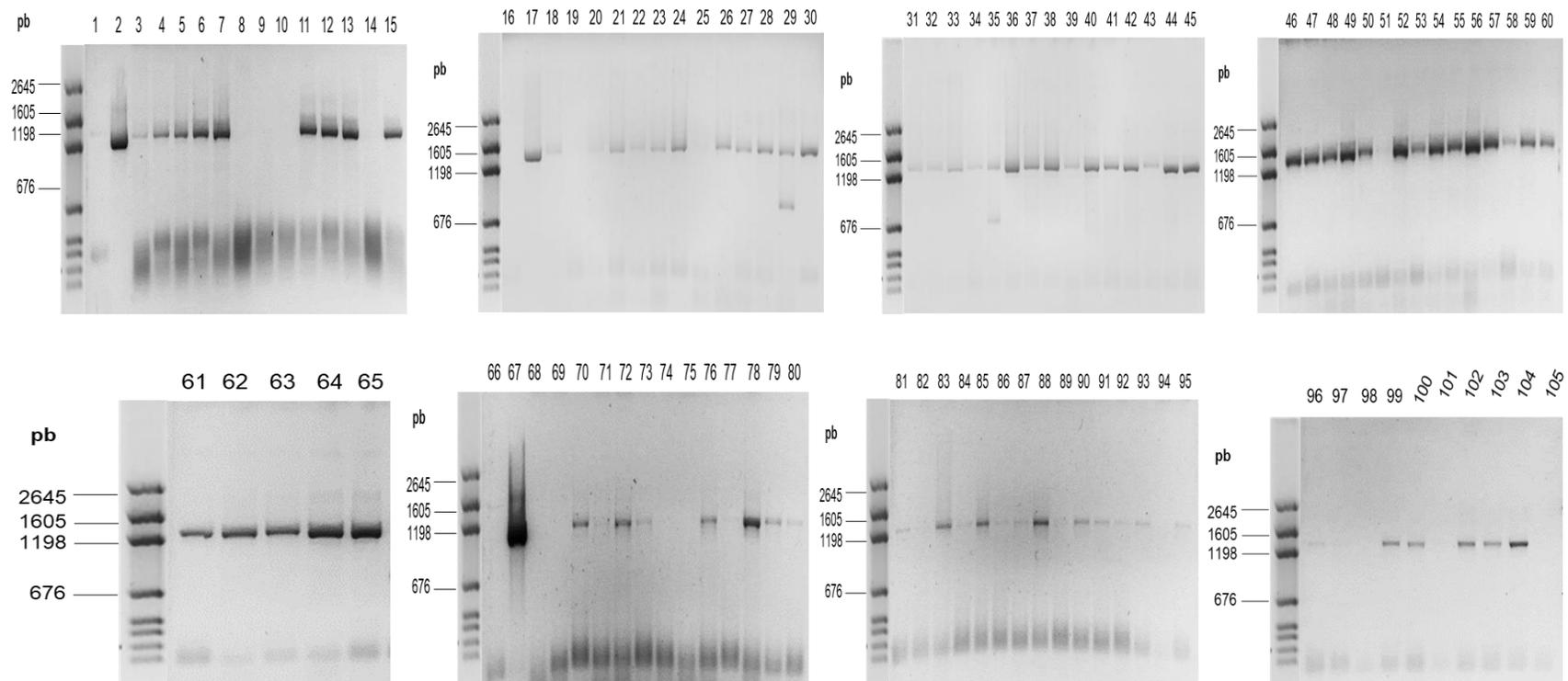


Figura 28. Análisis de 83 clonas positivas de Dp40 de las células PC12 diferenciadas (T12). El amplificado de Dp40 de las células PC12 diferenciadas, se ligó al vector pGEM-T Easy, y se transformó en bacterias competentes de *Escherichia coli* DH5 α , este análisis se realizó por duplicado. Se analizaron mediante PCR, utilizando los iniciadores 5' UTR-Dp71 y 3' UTR-Dp40. b) Experimento 2. El carril 1 y 16 corresponden al control negativo, carril 2 y 17 son el control positivo, que corresponden al fragmento Dp40 silvestre con un tamaño de 1256 pb. Se analizaron 101 colonias transformantes, de las cuales se obtuvo un total de 83 colonias positivas para Dp40. Los productos de las PCR se compararon con el marcador, identificando así una banda que presentan un menor tamaño en comparación con el transcrito completo (1256 pb). Dicha banda se observa en el carril número 35, con un tamaño aproximado de 676 pb.

En la Figura 29, se muestran las colonias que presentan un menor tamaño de banda al realizar una comparación con el control positivo (distrofina Dp40 silvestre).

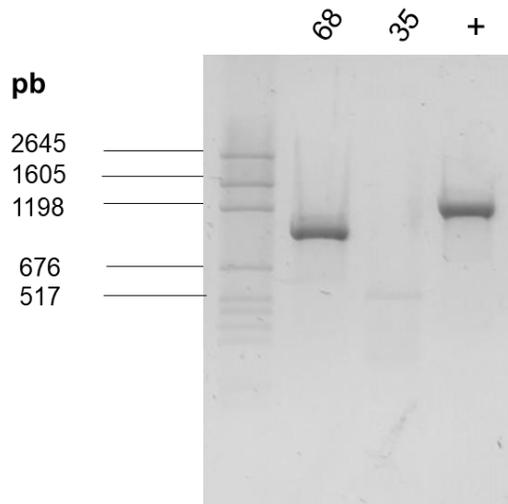


Figura 29. Análisis de la expresión de fragmentos de menor tamaño presentes en células PC12 diferenciadas. En los primeros dos carriles se muestran las bandas correspondientes a las colonias #68 y 35, las cuales fueron analizadas mediante PCR. El tercer carril es el control positivo (fragmento de Dp40 silvestre). Las bandas correspondientes a ambas colonias presentan un fragmento de menor tamaño en comparación con el control positivo. La banda de la colonia número 68 presenta un tamaño menor a 1198 pb, mientras que la colonia número 35 es la única que se observa con un tamaño de 517 pb.

Con la finalidad de confirmar que las bandas de las clonas 35 y 68 correspondían a alguna isoforma de Dp40, se aislaron estas colonias y se les extrajo DNA plasmídico, el cual fue utilizado para llevar a cabo reacciones de secuenciación. Como resultado del análisis de secuenciación se obtuvieron que ambas clonas presentan diferentes tamaños: la clona #35 corresponde a 759 pb y la clona #68 tiene un fragmento de 919 pb. Después de realizar el alineamiento de las secuencias de nucleótidos mediante el programa Clustal Omega se puede observar en la Figura 30 la clona 35, la cual presenta sólo una parte del exón 67 (47 nucleótidos), y no contiene los exones 68 al 70. La secuencia posterior al exón 67 y que no corresponde a Dp40, contiene después de los primeros 17 nucleótidos un

codón de paro que evita la traducción del resto de la secuencia. A esta nueva isoforma se le denominó Dp40 Δ p67-70.

	Exón 1	Exón 63	
Dp40wt	CATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACGAGACCCAAACAACCTTGTGGGACCATCCCAAAAT		180
Clona 35	CATGAGGGAACACCTCATAGGCCACGAGACCCAAACAACCTTGTGGGACCATCCCAAAAT		165

		Exón 64	
Dp40wt	GACAGAGCTCTACCAGTCTTTAG	CTGACCTGAATAATGTCAGGTCTCCGCTTATAGGAC	240
Clona 35	GACAGAGCTCTACCAGTCTTTAG	CTGACCTGAATAATGTCAGGTCTCCGCTTATAGGAC	225

		Exón 65	
Dp40wt	TGCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCT	TGGATCTCTTGAGCCTGTCAGC	300
Clona 35	TGCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCT	TGGATCTCTTGAGCCTGTCAGC	285

Dp40wt	TGCATGTGACGCCCTGGACCAGCACAACCTCAAGCAAAATGATCAGCCCATGGATATCCT		360
Clona 35	TGCATGTGACGCCCTGGACCAGCACAACCTCAAGCAAAATGATCAGCCCATGGATATCCT		345

Dp40wt	GCAGATAATTAACCTGTTTACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACACAATTT		420
Clona 35	GCAGATAATTAACCTGTTTACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACACAATTT		405

Dp40wt	GGTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATAC		480
Clona 35	GGTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATAC		465

		Exón 66	
Dp40wt	GGGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCTTTTAAACTGGCATCATTTCTCTGTGTAA		540
Clona 35	GGGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCTTTTAAACTGGCATCATTTCTCTGTGTAA		525

		Exón 67	
Dp40wt	AGCACACTTGGAGACAAGTACAGAT	ACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGGCTT	600
Clona 35	AGCACACTTGGAGACAAGTACAGAT	ACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGGCTT	585

Dp40wt	TTGTGACCAGCGTAGACTGGGCTTCTTCTGTCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTT		660
Clona 35	TTGTGACC	CCAAAAAAGTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATA	645

Dp40wt	GGGTGAAGTTGCCTCCTTTGGGGCAGTAACATGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTCC		719
Clona 35	GACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTATAGTGGACTCTGTTCCA		704

		Exón 68	
Dp40wt	AGTTT	GCCAATAATAAACCTGAGATGAAGCCGCTCTCTTCCCTGACTGGATGCGTCTGG	779
Clona 35	ACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAGGGATTTT		

Dp40wt	AACCCAGTCTATGGTGTGGCTGCCGCTTGCACAGAGTGGCTGCTGCTGAAACAGCCA		839
Clona 35	-----		759
		Exón 69	
Dp40wt	AGCATCAGGCCAAGTGTAACATCTGTAAGGAGTGCCAATCATGGATTACAGTACAGAA		899
Clona 35	-----		759
Dp40wt	GCCTGAAACACTTTAATTATGACATCTGCCAAGCTGCTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTA		959
Clona 35	-----		759
		Exón 70	
Dp40wt	AGGGCCATAAAATGCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCG	ACTACATCTGGAGAAG	1019
Clona 35	-----		759

Dp40wt	ATGTTTCGTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAAACAATTCGAACCAAAGGTATTTGCGA	1079
Clona 35	-----	759
Dp40wt	AGCATCCCCGAATGGGCTACCTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAAA	1139
Clona 35	-----	759
	3'UTR	
Dp40wt	CGTGAGTAGTGGCAAAGCAAAGCAAACCTTTAAACTTTCATTTGCTATATCCTTGGACCC	1199
Clona 35	-----	759
Dp40wt	CCTCCCAACCAAAAAACCGTCCTTCGCTCTCAAATGCAAACAGTCTCCTAAGCTCCT	1256
Clona 35	-----	759

Figura 30. Alineamiento de la secuencia del cDNA de la clona 35. Los amplificados de Dp40 de las células PC12 diferenciadas fueron tratados como se indica en materiales y métodos. Las colonias de *E. coli* DH5 α transformadas fueron analizadas mediante un ensayo de PCR utilizando los iniciadores 5'UTR-Dp71 y 3'UTR-Dp40. Se identificó la clona 35 que presentaba un producto de amplificación de menor tamaño en comparación con el amplificado de Dp40 silvestre, el cual fue secuenciado. Se muestran las secuencias a partir del exón 1 hasta la región 3'UTR de Dp40. Los exones 63 hasta el 70 que codifican a Dp40 están señalizados con diferentes colores, y los asteriscos debajo de las secuencias señalan la posición de las bases con 100% de identidad. Con una línea de color negro se indica la secuencia de 166 nucleótidos que no presenta identidad con los exones 67 y 68, además con una línea color verde se muestra la localización del codón de paro de la clona 35 y con una línea de color rojo el codón de paro correspondiente a Dp40 silvestre.

Por otra parte, en la Figura 31 se muestra el alineamiento correspondiente a la clona 68, y en este se observa que sólo presenta una parte del exón 65 (65 nucleótidos), no contiene el exón 66 y sólo la parte final del exón 67 (33 nucleótidos). A esta nueva isoforma se le denominó Dp40 $_{\Delta p65-p67}$. En el análisis del alineamiento de las secuencias se observó que la clona 35 presenta un corrimiento en el marco de lectura, cosa que no ocurre en la clona 68 en la cual la lectura del marco de lectura no se modificó a pesar de la delección.

	Exón 1	Exón 63	
Dp40wt	CATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACGAGACCCAAACAACCTTGTGGGACCATCCCAAAAT		180
Clona 68	CATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACGAGACCCAAACAACCTTGTGGGACCATCCCAAAAT		170

	Exón 64		
Dp40wt	GACAGAGCTCTACCAGTCTTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGAC		240
Clona 68	GACAGAGCTCTACCAGTCTTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGAC		230

	Exón 65		
Dp40wt	TGCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGAGCCTGTCAGC		300
Clona 68	TGCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGAGCCTGTCAGC		290

Dp40wt	TGCATGTGACGCCTTGGACCAGCACAACCTCAAGCAAATGATCAGCCCATGGATATCCT		360
Clona 68	TGCATGTGACGCCTTGGACCAGCACAACCTCAAGCAAATGAT-----		312

Dp40wt	GCAGATAATTAACCTGTTGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACAACAATTT		420
Clona 68	-----		312
Dp40wt	GGTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATAC		480
Clona 68	-----		312
	Exón 66		
Dp40wt	GGGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCTCTTTAAAACCTGGCATCATTTCTCTGTGTAA		540
Clona 68	-----		312
	Exón 67		
Dp40wt	AGCACACTTGAAGACAAGTACAGATACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGGCTT		600
Clona 68	-----		312
Dp40wt	TTGTGACCAGCGTAGACTGGGTCTTCTTCTGCATGATTCTATTCAAATCCAAGACAGTT		660
Clona 68	-----TCTATTCAAATCCAAGACAGTT		356

Dp40wt	GGGTGAAGTTGCCTCCTTTGGGGCAGTAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTTCCA		720
Clona 68	GGGTGAAGTTGCCTCCTTTGGGGCAGTAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTTCCA		416

	Exón 68		
Dp40wt	GTTTGCCAATAATAAACCTGAGATGAAGCCGCTCTTCTTCCCTTGACTGGATGCGTCTGGA		780
Clona 68	GTTTGCCAATAATAAACCTGAGATGAAGCCGCTCTTCTTCCCTTGACTGGATGCGTCTGGA		476

Dp40wt	ACCCAGTCTATGGTGTGGCTGCCGGTCTTGCACAGAGTGGCTGCTGCTGAAACAGCCAA		840
Clona 68	ACCCAGTCTATGGTGTGGCTGCCGGTCTTGCACAGAGTGGCTGCTGCTGAAACAGCCAA		536

	Exón 69		
Dp40wt	GCATCAGGCCAAGTGTAACATCTGTAAGGAGTGTCCAATCATTTGGATTACAGGTACAGAAG		900
Clona 68	GCATCAGGCCAAGTGTAACATCTGTAAGGAGTGTCCAATCATTTGGATTACAGGTACAGAAG		596

Dp40wt	CCTGAAACACTTTAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTAA		960
Clona 68	CCTGAAACACTTTAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTAA		656

	Exón 70		
Dp40wt	GGGCCATAAAATGCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATCTGGAGAAGA		1020
Clona 68	GGGCCATAAAATGCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATCTGGAGAAGA		716

Dp40wt	TGTTTCGTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAAACAAATTTCGAACCAAAAGGTATTTTTCGAA	1080
Clona 68	TGTTTCGTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAAACAAATTTCGAACCAAAAGGTATTTTTCGAA	776

Dp40wt	GCATCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAAAC	1140
Clona 68	GCATCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAAAC	836

	3' UTR	
Dp40wt	GTGAGTAGTGGCAAAAGCAAAGCAAACCTTAAACTTTCATTTGCTATATCCTTGGACCCC	1200
Clona 68	GTGAGTAGTGGCAAAAGCAAAGCAAACCTTAAACTTTCATTTGCTATATCCTTGGACCCC	892

Dp40wt	CTCCAACCAAAAAACCGTCCTTCGCTCTCAAATGCAAACAGTCTCCTAAGCTCCT	1256
Clona 68	CTCCAACCAAAAAACCGTCCTTCGCTCTCAAATGCAAACAGTCTCCTAAGTTCGA	919
	***** **	

Figura 31. Alineamiento de la secuencia del cDNA de la clona 68. Los amplificados de Dp40 de las células PC12 diferenciadas fueron tratados como se indica en materiales y métodos. Las colonias de *E. coli* DH5 α transformadas fueron analizadas mediante un ensayo de PCR utilizando los iniciadores 5'UTR-Dp71 y 3'UTR-Dp40. Se identificó la clona 68 que presentaba un producto de amplificación de menor tamaño en comparación con el amplificado de Dp40 silvestre, el cual fue secuenciado. Se muestran las secuencias a partir del exón 1 hasta la región 3'UTR de Dp40. Los exones 63 hasta el 70 que codifican a Dp40 están señalizados con diferentes colores, y los asteriscos debajo de las secuencias señalan la posición de las bases con 100% de identidad. Con una línea de color rojo se indica el codón de paro correspondiente a Dp40 silvestre y la clona 68.

Se realizó un ensayo *in silico* de la traducción de las secuencias de nucleótidos de ambas clonas utilizando el programa Clustal Omega. Como resultado se obtuvo que la isoforma Dp40 Δ p67-70 codifica para una secuencia de 167 aminoácidos. En la Figura 32, se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la clona 35 y la Dp40 silvestre, utilizando el programa Clustal Omega. En dicha imagen se observa que esta clona presenta sólo una parte del exón 67 y el resto de los exones hacia la región carboxilo terminal se eliminaron. El corrimiento en el marco de lectura generó, que posterior a los 162 aminoácidos que corresponden al exón 67, se traduzcan 5 nuevos aminoácidos de la secuencia que no presenta ninguna identidad con el resto de los exones, los cuales se encuentran localizados antes de la aparición del codón de paro prematuro, que provoca la aparición de una proteína trunca. Para la clona 68 que corresponde a la isoforma Dp40 Δ p65-p67 que se muestra en la Figura 33, se observa el alineamiento de la secuencia de aminoácidos. Esta isoforma codifica una proteína de 242 aminoácidos, e interesantemente no se observa cambio en el marco de lectura, a pesar de sólo contener una parte de los exones 65 y 67, además de carecer del exón 66.

Se hizo una predicción del peso molecular de estas isoformas mediante el programa ExPASy, con el cual se encontró que la isoforma Dp40 Δ p67-70 presentaría un peso molecular de 19.3 kDa y la isoforma Dp40 Δ p65-p67 de 27.9 kDa.

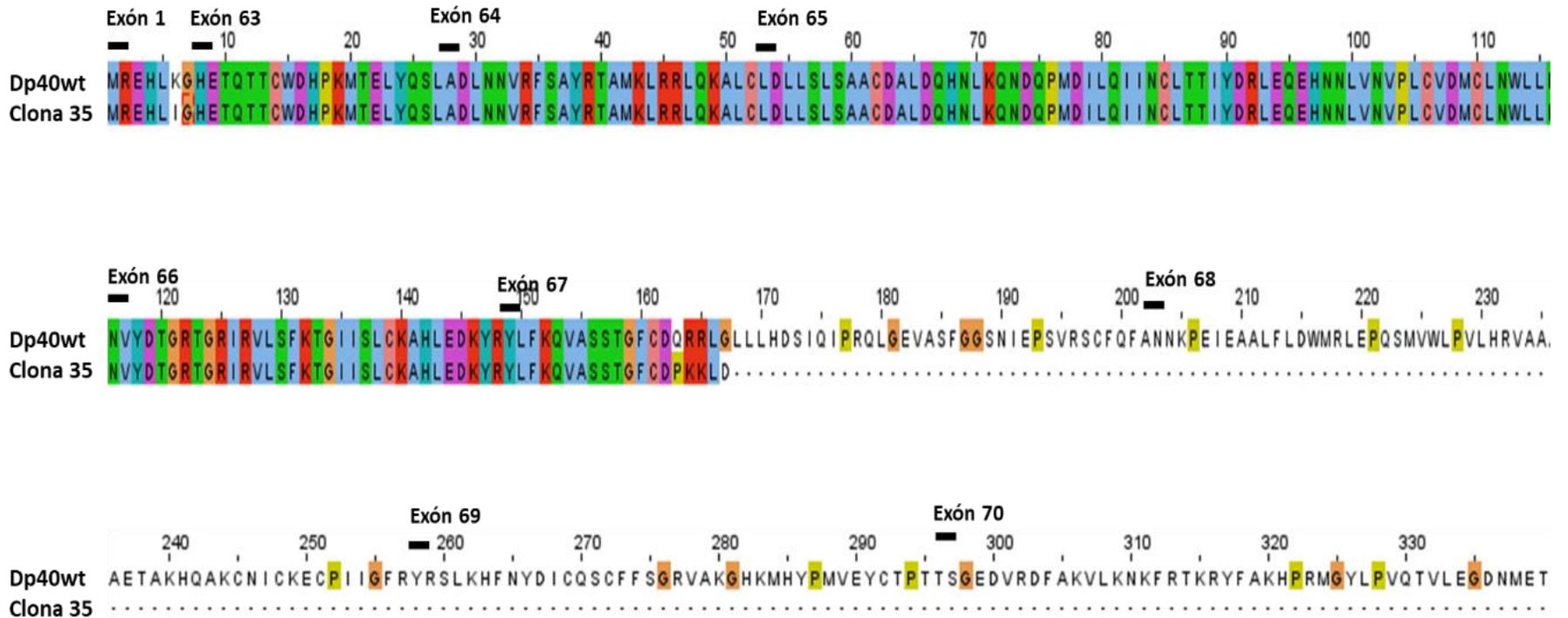


Figura 32. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la clona 35. Se realizó una traducción *in silico* de la secuencia de nucleótidos de la clona 35 que corresponde a la nueva isoforma Dp40 Δ p67-70. Las secuencias de aminoácidos obtenidos fueron alineadas mediante el programa Clustal Omega y visualizadas mediante el programa Jalview. La secuencia de esta clona fue comparada con la secuencia completa de Dp40 silvestre, observando así que se encuentra sólo una parte del exón 67 y el resto de los exones se encuentran deletados, por lo que se genera una proteína de 167 aminoácidos. En la parte superior de las secuencias se encuentra señalado la ubicación de los exones.

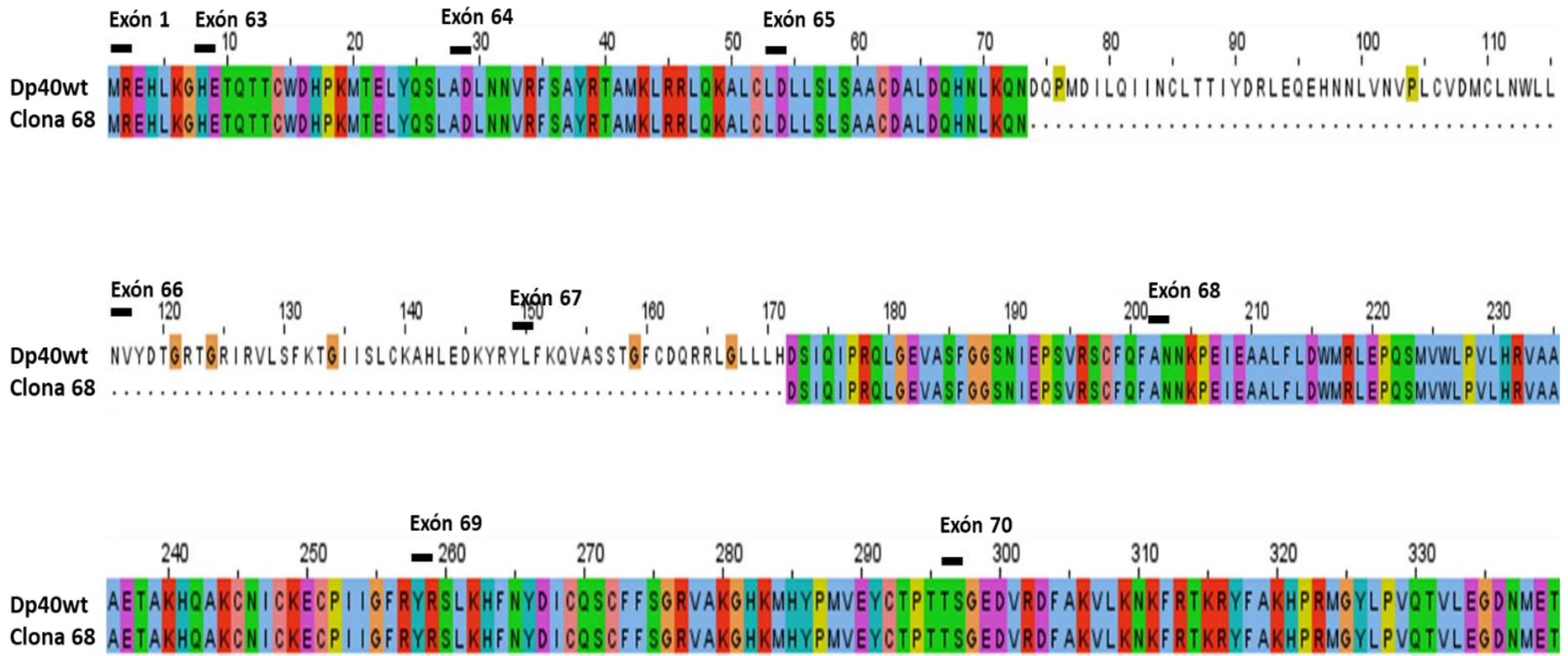
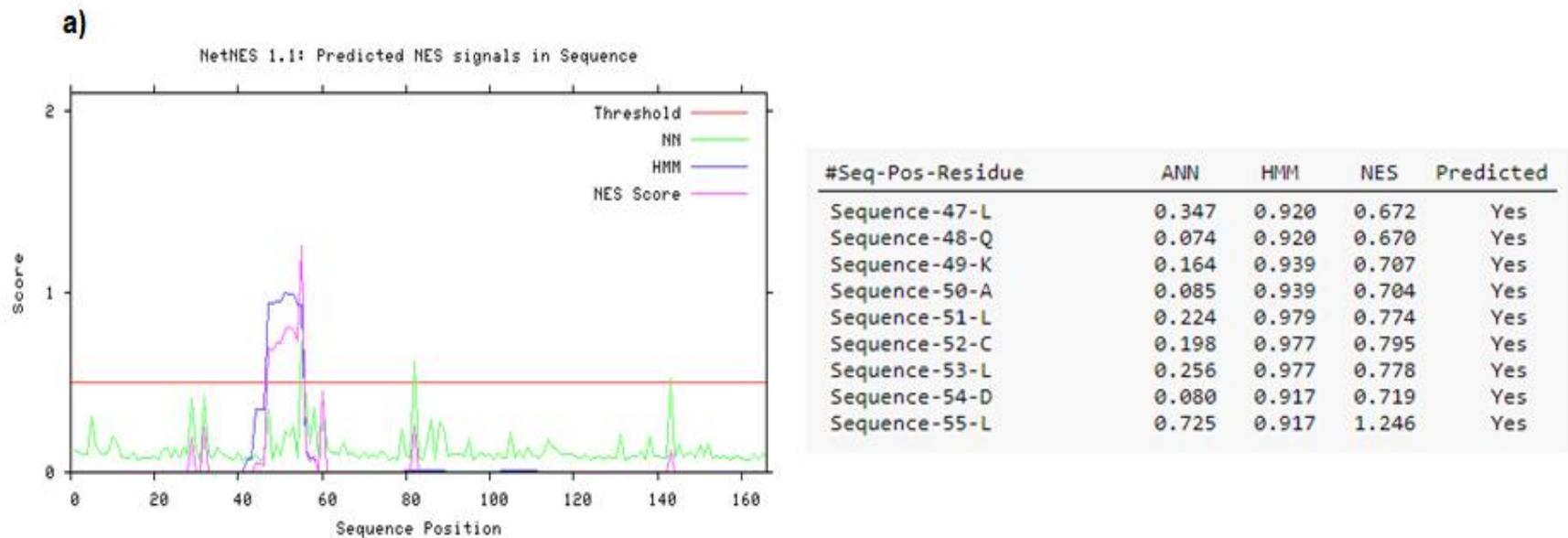


Figura 33. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la clona 68. Se realizó una traducción *in silico* de la secuencia de nucleótidos de la clona 68 que corresponde a la nueva isoforma Dp40_{Δp65-p67}. Las secuencias de aminoácidos obtenidos fueron alineadas mediante el programa Clustal Omega y visualizadas mediante el programa Jalview. La secuencia de esta clona fue comparada con la secuencia completa de Dp40 silvestre, observando así que se encuentra sólo una parte del exón 65 y 67 y el exón 66 se encuentra completamente deletado, por lo que se genera una proteína de 242 aminoácidos. En la parte superior de las secuencias se encuentra señalado la ubicación de los exones.

Para predecir la localización subcelular de las isoformas, Dp40 Δ p67-70 y Dp40 Δ p65-p67 su secuencia de aminoácidos se analizó mediante el software PSORT II, obteniéndose que ambas isoformas presentaban un porcentaje de 56.5% y 65.2% respectivamente de localización nuclear en la célula. Debido al tipo de localización subcelular que presentan las isoformas se llevó a cabo un análisis para la identificación de posibles señales de exporte nuclear en sus secuencias de aminoácidos utilizando el servidor NetNES 1.1, y de acuerdo con este análisis se encontró que los aminoácidos ⁴⁷LQKALCLDL⁵⁵ podrían funcionar como una secuencia NES en ambos casos (Figura 34).



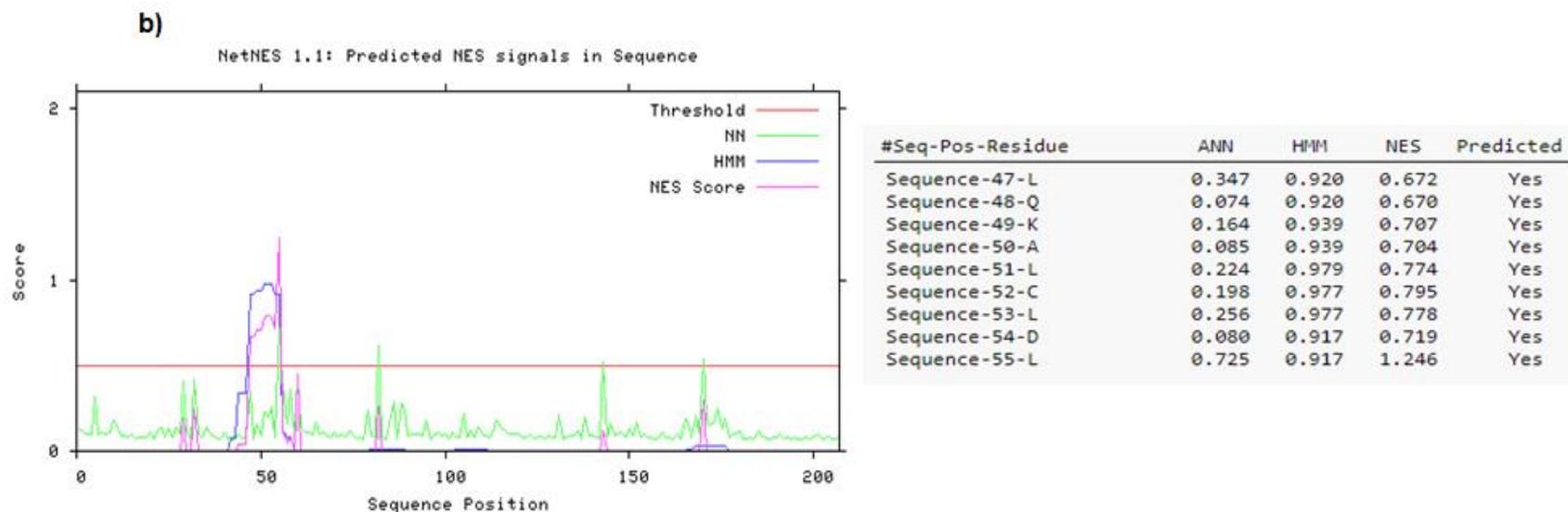


Figura 34. Predicción de señales de exportación nuclear de las isoformas Dp40 Δ p67-70 y Dp40 Δ p65-p67. Se realizó el análisis de la secuencia de aminoácidos correspondiente a las isoformas **a)** Dp40 Δ p67-70 y **b)** Dp40 Δ p65-p67 mediante el servidor Net NES 1.1. Se identificó una señal de exportación de nuclear (NES) en los aminoácidos ⁴⁷LQKALCLDL⁵⁵. ANN, NeuralNetwork; HMM, HiddenMarkovModel.

También se realizó la búsqueda de los dominios conservados de las isoformas Dp40 Δ p67-70 y Dp40 Δ p65-p67 utilizando la plataforma de NCBI. La Figura 35 muestra el esquema de los dominios conservados de la Dp40 silvestre y ambas isoformas, en el caso de la isoforma Dp40 Δ p67-70 que correspondiente a la clona 35 se observa que mantiene el dominio EF-hand pero no conserva el dominio ZZ, mientras que la isoforma Dp40 Δ p65-p67 mantiene conservados ambos dominios en su estructura, lo cual se debe a que no presenta una modificación en el marco de lectura.

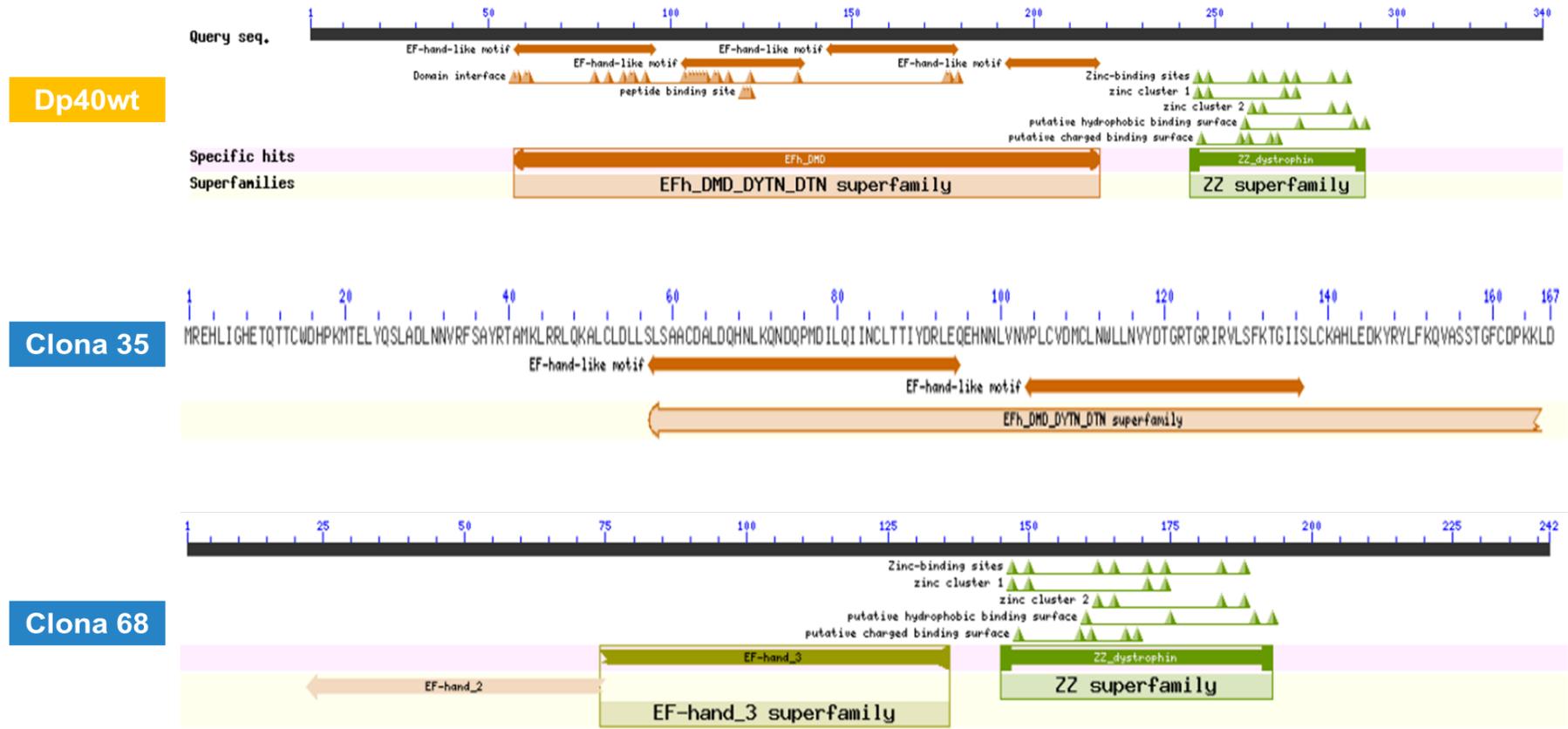


Figura 35. Dominios conservados en las isoformas Dp40 Δ p67-70 y Dp40 Δ p65-p67. Posterior a la traducción *in silico* de las secuencias de nucleótidos, las secuencias de aminoácidos obtenidas para las clonas 35 y 68 que corresponden a las isoformas Dp40 Δ p67-70 y Dp40 Δ p65-p67 respectivamente, fueron introducidas en la plataforma de NCBI con el objetivo de encontrar los dominios conservados que presentan estas isoformas. En la parte superior de la imagen se observa el esquema que ejemplifica los dominios de EF-hand y ZZ presentes en la distrofina Dp40 silvestre, seguido del esquema correspondiente a la isoforma Dp40 Δ p67-70 en el cual se observa que mantiene el dominio EF-hand, pero carece del dominio ZZ, mientras que por el contrario la isoforma Dp40 Δ p65-p67 conserva los dominios EF-hand y ZZ.

Se obtuvo el porcentaje de expresión de las diferentes isoformas, tanto para las células PC12 no diferenciadas como para las diferenciadas. En ambos casos, la distrofina Dp40 silvestre fue la más frecuente, con un porcentaje de 96.6% y 98.4% respectivamente. La isoforma Dp40 Δ p68 se expresa en las células PC12 no diferenciadas con una frecuencia del 3.4%, mientras que las isoformas Dp40 Δ p67-70 y Dp40 Δ p65-p67 se encontraron con una frecuencia del 0.8% como se puede observar en las gráficas de la Figura 36.

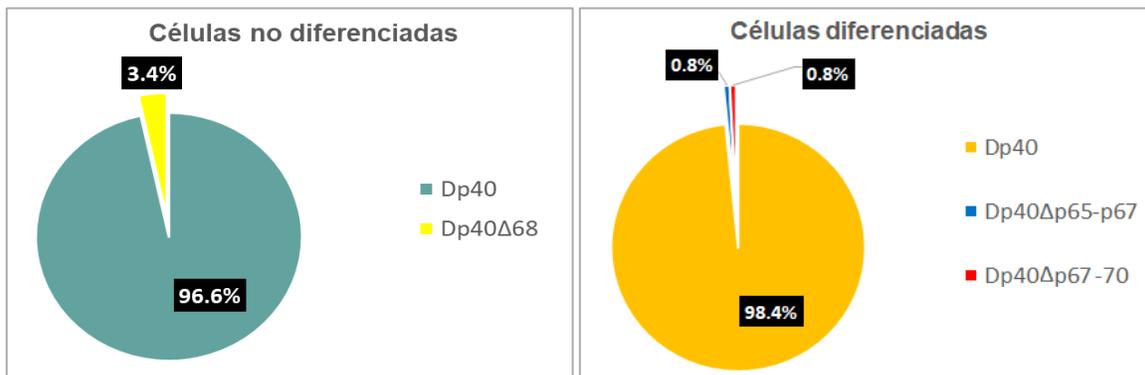


Figura 36. Frecuencia de expresión de las isoformas de Dp40 en las células PC12 no diferenciadas y diferenciadas. En la gráfica de la izquierda se observa la frecuencia de expresión de la isoforma Dp40 Δ p68 en células PC12 no diferenciadas. El 96.6% corresponde a la distrofina Dp40 silvestre y el 3.4% a la isoforma Dp40 Δ p68. En la gráfica de la derecha se observa la frecuencia de expresión de las isoformas Dp40 Δ p67-70 y Dp40 Δ p65-p67 en células PC12 diferenciadas. El 98.4% corresponde a la distrofina Dp40 silvestre y ambas isoformas Dp40 Δ p65-p67 y Dp40 Δ p67-70 el 0.8%.

La Figura 37 muestra a las tres nuevas isoformas encontradas en la línea celular PC12 no diferenciada y diferenciada, en la que se observa de manera específica cuales son los exones que se encuentran parcialmente o completamente delatados en dichas isoformas.

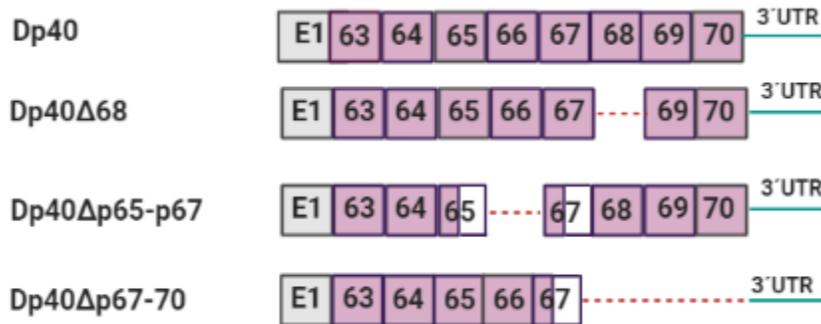


Figura 37. Isoformas de Dp40 encontradas en células PC12 no diferenciadas y diferenciadas. La distrofina Dp40 silvestre se expresa a partir del exón 1 hasta el exón 70, los cuales están representados en cuadros, los exones que se encuentran parcialmente deletados están esquematizados con cuadros mitad de color morado y mitad de color blanco y las líneas punteadas señalan la ausencia de exones. Del lado izquierdo se señala con una línea de color azul la región 3'UTR. Del lado izquierdo se indica el nombre asignado a cada isoforma.

9. DISCUSIÓN

La distrofia muscular de Duchenne, es una enfermedad causada por mutaciones en el gen que codifica la distrofina, lo que resulta en la ausencia o la disfunción de esta proteína (Naidoo, M., & Anthony, K. 2020). Además, de acuerdo a estudios previos un tercio de estos pacientes también presentan grados variables de deterioro cognitivo, que de acuerdo a ^b Daoud et al., (2009), tienen mutaciones en el exón 63-69 lo que influye directamente en la expresión de Dp40. Por ello, para poder comprender un poco acerca de la función de Dp40 en el SNC, en nuestro proyecto de investigación se decidió emplear como modelo de estudio las células PC12, para investigar sobre la expresión de isoformas de Dp40 durante el proceso de diferenciación de las células PC12.

Durante el proceso de cultivo de las células PC12, para evaluar que el crecimiento de las células fuera correcto, se contabilizó el número de células durante diferentes días generando así una curva de crecimiento (Figura 8), en la cual se observó en los primeros tres días, la fase de retraso, que se caracteriza por un lento crecimiento de las células, seguido de una fase exponencial, en la cual el aumento de la biomasa por unidad de concentración de la misma es constante (Szabados et al., 1991). Una vez, que se corroboró el correcto crecimiento y viabilidad de las células se llevó a cabo su diferenciación, empleando NGF, ya que esta línea celular responde a este factor de crecimiento deteniéndose el ciclo celular y adquiriendo un fenotipo simpático similar a las neuronas, como se observa en la Figura 9e. Además de que el tratamiento con NGF, logra una reorganización más estable del citoesqueleto por mecanismos dependientes de la síntesis de RNA (Acosta et al., 2004). Cabe destacar que estas células necesitan adherirse a una superficie antes de su diferenciación, ya que no son capaces de adherirse al plástico de la placa de cultivo (Wiatrak et al., 2020), por ello se modificó la superficie de la placa de cultivo con una cubierta de colágeno.

El crecimiento normal de esta línea celular, se caracteriza por la presencia de células redondas que crecen en pequeños grupos (Figura 9a), pero tratar las células con NGF (Figura 9c), estas sufren un cambio estructural. La reestructuración del

citoesqueleto es fundamental durante el proceso de diferenciación celular y para el crecimiento de las neuritas. Cuando se tratan a las células con el NGF, se genera la activación del receptor TrkA, lo que permite que se active la vía de los receptores acoplados a proteínas G. En esta vía, las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas heterotriméricas G interactúan con los microtúbulos celulares, lo que estimula su ensamblaje, lo que conduce finalmente al alargamiento de las neuritas (Sierra-Fonseca et al., 2014).

Además de caracterizar morfológicamente la diferenciación de las células, se confirmó este proceso mediante el empleo de diferentes marcadores de diferenciación: temprana y tardía. ERK 1/2 se empleó como un marcador de diferenciación temprana, su fosforilación forma parte de la activación de la vía de señalización. Al momento de adicionar NGF al medio de cultivo de las células a diferentes tiempos para poder realizar la extracción de proteínas (Figura 11a). La adición del NGF activa las tirosinas cinasas receptoras, generando así el inicio de una cascada de eventos de señalización que incluye la activación de varias proteínas cinasa y factores de transcripción río abajo como lo es ERK1 y ERK2, cuya activación por la fosforilación de treonina 183 y tirosina 185, le permite translocarse al núcleo, activando así la expresión de genes que conducen al crecimiento de neuritas (Halegoua et al., 1991, Dikic et al., 1994, Chang et al., 2003). Es por ello que al realizar la cuantificación de las proteínas por western blot y graficar la expresión relativa de la fosforilación (Figura 11b), se observa que el tiempo óptimo de activación de la vía de señalización fue a los 10 minutos, y posterior a este tiempo, es decir tiempos más largos hasta 6 horas su activación comienza a disminuir significativamente, lo cual concuerda con un estudio previo reportado por Chang et al., (2003).

Los marcadores de diferenciación tardía que se emplearon fueron NSE y NF-L, ya que el primero es una enzima que únicamente está presente en las células neuronales y neuroendocrinas, la expresión de esta proteína tiene una relación directa con el proceso de maduración neuronal (Isgrò et al., 2015). En el western blot (Figura 12a) se observó su expresión de manera abundante únicamente en las

células que se encuentran diferenciadas, en contraste con las células no diferenciadas en donde no se detectó su expresión. De igual forma, el anticuerpo NF-L se empleó porque esta proteína únicamente está presente en las neuronas, ya que los neurofilamentos son los principales constituyentes del citoesqueleto de las células neuronales. En específico los neurofilamentos de cadena ligera constituyen la columna vertebral en la que se ensamblan las cadenas más pesadas para formar la fibra de neurofilamentos (Lee et al., 1993).

Aunando a lo anterior, también se decidió emplear un marcador de proliferación celular debido a que los eventos iniciales de la vía de diferenciación neuronal además de la activación de la vía ERK 1 y ERK 2, también involucran el cese de la división celular (Bloom & Vallee, 1983). Por ello, el marcador de proliferación que se utilizó fue PCNA, que es una proteína nuclear sintetizada específicamente en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular. En el western blot, que se muestra en la Figura 14a se observó que PCNA se expresa de manera muy abundante únicamente en las células que no se encuentran en proceso de diferenciación (96% de expresión) en contraste con las en células diferenciadas (17% de expresión), lo que indica que su expresión disminuye considerablemente.

Además, también se evaluó la expresión de otras proteínas que interaccionan con la proteína distrofina, como son β -dístroglicano y FAK. El propósito de evaluar la expresión de β -dístroglicano, fue para determinar si la diferenciación de las células PC12 modifica la estabilidad del complejo proteico asociado a la distrofina (DAPC). El resultado obtenido, en el western blot de la Figura 15a muestra que no hay una diferencia significativa en la expresión de β -dístroglicano entre las células diferenciadas y las no diferenciadas. Por otra parte, la cinasa de adhesión focal (FAK), se analizó para comprender la capacidad de respuesta de las células, ya que esta proteína está relacionada con la transmisión de señales de receptores transmembrana, y de igual manera no se observó una diferencia significativa en sus niveles de expresión (Figura 16b) con respecto a ambas muestras de células.

En relación con la identificación de las isoformas de Dp40 que se expresan en las células no diferenciadas, mediante análisis de PCR se encontraron 147 clonas

positivas a Dp40, de las cuales 5 clonas presentaron fragmentos de menor tamaño en comparación con la Dp40 silvestre (Figura 22). Posterior al análisis de secuenciación se encontró que las cinco clonas presentaban en promedio un tamaño de 1049 pb aproximadamente. Como resultado del análisis de alineamiento de sus secuencias de nucleótidos se observó que todas presentan una delección en el exón 68, la cual se denominó Dp40 Δ 68, el porcentaje de frecuencia de esta isoforma fue de 3.4%. Al realizar la traducción *in silico* y el alineamiento de los aminoácidos, se obtuvo que esta secuencia codificaba una proteína de 208 aminoácidos, además se observó un cambio en el marco de lectura debido a la delección del exón 68, dicho cambio sólo permite que se traduzcan 201 aminoácidos correspondientes al exón 67 y 7 aminoácidos diferentes ubicados en el exón 69 antes del codón de paro que genera una proteína trunca. También mediante el empleo del programa ExpASy fue posible predecir el peso molecular y mediante el software PSORT II la localización de esta proteína, cuyo peso es de 23.9kDa con posible localización nuclear. De manera interesante, el análisis de los dominios conservados mostró que esta proteína solo contiene los dominios EF-hand y carece del dominio ZZ. El dominio ZZ es crucial en el proceso de interacción de la distrofina con β -dístroglicano. Debido a que existe poca información de Dp40, la asociación de esta distrofina con β -dístroglicano no está ampliamente descrita, pero de acuerdo a lo reportado por Aragón et al., 2015, las células PC12 presentan una colocalización con esta proteína, lo cual conlleva a sugerir que la pérdida de este dominio podría alterar la interacción con β -dístroglicano así como con el resto de sus proteínas asociadas. Aunado a lo anterior, de acuerdo al reporte de Suarez-Sánchez et al., 2014, se observó que la remoción del dominio ZZ en Dp71 disminuyó la localización nuclear de la proteína, porque en este dominio se encuentra una señal de exporte nuclear. Lo cual sugeriría que la isoforma Dp40 Δ 68 no tendría una localización nuclear en la célula, contrario a la predicción *in silico* que se realizó, la cual sugiere que dicha isoforma tendría un 65.2% de probabilidad de estar ubicada en el núcleo, por lo cual se requerirá realizar más estudios para confirmar su localización.

Por otra parte, del análisis de las células PC12 diferenciadas se encontraron dos isoformas de Dp40, las secuencias contenidas en las clonas 35 y 68 las cuales presentaron fragmentos de menor tamaño en comparación con la Dp40 silvestre. Posterior al análisis de secuenciación se obtuvo que la clona 35 presentaba un tamaño de 759pb y la clona 68 de 919pb, confirmando así que se trata de dos nuevas isoformas, ya que la primera presenta del exon 1 a una parte del exón 67, a esta isoforma se le denominó Dp40 Δ p67-70. Posterior a esta secuencia se encontró un fragmento de 166 nucleótidos que presenta homología con una región de la secuencia que corresponde a β -lactamasa del vector de clonación utilizado (pGEM-T Easy). En el caso de la clona 68, codifica para una isoforma que contiene una parte de los exones 65 y 67 y carece del exón 66, por lo cual se le denominó Dp40 Δ p65-p67. Como resultado de la traducción *in silico* de las secuencias, se obtuvo que la isoforma Dp40 Δ p67-70 codificaba para una proteína de 167 aminoácidos con la predicción de un peso molecular de 19.3kDa, mientras que la isoforma Dp40 Δ p65-p67 codificaba para una proteína de 242 aminoácidos con un peso molecular de 27.9kDa. La primera isoforma contiene el dominio EF-hand y carece del dominio ZZ, mientras que la segunda isoforma conserva los dos dominios debido a que la secuencia de aminoácidos no presenta un cambio en el marco de lectura.

La frecuencia con la que se encontró la isoforma Dp40 Δ 68 fue mayor en comparación con las otras dos isoformas encontradas correspondientes a las células PC12 diferenciadas. Este resultado nos permite sugerir que la isoforma Dp40 Δ 68 podría estar desempeñando un papel importante durante la proliferación de las células no siendo así en el proceso de diferenciación.

Nuestro grupo de investigación ha reportado la expresión de isoformas de Dp40 que han sido encontradas en diferentes líneas celulares; Dp40 Δ 63,64 presenta una delección en el exón 63-64, Dp40 Δ 64-67 que presenta una delección en los exones 64-67 en las células madre/progenitoras neurales de rata de acuerdo lo reportado por Paúl-González et al., (2021). Mientras que Cubas-García, D. (2020), también reportó tres isoformas de Dp40 en diversas líneas de cáncer de mama; la primera isoforma carecía del exón 68 (Dp40 Δ 68), que corresponde a la identificada en las

células PC12 no diferenciadas. La segunda isoforma que fue identificada en ese estudio carece de los exones 66 y 68 (Dp40 Δ 66,68) y la última variante presenta una inserción de 75 pb en el intrón 63 y una delección del exón 68 (Dp40 Δ i63 Δ 68). Estos resultados permiten sugerir, que algunas isoformas de Dp40 podrían expresarse en diferentes líneas celulares y tejidos, generando diferentes complejos con funciones particulares.

Aunque hasta el momento se desconoce la posible función de estas isoformas de Dp40, en este trabajo se reporta por primera vez la expresión de isoformas de Dp40 en las células PC12 no diferenciadas y diferenciadas. Esto corresponde a una aportación relevante para enriquecer el conocimiento acerca de Dp40, aunque es necesario reproducir estos resultados. De ser así será imprescindible realizar más estudios para determinar cuál es la función que están desempeñando estas isoformas en las células PC12 y en el cerebro, específicamente en las neuronas, en donde se ha visto una mayor expresión de Dp40 (Fujimoto et al., 2014).

10. CONCLUSIONES

- Las células PC12 se diferencian en un periodo de tiempo de 12 días después del tratamiento con NGF.
- La diferenciación de la línea celular PC12 se manifiesta por un cambio morfológico: aplanamiento, aumento del cuerpo celular y crecimiento de neuritas.
- Se observó la activación de ERK1 y ERK2, con un tiempo óptimo de 10 minutos.
- Las células PC12 diferenciadas expresan niveles altos de los marcadores de diferenciación tardía: NSE y NF-L, 86 y 99% respectivamente.
- La expresión del marcador de proliferación PCNA disminuyó en las células diferenciadas, lo cual indica que las células se encuentran en proceso de diferenciación.
- Las células PC12 no diferenciadas expresan a la isoforma Dp40 Δ 68 (3.4%).
- Las células diferenciadas expresan dos isoformas nuevas: Dp40 Δ p65-p67 y Dp40_{p67-70}, ambas con una frecuencia de 0.8%.

11. PERSPECTIVAS

- Confirmar las isoformas de Dp40 encontradas en las células no diferenciadas y diferenciadas, mediante la realización de un mayor número de ensayos de PCR.
- Estudiar la localización y función de las nuevas isoformas de Dp40 encontradas en células PC12 diferenciadas y no diferenciadas.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, R., Montañez, C., Fuentes-Mera, L., Gonzalez, E., Gómez, P., Quintero-Mora, L., ... & Cisneros, B. (2004). Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Experimental cell research*, 296(2), 265-275.
- Ahn, A. H., & Kunkel, L. M. (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature genetics*, 3(4), 283-291.
- Aragón, J., Martínez-Herrera, A., Bermúdez-Cruz, R. M., Bazán, M. L., Soid-Raggi, G., Ceja, V., ... & Montañez, C. (2015). EF-hand domains are involved in the differential cellular distribution of dystrophin Dp40. *Neuroscience letters*, 600, 115-120
- Aragón, J., Romo-Yáñez, J., Martínez-Herrera, A., Ceja, V., Rendon, A., & Montañez, C. (2011). Characterization of Dp71 Δ 78-79, a novel dystrophin mutant that stimulates PC12 cell differentiation. *Journal of neurochemistry*, 119(4), 697-707.
- Billard, C., Gillet, P., Signoret, J. L., Uicaut, E., Bertrand, P., Fardeau, M., ... & Santini, J. J. (1992). Cognitive functions in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal and comparison with spinal muscular atrophy. *Neuromuscular Disorders*, 2(5-6), 371-378.
- Blake, D. J., & Kröger, S. (2000). The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle?. *Trends in neurosciences*, 23(3), 92-99.
- Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., & Davies, K. E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological reviews*, 82(2), 291-329.
- Bloom, G. S., & Vallee, R. B. (1983). Association of microtubule-associated protein 2 (MAP 2) with microtubules and intermediate filaments in cultured brain cells. *The Journal of cell biology*, 96(6), 1523-1531.

- Boyce, F. M., Beggs, A. H., Feener, C., & Kunkel, L. M. (1991). Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(4), 1276-1280.
- Boyd, Y., & Buckle, V. J. (1986). Cytogenetic heterogeneity of translocations associated with Duchenne muscular dystrophy. *Clinical genetics*, 29(2), 108-115.
- Chang, J. H., Mellon, E., Schanen, N. C., & Twiss, J. L. (2003). Persistent TrkA activity is necessary to maintain transcription in neuronally differentiated PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 42877-42885
- Chelly, J., Hamard, G., Koulakoff, A., Kaplan, J. C., Kahn, A., & Berwald-Netter, Y. (1990). Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature*, 344(6261), 64-65.
- Cubas-García, D. (2020). Identificación de las isoformas de las distrofinas Dp71 y Dp40 que se expresan en cáncer de mama. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco. Ciudad de México.
- ^a Daoud, F., Angeard, N., Demerre, B., Martie, I., Benyaou, R., Leturcq, F., ... & Urtizbera, A. (2009). Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Human molecular genetics*, 18(20), 3779-3794.
- ^b Daoud, F., Candelario-Martínez, A., Billard, J. M., Avital, A., Khelfaoui, M., Rozenvald, Y., ... & Chelly, J. (2009). Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions. *PloS one*, 4(8).
- Dikic, I., Schlessinger, J., & Lax, I. (1994). PC12 cells overexpressing the insulin receptor undergo insulin-dependent neuronal differentiation. *Current Biology*, 4(8), 702-708.

- Doorenweerd, N. (2020). Combining genetics, neuropsychology and neuroimaging to improve understanding of brain involvement in Duchenne muscular dystrophy—a narrative review. *Neuromuscular Disorders*.
- Emery, A. E., Muntoni, F., & Quinlivan, R. C. (2015). Duchenne muscular dystrophy. OUP Oxford.
- Fujimoto, T., Itoh, K., Yaoi, T., & Fushiki, S. (2014). Somatodendritic and excitatory postsynaptic distribution of neuron-type dystrophin isoform, Dp40, in hippocampal neurons. *Biochemical and biophysical research communications*, 452(1), 79-84.
- Gaetani, L., Blennow, K., Calabresi, P., Di Filippo, M., Parnetti, L., & Zetterberg, H. (2019). Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. In *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-320106>
- Gao, Q. Q., & McNally, E. M. (2011). The dystrophin complex: structure, function, and implications for therapy. *Comprehensive Physiology*, 5(3), 1223-1239.
- García-Cruz, C., Merino-Jiménez, C., Ceja, V., Aragón, J., Siqueiros-Márquez, L., Reyes-Grajeda, J. P., & Montañez, C. (2019). The dystrophin isoform Dp71e Δ 71 is involved in neurite outgrowth and neuronal differentiation of PC12 cells. *Journal of proteomics*, 191, 80-87.
- Górecki, D. C., Monaco, A. P., Derry, J. M., Walker, A. P., Barnard, E. A., & Barnard, P. J. (1992). Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Human molecular genetics*, 1(7), 505-510.
- Halegoua, S., Armstrong, R. C., & Kremer, N. E. (1991). Dissecting the mode of action of a neuronal growth factor. In *Neuronal Growth Factors* (pp. 119-170). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Henderson, C. E. (1996). Role of neurotrophic factors in neuronal development. *Current opinion in neurobiology*, 6(1), 64-70.

- Isgrò, M. A., Bottoni, P., & Scatena, R. (2015). Neuron-specific enolase as a biomarker: biochemical and clinical aspects. *Advances in Cancer Biomarkers*, 125-143.
- Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C., & Kunkel, L. M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, 50(3), 509-517.
- Koenig, M., Monaco, A. P., & Kunkel, L. M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, 53(2), 219-228.
- Lee MK, Xu Z, Wong PC, Cleveland DW (1982). Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. *J Cell Biol.* sep. de 1993;122(6):1337-50.
- Martínez-Herrera, A., Aragón, J., Bermúdez-Cruz, R. M., Bazán, M. L., Soid-Raggi, G., Ceja, V., ... & Montañez, C. (2015). In silico analyses of dystrophin Dp40 cellular distribution, nuclear export signals and structure modeling. *Data in brief*, 4, 349-352.
- Miranda, R., Nudel, U., Laroche, S., & Vaillend, C. (2011). Altered presynaptic ultrastructure in excitatory hippocampal synapses of mice lacking dystrophins Dp427 or Dp71. *Neurobiology of Disease*, 43(1), 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.02.017>
- Moizard, M. P., Toutain, A., Fournier, D., Berret, F., Raynaud, M., Billard, C., ... & Moraine, C. (2000). Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical evidence for Dp71 isoform point mutations screening. *European Journal of Human Genetics*, 8(7), 552-556.
- Monaco, A. P., Walker, A. P., Millwood, I., Larin, Z., & Lehrach, H. (1992). A yeast artificial chromosome contig containing the complete Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics*, 12(3), 465-473.

- Muntoni, F., Torelli, S., & Ferlini, A. (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *The Lancet Neurology*, 2(12), 731-740.
- Naidoo, M., & Anthony, K. (2020). Dystrophin Dp71 and the Neuropathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Neurobiology*, 57(3), 1748-1767.
- Nichols, B., Takeda, S. I., & Yokota, T. (2015). Nonmechanical roles of dystrophin and associated proteins in exercise, neuromuscular junctions, and brains. *Brain sciences*, 5(3), 275-298.
- Paúl-González, S., Aragón, J., Rodríguez-Martínez, G., Romo-Yáñez, J., & Montanez, C. (2021). Differential expression of Dp71 and Dp40 isoforms in proliferating and differentiated neural stem cells: Identification of Dp40 splicing variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 560, 152-158.
- Rosa, G., Ceccarini, M., Cavaldesi, M., Zini, M., & Petrucci, T. C. (1996). Localization of the dystrophin binding site at the carboxyl terminus of β -dystroglycan. *Biochemical and biophysical research communications*, 223(2), 272-277.
- Rybakova, I. N., Amann, K. J., & Ervasti, J. M. (1996). A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *The Journal of cell biology*, 135(3), 661-672.
- Sarig, R., Mezger-Lallemand, V., Gitelman, I., Davis, C., Fuchs, O., Yaffe, D., & Nudel, U. (1999). Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Human molecular genetics*, 8(1), 1-10.
- Sierra-Fonseca, J. A., Najera, O., Martinez-Jurado, J., Walker, E. M., Varela-Ramirez, A., Khan, A. M., Miranda, M., Lamango, N. S., & Roychowdhury, S. (2014). Nerve growth factor induces neurite outgrowth of PC12 cells by promoting G β γ -microtubule interaction. *BMC Neuroscience*, 15(1), 132. <https://doi.org/10.1186/s12868-014-0132-4>

- Suzuki, A., Yoshida, M., Yamamoto, H., & Ozawa, E. (1992). Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain and the first half of the carboxy-terminal domain. *FEBS letters*, 308(2), 154-160.
- Szabados, L., Mroginski, L. A., & Roca, W. M. (1991). Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*, 173-210.
- Tinsley, J. M., Blake, D. J., & Davies, K. E. (1993). Apo-dystrophin-3: a 2.2 kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Human molecular genetics*, 2(5), 521-524.
- Tozawa, T., Itoh, K., Yaoi, T., Tando, S., Umekage, M., Dai, 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. *Molecular neurobiology*, 45(2), 287-297.
- Vinores, S. A., Marangos, P. J., Parma, A. M., & Guroff, G. (1982). Increased Levels of Neuron-Specific Enolase in PC 12 Pheochromocytoma Cells as a Result of Nerve Growth Factor Treatment. *Journal of Neurochemistry*, 37(3), 597-600.
- Wiatrak, B., Kubis-Kubiak, A., Piwowar, A., & Barg, E. (2020). PC12 cell line: cell types, coating of culture vessels, differentiation and other culture conditions. *Cells*, 9(4), 958.
- Wicksell, R. K., Kihlgren, M., Melin, L., & Eeg-Olofsson, O. (2004). Specific cognitive deficits are common in children with Duchenne muscular dystrophy. *Developmental medicine and child neurology*, 46(3), 154-159.
- Zhang, Z., Liu, Y., Zhu, X., Wei, L., Zhu, J., Shi, K., ... & Pan, L. (2018). Sciatic nerve leachate of cattle causes neuronal differentiation of PC12 cells via ERK1/2 signaling pathway. *Journal of veterinary science*, 19(4), 512-518.