

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 Dp71 que se expresan durante la diferenciación de las células PC12”

Tesis que presenta:

IBT. HÉCTOR DAVID CERVANTES SANTIAGO

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Directora de tesis:

Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda

Ciudad de México

Agosto 2021

Durante el desarrollo del presente trabajo el alumno Héctor David Cervantes Santiago fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro de CVU 996958.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda y con la asesoría de la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz y el Dr. Javier Hernández Sánchez, todos del departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV, con el apoyo de los proyectos de CONACYT: CB-2017-2018 A1-S-24868 y ECOS-NORD- ANUIES-CONACYT 276330

Agradecimientos

A mis padres, mis mas grandes maestros, por todas sus enseñanzas, por su apoyo, por estar conmigo siempre, por creer en mi. Todo es gracias a ustedes.

A mis hermanos por acompañarme y comprenderme en los momentos más importantes de mi vida.

A mi novia Patricia Elizabeth por estar conmigo en los momentos más difíciles en esta parte de mi carrera, así como también en los más felices y por ayudarme a mejorar en lo personal y en lo académico.

A la Dra. Cecilia Montañez por aceptar que fuera parte de su equipo de investigación.

Al Dr. Jorge Aragón, al Q.B.P. Víctor Ceja, a la Biol. Alejandra Sánchez por su paciencia en mi formación como estudiante, por sus consejos y por su grata compañía.

Al técnico Cleme por proporcionarnos un espacio apropiado en el laboratorio.

A mis asesores la Dra. Rosa María Bermúdez y al Dr. Javier Hernández por sus comentarios en la elaboración de este proyecto.

A mis amigos Diego, Randy, Sagrario, Majo, Gaby y Diana, por su amistad, su apoyo, por volver al posgrado una estancia mucho más agradable y por sus buenos deseos.

A la Dra Dulce María del Carmen Delgadillo y el laboratorio de secuenciación, unidad de genómica, proteómica y metabolómica por su servicio.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	7
2.1. ISOFORMAS DE LA DISTROFINA DP71D	7
2.2. ISOFORMAS DE LA DISTROFINA DP71F	9
2.3. ISOFORMAS DE LA DISTROFINA DP71E	11
2.4. CÉLULAS PC12	12
2.5. DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS PC12	13
2.6. MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR	15
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	19
5.1. OBJETIVO GENERAL	19
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	19
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1. CULTIVO CELULAR	21
7.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CÉLULAS PC12 NO DIFERENCIADAS Y DIFERENCIADAS	21
7.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	21
7.4. REACCIÓN DE RT-PCR	22
7.5. CLONACIÓN DE ISOFORMAS DE DP71	24
7.6. PCR MULTIPLEX	25
7.7. SECUENCIACIÓN DE ISOFORMAS DE DP71	25
8. RESULTADOS	26
8.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CÉLULAS PC12 NO DIFERENCIADAS Y DIFERENCIADAS	26
8.2. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE CÉLULAS PC12 NO DIFERENCIADAS Y DIFERENCIADAS	28

8.2.1. EXPRESIÓN DE MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR	28
8.2.2. EXPRESIÓN DE MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN CELULAR	30
8.2.3. EXPRESIÓN DE DP71 Y β -DISTROGLICANO	32
8.3. IDENTIFICACIÓN DE ISOFORMAS DE DP71 QUE SE EXPRESAN DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS PC12	34
8.3.1. EXTRACCIÓN DE RNA Y ENSAYOS DE RT-PCR DE DP71	34
8.3.2 CLONACIÓN Y ANÁLISIS POR PCR MULTIPLEX DE ISOFORMAS DE DP71	36
8.3.3. IDENTIFICACIÓN DE ISOFORMAS DE DP71 QUE SE EXPRESAN EN CÉLULAS PC12 NO DIFERENCIADAS	37
8.3.4. IDENTIFICACIÓN DE LA ISOFORMA DE DP71D _{Δ74}	42
8.3.5. IDENTIFICACIÓN DE ISOFORMAS DE DP71 QUE SE EXPRESAN EN CÉLULAS PC12 DIFERENCIADAS	47
9. DISCUSIÓN	54
10. CONCLUSIONES	61
11. PERSPECTIVAS	61
12. BIBLIOGRAFÍA	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización genómica del gen DMD.	2
Figura 2. Complejo de proteínas asociadas a distrofina.	3
Figura 3. Representación esquemática de las isoformas de Dp71.	6
Figura 4. Estrategia experimental.	20
Figura 5. Condiciones de PCR para Dp71.	24
Figura 6. Micrografías de células PC12.	27
Figura 7. Curva de crecimiento de células PC12 no diferenciadas.	27
Figura 8. Análisis de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).	28
Figura 9. Análisis de la expresión de la quinasa de adhesión focal (FAK).	29
Figura 10. Análisis de la expresión de la enolasa específica de neuronas (NSE).	30
Figura 11. Análisis de la expresión de neurofilamento de cadena ligera (NF-L).	31
Figura 12. Análisis de la expresión de neurofilamento de β -distroglicano (β -Dys).	32
Figura 13. Análisis de la expresión de neurofilamento de Dp71d (H4).	33
Figura 14. Extracción de RNA total de células PC12.	34
Figura 15. PCR de Dp71 de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas.	35
Figura 16. Esquema de hibridación de primers utilizados.	37
Figura 17. Análisis por PCR multiplex de colonias 0d: 15-44.	38
Figura 18. Análisis por PCR multiplex de colonias 0d: 45-70.	39
Figura 19. Análisis por PCR multiplex de colonias 0d: 71-99.	40
Figura 20. Análisis por PCR multiplex de colonias 0d: 100-117 y 8.	41
Figura 21. Alineación de las secuencias de la isoforma de Dp71d Δ 74 en células no diferenciadas.	43
Figura 22. Alineación de las secuencias de la isoforma de Dp71d Δ 74 en células no diferenciadas.	44
Figura 23. Alineación de las secuencias de aminoácidos de la isoforma de Dp71d Δ 74 en células no diferenciadas.	44
Figura 24. Identificación y cuantificación de isoformas de Dp71 de células no diferenciadas.	
¡Error! Marcador no definido.	
Figura 25. Análisis por PCR multiplex de colonias 12d: 1-29.	
¡Error! Marcador no definido.	
Figura 26. Análisis por PCR multiplex de colonias 12d: 30-59.	48
Figura 27. Análisis por PCR multiplex de colonias 12d: 60-89.	49
Figura 28. Análisis por PCR multiplex de colonias 12d: 90-119.	50

Figura 29. Identificación y cuantificación de isoformas de Dp71 de células diferenciadas.	51
Figura 30. Amplicones identificados en células no diferenciadas y diferenciadas.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de anticuerpos.	22
Tabla 2. Condiciones de amplificación por PCR.	23
Tabla 3. Tamaño de las secuencias de Dp71.	36

ABREVIATURAS

AKT: Proteína quinasa B

AP2 α : Proteínas de activación 2 α

cDNA: DNA de cadena complementaria

CO₂: Dióxido de carbono

DAPC: Complejo de proteínas asociadas a distrofina

dBcAMP: Dibutiril adenosina monofosfato cíclico

DMD: Distrofia muscular de Duchenne

DMEM: Medio Dulbecco modificado

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

FAK: Quinasa de adhesión focal

HCl: Ácido clorhídrico

HspB1: Proteína de choque térmico beta 1

kb: kilo base

kDa: kilo Dalton

LB: Medio Luria-Bertani

MgCl₂: Cloruro de magnesio

NaCl: Cloruro de sodio

NF-H: Neurofilamento de cadena pesada

NF-L: Neurofilamento de cadena ligera

NF-M: Neurofilamento de cadena media

NF: Neurofilamento

NGF: Factor de crecimiento neural

nm: Nanómetro

nNOS: Sintetasa de óxido nítrico neural

NSE: Enolasa específica de neuronas

NSPC: Células madre y progenitoras neurales

pb: Pares de base

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa

PLC γ : 1-fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato fosfodiesterasa gamma-1

Pyk2: Proteína tirosina quinasa 2

RNA: Ácido ribonucleico

rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción

S100A6: Proteína de unión al calcio

SDS: Dodecilsulfato de sodio

Shc: Proteína transformadora

SOC: Caldo súper óptimo

Sp1: Proteínas de especificidad 1

Src: Protooncogen tirosina quinasa

TBS-T:

TrkA:

v: Volts

XP21: Región 2 banda 1 del brazo corto del cromosoma X

RESUMEN

La distrofina Dp71 es el producto del gen DMD (distrofia muscular de Duchenne) que se expresa principalmente en el sistema nervioso central (SNC). La ausencia o la mutación de esta proteína está relacionada con el deterioro cognitivo y de ahí la importancia de su estudio. Se han reportado diferentes isoformas de la proteína de Dp71 y a través de varios ensayos se ha observado que tienen posibles funciones relacionados en los procesos de diferenciación, proliferación, adhesión y división celular. Además, Dp71 es capaz de interactuar directamente con distintas proteínas en la periferia celular, como β -dístroglicano y α -sintrofina, funcionando principalmente como un complejo de andamiaje celular. Sin embargo, la expresión diferencial y la funcionalidad de las isoformas individuales aún no se ha determinado con claridad. En este trabajo, se analizó la expresión de las isoformas de Dp71 durante la diferenciación de las células PC12 mediante ensayos de RT-PCR y clonación. Encontramos que las isoformas del grupo Dp71d se mantienen constante a lo largo del proceso de diferenciación. Así mismo, analizamos el procesamiento alternativo de los exones del 71-74 en células no diferenciadas y encontramos que, el 81 % de las isoformas carecen del exón 71, 1.4 % no contiene el exón 74 y el 17.6 % restante no se logró determinar el procesamiento alternativo en esta región. De igual manera, en las células diferenciadas encontramos que el 88.5 % no contienen el exón 71 y el 11.5% no se determinó el procesamiento alternativo. Los resultados sugieren que la isoforma Dp71d $_{\Delta 71}$ participa en el proceso de proliferación y diferenciación celular, mientras que la isoforma Dp71d $_{\Delta 74}$ participa únicamente en la proliferación celular. Por lo tanto, las células PC12 son capaces de expresar de manera diferencial las isoformas de la familia de Dp71. El estudio de las isoformas de Dp71 de manera individual y su correlación con otras proteínas, puede revelar sus funciones en las células del SNC.

ABSTRACT

Dystrophin Dp71 is the DMD (Duchenne muscular dystrophy) gene product majorly expressed in the central nervous system (CNS). The absence or mutation of this protein has been related to the cognitive impairment and hence the importance of its study. Different isoforms of Dp71 protein have been found using several assays. It has been described that these Dp71 isoforms are involved in the differentiation, proliferation, adhesion, and cellular division processes. Besides, Dp71 can interact directly with different protein in the cellular periphery, as β -dystroglycan and α -syntrophin, which function mainly as a cellular scaffold complex. However, the differential expression and functionality of individual Dp71 isoforms need to be determined. In this work, we analyzed the expression of Dp71 isoforms by RT-PCR and cloning assays during the neuronal differentiation of PC12 cells. We found that expression of isoforms of Dp71d group remain constant throughout the neuronal differentiation. Additionally, we analyzed the alternative splicing of exons 71-74 in the undifferentiated cells and we identified that 81 % of isoforms lack exon 71, 1.4 % do not contain exon 74 and it was not possible to determine the alternative splicing of this region in the remaining 17.6 %. Similarly, in the differentiated cells, we found that 88.5 % lack exon 71 and alternative splicing was not determined in 11.5 % of the isoforms. These results suggest that Dp71d $_{\Delta 71}$ isoform participates in the cell proliferation and differentiation processes, while the Dp71d $_{\Delta 74}$ isoform participates only in the cell proliferation process. Therefore, PC12 cells differentially express the isoforms of Dp71 family. The study of Dp71 isoforms individually and their correlation with other proteins can reveal their functions in the CNS.

1. INTRODUCCIÓN

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) afecta casi exclusivamente a hombres y se estima que la prevalencia es de 1 de cada 3,500 nacimientos. A pesar de que el padecimiento principal es la degeneración del músculo esquelético, se ha reportado que la prevalencia de discapacidad intelectual ocurre aproximadamente entre el 19 al 35 % de los pacientes con DMD, entre otras comorbilidades como discapacidad lectora, déficit de atención con hiperactividad, ansiedad, depresión y autismo. Adicionalmente, se ha observado que los pacientes con una mutación en Dp140 o Dp71 tienen una mayor tendencia a desarrollar problemas en su neurodesarrollo, mientras que estudios neuropatológicos observaron pérdida neuronal, gliosis, pérdida de células de Purkinje y desarrollo dendrítico anormal. Existen estudios que reportan que no hay presencia de anormalidades cerebrales, por lo que es necesario recabar más información en esta área (Darmahkasih et al., 2020; Naidoo & Anthony, 2020).

La DMD es un desorden genético ligado al cromosoma X, que se caracteriza por una pérdida de las funciones motoras debido a una degeneración progresiva del músculo esquelético (Kunkel, 1986; Monaco et al., 1986). El tamaño del gen DMD es de más de 2.5 Mp, siendo el gen más grande del genoma humano descrito hasta ahora, específicamente localizado en la banda Xp21 del brazo corto de este cromosoma (Figura 1), cubre el 0.1% de todo el genoma y el 1.5% del cromosoma X. Una de las causas que desencadena este desorden genético es la pérdida parcial o total del locus DMD. El transcrito de este gen corresponde a 14 kb con 79 exones y produce una proteína llamada distrofina de longitud completa de 3,685 residuos con un peso molecular de 427 kDa (Dp427) (Hoffman et al., 1987; Koenig et al., 1987). La distrofina contiene cuatro dominios principales que son: el amino terminal con la función de unión a actina, un dominio central con 24 repetidos de hélices triples “coiled coil” tipo espectrina que confiere flexibilidad a la proteína, una región rica en cisteína y el dominio carboxilo terminal (Figura 1). Estos dos

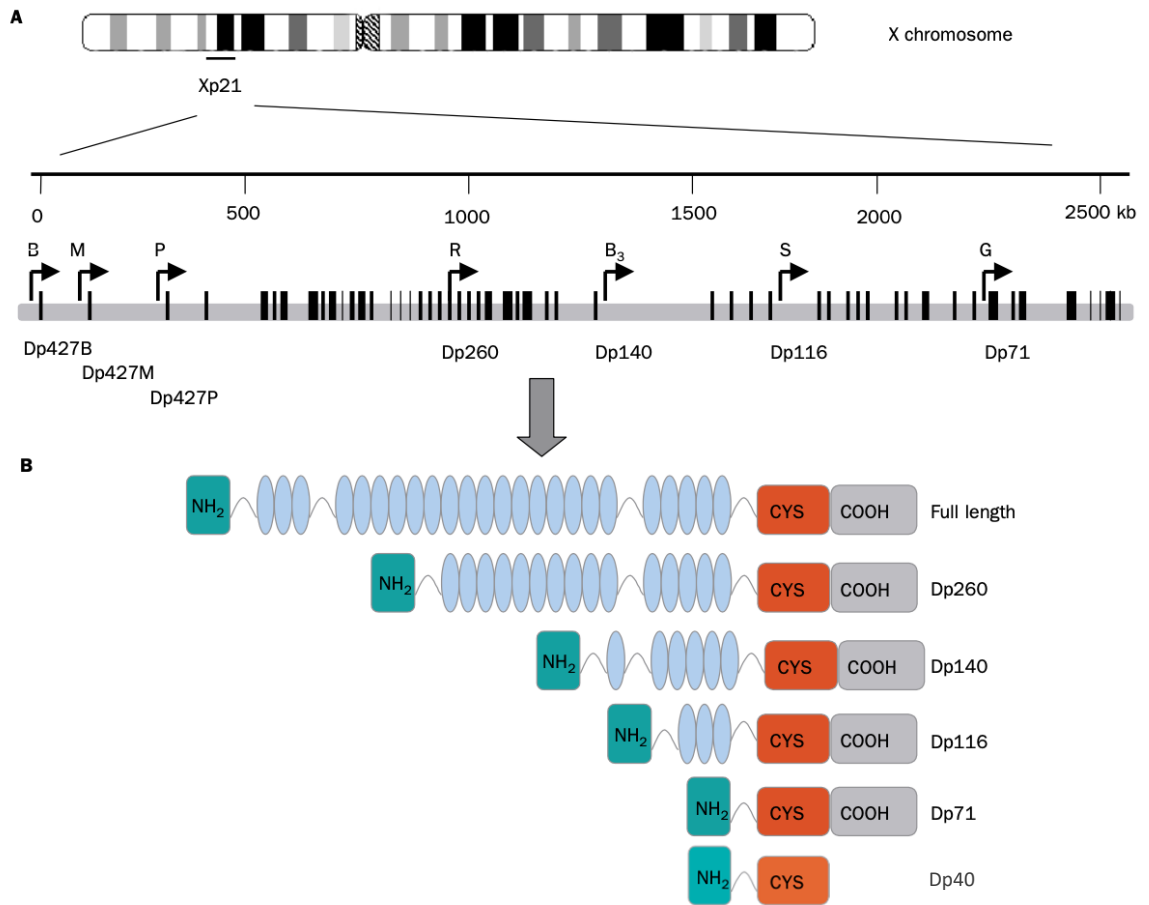


Figura 1. Localización genómica del gen DMD. A) El gen DMD se ubica en el brazo corto del cromosoma X región 2 banda 1. La Dp427 se transcribe a partir de 3 distintos promotores específicos de tejido. Además, el gen DMD contiene promotores internos dentro de sus 2,500 kb: B (brain), M (muscle), P (Purkinje), R (retinal), S (Shwann cells) y G (general) que producen una amplia familia de distrofinas. Las barras verticales negras representan los 79 exones del gen DMD. B) Los dominios principales de algunas distrofinas son: amino terminal, repetidos tipo espectrina, región rica en cisteína y carboxilo terminal. Ilustración tomada de Muntoni et al., 2003.

últimos dominios participan en la unión de proteínas del citoplasma llamadas distrobrevinas y sintrofinas y con proteínas integrales de membrana como sarcoglicanos y β -dystroglicano, y a su vez esta última interactúa con α -dystroglicano en la matriz extracelular (Ervasti & Campbell, 1991; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992; Montanaro et al., 1999; Rybakova et al., 1996; Suzuki et al., 1992). El conjunto de estas proteínas forman el complejo asociados a distrofinas (DAPC) localizadas en el sarcolema (Figura 2)

(Zubrzycka-Gaarn et al., 1988). La distrofina tiene un papel importante dentro de la estabilización del sarcolema debido a que conecta la matriz extracelular con el citoesqueleto, por lo tanto, la pérdida de la función de esta proteína, debido a mutaciones en el gen, provoca una desorganización del DAPC y ocasiona la degeneración de las células musculares (Campbell & Kahl, 1989).

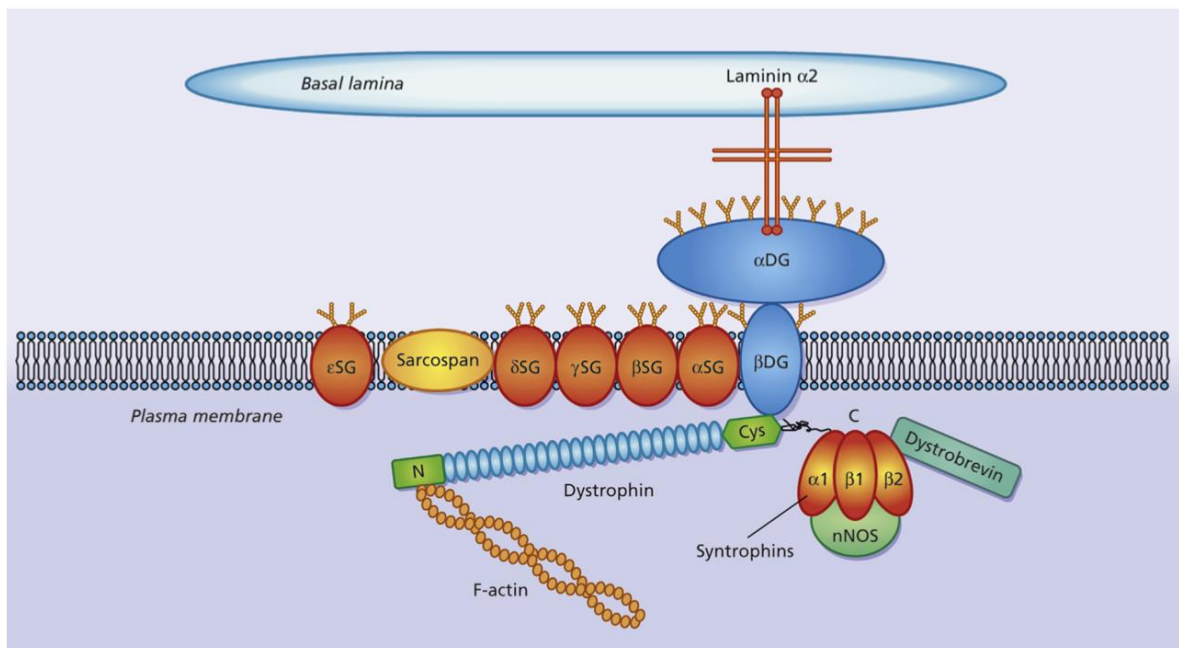


Figura 2. Complejo de proteínas asociadas a distrofina. El DAPC desempeña el papel de andamio para conectar el sarcolema y el citoesqueleto de actina. Ilustración tomada de Brown & Sewry, 2017.

Por otro lado, se han caracterizado diferentes productos del gen DMD que se expresa a partir de por diferentes promotores alternativos internos y que difieren en cuanto a estructura y patrón de expresión (Figura 1). Codifican para las distrofinas Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 y Dp40, denominados por su peso molecular (Byers et al., 1993; D'souza et al., 1995; Lederfein et al., 1992; Lidov et al., 1995; Tinsley et al., 1993).

Se ha reportado que Dp71 es el producto principal de gen DMD que se expresa en células del sistema nervioso, y también en otros tejidos como el

pulmón, testículo, hígado, riñón y estómago; sin embargo, en estudios iniciales no se encontró en células musculares (Bar et al., 1990; Blake et al., 1992; Hugnot et al., 1992; Lederfein et al., 1992), aunque un estudio reciente demostró que Dp71 también se expresa en células del músculo esquelético en niveles muy bajos (Kawaguchi et al., 2018). Interesantemente, la distrofina Dp71 es el primer producto del gen DMD expresado en el desarrollo de células madre embrionarias pluripotentes (Rapaport et al., 1992).

La caracterización de los transcritos hallados de 4.8 kb, pertenecientes a Dp71 mediante clonación y secuenciación, reportaron que tiene un promotor localizado en la parte distal del gen DMD con un sitio de inicio ATG entre los exones 62 y 63 (Bar et al., 1990; Blake et al., 1992; Hugnot et al., 1992). La transcripción y traducción *in vitro* de estos transcritos expresaron proteínas de aproximadamente 70.8 kDa que fueron denominadas Dp71 (Lederfein et al., 1992). La proteína Dp71 contiene una secuencia única de aminoácidos en el dominio amino terminal (MREQLKG) que le confiere un nuevo “motif” de unión a actina. Además, comparte con la distrofina los exones 63-79 que codifican para la región rica en cisteína y el dominio carboxilo terminal, aunque no conserva los repetidos tipo espectrina y el dominio amino terminal de unión a actina de la distrofina (Howard et al., 1998; Hugnot et al., 1992). El promotor de Dp71 es de tipo “housekeeping”, presenta un alto contenido de GC, no se localiza una caja TATA pero contiene sitios de unión a proteínas de especificidad 1 (Sp1), que son característicos de promotores sin caja TATA y también sitios de unión a proteínas de activación 2 α (AP2 α). Durante la diferenciación de neuronas, el factor de transcripción Sp1 se une a los sitios ricos en GC funcionando como regulador positivo y definiendo el inicio de la transcripción, mientras que AP2 α se libera durante este proceso debido a que este factor de transcripción tiene una actividad de regulador negativo (De León et al., 2005; Lederfein et al., 1993; Morales-Lázaro et al., 2010).

Los primeros indicios de procesamientos alternativos del transcrito de la distrofina fueron hallados por Feener y colaboradores. Encontraron que la distrofina en su extremo terminal 3' puede sufrir modificaciones por procesamientos alternativos generando así diferentes isoformas que difieren en el dominio carboxilo terminal y que este cambio le podría dar la capacidad de interactuar con diferentes proteínas (Feener et al., 1989). Posteriormente, mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se caracterizaron las primeras isoformas de Dp71 que presentan procesamientos alternativos en los exones 71 y/o 78, presentes en un cultivo de amniocitos humanos. Se detectó la expresión de estos transcritos en diferentes tejidos de humano incluyendo al corazón, cerebro, músculo, pulmón, riñón, testículo e hígado. Además observaron que hay una coexpresión de los transcritos y β -dístroglicano sugiriendo que Dp71 también podría formar un complejo tipo DAPC (Austin. et al., 1995).

Por otro lado, también se ha reportado que Dp71 esta involucrado en la formación de un complejo en la membrana de células gliales de Müller en la retina donde participan también las proteínas Kir 4.1 y Aquaporina-4, las cuales tienen una función en la homeostasis celular amortiguando las concentraciones de potasio y el drenaje de agua respectivamente (Connors & Kofuji, 2002; Fort et al., 2008; Sene et al., 2009) .

A partir de entonces se empezaron a reportar diferentes tipos de transcritos con procesamientos alternativos de Dp71, generalmente entre los exones 71-74 y en el 78. Recientemente, con el fin de facilitar la comprensión y tener una mejor clasificación de las isoformas de Dp71, Aragón y colaboradores en 2018 propusieron una nueva nomenclatura para la familia de las distrofinas Dp71 (Figura 3). Para nombrarlas a las diferentes isoformas, se mantuvo la nomenclatura de los grupos basada en la secuencia del carboxilo terminal de cada variante, por lo tanto, en el grupo Dp71d se organizan aquellos transcritos que contienen al exón 78, el grupo Dp71f

representa aquellos cuya secuencia carecen del exón 78 y en el grupo Dp71e se integran los transcritos que mantienen parte del intrón 77 y carecen de los exones 78 y 79. Adicionalmente al grupo al que pertenece el transcrito se le añade el símbolo Δ y el o los números de los exones que sufrieron procesamiento alternativo (Aragón et al., 2018). En otro estudio, se encontró la variante de Dp71 más pequeña reportada hasta ahora en células de un glioblastoma con una secuencia única en el dominio carboxilo terminal debido al procesamiento alternativo de los exones 68 al 76 y termina en el exón 77, de este modo, esta nueva isoforma pertenece al grupo Dp71g (Rani et al., 2019).

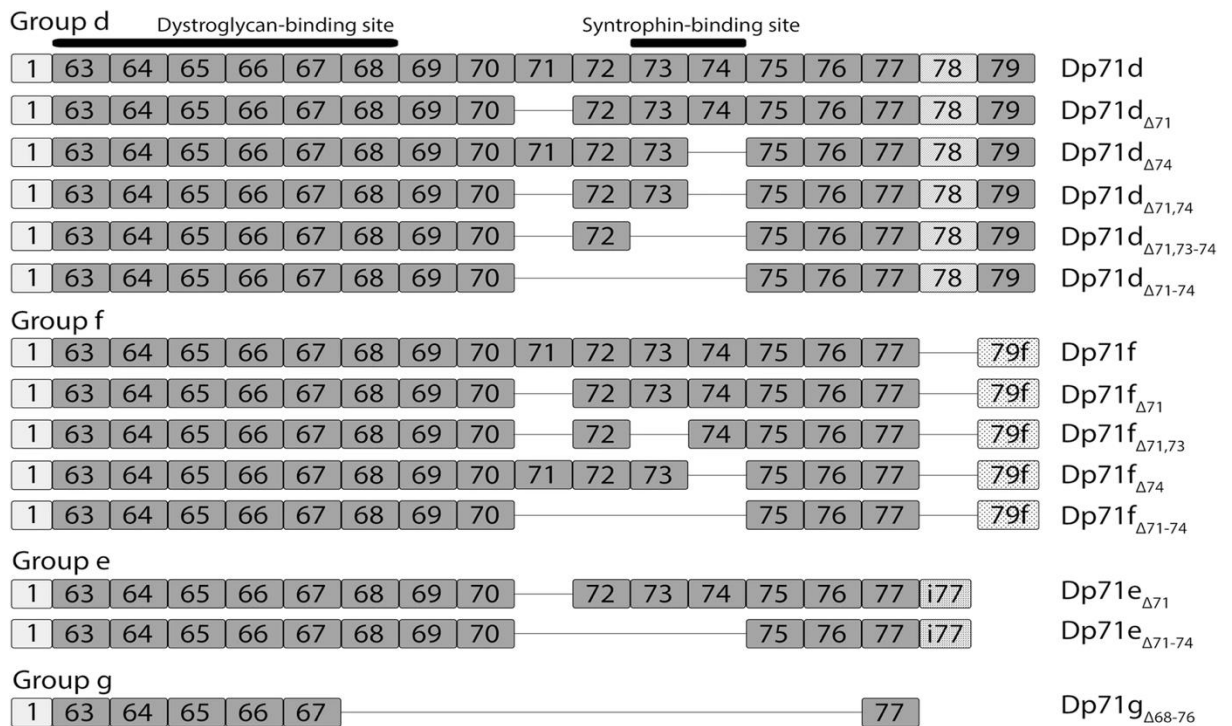


Figura 3. Representación esquemática de las isoformas de Dp71. Grupo Dp71d: contiene el exón 78. Grupo Dp71f: el exón 78 es excluido por procesamiento alternativo. Grupo Dp71e: se retiene parte del el intrón 77. Grupo Dp71g: se retiene el exón 77. Cada uno de los grupos genera distintas secuencias del dominio carboxilo terminal. El símbolo Δ y el número de los exones después del grupo indica que han sido excluidos del transcrito. Ilustración tomada de Naidoo & Anthony, 2020.

2. ANTECEDENTES

2.1. Isoformas de la distrofina Dp71d

El grupo Dp71d se identificó en cerebro de rata utilizando anticuerpos monoclonales contra el carboxilo terminal de la distrofina, se encontró una asociación de esta proteína glicosilada con la membrana plasmática sináptica y con orgánulos intracelulares (Jung et al., 1993). Otro trabajo realizado por Imamura y colaboradores observaron que Dp71d se localiza también en la membrana de astrocitos de cerebro de rata no diferenciados; además, reportaron que la cantidad de esta isoforma aumenta durante la diferenciación de las células inducidas por dibutilil adenosina monofosfato cíclico (dBcAMP) (Imamura & Ozawa, 1998). Uno de los primeros estudios de la función de Dp71d demostró que los primeros 6 aminoácidos en el único dominio amino terminal fueron necesarios y suficientes para servir como sitio de unión a actina, sugiriendo que Dp71d forma un complejo de diferentes proteínas en la membrana (Howard et al., 1998). Blake y colaboradores reportaron una asociación entre α -distrobrevina y Dp71d, utrofina y sintrofina en astrocitos perivasculares y en la glía de Bergmann (Blake et al., 1999). Posteriormente, se comprobó que Dp71d es una proteína importante para la formación del DAPC que se asocia con distroglicanos, sintrofinas y distrobrevinas que permite la conexión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, regulando vías de señalización para la organización estructural de zonas de contacto de membranas o en canales iónicos (Albrecht & Froehner, 2002). Daoud y colaboradores observaron que la expresión de Dp71d en neuronas está relacionada con la regulación de la organización y función de las sinapsis glutamatérgicas, por lo que esto podría explicar que la pérdida de esta proteína y otras isoformas conduzcan a un mayor grado de retraso mental (Daoud et al., 2009). Se encontró 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). Por otra parte, Acosta y colaboradores reportaron que Dp71d Δ 71 es esencial

para el crecimiento de neuritas en células PC12 cuando son diferenciadas con el factor de crecimiento neural (NGF) o dBcAMP y además, la deficiencia de Dp71d afecta los niveles de proteína de α - y β -distrobrevina (Acosta et al., 2004).

Como se mencionó anteriormente Austin y colaboradores reportaron las primeras isoformas del grupo Dp71d, estas incluyeron a Dp71d Δ 71, que se expresaban en una variedad de tejidos humanos como el cerebro y además sugirió que podrían formar un complejo tipo DAPC debido a que coexpresan con β -dístroglicano (Austin. et al., 1995). González y colaboradores examinaron la localización subcelular de Dp71d y Dp71d Δ 71 en células HeLa, C2C22 y en N1E-115 y encontraron que se localiza principalmente en el núcleo, posiblemente por una marca de localización nuclear en el exón 78 (González et al., 2000). En otro estudio, se reportó que Dp71d Δ 71 se encuentra localizado en el citoplasma y la periferia de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas con NGF donde colocaliza con β -dístroglicano y α -sintrofina y observaron a Dp71d Δ 71 localizada en mayor medida en el núcleo de células diferenciadas en comparación con células no diferenciadas (Aragón et al., 2016). Márquez y colaboradores observaron que en células diferenciadas PC12 inducidas por NGF la isoforma Dp71d Δ 71 incrementó 7 veces en el extracto nuclear, además, detectaron que se reubica casi por completo en el núcleo junto con β -dístroglicano y también ubicaron a Dp71d Δ 71 en los sitios de contacto célula-célula (Marquez et al., 2003).

Ceccarini y colaboradores amplificaron un transcrito por RT-PCR de un tejido neural fetal de humano que carece de los exones 71-74, es decir Dp71d Δ 71-74, esta isoforma pierde 330 pb, el sitio de unión a sintrofina (Ceccarini et al., 1997). Así mismo, Austin y colaboradores, observaron una variante de Dp71 sin los exones 71-74 en el tejido de cerebro humano adulto (Austin et al., 2000). Aragón y colaboradores observaron que la isoforma Dp71d Δ 71-74 se localiza principalmente en la periferia celular y tuvo una baja

colocalización con β -dístroglicano y α -sintrofina en células PC12 no diferenciadas y diferenciadas (Aragón et al., 2016).

Recientemente, se describió que en cerebro y retina de ratón adulto las isoformas Dp71d, Dp71d Δ 71, Dp71d Δ 71-74 se encuentran expresadas diferencialmente en ambos tejidos, además, se reportaron 3 nuevas isoformas del grupo Dp71d que carecen de los exones 74; 71 y 74 y 71,73 y 74, llamados Dp71d Δ 74, Dp71d Δ 71,74 y Dp71d Δ 71,73-74 respectivamente. En este sentido, la expresión de Dp71d Δ 71,74 se detectó exclusivamente en cerebro, Dp71d Δ 71,73-74 en retina y Dp71d Δ 74 en ambos tejidos; sin embargo, los niveles de expresión fueron bajos comparados con las demás isoformas. En general, el grupo Dp71d tuvo una mayor expresión en cerebro que en retina (Aragón et al., 2018). De manera similar, Gonzales-Reyes reportó la expresión diferencial de las isoformas Dp71d, Dp71d Δ 71, Dp71d Δ 71-74, Dp71d Δ 74 y Dp71d Δ 71,74 en el hipocampo, en la corteza cerebral y en el cerebelo de ratón. Además, se observó que a nivel de proteína las isoformas del grupo Dp71d tienen una tendencia creciente en el proceso de neurodesarrollo.

2.2. Isoformas de la distrofina Dp71f

En el grupo Dp71f, la pérdida del exón 78 provoca un cambio en el marco de lectura reemplazando los últimos 13 aminoácidos, propios de las isoformas del grupo Dp71d, por 31 nuevos, creando un nuevo dominio carboxilo terminal hidrofóbico. Austin y colaboradores (Austin et al., 1995) identificaron las primeras variantes de Dp71; Dp7f y Dp71f Δ 71, en amniocitos humanos, cerebro y otros tejidos, además, observaron que colocaliza con β -dístroglicano. González y colaboradores reportaron que Dp71f se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma de células HeLa, C2C12 y N1E-115, mientras que Dp71f Δ 71 mostró una localización solo en el citoplasma y en mayor medida en la periferia de la célula (González et al., 2000). Márquez y colaboradores mostraron que Dp71f Δ 71 aumenta 9 veces durante la

diferenciación de células PC12 inducidas por NGF (Marquez et al., 2003). Además, en estas células no diferenciadas se observó una ligera marca de Dp71f Δ 71 en el citoplasma y en la periferia celular, después de nueve días de diferenciación se observó una marca de inmunoreactividad en el citoplasma del soma celular y más intensamente en la periferia, así como en las varicosidades y en el cono de crecimiento neural. Se observó también que hay una colocalización de Dp71f Δ 71 y β -dístroglicano en estas áreas tanto en células PC12 no diferenciadas como en las diferenciadas. Adicionalmente, se reportó que Dp71f Δ 71 se localiza principalmente en la periferia, en el citoplasma, las neuritas y en conos de crecimiento de células PC12 no diferenciadas, mientras que en células diferenciadas no se observó un cambio significativo (Aragón et al., 2016). Romo-Yáñez y colaboradores utilizando ensayos de RT-PCR, western blot e inmunofluorescencia observaron la formación de dos complejos entre la isoforma Dp71f Δ 71 y DAPC. El primero formado por Dp71f Δ 71, β -dístroglicano, α 1-sintrofina, β -dístrobrevina y α , β , γ -sarcoglicano en células PC12 no diferenciadas y el segundo por Dp71f Δ 71, β -dístroglicano, α 1-sintrofina, β -dístrobrevina y sintetasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) en células diferenciadas por NGF. La incorporación de nNOS al segundo complejo formado podría sugerir que Dp71f Δ 71 tiene una función en la señalización para la diferenciación celular (Romo-Yáñez et al., 2007).

La variante de Dp71 reportada por primera vez por Austin y colaboradores, denominada Dp71f Δ 71-74, fue encontrada en un tejido de cerebro humano adulto, que carece del sitio de unión a sintrofina (Austin et al., 2000). Posteriormente, Aragón y colaboradores observaron que las isoformas Dp71f, Dp71f Δ 71 y Dp71f Δ 71-74 se expresan tanto en cerebro como en retina de ratón, pero predominantemente en la retina, además, se reportó en estos tejidos una nueva isoforma denominada Dp71f Δ 74 (Aragón et al., 2018). De igual manera, Gonzales-Reyes encontró que las isoformas Dp71f, Dp71f Δ 71, Dp71f Δ 71-74 se expresan de manera diferencial en el hipocampo, el cerebelo y la corteza

cerebral del ratón. Interesantemente, las isoformas del grupo Dp71f se expresan principalmente en etapas tempranas del neurodesarrollo, un patrón inverso a las isoformas del grupo Dp71d, lo cual sugiere que ambos grupos tienen participación en procesos distintos durante el desarrollo cerebral.

2.3. Isoformas de la distrofina Dp71e

Saint Martín y colaboradores descubrieron una nueva variante de Dp71 denominada Dp71e Δ 71 que presenta un procesamiento alternativo en el intrón 77 del gen DMD, lo cual añade 34 pb con un codón de paro que evita la traducción de los exones 78 y 79. Esta secuencia le provee a la Dp71 un nuevo dominio carboxilo terminal de 10 aminoácidos (DLSASSSLYY). Un análisis bioinformático sugiere que la masa molecular de esta isoforma es de 68.5 kDa y su función podría ser mediada por la fosforilación del residuo serina 3667. Además, se hipotetiza que tiene una función relacionada con la diferenciación debido a que su expresión aumenta durante la diferenciación de células PC12 inducidas por NGF. La expresión del mRNA Dp71e Δ 71 fue detectada en diferentes órganos de rata entre ellos el cerebro, pulmón, testículo e intestino; sin embargo, en el cerebro se detectó una variante adicional de Dp71e Δ 71 que presenta una eliminación de los exones 71-74, denominada Dp71e Δ 71-74 (Saint Martín et al., 2012).

Adicionalmente, se observó que la localización de Dp71e Δ 71 se encuentra en el citoplasma y la periferia de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas con NGF y una colocalización con β -dístroglicano y α 1-sintrofina, mientras que, Dp71e Δ 71-74 se localiza principalmente en la periferia, pero con una menor colocalización con β -dístroglicano y α 1-sintrofina tanto en células no diferenciadas como diferenciadas. Esto sugiere que la localización de estas isoformas está determinada por los exones 71-74 y la posible interacción con β -dístroglicano y α 1-sintrofina. Además, se observó que la localización de

Dp71e Δ 71 y Dp71e Δ 71-74 aumenta en el núcleo de las células PC12 diferenciadas comparadas con las no diferenciadas (Aragón et al., 2016).

García-Cruz y colaboradores analizaron la sobreexpresión de Dp71e Δ 71 en células PC12 diferenciadas con NGF y observaron que esta isoforma provoca un incremento en el porcentaje de células con neuritas así como la longitud de las neuritas. Esta sobreexpresión también cambia el perfil de proteínas que se traducen en las células PC12 diferenciadas con NGF a los 9 días de tratamiento, entre esas proteínas se incrementa la expresión de las involucradas en la estructura del citoesqueleto tales como HspB1, S100A6 y K8 así como proteínas implicadas en la síntesis de neurotransmisores como el péptido neuroestimulante colinérgico hipocampal. La proteína Dp71e Δ 71 se localiza en el citoplasma y a lo largo de las neuritas de células PC12 diferenciadas (García-Cruz et al., 2019)..

2.4. Células PC12

La línea celular PC12 se originó a partir de un feocromocitoma de rata. Estas células cromafines o feocromocitos se ubican en la médula de las glándulas suprarrenales en mamíferos. Esta línea celular ha servido como modelo de estudio para dilucidar diferentes procesos neurales; por ejemplo, se ha reportado que las células PC12 responden al NGF provocando la diferenciación a células tipo neuronas simpáticas, es decir, generan neuritas, además de que ocurre la síntesis, el almacenaje, la liberación y recepción de catecolaminas y acetilcolina (Greene & Tischler, 1976; Grifman & Soreq, 1997; Schubert & Klier, 1977).

El NGF se une a un receptor de alta afinidad en la superficie de las células PC12, llamado TrkA. Este receptor al estar en contacto con el NGF se dimeriza y se transfosforila para después unirse con una variedad de efectores de señalización. Por ejemplo, el efector de señalización o primer mensajero, PLC γ , después de unirse a TrkA fosforilado, cataliza la síntesis de diacilglicerol

e inositol trifosfato a partir de PI 4,5 bifosfato. Estas dos moléculas o segundos mensajeros van a reclutar a la proteína quinasa C para elevar el calcio intracelular provocando un reordenamiento del citoesqueleto. Otro ejemplo, PI3K, es otro intermediario que forma un complejo con el TrkA fosforilado, la activación de PI3K cataliza la formación de segundos mensajeros llamados fosfoinosítidos que a su vez activarán a la serina treonina quinasa AKT. Este proceso está relacionado con la supervivencia de distintos tipos de células incluidas las neuronas. (Cowley et al., 1994; Klesse et al., 1999)

Además, esta línea celular ha servido para estudiar ampliamente la expresión, localización y funciones de las diferentes distrofinas cortas incluyendo a la familia de Dp71 y Dp40.

2.5. Diferenciación de células PC12

Las células PC12 diferenciadas presentan una morfología similar a la de una neurona. Con la ayuda de un microscopio invertido se puede observar la presencia de neuritas, una diferencia muy clara comparada con las células PC12 que no están diferenciadas. Por lo tanto, la reestructuración del citoesqueleto es un proceso importante para la diferenciación celular y especialmente para el crecimiento de las neuritas. Cuando se tratan a las células con el NGF y después de que se activa el receptor TrkA, se activa la vía de los receptores acoplados a proteínas G. En esta vía, las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas heterotriméricas G van a interactuar con los microtúbulos celulares y de este modo se estimulará su ensamblaje y que conduce al alargamiento de las neuritas (Sierra-Fonseca et al., 2014).

Los neurofilamentos (NF), miembros de la familia de filamentos intermedios de clase IV, se expresan exclusivamente en el sistema nervioso central ubicados principalmente en los axones de las neuronas y en el citoplasma. Los NF les dan soporte estructural a las células, especialmente en las dendritas y el soma, además de los axones. Existen 3 tipos de

neurofilamentos, los de cadena pesada (NF-H), los de cadena media (NF-M) y los de cadena ligera (NF-L). Estas tres proteínas se unen para formar finalmente un heteropolímero de 10 nm de diámetro el cual es la forma madura del neurofilamento (Gaetani et al., 2019; Khalil et al., 2018). Se ha reportado que se expresa en altos niveles en células PC12 tratadas con NGF comparadas con células PC12 control. Estos resultados indican que un aumento en la expresión de NF constituye una evidencia bioquímica de diferenciación neural (Doucette et al., 2004; Lee et al., 1982; Ohuchi et al., 1994).

La enzima α enolasa es una proteína glicolítica ubicua con la función de convertir anaeróticamente a la glucosa en metabolitos adecuados para la oxidación. Posteriormente se reportó un tipo de enolasa que es diferente en estructura y función a la ya reportada pero que se ubica en células neuroendócrinas periféricas y neuronas diferenciadas. Esta isoenzima fue llamada enolasa específica de neurona (NSE) o también llamada γ enolasa. (BOCK & DISSING, 1975; Fletcher et al., 1976). Además, una tercera isoenzima llamada β enolasa esta presente específicamente en las células musculares. Por otro lado, la NSE se expresa en forma de dímeros dependiendo del tipo celular, por ejemplo: los dímeros $\alpha\gamma$ y $\gamma\gamma$ se expresan en neuronas, $\gamma\gamma$ en la microglía y oligodendrocitos y $\alpha\gamma$ en astrocitos (Isgrò et al., 2015; Polcyn et al., 2017). En este sentido, se ha reportado por diferentes trabajos que la expresión de NSE esta correlacionada con la diferenciación neuronal (Marangos et al., 1979; Schmechel et al., 1980). Un trabajo realizado por Viores y colaboradores, observaron un incremento en los niveles de NSE en células PC12 tratadas con NGF por cinco días comparadas con células sin NGF (Viores et al., 1982).

Por otra parte, también se han utilizado en diferentes trabajos marcadores de diferenciación celular tales como la tirosina hidroxilasa o la

proteína 2 asociada a microtúbulos (García-Cruz et al., 2019)(Acosta et al., 2004).

2.6. Marcadores de proliferación celular

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) es una proteína de aproximadamente 29 KDa que se ha conservado evolutivamente en todos los eucariontes. Se ha reportado que esta proteína funciona como factor de procesividad de las DNA polimerasas δ y ϵ en la síntesis del DNA, además de otras funciones como la reparación del DNA, la remodelación de la cromatina, progresión del ciclo celular y segregación de cromosomas (Strzalka & Ziemienowicz, 2011). Debido a las funciones que cumple PCNA, se ha establecido como un marcador de proliferación celular. De modo que, aquellas células que se encuentran en división celular expresan una cantidad relativamente mayor de PCNA que las que se hayan en quiescencia celular. Y efectivamente, se ha observado en ensayos de western blot, que hay un aumento marcado en la expresión de PCNA en muestras de carcinoma hepatocelular comparado con muestras de paracarcinoma (Ma et al., 2016).

Por otro lado, la quinasa de adhesión focal (FAK) es una proteína tirosina quinasa no receptora de 125 KDa aproximadamente que se encuentra ubicada en la periferia celular y en los puntos de contacto célula-célula o adhesiones focales. FAK en su forma activa participa en la transmisión de señales dependientes de la adhesión que están implicadas en el crecimiento celular, migración y supervivencia, aunque también en la proliferación y la invasión celular por participar en la vía de señalización mediada por el receptor del factor de crecimiento. A través de diferentes receptores como las integrinas, receptores de factores de crecimiento, los acoplados a proteínas G, los de quinasa de tirosina o los de citosinas se puede activar a FAK. Sin embargo, también se activa por la fosforilación de la Tyr-397 por la proteína Src o incluso por la autofosforilación en el mismo residuo. Esta fosforilación sirve para la interacción de proteínas como Src, Shc, PI3K, Grb7, PLC γ o

proteínas que tengan el dominio SH2 y que resultará en la activación de sus respectivas vías de señalización y actividades biológicas (Li & Hua, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

Considerando que las isoformas de Dp71 se expresa principalmente en el sistema nervioso central y tienen funciones relacionadas con la diferenciación neural, adhesión y división celulares, entre otras, es importante identificar los mecanismos moleculares responsables de los trastornos cognitivos y del neurodesarrollo caracterizando a las isoformas de Dp71 expresadas en el modelo celular PC12.

El conocer las funciones de las isoformas de Dp71 en el cerebro humano permitirá contribuir al conocimiento de cómo se desarrollan estos procesos a nivel molecular.

4. HIPÓTESIS

Las células PC12 son un modelo que puede proporcionar información sobre la función de las diferentes isoformas de Dp71 y su participación durante el proceso de diferenciación.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

- Determinar los patrones de expresión de las isoformas de Dp71 en células PC12 durante la diferenciación neuronal inducida por NGF.

5.2. Objetivos Particulares

1. Obtener un cultivo de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas inducidas por NGF.
2. Caracterizar el cultivo de células no diferenciadas y diferenciadas por morfología y expresión de marcadores de diferenciación NF y NSE.
3. Determinar las isoformas de la proteína Dp71 que se expresan en células PC12 no diferenciadas y diferenciadas mediante un ensayo de RT-PCR y clonación en un vector de expresión.
4. Caracterización de las isoformas identificadas a nivel de secuenciación del cDNA.
5. Analizar de manera comparativa las diferencias de expresión en las isoformas de Dp71 durante la diferenciación de las células PC12.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para comenzar, se obtuvieron cultivos de células PC12 control y tratadas con NGF para inducir la diferenciación celular. Se le hizo cambio de medio cada tercer día a las células control y a las tratadas se renovó el NGF con el cambio de medio hasta obtener células diferenciadas a 12 días. Posteriormente, se hizo la extracción de proteínas totales de las células no diferenciadas y diferenciadas para el análisis de marcadores de proliferación y diferenciación celular mediante western blot. De igual manera, se hizo la extracción del RNA total para el análisis de los transcritos de las distrofinas de Dp71 mediante RT-PCR. Los productos obtenidos fueron clonados en un vector de expresión y se utilizaron para transformar bacterias *E. Coli* DH5 α . Finalmente, se analizaron las colonias obtenidas por PCR multiplex para analizar el procesamiento alternativo de las distrofinas de Dp71.

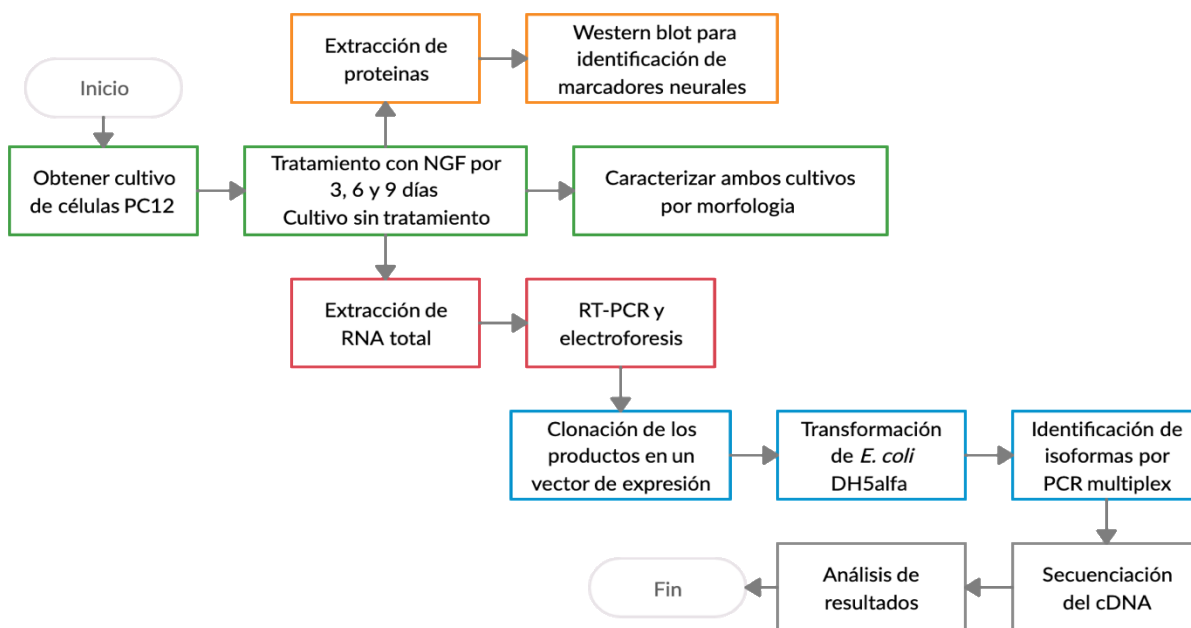


Figura 4. Estrategia experimental. Los recuadros verdes representan el flujo de trabajo para el cumplimiento del objetivo 1. Los recuadros naranjas del objetivo 2. Los rojos y azules para el objetivo 3 y en gris para el objetivo último número 4.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cultivo celular

Las células PC12 se cultivaron en placas de plástico P100 con un medio suplementado DMEM diluido a 1:10, 10% de suero de caballo, 5% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 1 mg/mL de estreptomicina a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con 5% de CO₂. Después de tres días de adaptación de las células, se hizo el cambio de medio al cultivo que incluyó 50 ng/mL de 2.5 S factor de crecimiento neural (NGF) durante periodos de 3,6 y 9 días.

Para la cosecha de las células, primero se retiró el medio de la caja de cultivo, luego se lavaron las células con buffer fosfato salino (PBS) y se utilizó una espátula para desprender las células y finalmente se centrifugaron a 5,000 rpm por 5 minutos.

7.2. Caracterización morfológica de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas

Las células PC12 se cultivaron a baja confluencia en placas de plástico P100 recubiertas de colágeno en un medio suplementado DMEM y se trataron con NGF 50 ng/mL a los días 0, 3, 6 y 9. En la figura 6 se muestran las micrografías de las células control y tratadas con NGF, que fueron tomadas con un microscopio invertido.

7.3. Cuantificación de proteínas por Western blot

El extracto total de proteínas se obtuvo del cultivo de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas con NGF. Se removieron las células de la placa de cultivo, se lavaron con PBS y después se le agregó a cada pastilla 200 µL del buffer de extracción 2 (50 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Tritón x-100 e inhibidores de proteasas cOmplete). Posteriormente, se calculó la concentración de proteína utilizando el método Bradford. A las proteínas

totales se les agregó buffer de carga de electroforesis (75mM Tris-HCl pH 6.8, 15% SDS, 5% mercaptoetanol, 20% glicerol, 0.01% azul de bromofenol). Se corrieron un equivalente de 60 µg de proteína, de cada una de las muestras, en un gel de 8 % poliacrilamida y SDS al 10 % a 118 v. Luego, se hizo la transferencia de las proteínas en el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa por toda la noche a 4 °C a 23 v. Al final de la transferencia, se tiñeron las membranas con rojo de Ponceau 1X por 5 min y después se retiró el colorante con un lavado con agua destilada y por último con TBS-T por 10 min. Las membranas se bloquearon utilizando leche en polvo sin grasa al 5 % por 2 h y luego se incubaron toda la noche con anticuerpos primarios, las especificaciones se encuentran en la tabla 1. Después, se hicieron 3 lavados a cada membrana con TBS-T de 10 min cada uno. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 1) disuelto en leche al 5% por 2 horas, luego se lavaron 2 veces las membranas con TBS-T por 10 min y finalmente se revelaron en el cuarto oscuro. Para la determinación de la expresión relativa de cada proteína se hizo un escáner por densitometría de las bandas, utilizando a β-actina como control de carga, en el software Image J.

Tabla 1. Características de anticuerpos.

Anticuerpo	Especie	Dilución
NSE	Conejo	1:100
NF-L	Ratón	1:500
FAK	Conejo	1:200
PCNA	Ratón	1:250
β-Dys	Monoclonal	1:100
H4	Conejo	1:100
Actina	Monoclonal	1:200

7.4. Reacción de RT-PCR

El RNA total se extrajo de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas con NGF mediante el método de Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para obtener el cDNA de Dp71 se realizó la síntesis en un volumen total de mezcla de reacción de 20 µL con 2 µg de RNA, utilizando

iniciadores al azar y el kit de síntesis de la primera cadena SuperScript III (Invitrogen), de acuerdo a lo descrito por el proveedor.

Para la amplificación de los transcritos de Dp71, se utilizaron 3 μ L de cDNA en la mezcla de reacción de PCR, 1 μ L de los iniciadores 5'UTR-Dp71 y gEx79R (Tabla 2), la polimerasa Phusion High Fidelity PCR MM with HF buffer (New England BioLabs), 5% de DMSO y agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 50 μ L. Las condiciones específicas de PCR se indican en la figura 5.

Tabla 2. Condiciones de amplificación por PCR.

Producto amplificado	Nombre del iniciador	Secuencia 5'-3'	Condiciones de PCR
Dp71	5'UTR-Dp71	AGTGCTTTCGGCTGCGAGC	40 ciclos de 98 °C/30s y 68 °C/1.5min
	gEx79R	GTAAACATTTATTCTGCTCCTTCTTATATCT	
	(Aragón et al., 2016)		
b-actina	Actina 1	TTGTAACCAACTGGGACGATATGG	35 ciclos de 98 °C/30s, 58 °C/30s, 60 °C/30s, y 72 °C/10min
	Actina 2	GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG	
PCR multiplex			
Exones 71-74	hEx69F	CATAAAATGCACTATCCCATGGT	40 ciclos de 95 °C/30s, 55 °C/30s y 72°C/30s
	hEx75R	AGTGGGGACAGGCCTTTATG	
	(Aragón et al., 2016), (D. Cubas, Tesis Maestría)		
Exones 77-79	gEx77F	CCTCCCTAGTTCAAGAG	40 ciclos de 95 °C/30s, 55 °C/30s y 72°C/30s
	gEx79R		
	(Aragón et al., 2016)		

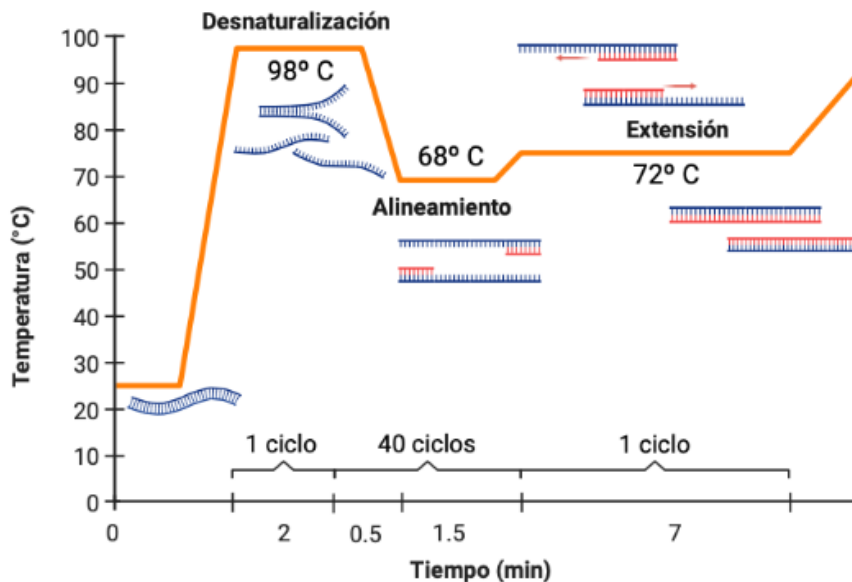


Figura 5. Condiciones de PCR para Dp71. La desnaturalización inicial fue de 98° C por 2 minutos. Seguido de: 40 ciclos de desnaturalización a 98° C por 0.5 minutos y alineamiento y extensión a 68° C por 2 minutos. La extensión final fue de 7 minutos a 72 °C.

7.5. Clonación de isoformas de Dp71

Los productos obtenidos de la RT-PCR fueron recuperados del gel y purificados por electroelución, utilizando acetato de amonio como buffer de recuperación. Posteriormente, 8 μ L de los amplicones purificados fueron adenilados en los extremos utilizando 0.25 μ L de GoTaq Flexi DNA polimerasa, 1 μ L de buffer 5X, 1 μ L de dNTPs, 3.5 μ L de MgCl₂ 25 mM, 0.8 μ L de agua estéril para completar un volumen final de 12.5 μ L y se incubó la mezcla de reacción a 72 °C por 20 minutos. Después, 3 μ L del DNA adenilado fue ligado con 1 μ L del vector de tránsito pGEM-T Easy (1:6 relación inserto:vector), 5 μ L de buffer de ligación 2X y 1 μ L de Ligasa T4 DNA por 1 h a temperatura ambiente y posteriormente a 4°C toda la noche. Los 10 μ L del vector obtenido fueron utilizados para la transformación de 100 μ L de las células competentes de *Escherichia coli* DH5 α . Las células competentes se prepararon siguiendo el protocolo de Hanahan. Esta mezcla se incubó 30

minutos en hielo, posteriormente, se le dio un choque térmico a las células con una temperatura de 42 °C por 90 segundos y 2 minutos en hielo y en seguida se agregó 500 µL de medio SOC y se incubaron a 37 °C. Después, 120 µL de las células transformadas fueron espatuladas en placas con medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y se incubaron a 37° C por aproximadamente 17 h. Todas las colonias fueron recolectadas y sembradas en placas con medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina.

7.6. PCR multiplex

Para el análisis de las isoformas de Dp71, las colonias fueron analizadas por PCR multiplex utilizando los pares de iniciadores hEx69F-hEx75R y gEx77F-gEx79R para determinar el procesamiento alternativo de los exones 71-74 y 78 respectivamente y además de la Taq DNA polimerasa en una mezcla de reacción de 50 µL. Las condiciones de la PCR multiplex se muestran en la tabla 2. Por último, se tomaron 5 µL de los amplicones para ser visualizados en un gel de agarosa al 1.5% pre-teñido con bromuro de etidio.

7.7. Secuenciación de isoformas de Dp71

Las isoformas representativas identificadas fueron analizadas por secuenciación usando el kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Se utilizaron 300-400 ng de cada plásmido purificado, 4 µL de los iniciadores hEx75R y gEx79R para la mezcla de reacción de secuenciación, completando un volumen final de 20 µL. Para la purificación de los fragmentos a secuenciar se agregaron 80 µL de isopropanol al 75 %, se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, se centrifugó a 13,000 rpm, luego se decantó y se añadieron 400 µL de isopropanol al 75 % y se mezcló en el vortex, después se centrifugó en las condiciones anteriores, se decantó y finalmente se secó la muestra en una centrifuga al vacío por 10-15 minutos.

8. RESULTADOS

8.1. Caracterización morfológica de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas

Se realizó una curva de crecimiento de las células PC12 sin diferenciar iniciando con un conteo de aproximadamente 400,000 células/mL a las 0 horas y concluyendo la curva con 2,760,000 células/mL a las 216 horas en promedio. Se puede observar que la curva de crecimiento se comporta de manera similar a la ecuación de crecimiento exponencial (Figura 6). Posteriormente, se obtuvieron células PC12 sin diferenciar y células diferenciadas a diferentes tiempos hasta 12 días de diferenciación utilizando NGF, con el fin de caracterizarlas morfológicamente. Se observaron bajo el microscopio de campo claro encontrando que existe una diferencia morfológica muy clara entre ambos estados celulares (Figura 7). Las células no diferenciadas tienen un cuerpo celular redondeado u ovoide, con microvellosidades y con gránulos de diferentes tamaños, a diferencia de las células diferenciadas las cuales adquieren un cuerpo celular aplanado, neuritas ramificadas que vuelven a algunas células unipolares, dipolares o multipolares, además, se logra observar espinas, así como gránulos dispersos.

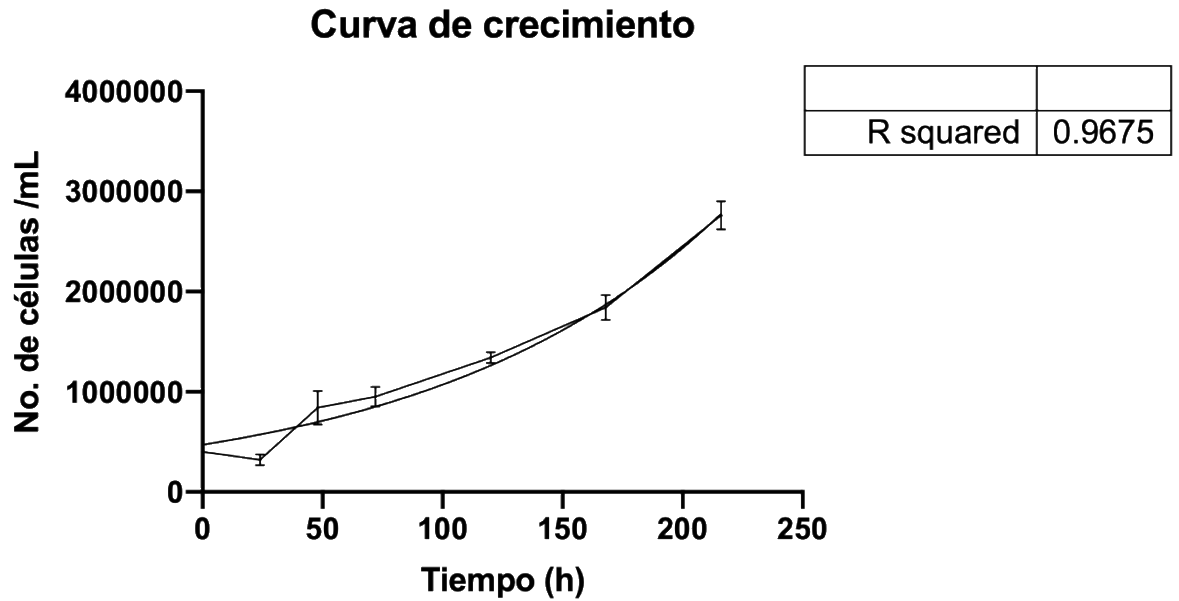


Figura 6. Curva de crecimiento de células PC12 no diferenciadas. Con un conteo en el tiempo 0 de 400,000 células/mL y a un tiempo final de 216 horas de 2,760,000 células/mL. Los datos se muestran como promedio y desviación estándar (n=2).

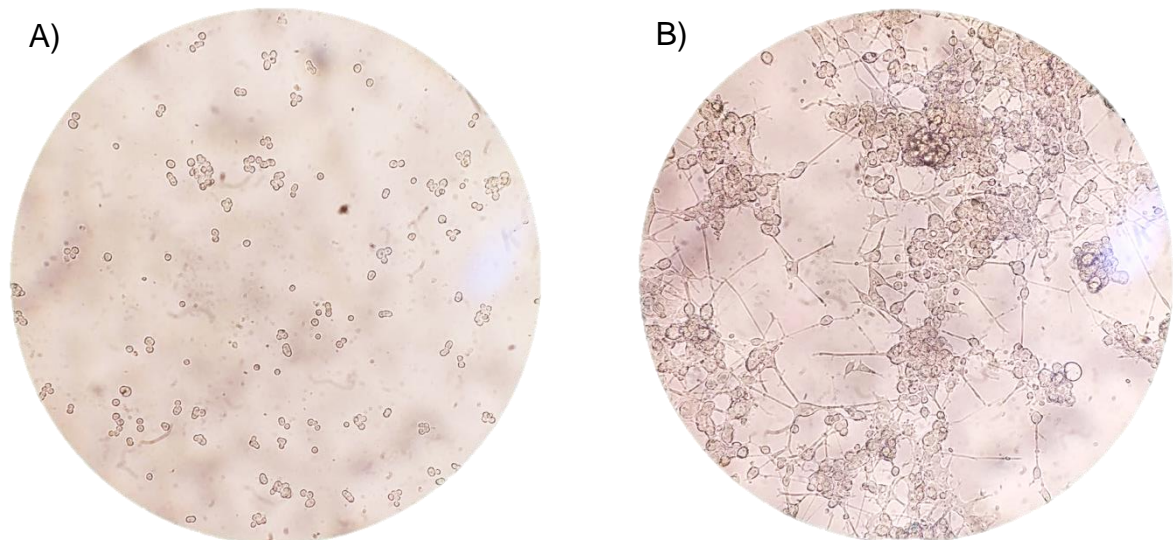


Figura 7. Micrografías de células PC12. A) Las células no diferenciadas presentan una morfología redonda, con microvellosidades y con gránulos de distintos tamaños. B) Las células con 12 días de diferenciación se observan aplanadas, con neuritas ramificadas y con gránulos dispersos. Las micrografías fueron tomadas con objetivos 10X y 20X respectivamente, utilizando un microscopio invertido de campo claro.

8.2. Caracterización fisiológica de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas

8.2.1. Expresión de marcadores de proliferación celular

Para evaluar la proliferación celular en ambos estados de las células PC12, se utilizó un anticuerpo anti-PCNA. Este ensayo permitió detectar una mayor cantidad de la proteína en las células de no diferenciadas en comparación con las de 12 días de diferenciación (Figura 8 A). Se llevó a cabo un análisis de las bandas mediante un análisis de densitometría en donde se observa una elevada expresión de esta proteína en células no diferenciadas y una significativa reducción (4 veces menor) de la expresión en las células diferenciadas a 11 días (Figura 8 B). Esta disminución en las células PC12 diferenciadas corresponde con una baja proliferación celular.

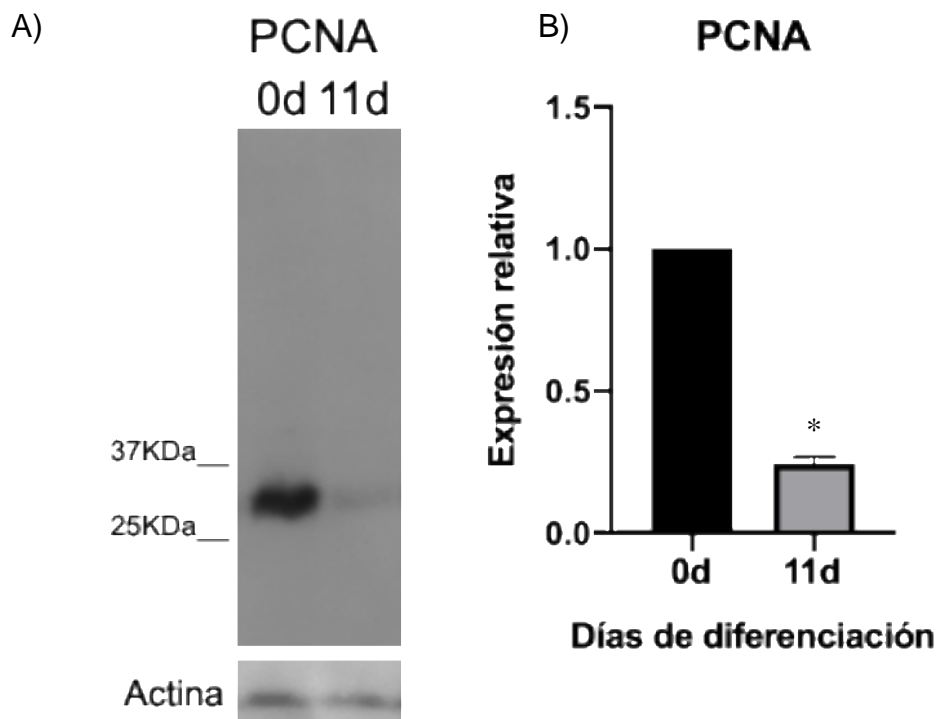


Figura 6. Análisis de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). A) Western blot utilizando el anticuerpo contra PCNA utilizando el extracto de proteínas totales de células PC12 con 0 y 12 días de diferenciación. B) Cuantificación de la expresión relativa de PCNA por análisis de densitometría a través del software ImageJ. Se utilizó a actina como control de carga. Los datos se muestran como promedio y desviación estándar (n=2).

Por otra parte, se analizó la expresión de la proteína FAK (Figura 9) utilizando el anticuerpo anti-FAK, y se pudo observar que no hay un cambio significativo tanto en las células de 0 días como en las de 12 días de diferenciación. Las bandas que se observan en el western blot (Figura 9 A) son similares en ambas condiciones. El mismo comportamiento se observa al analizar la cuantificación de las bandas obtenidas ya que no hay un cambio importante entre las células no diferenciadas y diferenciadas (Figura 9 B).

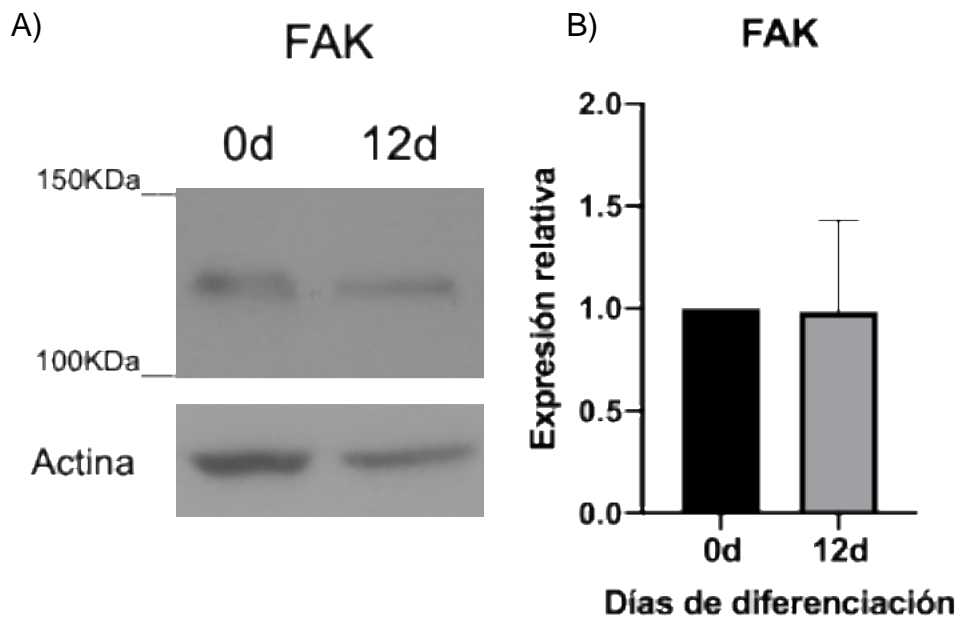


Figura 7. Análisis de la expresión de la quinasa de adhesión focal (FAK). A) Western blot utilizando el anticuerpo contra FAK utilizando el extracto de proteínas totales de células PC12 con 0 y 12 días de diferenciación. B) Cuantificación de la expresión relativa de FAK por análisis de densitometría a través del software ImageJ. Se utilizó a actina como control de carga. Los datos se muestran como promedio y desviación estándar (n=2).

8.2.2. Expresión de marcadores de diferenciación celular

Con el objetivo de analizar la expresión de marcadores de diferenciación en las células PC12 tratadas con NGF, se utilizaron ensayos de western blot. El primer marcador analizado correspondió a NSE, y para esto se utilizó el anticuerpo anti-NSE. Se obtuvieron extractos de proteínas de células no diferenciadas y tratadas con NGF por 12 días. En las muestras de las células no diferenciadas no se logra observar la expresión de esta proteína, contrario a las muestras de las células diferenciadas a 12 días donde sí se observa una banda cercana a los 50 kDa que indica la expresión de NSE (Figura 10 A). Al cuantificar la expresión relativa de NSE, se observa claramente una expresión muy baja de proteína en 0 días y una expresión elevada que es estadísticamente significativa. Se calculó una expresión de 45 veces mayor de NSE en 12 días comparadas con las de 0 días (Figura 10 B). Estos datos muestran que las células PC12 con 12 días de tratamiento con

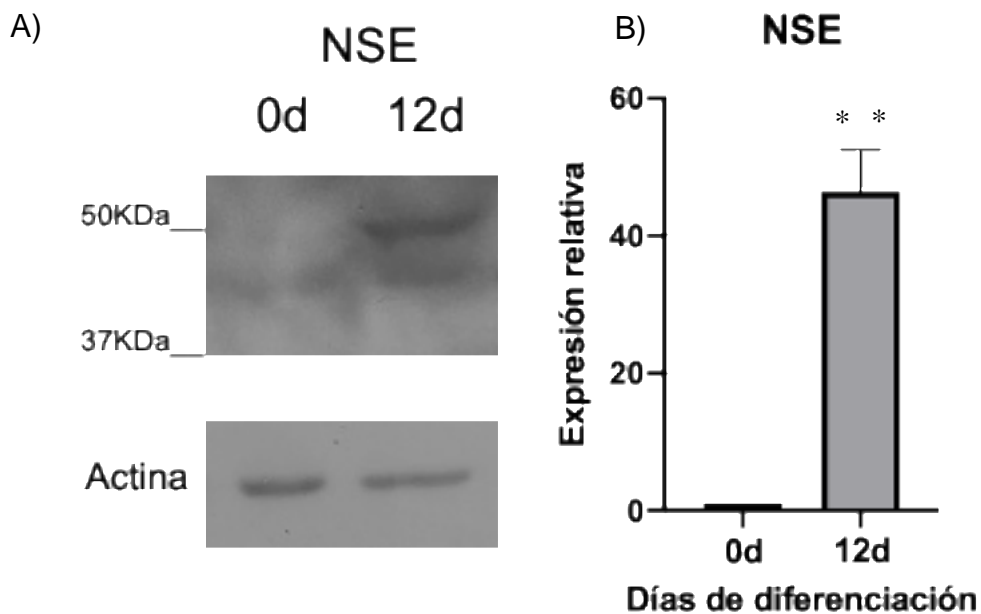


Figura 8. Análisis de la expresión de la enolasa específica de neuronas (NSE). A) Western blot utilizando el anticuerpo contra NSE utilizando el extracto de proteínas totales de células PC12 con 0 y 12 días de diferenciación. B) Cuantificación de la expresión relativa de NSE por análisis de densitometría a través del software ImageJ. Se utilizó a actina como control de carga. Los datos se muestran como promedio y desviación estándar (n=2).

NGF se encuentran diferenciadas, precisamente porque la NSE sólo puede ser expresada en aquellas células de tipo neuroendócrinas y en neuronas diferenciadas (Fletcher et al., 1976).

Adicionalmente, se analizó la expresión de NF-L, en células PC12 no diferenciadas y diferenciadas. En la figura 11A se puede observar la ausencia de la banda de aproximadamente 68 kDa en las células no diferenciadas y una marcada expresión las diferenciadas. En la figura 11B se observa la cuantificación de la expresión relativa de NF-L, en el cual se aprecia un aumento de 9 veces más en las células diferenciadas a 12 días comparados con las células no diferenciadas, por lo tanto, esta diferencia sugiere una completa diferenciación de las células PC12 tratadas con NGF por 12 días.

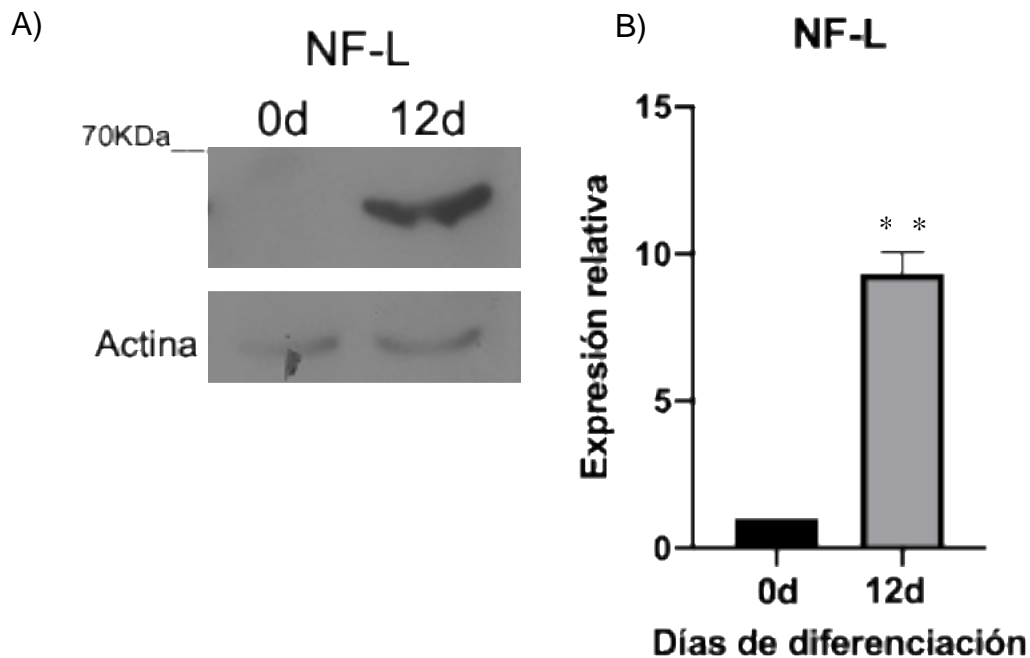


Figura 9. Análisis de la expresión de neurofilamento de cadena ligera (NF-L). A) Western blot utilizando el anticuerpo contra NF-L utilizando el extracto de proteínas totales de células PC12 con 0 y 12 días de diferenciación. B) Cuantificación de la expresión relativa de NF-L por análisis de densitometría a través del software ImageJ. Se utilizó a actina como control de carga. Los datos se muestran como promedio y desviación estándar (n=2).

8.2.3. Expresión de Dp71 y β -dístroglicano

Se analizó también la expresión de la proteína β -dístroglicano, con el objetivo de determinar si se presenta un cambio en su nivel de expresión durante la diferenciación. Como puede observarse en la figura 12 panel A, aparentemente hay una reducción en la banda de aproximadamente 43 kDa que corresponde a la expresión de β -dístroglicano. Además, la cuantificación de la expresión relativa muestra también una reducción de la proteína en las células diferenciadas comparadas con las no diferenciadas, sin embargo, no hay diferencia significativa (Figura 12 B).

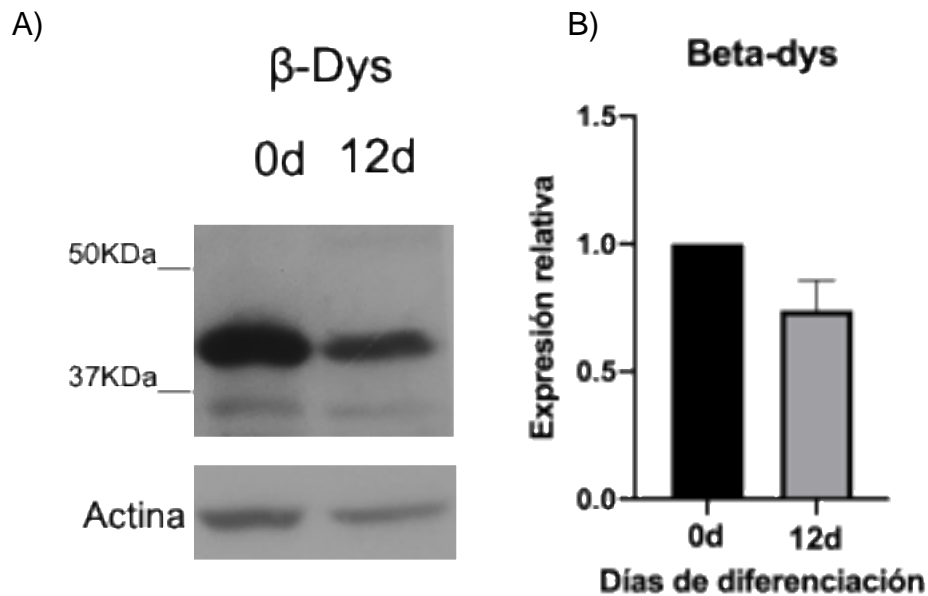


Figura 10. Análisis de la expresión de neurofilamento de β -dístroglicano (β -Dys). A) Western blot utilizando el anticuerpo contra β -dístroglicano utilizando el extracto de proteínas totales de células PC12 con 0 y 12 días de diferenciación. B) Cuantificación de la expresión relativa de β -dístroglicano por análisis de densitometría a través del software ImageJ. Se utilizó a actina como control de carga. Los datos se muestran como promedio y desviación estándar (n=2).

Igualmente, se examinó la expresión de la proteína Dp71 en las células PC12 tanto no diferenciadas como en las diferenciadas a 12 días, se identificaron específicamente todas aquellas isoformas incluidas en el grupo d, debido a que el anticuerpo utilizado reconoce los aminoácidos 3669-3685 que corresponden a los exones 77-79, propios de este grupo (Figura 13 A). Se observó que no hay un cambio importante en la expresión de esta proteína en el extracto de proteínas totales obtenido de las células diferenciadas comparado con las células sin diferenciar (Figura 13 B).

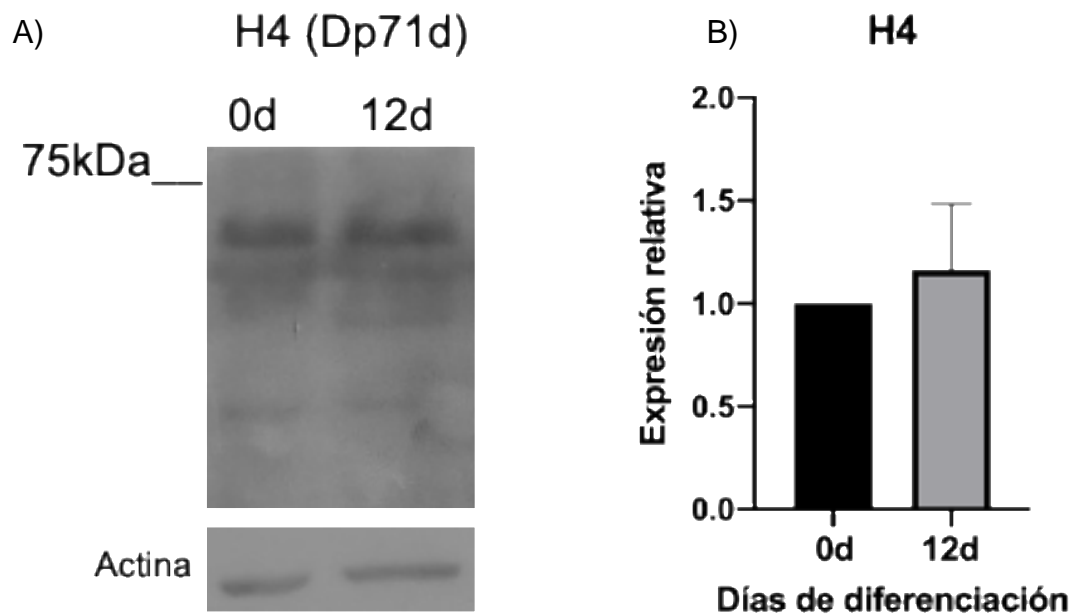


Figura 11. Análisis de la expresión de neurofilamento de Dp71d (H4). A) Western blot utilizando el anticuerpo contra Dp71d utilizando el extracto de proteínas totales de células PC12 con 0 y 12 días de diferenciación. B) Cuantificación de la expresión relativa de Dp71d por análisis de densitometría a través del software ImageJ. Se utilizó a actina como control de carga. Los datos se muestran como promedio y desviación estandar (n=2).

8.3. Identificación de isoformas de Dp71 que se expresan durante la diferenciación de las células PC12

8.3.1. Extracción de RNA y ensayos de RT-PCR de Dp71

Se extrajo RNA total de las células PC12, utilizando el método de Trizol como se describió en materiales y métodos, tanto para las células PC12 no diferenciadas como diferenciadas, con el fin de poder obtener las isoformas de Dp71 a nivel de transcritos. En la Figura 14A se muestra el RNA analizado por electroforesis, en donde se pueden notar los fragmentos característicos de las subunidades 28s y 18s del RNA ribosomal, lo que indica que el RNA obtenido presenta la integridad y concentración adecuada. Por otra parte, en el panel B se muestran las cuantificaciones de cada uno de los RNA obtenidos.

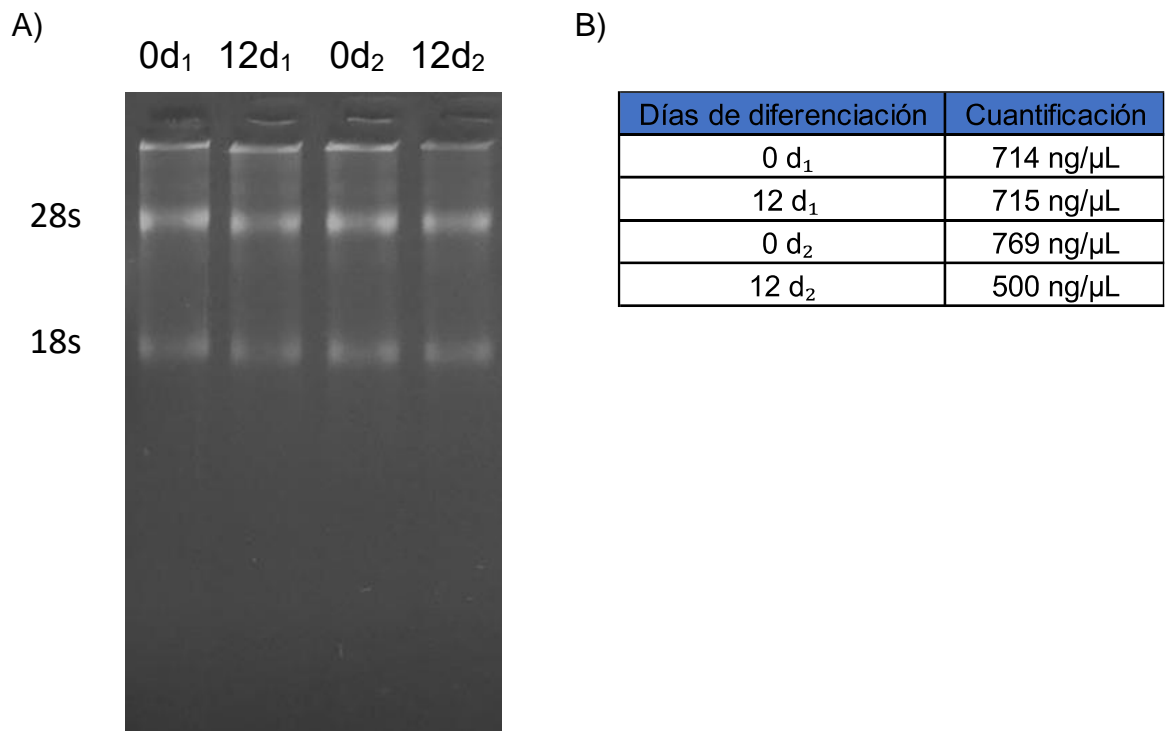


Figura 12. Extracción de RNA total de células PC12. A) Electroforesis de 500 ng de RNA extraído en un gel al 1.2% de agarosa, donde se observa los fragmentos de las subunidades 28s y 18s del RNA ribosomal. B) Cuantificación del RNA obtenido de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas por duplicado.

Se utilizaron iniciadores al azar para obtener el cDNA y se procedió a amplificar los transcritos de Dp71 expresados por las células PC12 en los estados no diferenciados y diferenciados. Para eso, se utilizó el par de iniciadores 5'UTR y gEx79R con los cuales se amplifican las isoformas de los grupos Dp71d, Dp71f y Dp71e (Figura 15). Las condiciones específicas de amplificación se muestran en la Tabla 1. Los amplicones fueron analizados en un gel de agarosa al 1.2% (Figura 15), en donde se observa un fragmento por arriba de 1,605 pb, de acuerdo con el marcador de peso molecular, en los carriles 3 a 6 que corresponden a los cDNA de las condiciones 0d₁, 12d₁, 0d₂ y 12d₂ respectivamente. Este fragmento corresponde con el tamaño esperado de 2,022 pb, según las hibridaciones de iniciadores utilizados (Tabla 2) en la secuencia de Dp71 reportada con código de identificación de secuencias de referencia en NCBI: NM_012698.3 Además, la migración de estos fragmentos es similar al fragmento observada en el control positivo en el carril 7. Posteriormente los fragmentos fueron recortados del gel y purificadas por

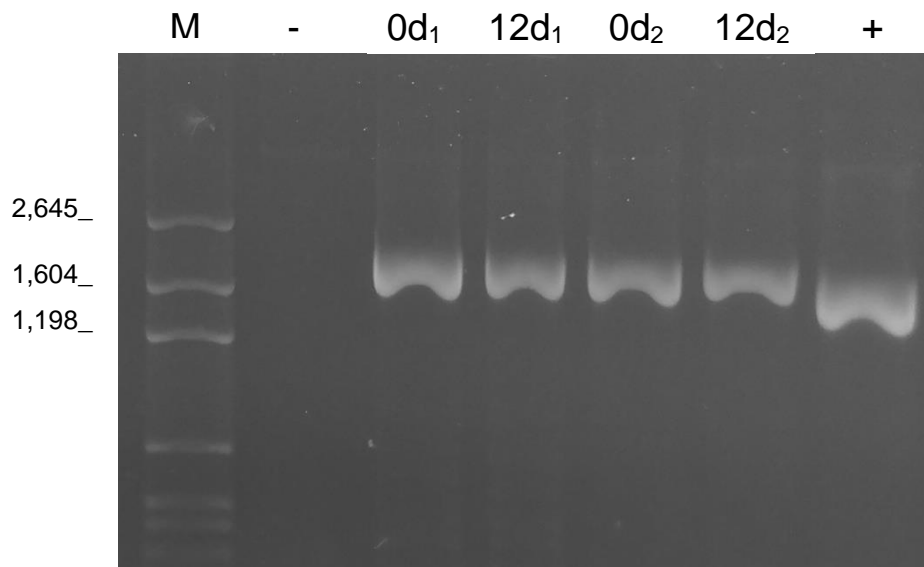


Figura 13. PCR de Dp71 de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas. A partir del RNA total extraído de cada duplicado de células en 0 y 12 días de diferenciación, se obtuvo el cDNA y posteriormente se amplificó a Dp71 usando oligos específicos. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, en el segundo el control negativo, de los carriles 3-6 se usó el cDNA proveniente de las condiciones 0d₁, 12d₁, 0d₂ y 12d₂ respectivamente. En el carril final se muestra el control positivo.

electroelución para continuar con los ensayos de clonación de las isoformas de Dp71.

Tabla 3. Tamaño de las secuencias de Dp71.

Secuencia	Exones-Intrones (nt)	Exones (nt)
5'UTR-Exón 79	156,411	2,022
Exón 69-Exón 75	37,413	569
Exón 77-Exón 79	11,832	157

8.3.2 Clonación y análisis por PCR multiplex de isoformas de Dp71

Una vez purificado los amplicones que corresponden a Dp71, se utilizó 3 µL de cada una de los productos de cada condición para la reacción de ligación para conservar una relación transcrito:vector de 6:1, de acuerdo a la fórmula:

$$\frac{ng \text{ de vector} \cdot kb \text{ del inserto}}{kb \text{ del vector}} \cdot relación \text{ inserto:vector} = ng \text{ de inserto}$$

El producto de ligación se usó posteriormente para realizar la transformación con células competentes *E. coli* cepa DH5α. Finalmente, cada una de las colonias obtenidas fueron analizadas por PCR multiplex.

Con el objetivo de identificar el procesamiento alternativo de los transcritos que se expresan tanto en las células PC12 no diferenciadas como en las diferenciadas, se realizó una reacción de PCR multiplex, con los pares de iniciadores hEx69F-hEx75R y gEx77F-gEx79R. Estos iniciadores permitieron analizar los procesamientos alternativos de los exones 71-74 y el 78 respectivamente (Figura 16). Las condiciones específicas de la PCR multiplex se muestran en la tabla 2.

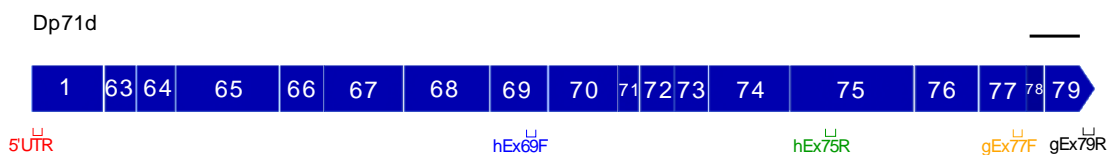


Figura 14. Esquema de hibridación de primers utilizados.

8.3.3. Identificación de isoformas de Dp71 que se expresan en células PC12 no diferenciadas

Las colonias transformadas con los plásmidos que contenían las secuencias de los transcritos de 0 días de diferenciación fueron picadas y analizadas mediante PCR multiplex. Los amplicones de 104 colonias se analizaron en geles de agarosa al 1.5 % (Figuras 17-20), de las cuales 68 fueron positivas, es decir, que tuvieron al menos el producto de un amplicón. En cada uno de los geles se observa la presencia de un fragmento superior que representa la amplificación de los exones del 72-74, de acuerdo con el tamaño esperado de 530 pb de este amplicón, 55 colonias (No. de colonias: 18-25, 27, 31, 34-35, 41-43, 45, 46, 50, 52, 56, 58, 61, 64, 71-72, 74-80, 82-84, 86-88, 92-95, 97-99, 100-103, 105-107, 109 y 113-114) presentan este fragmento (Figura 24 A). Sin embargo, también hay colonias en las que aparentemente no se observa este fragmento, por lo que fueron clasificadas como no determinadas (n/d) ya que no se pudo observar si contienen o no los exones 71 al 74 u otros exones, el total de estos casos especiales fueron de 12 colonias (No. de colonias: 17, 35, 39, 47-48, 57, 59, 60, 68-69, 70 y 81). También se observó la amplificación de un fragmento de 410 pb que indica la presencia de un transcrito que carece del exón 74 (No. de colonia: 8). Por otro lado, el fragmento inferior corresponde al fragmento con la amplificación del exón 78 de 157 pb (grupo Dp71d), que se presenta en el total de las colonias positivas analizadas (Figura 24 B). Como se muestra en la electroforesis (Figura 30), la migración de los fragmentos de los exones 72-74, 71-73 y 78

corresponden con el tamaño esperado de 530 pb (carril 2), 410 pb (carril 3) y 157 pb (carriles 2-5).

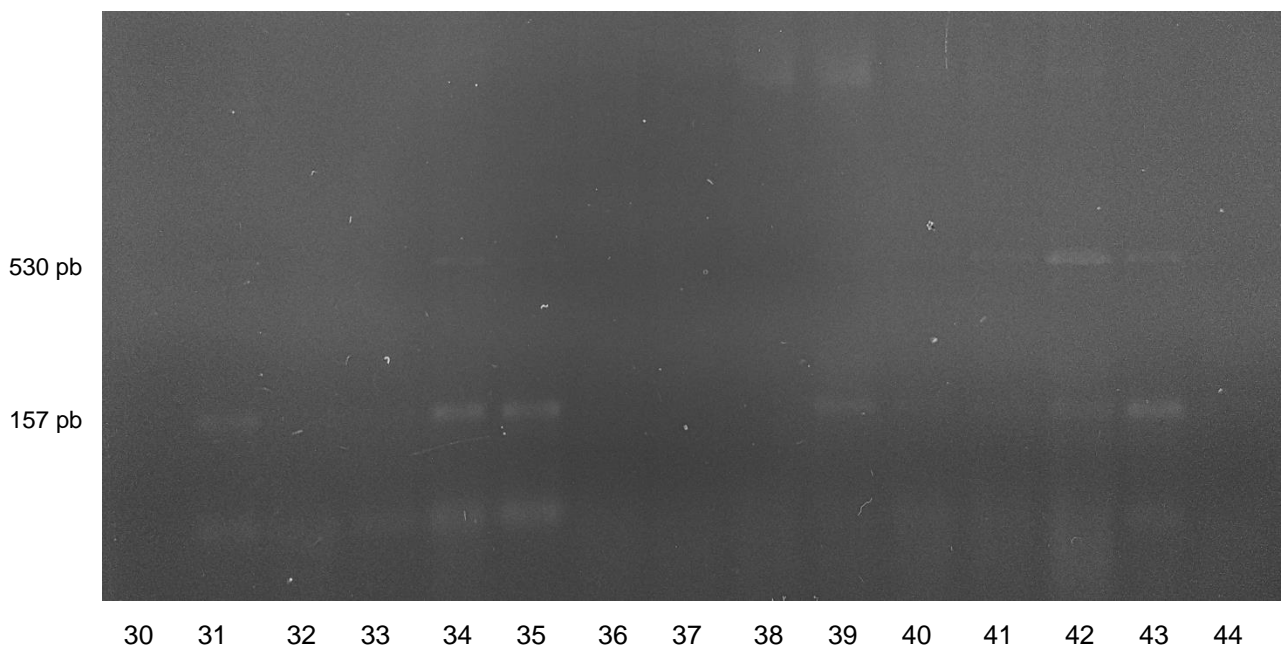
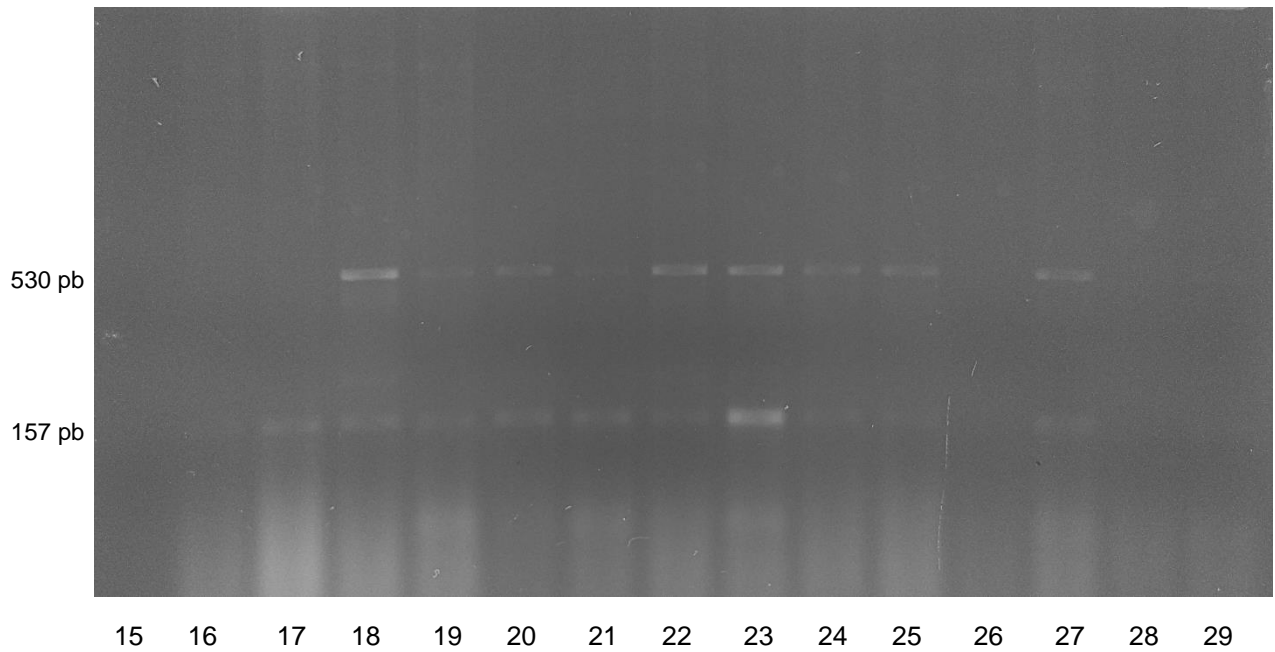
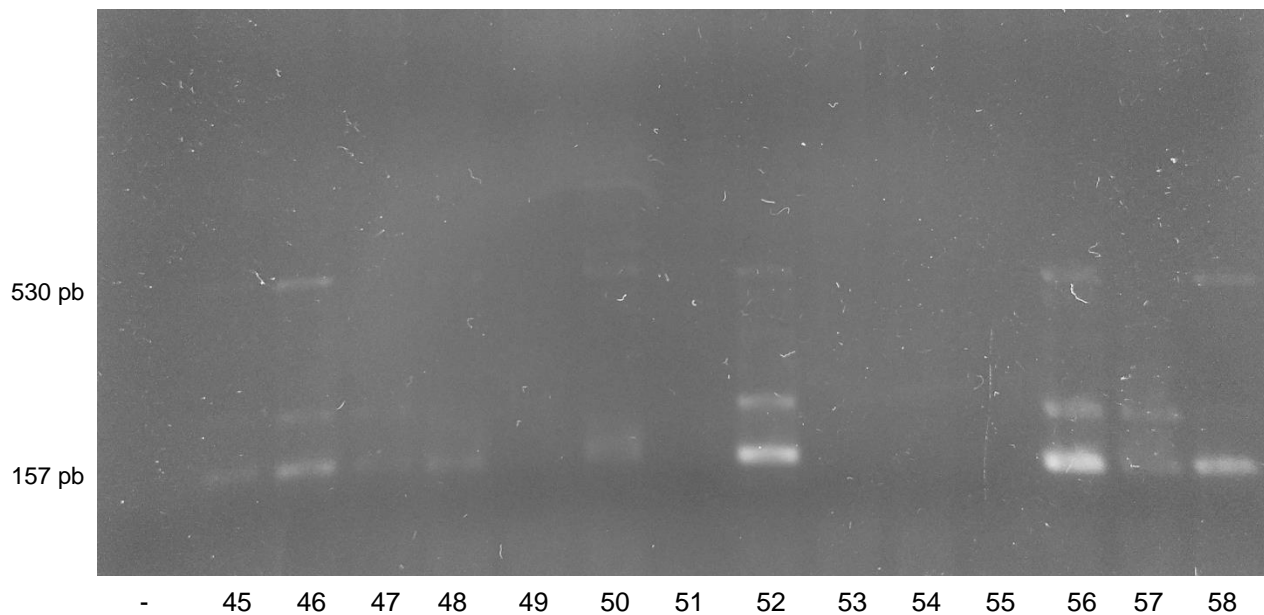


Figura 15. Análisis por PCR multiplex de colonias Od: 15-44. El fragmento superior representa la amplificación de los exones 72-74 (530 pb) y el fragmento inferior del exón 78 (157 pb). Los números al inferior de cada imagen representan el número de la colonia analizada.

Colonias 45-58



Colonias 59-70

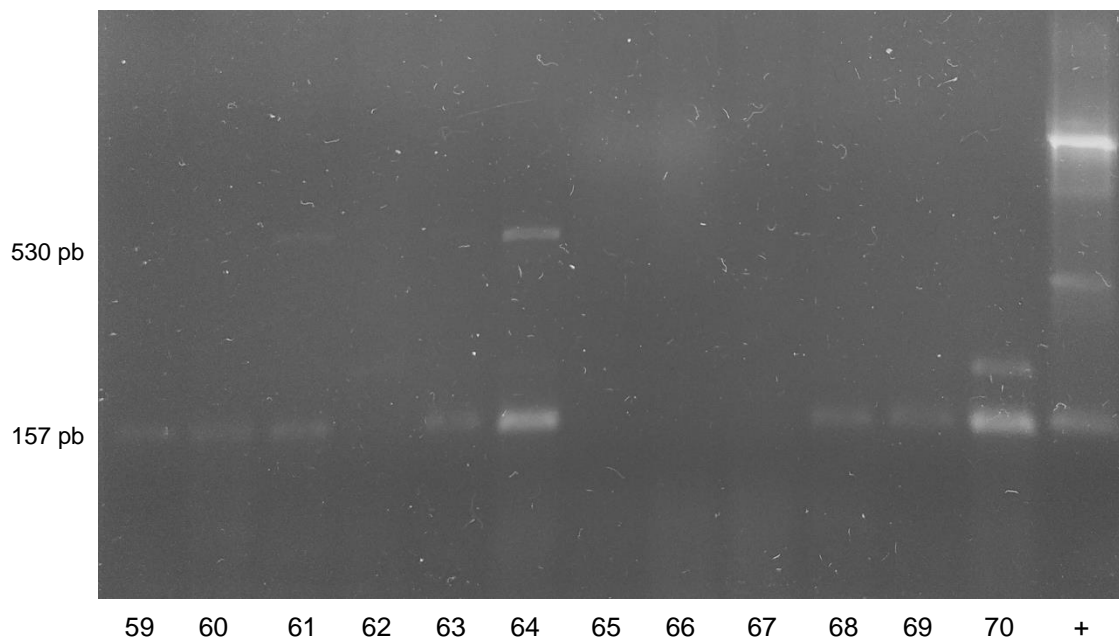
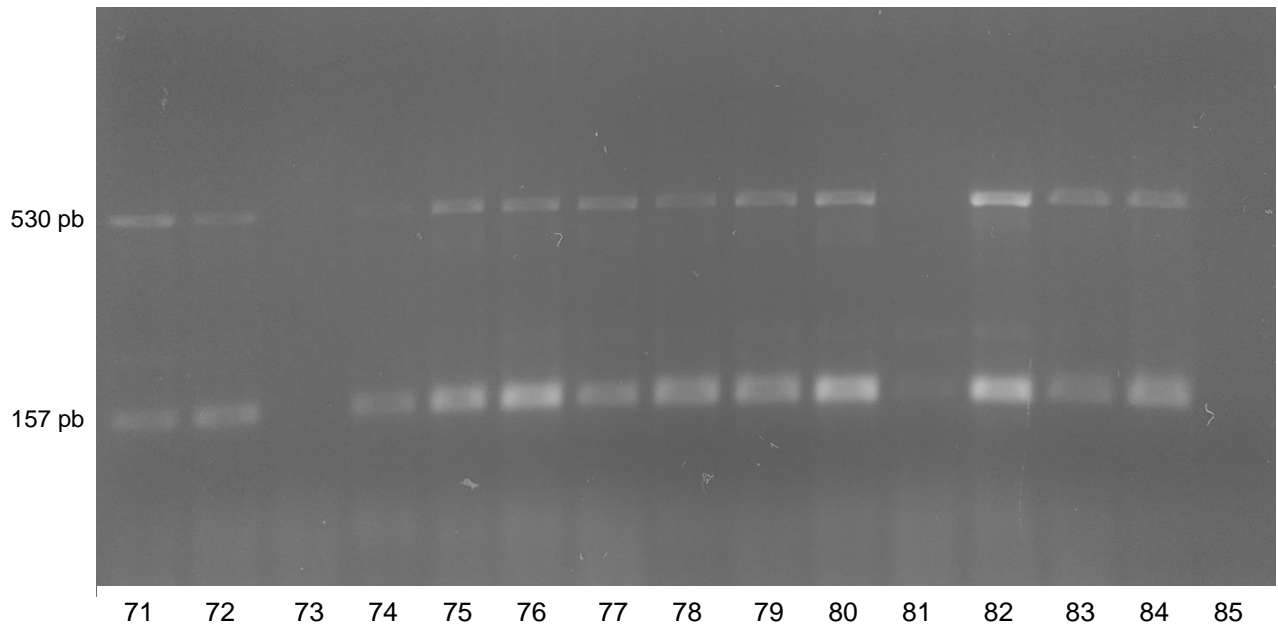


Figura 16. Análisis por PCR multiplex de colonias 0d: 45-70. El fragmento superior representa la amplificación de los exones 71-74 (530 pb) y el fragmento inferior del exón 78 (157 pb). Los números al inferior de cada imagen representan el número de la colonia analizada. El control negativo y positivo se indican con el símbolo – y + respectivamente.

Colonias 71-85



Colonias 86-99

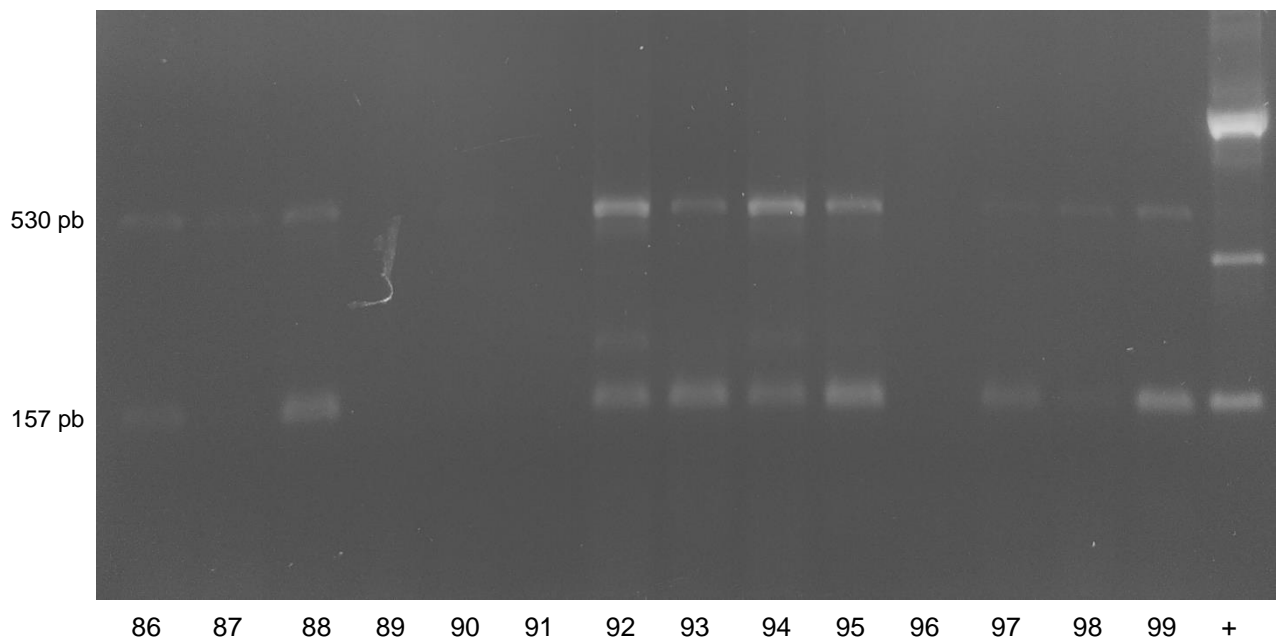


Figura 17. Análisis por PCR multiplex de colonias Od: 71-99. El fragmento superior representa la amplificación de los exones 71-74 (530 pb) y el fragmento inferior del exón 78 (157 pb). Los números al inferior de cada imagen representan el número de la colonia analizada. El control positivo se indican con el símbolo +.

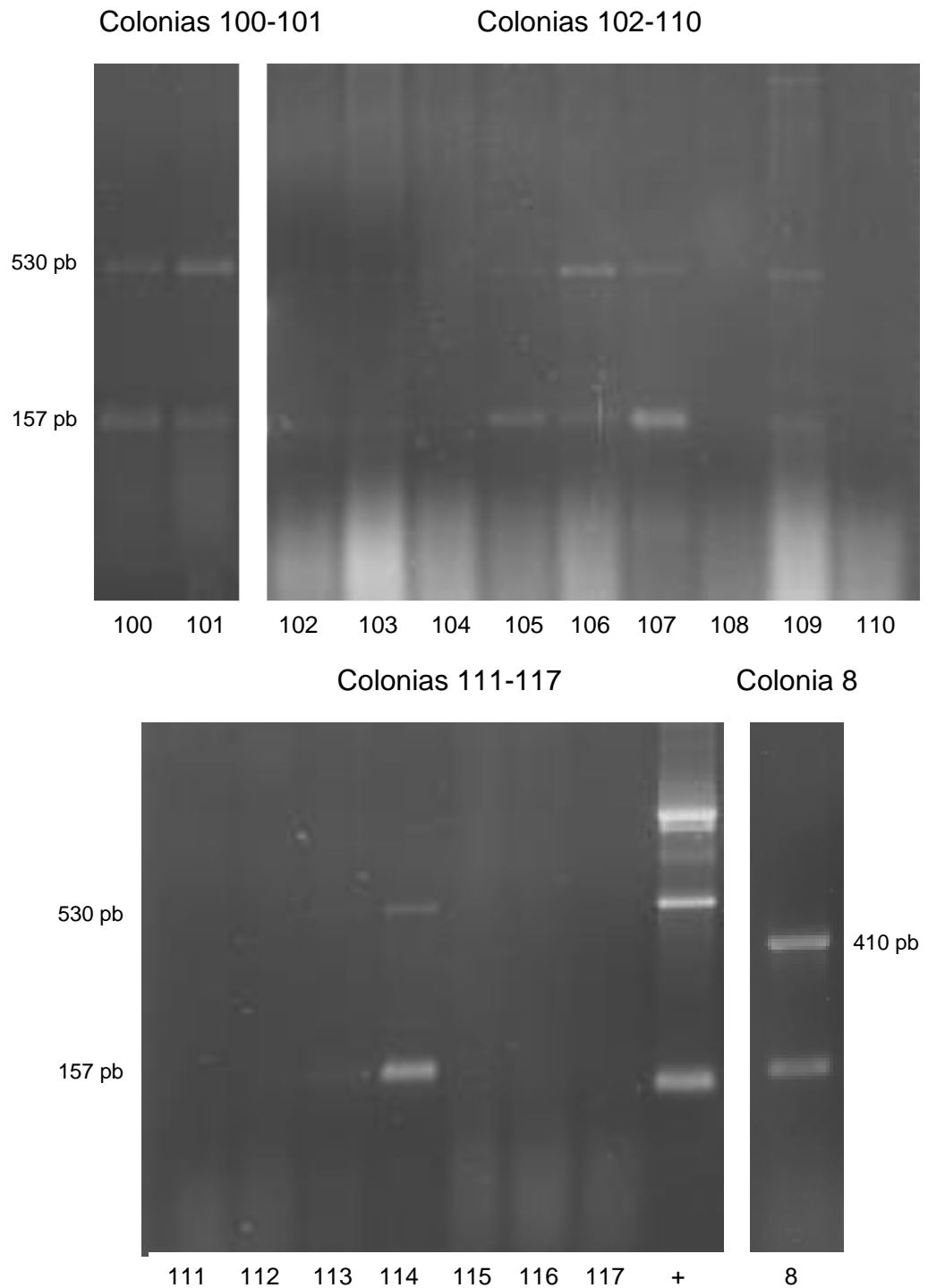


Figura 18. Análisis por PCR multiplex de colonias Od: 100-117 y 8. El fragmento superior representa la amplificación de los exones 71-74 (530 pb) y el fragmento inferior del exón 78 (157 pb). Los números al inferior de cada imagen representan el número de la colonia analizada. El control positivo se indican con el símbolo +.

8.3.4. Identificación de la isoforma de Dp71d_{Δ74}

Se analizó la secuencia de la isoforma clonada en la colonia número 8 que se identificó en las células no diferenciadas, como se indica en materiales y métodos. El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando la secuencia de la isoforma de Dp71d_{Δ71} (secuencia 2) registrada con el código de identificación NM_012698.3 y el software SnapGene 5.3.2 con el método de alineación local de Smith-Waterman. La reacción de secuenciación de esta clona se realizó 2 veces; en la secuencia 1 se puede observar los exones del 69 al 78, parte del exón 79 y la carencia del exón 74 (Figuras 21-22). En color rojo se muestran los cambios que presenta la secuenciación de la clona 8 respecto a la secuencia de Dp71d_{Δ71}. Estos datos confirman que la isoforma identificada pertenece al grupo Dp71d ya que contiene el exón 78 y presenta un procesamiento alternativo en el exón 74. Por lo tanto, la isoforma identificada corresponde a la Dp71d_{Δ74}.



Figura 19. Alineación de las secuencias de la isoforma de Dp71 $_{\Delta 74}$ en células no diferenciadas. La alineación de las secuencias se realizó en el software SnapGene 5.3.2. La secuencia 1 corresponde al fragmento de la clona 8, se muestran los exones 69-73 y parcialmente el exón 75. Los mismos exones se muestran para la secuencia 2 que corresponde a la secuencia de referencia de Dp71d $_{\Delta 71}$.



Figura 20. Alineación de las secuencias de la isoforma de Dp71_{Δ74} en células no diferenciadas. La alineación de las secuencias se realizó en el software SnapGene 5.3.2. En la secuencia 1 se muestran parcialmente el exón 75, los exones 76-78 y parte del 79. Los mismos exones se muestran para la secuencia 2 que corresponde a la secuencia de referencia de Dp71_{Δ71}.

Adicionalmente, se hizo la traducción *in silico* de la secuencia de Dp71d Δ 74 utilizando el software Expassy y se pudo observar que la delección del exón 74 no cambia el marco de lectura de esta isoforma (Figura 23). Este cambio genera un codón de paro después de los primeros tres aminoácidos del exón 79, mismos que presenta la isoforma Dp71 Δ 71.

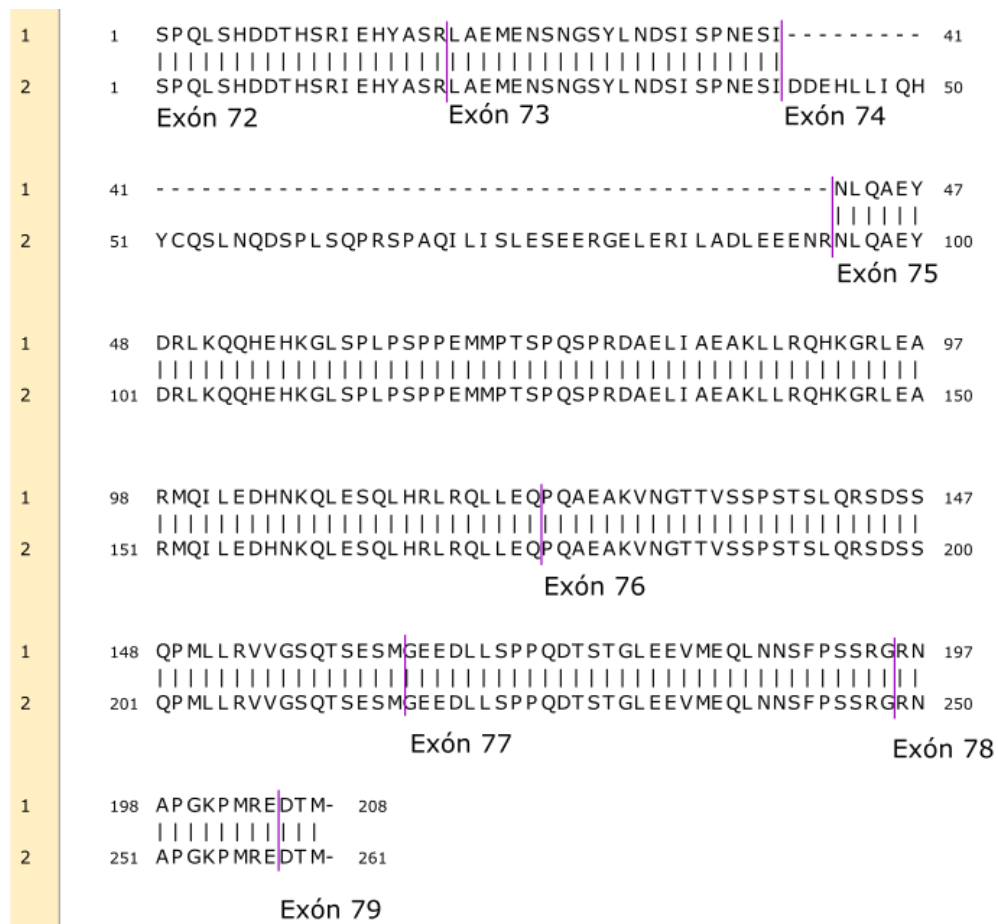


Figura 21. Alineación de las secuencias de aminoácidos de la isoforma de Dp71d Δ 74 en células no diferenciadas. En la secuencia 1 se puede observar los aminoácidos de los exones 72-79 con la delección del exón 74. En la secuencia 2 se observa la secuencia de aminoácidos de la secuencia de los exones 72-79 de referencia de Dp71 Δ 71.

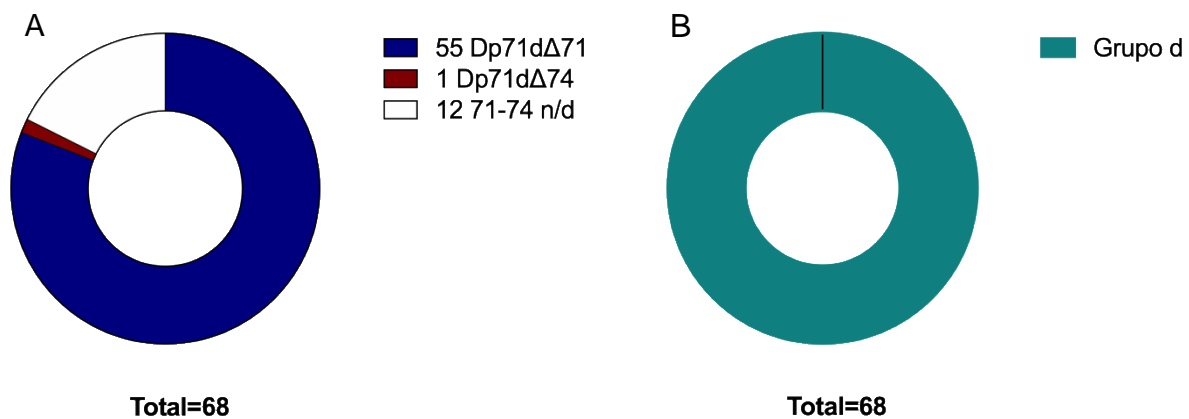


Figura 22. Identificación y cuantificación de isoformas de Dp71 de células no diferenciadas. A) Análisis de las isoformas identificadas por el procesamiento alternativo de los exones 71-74. B) 68 colonias positivas para el fragmento de Dp71 resultaron tener isoformas del grupo de Dp71d.

8.3.5. Identificación de isoformas de Dp71 que se expresan en células PC12 diferenciadas

Se examinaron las colonias que contienen los plásmidos con los transcritos de Dp71 de las células con 12 días de diferenciación mediante PCR multiplex. Los amplicones de 119 colonias se analizaron en geles de agarosa al 1.5 % (Figuras 25-28), de las cuales 104 resultaron positivas, es decir, que amplificaron al menos un producto de PCR. En cada uno de los geles se observa la presencia de un fragmento de 530 pb, que corresponde a la amplificación de los exones 72-74, 92 colonias (No. de colonias: 1-33, 36-37, 39-59, 62-68, 70, 72-73, 79-82, 84-86, 89-90, 92-94, 96-100, 102, 105-106, 108, 111-112, 114-116 y 118) presentan este fragmento (Figura 29 A). Sin embargo, también hay colonias en las que aparentemente no hay un amplicón de esta región, se clasificaron como no determinadas. El número de estos casos fueron 12 colonias (No. de colonias: 60-61, 69, 71, 76-78, 104, 107, 110, 117 y 119). Además, las 104 colonias positivas analizadas amplificaron al exón 78 (grupo Dp71d), ya que se logra observar un fragmento inferior del tamaño esperado de 157 pb (Figura 29 B). De igual manera, el análisis de los fragmentos de las isoformas identificadas se puede observar en la Figura 30, el carril 2 se muestra la isoforma (Dp71d Δ 71), en los carriles 4 y 5 se muestran los casos de las colonias que no amplificaron la región de los exones 71-74.

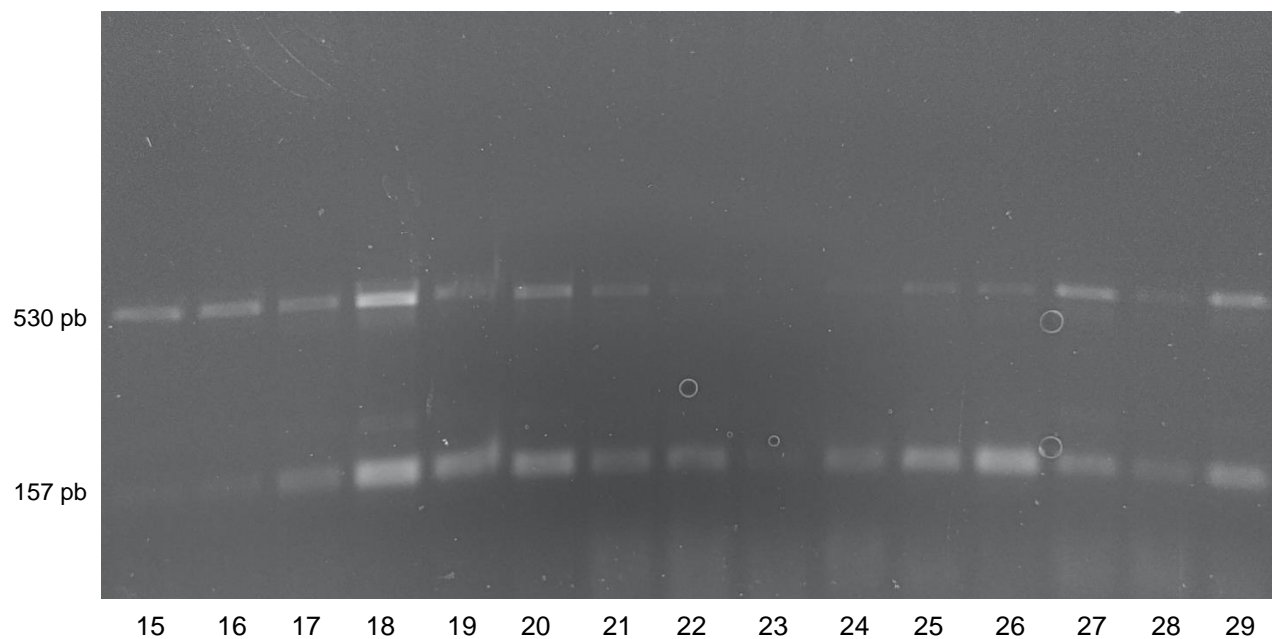
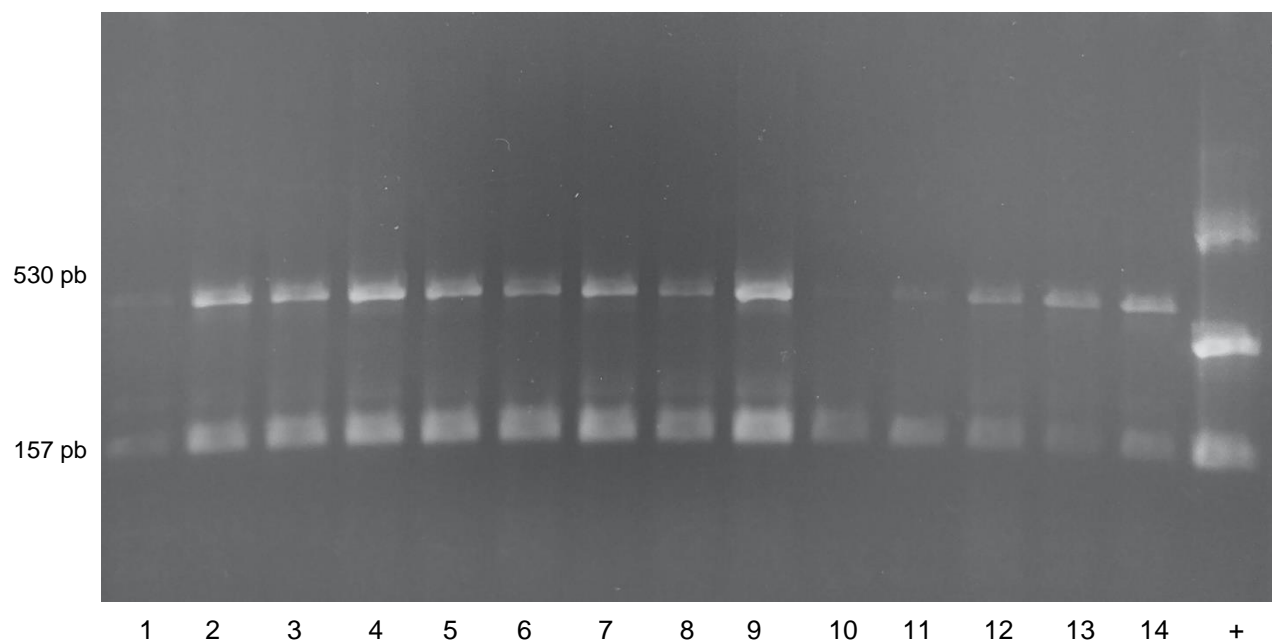


Figura 23. Análisis por PCR multiplex de colonias 12d: 1-29. El fragmento superior representa la amplificación de los exones 71-74 (530 pb) y el fragmento inferior del exón 78 (157 pb). Los números al inferior de cada imagen representan el número de la colonia analizada. El control positivo se indican con el símbolo +.

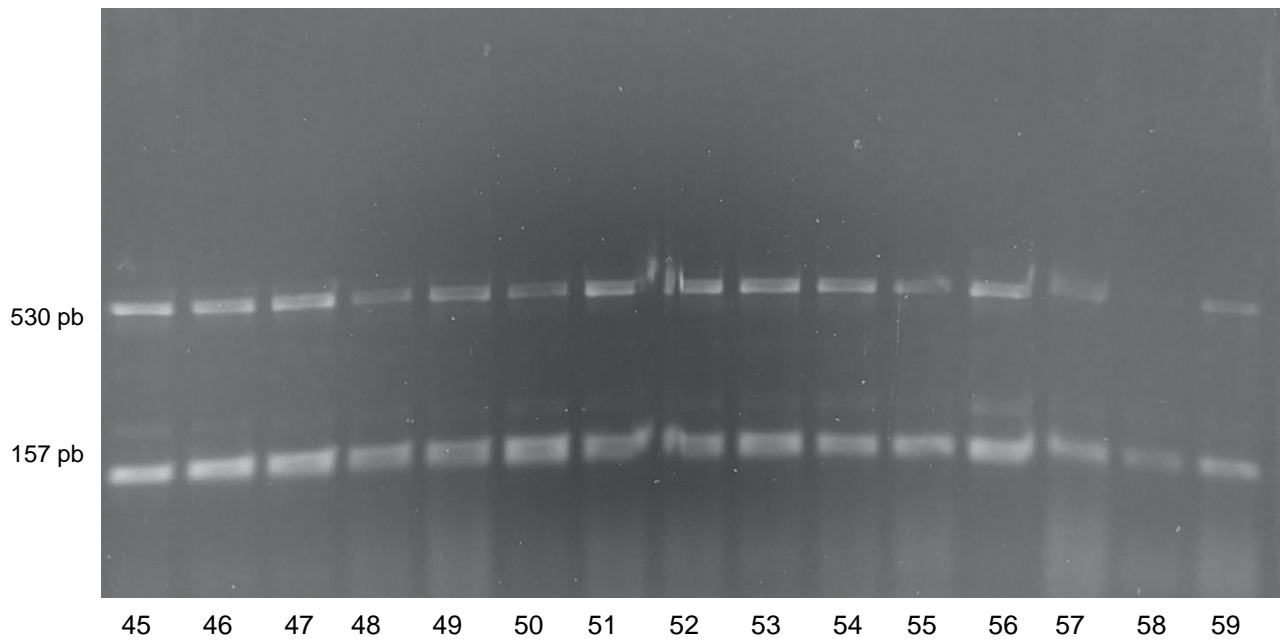
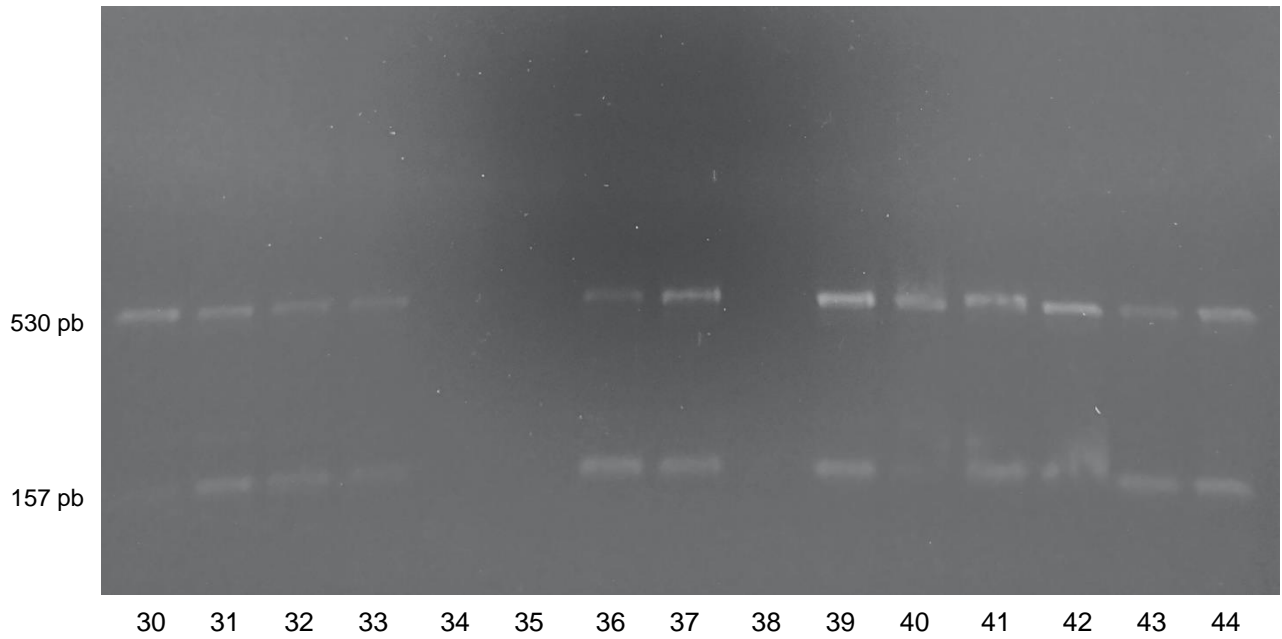


Figura 24. Análisis por PCR multiplex de colonias 12d: 30-59. El fragmento superior representa la amplificación de los exones 71-74 (530 pb) y el fragmento inferior del exón 78 (157 pb). Los números al inferior de cada imagen representan el número de la colonia analizada.

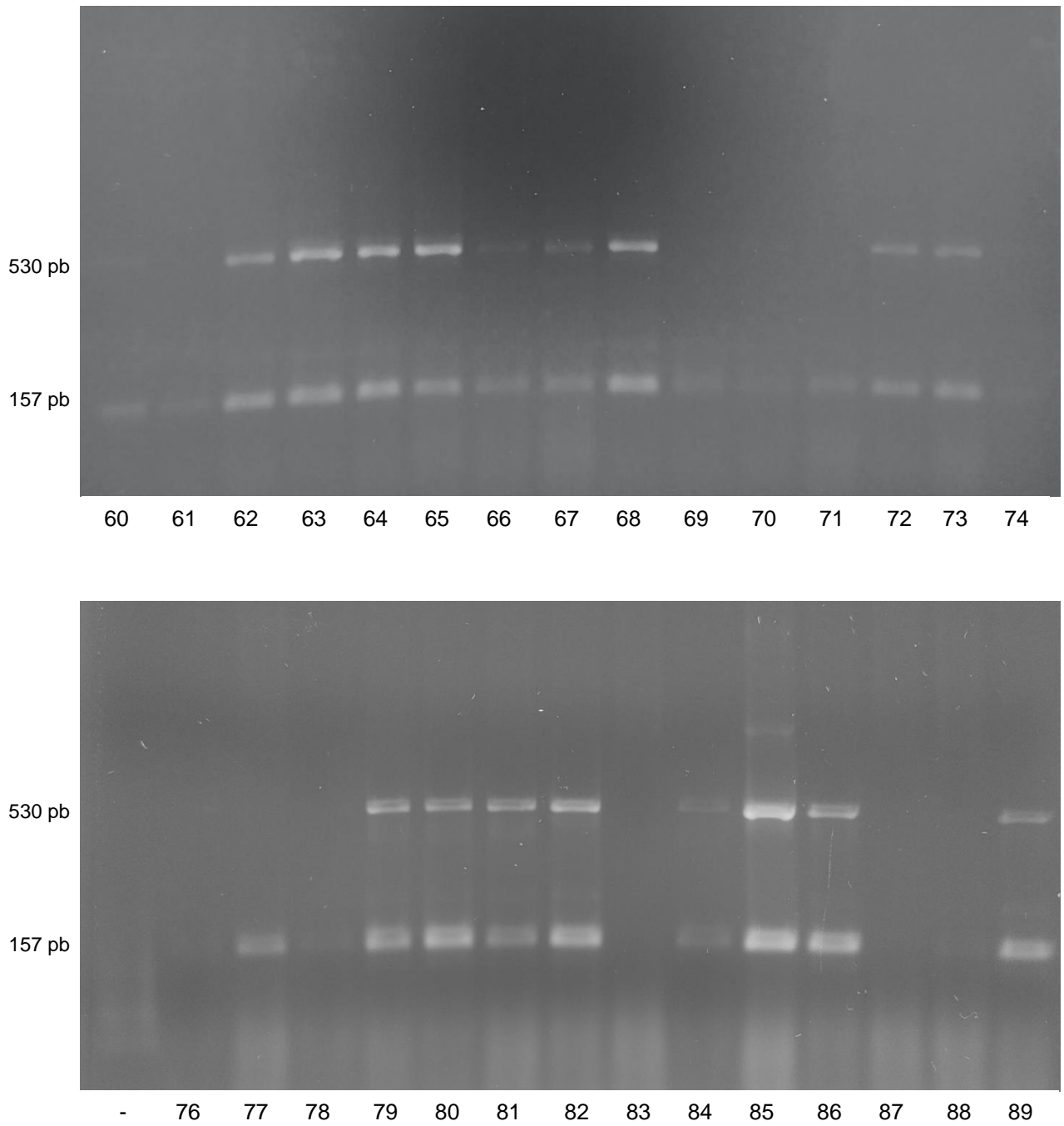


Figura 25. Análisis por PCR multiplex de colonias 12d: 60-89. El fragmento superior representa la amplificación de los exones 71-74 y el fragmento inferior del exón 78. Los números al inferior de cada imagen representan el número de la colonia analizada. El control negativo se indican con el símbolo -.

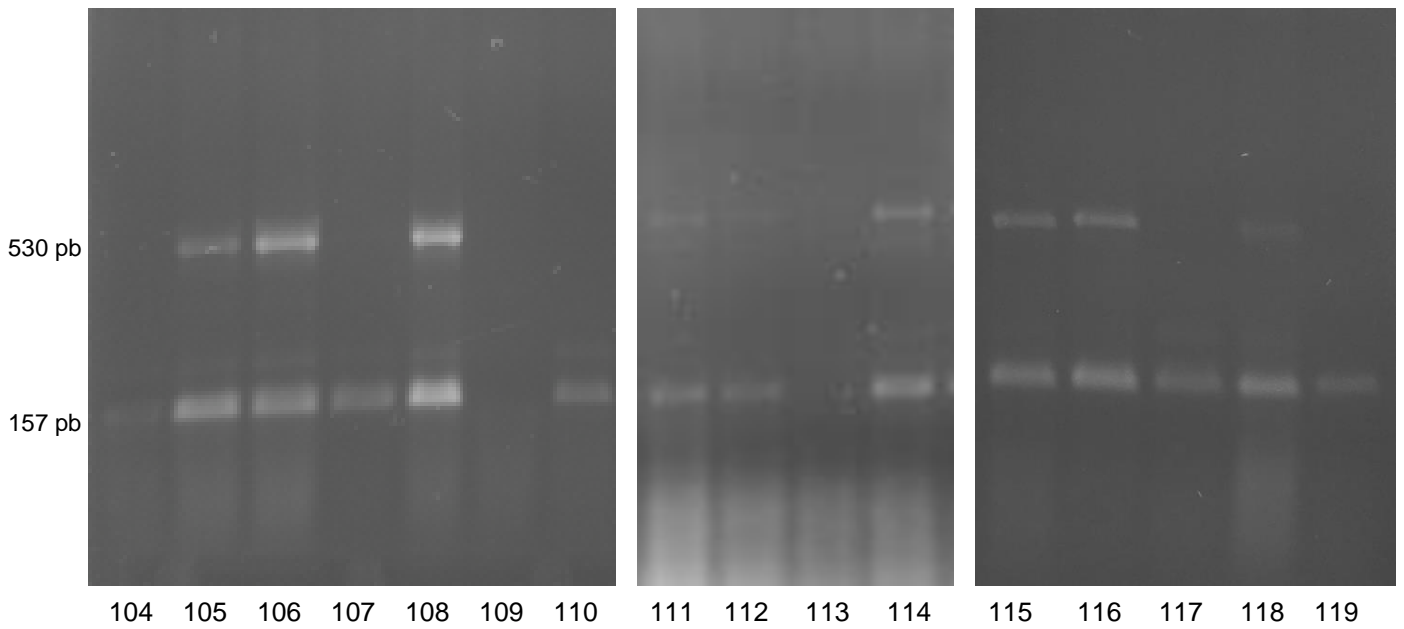
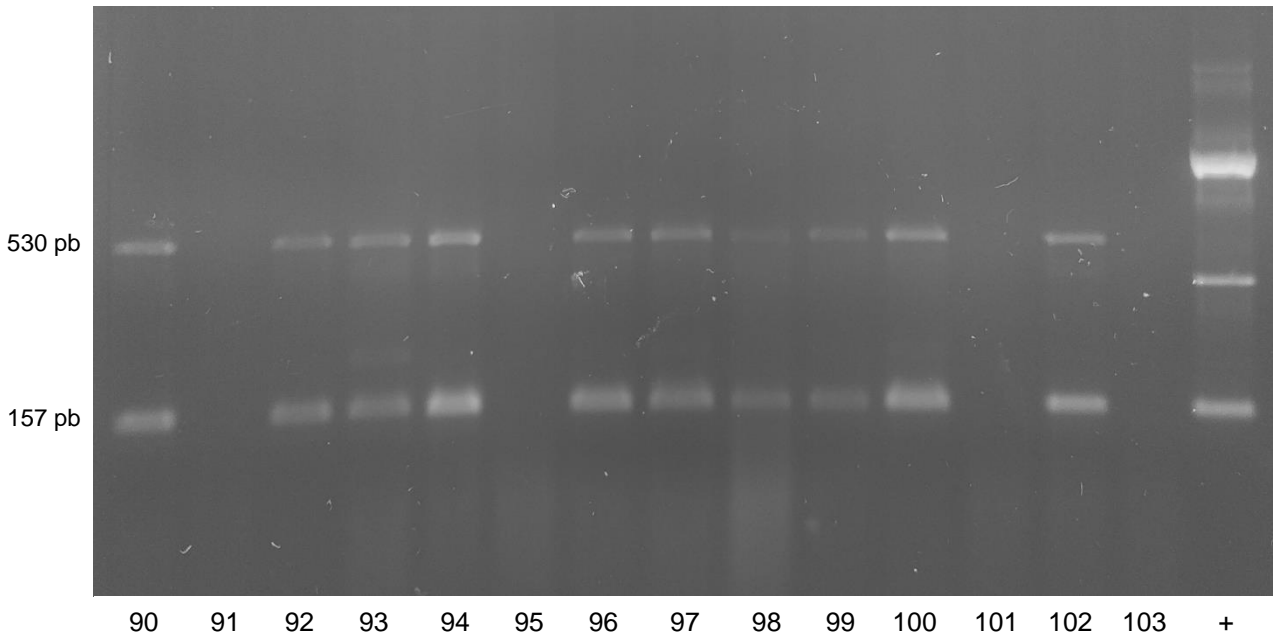


Figura 26. Análisis por PCR multiplex de colonias 12d: 90-119. El fragmento superior representa la amplificación de los exones 71-74 y el fragmento inferior del exón 78. Los números al inferior de cada imagen representan el número de la colonia analizada. El control positivo se indican con el símbolo +.

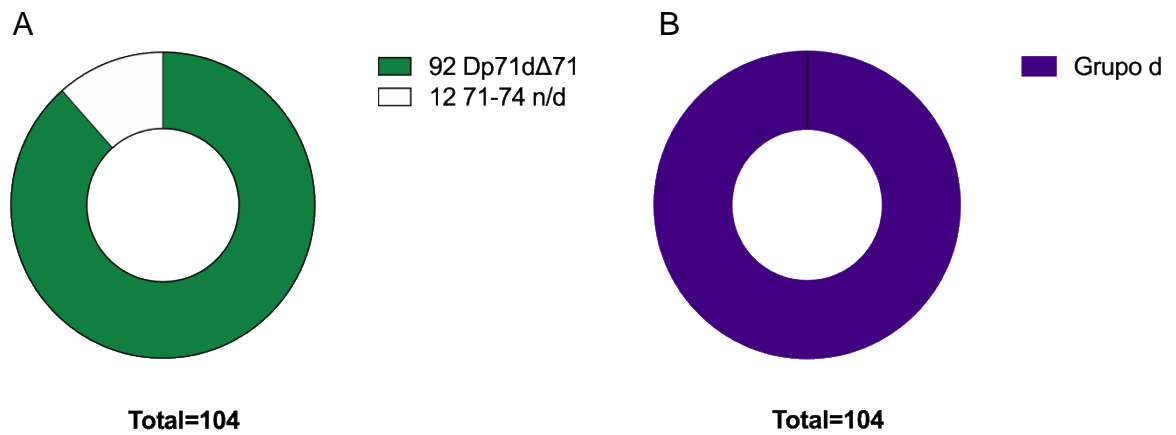


Figura 27. Identificación y cuantificación de isoformas de Dp71 de células diferenciadas. A) Análisis de las isoformas identificadas por el procesamiento alternativo de los exones 71-74. B) 104 colonias positivas para el fragmento de Dp71 resultaron tener isoformas del grupo de Dp71d.

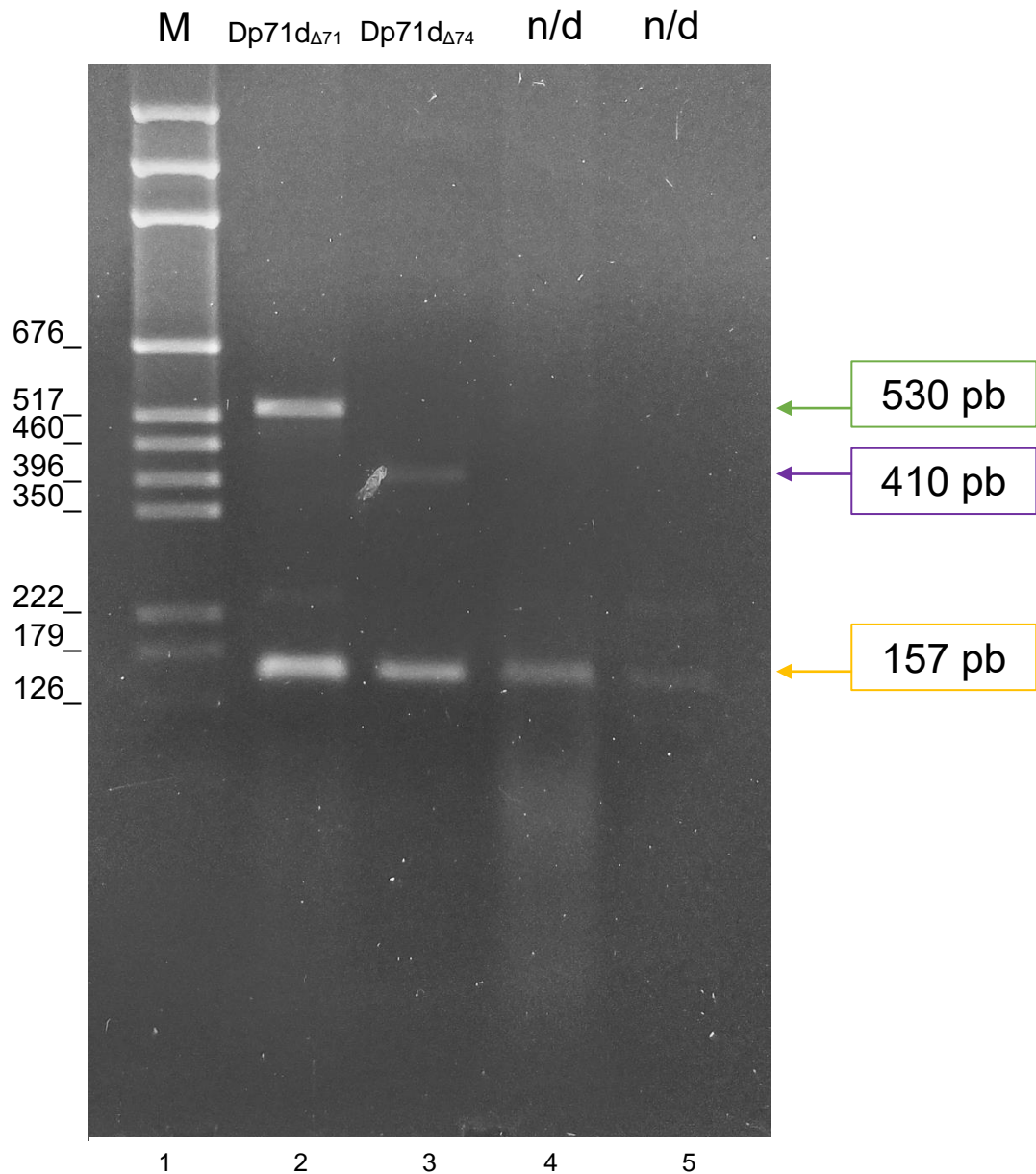


Figura 28. Amplicones identificados en células no diferenciadas y diferenciadas. De izquierda a derecha, en el primer carril se muestra los fragmentos del marcador de peso molecular. Carril dos: isoforma Dp71d Δ 71, el fragmento superior de aproximadamente 530 pb representa la amplificación de los exones 72-74. Carril 3: isoforma Dp71d Δ 74, el fragmento superior de aproximadamente 410 pb corresponde a la amplificación de los exones 71-73. El fragmento inferior en los carriles 2-5 de aproximadamente 157 pb indica la presencia del exón 78. En los carriles 4 y 5 no se observa un fragmento de 530 pb por lo que se representó como amplicón aún no determinado y por caracterizar (n/d).

9. DISCUSIÓN

Poco después a la identificación de la distrofina Dp71 se reportó la existencia de isoformas generadas por la maquinaria del “splicing” alternativo, así como también del cambio de estas isoformas a lo largo del proceso de diferenciación de distintos tipos de células del sistema nervioso central (Aragón et al., 2018; Austin et al., 2000; Miranda et al., 2011). Por lo cual, en este trabajo se fijó el objetivo de continuar con la descripción y caracterización de las isoformas que se expresan a nivel de RNA mensajero en el modelo celular neural PC12 tanto en su estado no diferenciado como en el diferenciado con la intención de determinar si durante este proceso se expresan diferentes isoformas de Dp71.

Se analizó la expresión de la proteína PCNA como parte de la caracterización de las células PC12, la cual se observó sobreexpresada en las células no diferenciadas respecto a las diferenciadas (Figura 8). PCNA es un marcador de proliferación celular el cual presenta una máxima expresión en la fase tardía G1 y la fase S del ciclo celular (Wang, 2014). Por lo tanto, al observar una menor expresión de PCNA en las células diferenciadas nos indica que se encuentran en quiescencia celular, no en proliferación y consecuentemente en diferenciación celular. Se ha reportado que esta proteína se sobreexpresa en diferentes tipos de cáncer, por ejemplo, en carcinomas hepatocelulares temprano (Ma et al., 2016); precisamente porque PCNA es un factor esencial para la replicación celular, sin embargo, no se ha establecido completamente la relación entre la expresión de PCNA en los tejidos cancerosos y el estado del paciente.

Así mismo, se evaluó la expresión de la proteína FAK (Figura 9) y se pudo observar que su expresión es constante a lo largo de la diferenciación. Sin embargo, es posible que al analizar la expresión de FAK fosforilado, o sea en su estado activo, se habría podido percibir una diferencia entre las células sin tratamiento con NGF y las tratadas a 12 días. Es necesaria la participación

de proteínas pertenecientes a la familia de cinasas Src para la completa activación de FAK, especialmente en el residuo Tyr-397 (Hanks et al., 2003). Además, se ha establecido a FAK como un mediador para la activación de las cascadas de señalización efectuadas por integrinas y factores de crecimiento. En este sentido, se reportó que al tratar a células PC12 con el factor de crecimiento epidermal, se activa a las proteínas Pyk2/FAK, las cuales son importantes para desencadenar una cascada de señalización en donde interviene también la proteína paxilina y que finalmente lleva a una regulación del crecimiento de las neuritas (Ivankovic-Dikic et al., 2000).

Desde otra perspectiva, con la caracterización de las células PC12, se realizaron ensayos de western blot utilizando anticuerpos dirigidos contra diferentes marcadores de diferenciación y proliferación celular. En la figura 10, se observó una expresión perceptible de NSE en el extracto de proteínas totales de las células P12 diferenciadas y una ausencia parcial en las no diferenciadas. El mismo patrón de expresión se observó con el marcador NF-L (Figura 11). Estos resultados demostraron que las células están en un estado completamente diferenciado a los 12 días de tratamiento con el NGF. Anteriormente, se habían utilizado los mismos marcadores para caracterizar el estado diferenciado de las células PC12, por ejemplo, en células PC12 y en oligodendrocitos de rata diferenciados existe una expresión de NSE elevada, no así en las células precursoras en proliferación de cada línea celular (Deloulme et al., 1996; Vinores et al., 1982) . Además, en otros estudios también se detecta una mayor inmunofluorescencia del triplete de neurofilamentos en células PC12 que fueron tratadas con NGF comparadas con las células control (Lee et al., 1982).

Con la finalidad de evaluar el comportamiento de β -dístroglicano, igualmente se evaluó su expresión a través de la diferenciación de las células PC12 (Figura 12). En este ensayo de western blot se pudo observar una ligera disminución en la expresión de la proteína en las células diferenciadas comparadas con el control; sin embargo, no se observó una disminución

significativa, como se describió anteriormente donde β -dístroglicano mantiene su expresión es constante desde el día 0 hasta el día 12 de diferenciación en células PC12 (Romo-Yáñez et al., 2007).

De igual manera, se analizó la expresión de las isoformas del grupo Dp71d, encontrando que no hay un cambio importante entre ambos estados celulares (Figura 13). Esto es consistente con lo ya reportado por Márquez y colaboradores, donde se observó una constante expresión de Dp71d en el extracto total de proteínas de células PC12 no diferenciadas así como con 15 días de diferenciación; sin embargo, también se registró un aumento de esta proteína en el extracto nuclear en células diferenciadas (Márquez et al., 2003). De hecho, el importe nuclear de Dp71d en células C2C12 se lleva a cabo por la importina $\alpha 2/\beta 1$ que interactúa con el dominio ZZ de esta distrofina (Suárez-Sánchez et al., 2014). Además, también se ha analizado la localización de Dp71d en células PC12 Tet-on, encontrando que en estas células diferenciadas por el efecto de NGF la presencia de Dp71d aumenta en el núcleo respecto a las células no diferenciadas (Aragón et al., 2016). Esto indica que la presencia de Dp71d participa en el proceso de diferenciación a través de la formación de un posible complejo en la membrana nuclear.

En este trabajo se analizó la expresión de las isoformas de Dp71 a nivel de RNA mensajero en células PC12 no diferenciadas y diferenciadas con NGF. En este sentido, en las células sin diferenciar se encontró que 100% de los transcritos pertenecen a las isoformas de grupo Dp71d (Figura 24 B), ya que el total de las colonias positivas amplificaron un fragmento de aproximadamente 157 pb (Figura 30). Así mismo, el 100% las isoformas identificadas en las células diferenciadas pertenecen al grupo Dp71d (Figura 29 B). Estos datos son congruentes con lo que se reportó anteriormente, en donde se encontró que la expresión de los transcritos del grupo de Dp71d permanecen constantes a lo largo de la diferenciación de 15 días de las células PC12. Además, las isoformas de Dp71 a nivel de RNA del grupo Dp71f

tuvieron un pico de expresión a las 12 horas del tratamiento con NGF en las células PC12 y posteriormente ésta expresión disminuyó gradualmente (Marquez et al., 2003). Por lo tanto, estos datos apoyan el hecho de que en este trabajo no se encontraron isoformas del grupo Dp71f. Sin embargo, la cantidad de colonias analizadas y la ausencia de más replicas experimentales pueden ser un factor muy importante en la determinación de las isoformas halladas, por lo cual es preciso que se realicen más análisis para poder tener mayor certeza sobre los resultados actuales.

En cuanto al procesamiento alternativo en la región de los exones del 71 al 74, en las células no diferenciadas, 55 de 68 colonias positivas, que corresponden al 81 %, contienen transcritos de Dp71d que carecen del exón 71, 1 colonia o 1.4 % del total corresponden a la isoforma Dp71d carente del exón 74 (Dp71d Δ 74) y 12 colonias o 17.6 % de las cuales no se ha definido si contienen o no los exones del 71 al 74. Estas últimas, clasificadas como no determinadas, probablemente no se identificó el amplicón por dos posibles razones, primero, que los exones 69, 75 o ambos, que son los sitios donde los primers deben hibridar no existan y por lo tanto no habría un producto de amplificación. La segunda razón es que la amplificación de los insertos en las colonias transformadas dependa de variables diferentes, por ejemplo, la cantidad del plásmido o demás componentes celulares. Por consiguiente, esto provoque que no se establezcan las condiciones adecuadas de reacción para la amplificación óptima del producto deseado. Pueden obtenerse múltiples productos de PCR, ningún producto, productos de tamaños no deseados. problemas comunes en la realización de la PCR de colonia (Woodman et al., 2016).

De igual manera, en las células diferenciadas se identificaron 92 de 104 colonias positivas para la isoforma de Dp71d Δ 71, siendo un 88.5 % del total, mientras que 12 colonias, o sea 11.5 %, se agruparon en las isoformas no determinadas para los exones 71-74.

Los resultados muestran que más del 80 % de las isoformas identificadas en ambos estados celulares corresponden a Dp71d Δ 71. En efecto, esta isoforma ha sido analizada anteriormente a nivel de transcrito, la cual se encuentra presente durante la diferenciación de las células PC12 (Marquez et al., 2003). De igual manera, esta misma isoforma esta presente en un 85.4 % de las isoformas analizadas en células PC12 Tet-on no diferenciadas, siendo la isoforma predominante en este análisis (Paúl-González, 2021). Y de modo similar, las isoformas de Dp71d parecen ser las distrofinas predominantes en células madre y progenitoras neurales (NSPC) (Paúl-González et al., 2021). También, se encontró que las isoformas del grupo Dp71d, tanto a nivel de transcripción como de traducción, se expresan mayoritariamente, de manera general, en el cerebro de ratón (Aragón et al., 2018). Por tanto, las isoformas del grupo de Dp71d parecen ser las que predominan en las células mencionadas en estos estudios. Por otro lado, la isoforma Dp71d Δ 74 fue encontrada en una baja proporción en las células PC12 Tet-on no diferenciadas, así como otras isoformas: Dp71d, Dp71d Δ 71-74, Dp71f y Dp71f Δ 74 (Paúl-González, 2021). Curiosamente, la distrofina Dp71d Δ 74 también fue detectada en NSPC aunque no se haya encontrado en células diferenciadas de la misma línea celular (Paúl-González et al., 2021). Considerando lo anterior, la identificación de la isoforma Dp71d Δ 74 en células PC12 no diferenciadas en este trabajo, sugiere el hecho de que la expresión de esta isoforma esta relacionada con el proceso de proliferación celular, aunque específicamente no se conoce aún de qué modo, por lo que es necesario su estudio de forma independiente.

La expresión de Dp71 a nivel de transcrito y de proteína ha sido analizada en otros cultivos celulares, como en el caso del cultivo de las células miogénicas fetales humanas, en donde se observó que el transcrito de Dp71 se mantiene constante durante la diferenciación de estas células a células de mioblastos multinucleados; sin embargo, los niveles de proteína de Dp71 aumentaron significativamente (Tennyson et al., 1996). Un comportamiento

similar se observó en el análisis de la distrofina Dp71f, como se mencionó anteriormente, su expresión a nivel de transcrito disminuyó considerablemente después del primer día con el tratamiento con NGF en las células PC12 y a pesar de esto, se pudo apreciar un aumento de la proteína de Dp71f en el extracto total de las células diferenciadas respecto a las no diferenciadas (Marquez et al., 2003). Por lo tanto, este interesante cambio podría explicarse por cambios en la eficiencia de traducción o bien por la estabilidad efectiva durante la diferenciación celular. Por otra parte, contrario al patrón de expresión previamente descrito, se encontró que la expresión de Dp71 esta regulada negativamente en los tejidos musculares de ratón, indicando que la regulación es diferente en un sistema *in vivo* (Tennyson et al., 1996).

Dentro de este marco de referencia, el patrón de expresión de las isoformas de Dp71 también se han analizado en el desarrollo del cerebro de ratón. En este estudio se caracterizaron a las isoformas del grupo Dp71f por expresarse preferencialmente en etapas embrionarias de 10 días del neurodesarrollo (84 % del grupo Dp71f y 16 % del grupo Dp71d) y disminuyendo gradualmente hacia estados maduros del cerebro (22 % del grupo Dp71f y 78 % del grupo Dp71d). El mismo patrón se ve en el análisis de ambos grupos de isoformas, pero en las porciones del sistema nervioso central: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. En tanto que las isoformas del grupo Dp71d se expresan principalmente en etapas postnatales, específicamente en las estructuras cerebrales de hipocampo, cerebelo y corteza cerebral (84, 77 y 80 % respectivamente). Los resultados indican que la presencia de tales isoformas tiene una participación dentro de los procesos de la gliogénesis, la neurogénesis, astrocitogénesis de los estados embrionarios o la angiogénesis, crecimiento de neuritas, sinaptogénesis y espinogénesis en etapas postnatales (Gonzales-Reyes et al., en preparación). Adicionalmente se ha observado que la expresión de Dp71 a nivel de transcrito y de proteína permanece constante en la diferenciación de células madre y progenitoras neurales de rata. Aunque, las distrofinas Dp427 y Dp140

presentaron un aumento en la transcripción y traducción en la diferenciación de estas mismas células (Romo-Yáñez et al., 2020).

Los datos obtenidos en este trabajo son preliminares por lo que es necesario la realización de más ensayos para obtener resultados significativos, sin embargo, se observa una clara tendencia de que las isoformas del grupo Dp71d a nivel de transcritos serán los que predominen durante la diferenciación de las células PC12. De obtener de nuevo la isoforma Dp71d_{Δ74}, indicaría que esta isoforma efectivamente esta presente sólo en las células PC12 no diferenciadas por lo que tendría un rol especial dentro de este estado celular. Adicionalmente, no se descarta la idea de obtener más isoformas de los demás grupos, pero el análisis de colonias tendría que ampliarse de forma considerable. El estudio individual de las isoformas de Dp71, así como su relación con proteínas del DAPC e incluso con otras isoformas de la misma familia, puede contribuir a revelar sus funciones en los diferentes tipos celulares y además ampliar el conocimiento de su interrelación con otros mecanismos neurales que permitan un correcto funcionamiento del sistema nervioso central.

10. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron células PC12 no diferenciadas y diferenciadas por medio del tratamiento con NGF.
- Las células PC12 sobreexpresan el marcador de proliferación PCNA mientras que las células diferenciadas sobreexpresan a los marcadores de diferenciación NSE y NF-L.
- Los transcritos de las isoformas del grupo Dp71d, específicamente de la Dp71d_{Δ71}, predominan en las células PC12 sin diferenciar y diferenciadas.
- El transcrito de la isoforma Dp71d_{Δ74} únicamente se encontró en las células PC12 no diferenciadas.
- Se identificaron isoformas cuyo procesamiento ocurrió posiblemente alrededor de los exones 71-74, que requieren mayor caracterización.

11. PERSPECTIVAS

- Confirmar la isoformas identificadas de las células PC12 no diferenciadas y diferenciadas mediante secuenciación.
- Realizar más ensayos experimentales así como aumentar el número de las colonias analizadas.
- Realizar un análisis estadístico para precisar si existe un cambio significativo en la expresión de las isoformas de Dp71 en células PC12 no diferenciadas y diferenciadas.
- Identificar a las diferentes isoformas a nivel de proteína en ambos estados de las células PC12.
- Determinar el procesamiento alternativo de los transcritos que no fueron caracterizados en la región de los exones del 71 al 74.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, R., Montañez, C., Fuentes-Mera, L., Gonzalez, E., Gómez, P., Quintero-Mora, L., Mornet, D., Álvarez-Salas, L. M., & Cisneros, B. (2004). Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Experimental Cell Research*, 296(2), 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.01.015>
- Albrecht, D. E., & Froehner, S. C. (2002). Syntrophins and dystrobrevins: Defining the dystrophin scaffold at synapses. In *NeuroSignals* (Vol. 11, Issue 3, pp. 123–129). Neurosignals. <https://doi.org/10.1159/000065053>
- Aragón, J., González-Reyes, M., Romo-Yáñez, J., Vacca, O., Aguilar-González, G., Rendón, A., Vaillend, C., & Montañez, C. (2018). Dystrophin Dp71 Isoforms Are Differentially Expressed in the Mouse Brain and Retina: Report of New Alternative Splicing and a Novel Nomenclature for Dp71 Isoforms. *Molecular Neurobiology*, 55(2), 1376–1386. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0405-x>
- Aragón, J., Martínez-Herrera, A., Romo-Yáñez, J., Ceja, V., Azotla-Vilchis, C., Siqueiros-Márquez, L., Soid-Raggi, G., Herrera-Salazar, A., & Montañez, C. (2016). Identification of Dp71 Isoforms Expressed in PC12 Cells: Subcellular Localization and Colocalization with β -Dystroglycan and α 1-Syntrophin. *Journal of Molecular Neuroscience*, 58(2), 201–209. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0657-8>
- Austin, R. C., Morris, G. E., Howard, P. L., Klamut, H. J., & Ray, P. N. (2000). Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain. *Neuromuscular Disorders*, 10(3), 187–193. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(99\)00105-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(99)00105-4)
- Austin, R. C., Howard, P. L., D'souza, V. N., Klamut, H. J., & Ray, P. N. (1995). Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Human Molecular Genetics*, 4(9), 1475–1483. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.9.1475>
- Bar, S., Barnea, E., Levy, Z., Neuman, S., Yaffe, D., & Nudel, U. (1990). A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochemical Journal*, 272(2), 557–560. <https://doi.org/10.1042/bj2720557>
- Blake, D. J., Hawkes, R., Benson, M. A., & Beesley, P. W. (1999). Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *Journal of Cell Biology*, 147(3), 645–657. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.3.645>
- Blake, D. J., Love, D. R., Tinsley, J., Morris, G. E., Turley, H., Gatter, K., Dickson, G., Edwards, Y. H., & Davies, K. E. (1992). Characterization of a 4.8kb transcript from the duchenne muscular dystrophy locus expressed in schwannoma cells. *Human Molecular Genetics*, 1(2), 103–109. <https://doi.org/10.1093/hmg/1.2.103>
- BOCK, E., & DISSING, J. (1975). Demonstration of Enolase Activity Connected to the Brain-Specific Protein 14-3-2. *Scandinavian Journal of Immunology*, 4, 31–36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1975.tb03806.x>
- Byers, T. J., Lidov, H. G. W., & Kunkel, L. M. (1993). An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nature Genetics*, 4(1), 77–81. <https://doi.org/10.1038/ng0593-77>
- Campbell, K. P., & Kahl, S. D. (1989). Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*, 338(6212), 259–262. <https://doi.org/10.1038/338259a0>
- Ceccarini, M., Rizzo, G., Rosa, G., Chelucci, C., Macioce, P., & Petrucci, T. C. (1997). A splice variant of Dp71 lacking the syntrophin binding site is expressed in early stages of human neural development. *Developmental Brain Research*, 103(1), 77–82. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(97\)00122-3](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(97)00122-3)
- Connors, N. C., & Kofuji, P. (2002). Dystrophin Dp71 is Critical for the Clustered Localization of Potassium Channels in Retinal Glial Cells. *Journal of Neuroscience*, 22(11), 4321–4327. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-11-04321.2002>
- Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., & Marshall, C. J. (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*, 77(6), 841–852. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90133-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90133-3)
- D'souza, V. N., Man, N. T., Morris, G. E., Karges, W., Pillers, D. A. M., & Ray, P. N. (1995). A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Human Molecular Genetics*, 4(5), 837–842. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.5.837>
- Daoud, F., Candelario-Martínez, A., Billard, J. M., Avital, A., Khelifaoui, M., Rozenvald, Y., Guegan, M., Mornet, D., Jaillard, D., Nudel, U., Chelly, J., Martínez-Rojas, D., Laroche, S., Yaffe, D., & Vaillend, C. (2009). Role of Mental Retardation-Associated Dystrophin-Gene Product Dp71 in Excitatory Synapse Organization, Synaptic Plasticity and Behavioral Functions. *PLoS ONE*, 4(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006574>
- Darmahkasih, A. J., Rybalsky, I., Tian, C., Shellenbarger, K. C., Horn, P. S., Lambert, J. T., & Wong, B. L. (2020). Neurodevelopmental, behavioral, and emotional symptoms common in Duchenne

- muscular dystrophy. *Muscle and Nerve*, 61(4), 466–474. <https://doi.org/10.1002/mus.26803>
- De León, M. B., Montañez, C., Gómez, P., Morales-Lázaro, S. L., Tapia-Ramírez, V., Valadez-Graham, V., Recillas-Targa, F., Yaffe, D., Nudel, U., & Cisneros, B. (2005). Dystrophin Dp71 expression is down-regulated during myogenesis: Role of Sp1 and Sp3 on the Dp71 promoter activity. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5290–5299. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411571200>
- Deloulme, J. C., Lucas, M., Gaber, C., Bouillon, P., Keller, A., Eclancher, F., & Sensenbrenner, M. (1996). Expression of the neuron-specific enolase gene by rat oligodendroglial cells during their differentiation. *Journal of Neurochemistry*, 66(3), 936–945. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66030936.x>
- Doucette, T., Perry, M., Langdon, K., Gill, D., & Ryan, C. (2004). Detection of clinically relevant long-term functional deficits following transient MCAO in rats. *Proceedings of the 5th World Stroke Congress, Vancouver, 2004*, 118.
- Ervasti, J. M., & Campbell, K. P. (1991). Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, 66(6), 1121–1131. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90035-W](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90035-W)
- Feener, C. A., Koenig, M., & Kunkel, L. M. (1989). Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature*, 338(6215), 509–511. <https://doi.org/10.1038/338509a0>
- Fletcher, L., Rider, C. C., & Taylor, C. B. (1976). Enolase isoenzymes. III. Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase. *BBA - Enzymology*, 452(1), 245–252. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(76\)90077-2](https://doi.org/10.1016/0005-2744(76)90077-2)
- Fort, P. E., Sene, A., Pannicke, T., Roux, M. J., Forster, V., Mornet, D., Nudel, U., Yaffe, D., Reichenbach, A., Sahel, J. A., & Rendon, A. (2008). Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Müller retinal glial cell membrane. *GLIA*, 56(6), 597–610. <https://doi.org/10.1002/glia.20633>
- 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>
- García-Cruz, C., Merino-Jiménez, C., Ceja, V., Aragón, J., Siqueiros-Márquez, L., Reyes-Grajeda, J. P., & Montañez, C. (2019). The dystrophin isoform Dp71eΔ71 is involved in neurite outgrowth and neuronal differentiation of PC12 cells. *Journal of Proteomics*, 191, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.03.027>
- González, E., Montañez, C., Ray, P. N., Howard, P. L., García-Sierra, F., Mornet, D., & Cisneros, B. (2000). Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS Letters*, 482(3), 209–214. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02044-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02044-5)
- Gonzales-Reyes, M. (2018). Tesis de Maestría.
- Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7), 2424–2428. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.7.2424>
- Grifman, M., & Soreq, H. (1997). Differentiation intensifies the susceptibility of pheochromocytoma cells to antisense oligodeoxynucleotide-dependent suppression of acetylcholinesterase activity. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 7(4), 351–359. <https://doi.org/10.1089/oli.1.1997.7.351>
- Hanks, S. K., Ryzhova, L., Shin, N. Y., & Brábek, J. (2003). Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 8). <https://doi.org/10.2741/1114>
- Hoffman, E. P., Brown, R. H., & Kunkel, L. M. (1987). Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51(6), 919–928. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90579-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90579-4)
- Howard, P. L., Klamut, H. J., & Ray, P. N. (1998). Identification of a novel actin binding site within the Dp71 dystrophin isoform. *FEBS Letters*, 441(2), 337–341. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01566-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01566-X)
- Hugnot, J. P., Gilgenkrantz, H., Vincent, N., Chafey, P., Morris, G. E., Monaco, A. P., Berwald-Netter, Y., Koulakoff, A., Kaplan, J. C., Kahn, A., & Chelly, J. (1992). Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(16), 7506–7510. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7506>
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J. M., Leveille, C. J., Slaughter, C. A., Sernett, S. W., & Campbell, K. P. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, 355(6362), 696–702. <https://doi.org/10.1038/355696a0>
- Imamura, M., & Ozawa, E. (1998). Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyryl-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6139–6144.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6139>
- Isgro, M. A., Bottoni, P., & Scatena, R. (2015). Neuron-specific enolase as a biomarker: Biochemical and clinical aspects. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 867, pp. 125–143). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_9
- Ivankovic-Dikic, I., Grönroos, E., Blaukat, A., Barth, B. U., & Dikic, I. (2000). Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins. *Nature Cell Biology*, 2(9), 574–581. <https://doi.org/10.1038/35023515>
- Jung, D., Filliol, D., Metz-Boutigue, M. H., & Rendon, A. (1993). Characterization and subcellular localization of the dystrophin-protein 71 (Dp71) from brain. *Neuromuscular Disorders*, 3(5–6), 515–518. [https://doi.org/10.1016/0960-8966\(93\)90107-U](https://doi.org/10.1016/0960-8966(93)90107-U)
- Kawaguchi, T., Niba, E. T. E., Rani, A. Q. M., Onishi, Y., Koizumi, M., Awano, H., Matsumoto, M., Nagai, M., Yoshida, S., Sakakibara, S., Maeda, N., Sato, O., Nishio, H., & Matsuo, M. (2018). Detection of dystrophin Dp71 in human skeletal muscle using an automated capillary western assay system. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061546>
- Khalil, M., Teunissen, C. E., Otto, M., Piehl, F., Sormani, M. P., Gattringer, T., Barro, C., Kappos, L., Comabella, M., Fazekas, F., Petzold, A., Blennow, K., Zetterberg, H., & Kuhle, J. (2018). Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 14, Issue 10, pp. 577–589). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0058-z>
- Klesse, L., Meyers, K., Marshall, C., & Parada, L. (1999). Nerve growth factor induces survival and differentiation through two distinct signaling cascades in PC12 cells. *Oncogene*, 18(12), 2055–2068. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202524>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90504-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90504-6)
- Kunkel, L. M. (1986). Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, 322(6074), 73–77. <https://doi.org/10.1038/322073a0>
- Lederfein, D., Levy, Z., Augier, N., Mornet, D., Morris, G., Fuchs, O., Yaffe, D., & Nudel, U. (1992). A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(12), 5346–5350. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5346>
- Lederfein, D., Yaffe, D., & Nudel, U. (1993). A housekeeping type promoter, located in the 3' region of the duchenne muscular dystrophy gene, controls the expression of Dp71, a major product of the gene. *Human Molecular Genetics*, 2(11), 1883–1888. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.11.1883>
- Lee, V., Trojanowski, J. Q., & Schlaepfer, W. W. (1982). Induction of neurofilament triplet proteins in PC12 cells by nerve growth factor. *Brain Research*, 238(1), 169–180. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90779-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90779-X)
- Li, S., & Hua, Z. C. (2008). Chapter 3 FAK Expression. Regulation and Therapeutic Potential. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 101, pp. 45–61). [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)00403-X](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)00403-X)
- Lidov, H. G. W., Selig, S., & Kunkel, L. M. (1995). Dp140: A novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Human Molecular Genetics*, 4(3), 329–335. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.3.329>
- Ma, S., Yang, J., Li, J., & Song, J. (2016). The clinical utility of the proliferating cell nuclear antigen expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Tumor Biology*, 37(6), 7405–7412. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4582-9>
- Marangos, P. J., Schmechel, D., Parma, A. M., Clark, R. L., & Goodwin, F. K. (1979). MEASUREMENT OF NEURON-SPECIFIC (NSE) AND NON-NEURONAL (NNE) ISOENZYMES OF ENOLASE IN RAT, MONKEY AND HUMAN NERVOUS TISSUE. *Journal of Neurochemistry*, 33(1), 319–329. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1979.tb11735.x>
- Márquez, F. G., Cisneros, B., García, F., Ceja, V., Velázquez, F., Depardón, F., Cervantes, L., Rendón, A., Mornet, D., Rosas-Vargas, H., Mustre, M., & Montañez, C. (2003). Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience*, 118(4), 957–966. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00063-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00063-0)
- 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>
- Monaco, A. P., Neve, R. L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C. J., Kurnit, D. M., & Kunkel, L. M. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*, 323(6089), 646–650. <https://doi.org/10.1038/323646a0>
- Montanaro, F., Lindenbaum, M., & Carbonetto, S. (1999). α -dystroglycan is a laminin receptor involved in extracellular matrix assembly on myotubes and muscle cell viability. *Journal of Cell Biology*, 145(6), 1325–1340. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.6.1325>
- Morales-Lázaro, S. L., González-Ramírez, R., Gómez, P., Tapia-Ramírez, V., De León, M. B., & Cisneros,

- B. (2010). Induction of dystrophin Dp71 expression during neuronal differentiation: Opposite roles of Sp1 and AP2 α in Dp71 promoter activity. *Journal of Neurochemistry*, 112(2), 474–485. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06467.x>
- Naidoo, M., & Anthony, K. (2020). Dystrophin Dp71 and the Neuropathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 57, Issue 3, pp. 1748–1767). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01845-w>
- Ohuchi, T., Katoh, N., Ueno, T., & Arai, T. (1994). Application of image processing to screening and characterizing of monoclonal antibodies recognizing PC12 cell surface antigen. *Bioimages*, 2, 101–109. <https://sci-hub.si/https://ci.nii.ac.jp/naid/10010232778/>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.03.142>
- Polcyn, R., Capone, M., Hossain, A., Matzelle, D., Banik, N. L., & Haque, A. (2017). Neuron specific enolase is a potential target for regulating neuronal cell survival and death: implications in neurodegeneration and regeneration. *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 4(12), 254. <https://doi.org/10.20517/2347-8659.2017.59>
- Rani, A. Q. M., Farea, M., Maeta, K., Kawaguchi, T., Awano, H., Nagai, M., Nishio, H., & Matsuo, M. (2019). Identification of the shortest splice variant of Dp71, together with five known variants, in glioblastoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508(2), 640–645. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.168>
- Rapaport, D., Fuchs, O., Nudel, U., & Yaffe, D. (1992). Expression of the Duchenne muscular dystrophy gene products in embryonic stem cells and their differentiated derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 267(30), 21289–21292. <https://sci-hub.si/http://www.jbc.org/content/267/30/21289.short>
- Romo-Yáñez, J., Ceja, V., Ilaraza-Lomelí, R., Coral-Vázquez, R., Velázquez, F., Mornet, D., Rendón, A., & Montañez, C. (2007). Dp71ab/DAPs complex composition changes during the differentiation process in PC12 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102(1), 82–97. <https://doi.org/10.1002/jcb.21281>
- Romo-Yáñez, J., Rodríguez-Martínez, G., Aragón, J., Siqueiros-Márquez, L., Herrera-Salazar, A., Velasco, I., & Montanez, C. (2020). Characterization of the expression of dystrophins and dystrophin-associated proteins during embryonic neural stem/progenitor cell differentiation. *Neuroscience Letters*, 736. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135247>
- Rybakova, I. N., Amann, K. J., & Ervasti, J. M. (1996). A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *Journal of Cell Biology*, 135(3), 661–672. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.3.661>
- Saint Martín, A., Aragón, J., Depardon-Benítez, F., Sánchez-Trujillo, A., Mendoza-Hernández, G., Ceja, V., & Montañez, C. (2012). Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy-terminal end. *FEBS Journal*, 279(1), 66–77. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08399.x>
- Schmechel, D. E., Brightman, M. W., & Marangos, P. J. (1980). Neurons switch from non-neuronal enolase to neuron-specific enolase during differentiation. *Brain Research*, 190(1), 195–214. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)91169-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)91169-5)
- Schubert, D., & Klier, F. G. (1977). Storage and release of acetylcholine by a clonal cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5184–5188. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5184>
- Sene, A., Tadayoni, R., Pannicke, T., Wurm, A., El Mathari, B., Benard, R., Roux, M. J., Yaffe, D., Mornet, D., Reichenbach, A., Sahel, J. A., & Rendon, A. (2009). Functional implication of Dp71 in osmoregulation and vascular permeability of the retina. *PLoS ONE*, 4(10), e7329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007329>
- Sierra-Fonseca, J. A., Najera, O., Martínez-Jurado, J., Walker, E. M., Varela-Ramírez, A., Khan, A. M., Miranda, M., Lamango, N. S., & Roychowdhury, S. (2014). Nerve growth factor induces neurite outgrowth of PC12 cells by promoting G $\beta\gamma$ -microtubule interaction. *BMC Neuroscience*, 15(1), 132. <https://doi.org/10.1186/s12868-014-0132-4>
- Strzalka, W., & Ziemienowicz, A. (2011). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A key factor in DNA replication and cell cycle regulation. In *Annals of Botany* (Vol. 107, Issue 7, pp. 1127–1140). <https://doi.org/10.1093/aob/mcq243>
- Suárez-Sánchez, R., Aguilar, A., Wagstaff, K. M., Velez, G., Azuara-Medina, P. M., Gomez, P., Vásquez-Limeta, A., Hernández-Hernández, O., Lieu, K. G., Jans, D. A., & Cisneros, B. (2014). Nucleocytoplasmic shuttling of the Duchenne muscular dystrophy gene product dystrophin Dp71d is dependent on the importin α/β and CRM1 nuclear transporters and microtubule motor dynein. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(5), 985–1001. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.01.027>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81265-N](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)81265-N)
- Tennyson, C. N., Dally, G. Y., Ray, P. N., & Worton, R. G. (1996). Expression of the dystrophin isoform Dp71 in differentiating human fetal myogenic cultures. *Human Molecular Genetics*, 5(10), 1559–1566. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.10.1559>
- Tinsley, J. M., Blake, D. J., & Davies, K. E. (1993). Apo-dystrophin-3: A 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Human Molecular Genetics*, 2(5), 521–524. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.5.521>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1982.tb12528.x>
- Wang, S. C. (2014). PCNA: A silent housekeeper or a potential therapeutic target? In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 35, Issue 4, pp. 178–186). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.02.004>
- Woodman, M. E., Savage, C. R., Arnold, W. K., & Stevenson, B. (2016). Direct PCR of intact bacteria (colony PCR). *Current Protocols in Microbiology*, 2016, A.3D.1-A.3D.7. <https://doi.org/10.1002/cpmc.14>
- Zubrzycka-Gaarn, E. E., Bulman, D. E., Karpati, G., Burghes, A. H. M., Belfall, B., Klamut, H. J., Talbot, J., Hodges, R. S., Ray, P. N., & Worton, R. G. (1988). The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature*, 333(6172), 466–469. <https://doi.org/10.1038/333466a0>