

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Caracterización de vectores lentivirales/Dp71d<sub>Δ71</sub> y  
Dp71d<sub>Δ71-74</sub>”**

Tesis que Presenta:

Lic. En Biotec. Lourdes Alejandra Figueroa Vilchis

Para obtener el Grado de

**Maestra en Ciencias**

en la Especialidad de

**Genética y Biología Molecular**

Directora de tesis:

Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda

Ciudad de México

Mayo 2022

**Durante el desarrollo de este proyecto, Lourdes Alejandra Figueroa Vilchis (CVU: 924401) fue becada por el Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología (CONACYT) durante el período de septiembre del año 2018 a agosto del año 2020 y recibió apoyo de los proyectos CB 2017-2018-A1-S-24868 y ECOS-NORD-ANUIES 276330 para la adquisición de materiales y reactivos.**

## **Dedicatoria**

A mi familia  
A mi chaparrita

## **Agradecimientos**

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

A la Dra. Cecilia Montañez por abrirme las puertas de su laboratorio, a la Dra. Rosa María Bermúdez y el Dr. José Manuel Hernández, por sus consejos y sus aportaciones al presente trabajo, por su disponibilidad, amabilidad y atención. A Candelaria, Jorge, Víctor y Alejandra, por sus enseñanzas, consejos, disposición y apoyo. A Clemencia y Gabriela, gracias por su valiosa ayuda.

A mi mamá, hermano y abuelos, gracias por el amor, la paciencia, el tiempo y ser mi soporte, son mi motor para seguir. A mi vida, por el amor, apoyo y tiempo incondicional.

A mi mejor amiga Arlene, por ser la mejor roomie. A mis compañeros de generación, gracias por inspirarme y motivarme a ser mejor. A los integrantes de los laboratorios 4 y 7: Coztli, Sandra, Pablo y César.

## Índice

Índice de Tablas	8
Índice de Figuras	9
Lista de Abreviaturas	10
Resumen	11
Abstract	12
Introducción	13
Distrofia muscular de Duchenne (DMD)	13
Distrofina	13
Generalidades de la distrofina Dp71 y sus isoformas	15
Importancia y función de Dp71	17
Línea celular PC12	20
Métodos de transfección	22
Vectores Virales	22
Lentivirus como vector viral	23
Producción de vectores lentivirales	27
Plásmido pPAX2	28
Plásmido pMD2.G	29
Plásmido pHAGE	30
Justificación	33
Hipótesis	34
Objetivos	35
Objetivo general	35
Objetivos particulares	35
Materiales y métodos	36

Cultivo de líneas celulares	36
Amplificación de los fragmentos Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 en el vector pHAGE	36
Secuenciación de los fragmentos clonados en los vectores pHAGE	37
Cuantificación de células	38
Curva de viabilidad en presencia de geneticina.	39
Producción de partículas virales	39
Infección de células HEK293 y PC12 con las partículas virales.	40
Selección de células PC12 infectadas	41
Extracción de DNA genómico	41
Inmunofluorescencia indirecta	42
Extracción de proteínas	43
Western blot	43
Resultados	45
Caracterización de los vectores pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71 y pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71-74.	45
Secuenciación de los fragmentos presentes en los vectores pHAGE-Dp71 $\Delta$ 71 y pHAGE-Dp71 $\Delta$ 71-74.	46
Curva de resistencia a Geneticina	46
Infección de células HEK 293	48
Generación de células PC12 estables que expresan GFP, Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74.	53
Identificación de las secuencias Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 en células PC12	53
Discusión	56
Conclusiones	63
Perspectivas	64
Referencias	65

Anexo	75
Secuenciación de Dp71d $\Delta$ 71 del plásmido pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71	75
Secuenciación de Dp71d $\Delta$ 71-74 del plásmido pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71-74	81
Secuencias de las distrofinas Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 reportadas en NCBI.	86

## Índice de Tablas

Tabla 1 <b>Cuadro comparativo de vectores virales más utilizados</b>	23
Tabla 2 <b>Lista de iniciadores utilizados en las diferentes reacciones de PCR.</b>	38
Tabla 3 <b>Lista de anticuerpos.</b>	43

## Índice de Figuras

Figura 1. <b>Gen DMD, promotores y productos.</b>	14
Figura 2. Estructura y sitios de unión de la distrofina Dp7116	
Figura 3 <b>Representación esquemática de las isoformas de Dp71.</b>	17
Figura 4 <b>Representación esquemática del genoma viral y la estructura del virión VIH-1.</b>	232
Figura 5 <b>Diagrama esquemático del ciclo de vida del VIH-1.</b>	25
Figura 6 <b>Plásmidos usados para producir vectores lentivirales.</b>	27
Figura 7 <b>Plásmido psPAX2.</b>	28
Figura 8 <b>Plásmido pMD2.G.</b>	29
Figura 9 <b>Plásmido pHAGE-Dp71<math>\Delta</math>71.</b>	30
Figura 10 <b>Sistema Tet-On presente en plásmido pHAGE.</b>	31
Figura 11 <b>Amplificación de las secuencias de Dp71d<math>\Delta</math>71 y Dp71d<math>\Delta</math>71-74 presentes en los plásmidos pHAGE.</b>	45
Figura 12 <b>Curva de resistencia a geneticina.</b>	47
Figura 13 <b>Transfección en células HEK 293 con diferentes proporciones de partículas virales</b>	48
Figura 14 <b>Expresión y distribución de myc-Dp71d<math>\Delta</math>71 recombinante en células HEK 293.</b>	50
Figura 15 <b>Expresión y distribución de myc-Dp71d<math>\Delta</math>71 recombinante en células HEK 293.</b>	51
Figura 16 <b>Expresión y distribución de myc-Dp71d<math>\Delta</math>71-74 recombinante en células HEK 293.</b>	52
Figura 17 <b>Expresión de GFP en células PC12 infectadas con las partículas virales.</b>	53
Figura 18 <b>Amplificación de las secuencias de Dp71d<math>\Delta</math>71, Dp71d<math>\Delta</math>71-74 a partir del DNA genómico de los grupos celulares de PC12.</b>	54
Figura 19 <b>Expresión de las proteínas recombinantes Dp71d<math>\Delta</math>71 y Dp71d<math>\Delta</math>71-74 en los grupos celulares de PC12</b>	55

## Lista de Abreviaturas

Aa	Aminoácido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AQP4	Canal de agua aquaporina-4
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
Pb	Pares de bases
CDKs	Cinasa dependiente de Ciclina
DAPC	Complejo de proteínas asociado a distrofina
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
DMEM	Eagle's minimal essential medium
Dp	Distrofina
FAK	Cinasa de adhesión focal
FBS	Suero fetal bovino
FCS	Suero fetal de ternera
G418	Sal disulfato G418
HspB1	Proteína de choque térmico beta-1
NGF	Factor de crecimiento neural
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P <sub>tet</sub>	Promotor de elemento de respuesta a tetraciclina
TH	Tirosina Hidroxilasa
TrkA	Tropomiosina cinasa A
rTetR	Proteína TetR reversa
TetO	Operador de elemento de respuesta a tetraciclina

## Resumen

La distrofia muscular de Duchenne es una enfermedad neuromuscular asociada a mutaciones en el gen DMD que codifica para diferentes proteínas llamadas distrofinas (Dp). Dentro de estas proteínas, el gen DMD codifica para la distrofina corta Dp71. Particularmente, en el desarrollo del cerebro, se ha visto la expresión de dos isoformas del grupo Dp71d: Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74, razón por la cual resulta interesante dilucidar el papel que juegan estas proteínas en la proliferación y diferenciación celular mediante su sobreexpresión en células PC12. Estudios realizados hasta el momento, han reportado que las células PC12 presentan una baja eficiencia de transfección, por lo que, en el presente trabajo, se utilizaron vectores lentivirales para la transfección de las isoformas Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 en estas células. Como primer paso, se llevó a cabo la caracterización de los vectores lentivirales a utilizarse, la cual consistió en primer lugar, en la determinación de la secuencia nucleotídica de las isoformas de la distrofina presente en los vectores pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71 y pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71-74 que cuentan con un sistema de respuesta a doxiciclina y que posteriormente fueron utilizados para producir los vectores lentivirales. Los vectores lentivirales fueron producidos en células HEK 293 utilizando tres plásmidos: psPAX2, pMD2.G y pHAGE. Las partículas virales se emplearon para infectar células HEK293 y PC12 observándose una eficiencia de transfección de 74 y 30.85%, respectivamente. Se seleccionaron las células PC12 transfectadas de manera estable y se verificó la integración de los vectores pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71 y pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71-74 en el genoma de las células por la presencia de las isoformas de Dp71 mediante PCR de DNA genómico. La expresión de las isoformas de Dp71 fue determinada mediante ensayos de Western Blot e inmunofluorescencia. La isoforma Dp71d $\Delta$ 71 mostró una localización en citoplasma y periferia, mientras que la isoforma Dp71d $\Delta$ 71-74 presentó una localización principalmente en citoplasma. Con estos resultados, se propone el uso de vectores lentivirales como alternativa para mejorar la transfección y expresión de secuencias que codifican para las proteínas Dp71 en células PC12.

## Abstract

Duchenne muscular dystrophy is a neuromuscular disease associated with mutations in the DMD gene that codes for different proteins called dystrophins (Dp).

Particularly, two isoforms of the Dp71d group have been involved in brain development: Dp71d $\Delta$ 71 and Dp71d $\Delta$ 71-74. For this reason, we have sought to elucidate the role of these proteins in cell proliferation and differentiation by its overexpression in PC12 cells. Studies carried out to date have reported that PC12 cells have a low transfection efficiency, therefore, in the present work, we report the use of lentiviral vectors for the transfection of the Dp71d $\Delta$ 71 and Dp71d $\Delta$ 71-74 isoforms in PC12 cells. First, pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71 and pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71-74 vectors were characterized by PCR amplification and DNA sequencing. Lentiviral vectors were then produced in HEK 293 cells using three plasmids: psPAX2, pMD2.G, and pHAGE and used to infect HEK293 and PC12 cells. The results showed, a transfection efficiency of 74 and 31% in HEK 293 and PC12 cells, respectively. Stably transfected PC12 cells were selected with geneticin and the presence of the Dp71 isoforms DNA was verified by genomic DNA PCR, which confirmed the integration of vectors pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71 and pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71-74 in the cellular genome. The expression of Dp71 isoforms was determined by Western Blot and immunofluorescence assays. The Dp71d $\Delta$ 71 isoform showed a localization in the cell cytoplasm and cell periphery, while the Dp71d $\Delta$ 71-74 isoform showed a localization in the membrane. Considering these results, the use of lentiviral vectors is proposed to improve the transfection and expression of Dp71 isoforms in PC12 cells.

## Introducción

### **Distrofia muscular de Duchenne (DMD)**

La distrofia muscular de Duchenne es la enfermedad neuromuscular hereditaria más común en la infancia y afecta principalmente a hombres. Se caracteriza por la atrofia y debilidad muscular que progresan rápidamente como consecuencia de la degeneración de los músculos lisos, esqueléticos y cardiacos, además, aproximadamente el 30% de los pacientes con DMD presentan deterioro cognitivo. La esperanza de vida de los pacientes con DMD suele estar alrededor de los 25 años (Yiu, *et al.*, 2015).

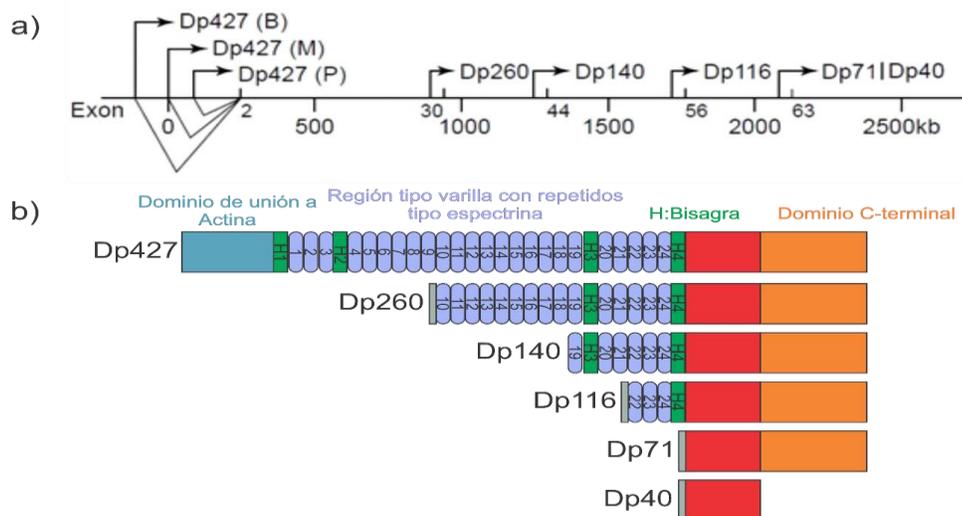
Esta enfermedad es causada por mutaciones en el gen DMD (Morgan, *et al.* 2003; Strehle, 2015; Koenig, *et al.*, 1989) ubicado en el brazo corto del cromosoma X en la banda Xp21. El gen DMD, es el más largo que se ha podido identificar a la fecha en humanos, consta de 79 exones (Tadayoni, *et al.*, 2012) y codifica para una proteína del citoesqueleto denominada distrofina de 427 kDa que cuenta con 3,685 residuos.

### **Distrofina**

La distrofina (Dp) es una proteína formada por cuatro dominios principales: 1) la región N-terminal de unión a actina, 2) la región central tipo varilla que comprende 24 hélices enrolladas tipo espectrina, que forma un dominio de barra interrumpido por 4 regiones bisagra que también es funcional para su unión a actina, 3) un dominio rico en cisteínas que permite a la distrofina asociarse con un grupo de proteínas extracelulares ( $\alpha$ -dístroglicano) e integrales de membrana (sarcoglicanos y  $\beta$ -dístroglicano), este dominio, está constituido por el subdominio WW, dos subdominios EF-hand y un dominio ZZ y finalmente 4) el dominio C-terminal que interactúa con proteínas citoplasmáticas: sintrofinas y distrobrevinas (Ahn, *et al.*, 1993; Gao, *et al.*, 2015) (Figura 1). La unión de la distrofina con las diferentes proteínas mencionadas anteriormente es fundamental para formar el complejo de proteínas asociado a distrofina (DAPC) (Ervasti, *et al.*, 1991). Particularmente, la distrofina se une a actina y  $\beta$ -dístroglicano, el dominio extracelular de este

último se une a  $\alpha$ -dístroglicano, que a su vez se une a la laminina en la matriz extracelular. Además, la unión de la distrofina a las sintrofinas y distrobrevinas es importante dado que las sintrofinas funcionan como adaptadores modulares que interaccionan con moléculas de señalización como la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) (Brenman, *et al.*, 1996; Kameya, *et al.*, 1999), el canal de agua aquaporina-4 (AQP4) (Yokota, *et al.*, 2000), canales iónicos (Gee; *et al.*, 1998) y quinasas (Hogan, *et al.*, 2001). El DAPC conecta la matriz extracelular con el citoesqueleto, dando soporte al sarcolema durante la contracción muscular y modulando la señalización celular en la membrana plasmática (Blake, *et al.*, 2002). (Figura 1).

El gen DMD posee varios promotores independientes distribuidos a lo largo de su secuencia, como se muestra en la Figura 2, la expresión que ocurre a partir de estos promotores resulta en distintas proteínas que se nombran de acuerdo con su masa atómica en kDa: Dp427 que es la distrofina de longitud completa, y las truncas en la región N terminal, que son: Dp260, Dp140, Dp116 y Dp71/Dp40 (Blake, *et al.*, 2000), representadas en la Figura 1.



**Figura 1. Gen DMD, promotores y productos.** a) Promotores del gen DMD. En la figura se puede observar una representación del gen DMD y los promotores que dan origen a sus diferentes productos. b) Proteínas derivadas del gen DMD. Se muestran Dp427, Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 y Dp40 y los dominios que componen a cada una de las proteínas. El dominio de unión a actina, en azul; la región tipo varilla, en morado las regiones bisagra: en verde; el dominio rico en cisteína en rojo y el dominio C-terminal, en naranja. Modificado de Blake, *et al.*, 2000 y Nichols, *et al.*, 2015

### **Generalidades de la distrofina Dp71 y sus isoformas**

La distrofina Dp71, se expresa a partir de un promotor constitutivo localizado en la parte distal del gen DMD, en el intrón 62, y abarca desde el exón 63 hasta el 79 del gen DMD. Esta proteína corresponde al producto del gen con mayor expresión en el cerebro (Figura 2).

La Dp71 se asocia con distroglicanos, sarcoglicanos, distrobrevinas, sintrofinas y proteínas accesorias para formar el DAPC en diversos tipos y diferentes compartimentos celulares, incluidos la membrana plasmática y el núcleo. Esta distrofina, a diferencia de la Dp427, carece de los dominios N-terminal de unión a actina y de la región de repetidos tipo espectrina, sin embargo, conserva los dominios NH<sub>2</sub> terminal único de 6 aminoácidos, un dominio WW, un dominio rico en cisteínas y un dominio C-terminal. Este extremo N-terminal específico posee un dominio de unión a actina, el dominio WW se une a sustratos ricos en prolina (de manera análoga como lo hacen los dominios SH<sub>3</sub>), región que media la interacción entre β-distroglicano y la distrofina (el dominio citoplasmático del β-distroglicano es rico en prolina).

El dominio rico en cisteína contiene dos motivos EF-hand que son similares a α-actina y que podrían unir Ca<sup>2+</sup> intracelular. El subdominio ZZ contiene un número conservado de residuos de cisteína que se predice que forman sitios de coordinación para cationes bivalentes (Ponting, *et al.*, 1996), similar a diferentes tipos de dedos de zinc se une a calmodulina de manera dependiente de Ca<sup>2+</sup> (Anderson, *et al.*, 1996). El dominio C-terminal contiene dos polipéptidos estrechos que forman una espiral α-hélice similar al dominio rod. Dichos polipéptidos tienen una heptada repetida conservada (a, b, c, d, e, f, g) similar a las que se encuentran en las cremalleras de leucina donde la leucina predomina en la posición "d" (Blake, *et al.*, 1997). Este dominio forma un sitio de unión para distrobrevinas y podría modular la interacción entre sintrofinas y otras proteínas asociadas a distrofina (Sadoulet, *et al.*, 1997).



Figura 2. **Estructura y sitios de unión de la distrofina Dp71.** En azul, el dominio N-terminal; en rojo el dominio rico en cisteínas, constituido a su vez por un dominio WW, EF y ZZ, que en conjunto sirven para la unión a  $\beta$ -distroglicano; en naranja, el dominio C-terminal que se une con sintrofinas y distrobrevinas en amarillo y café, respectivamente. Adaptación de Ervasti, 2006; Fairclough et al., 2006.

La Dp71 presenta diversas isoformas, generadas por procesamiento alternativo de los exones 71 al 74, 78 y/o del intrón 77. El procesamiento del exón 78 o del intrón 77 provoca un desplazamiento del marco de lectura, formando así tres grupos de isoformas de Dp71 con extremos C-terminal diferentes: Dp71d, Dp71f y Dp71e (Saint, et al., 2012; Aragón, et al., 2016) (Figura 3).

El grupo Dp71d contiene los exones 78 y 79, mientras que el grupo Dp71f no presenta el exón 78 generándose un exón 79 alternativo. Por otro lado, en el grupo Dp71e se preservan los últimos 34 pb del intrón 77. Adicionalmente, también puede presentarse procesamiento alternativo de los exones 71 al 74.

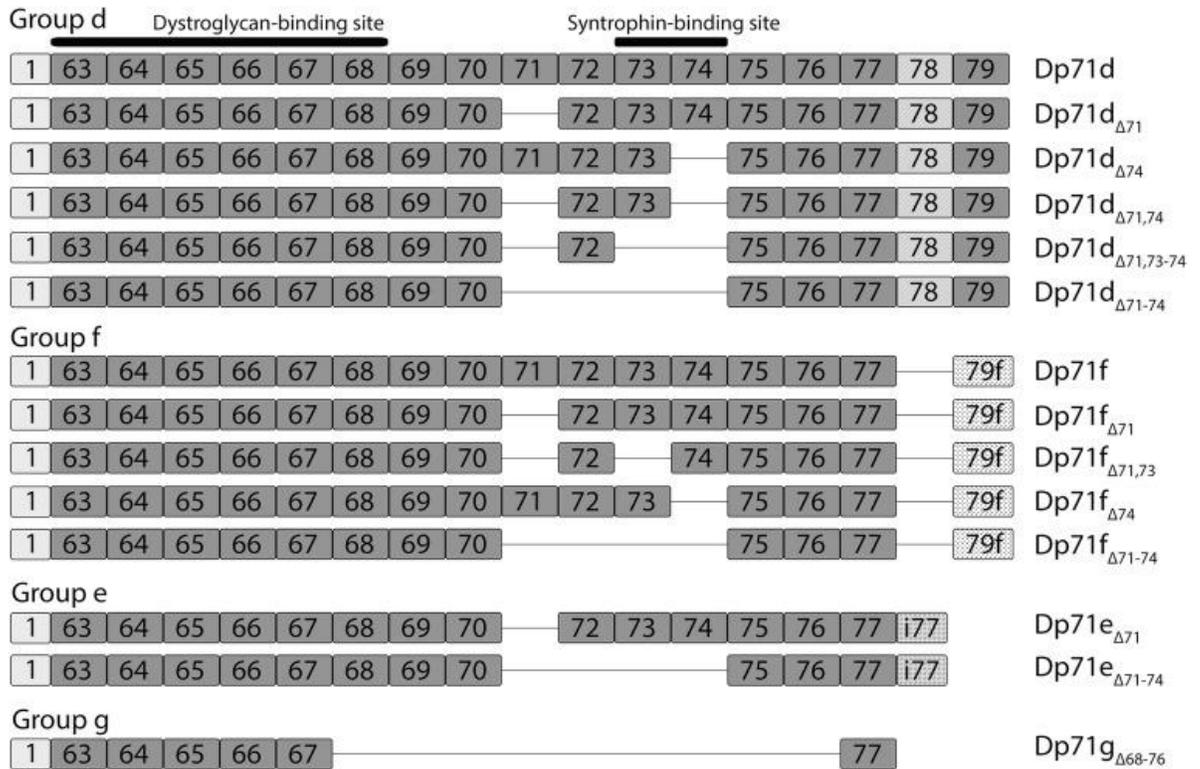


Figura 3. **Representación esquemática de las isoformas de Dp71.** Se muestran los grupos de las isoformas de Dp71: Dp71d, Dp71f, Dp71e y Dp71g, y los exones que las conforman indicados con número. Cada grupo de Dp71 tiene un C-terminal específico debido a la presencia o ausencia del exón 78 o el intrón 77. Se señalan: parte del intrón 62, los exones 63-79, el exón 79 alternativo (79f) y el intrón 77 (i77). Modificado de Naidoo, et al., 2020.

En el grupo Dp71d están incluidas 6 isoformas: la Dp71d de longitud completa, Dp71d<sub>Δ71</sub>, que no contiene el exón 71, Dp71d<sub>Δ74</sub>, que no contiene el exón 74, Dp71d<sub>Δ71,74</sub>, sin los exones 71 y 74; Dp71d<sub>Δ71,73-74</sub>, sin los exones 71, 73 y 74; y Dp71d<sub>Δ71-74</sub>, sin los exones 71 al 74 (Aragón, et al., 2018). Por otro lado, en el grupo Dp71f se incluyen 4 isoformas: la Dp71f de longitud completa, la Dp71f<sub>Δ71</sub> que no contiene el exón 71, la Dp71f<sub>Δ74</sub> que carece del exón 74 y la Dp71f<sub>Δ71-74</sub>, sin los exones del 71 al 74. En el grupo Dp71e están incluidas las isoformas Dp71e<sub>Δ71</sub> que carece del exón 71 y la isoforma Dp71e<sub>Δ71-74</sub> la cual no contiene los exones 71 al 74. Finalmente, en el grupo Dp71g, se encuentra la Dp71g<sub>Δ68-76</sub> que no contiene los exones del 68 al 76 (Naidoo, et al., 2020).

### Importancia y función de Dp71

Diversos estudios han mostrado que la proteína Dp71 cumple funciones relevantes en el cerebro. Moizard y colaboradores (1998) realizaron un estudio

en donde asociaron el deterioro cognitivo severo de pacientes con DMD con una Dp71 alterada. Siguiendo esta línea, otro estudio llevado a cabo por Daoud y colaboradores (2009) señala que los pacientes que presentan mutaciones localizadas en los exones 75 y 76, manifiestan deterioro cognitivo, mientras que los pacientes que presentan mutaciones río arriba del exón 62, generalmente son individuos con rendimiento cognitivo normal.

Dada la versatilidad de las isoformas de Dp71, se ha señalado que podría estar involucrada en múltiples procesos como ciclo celular, diferenciación celular neuronal, arquitectura nuclear y de membrana, funciones sinápticas y homeostasis mediada por canales de potasio y de agua (Tayadoni, *et al.*, 2012).

Cisneros y colaboradores en 1996 observaron el aumento de Dp71 a nivel RNAm y proteína durante la diferenciación de células PC12, sugiriendo que el aumento de la expresión de Dp71 podría estar relacionado con el crecimiento de neuritas. Por su parte, estudios realizados por Márquez y colaboradores (2003) revelaron que Dp71f incrementa durante la diferenciación neuronal, efecto que no se observa en Dp71d. Además, la localización intracelular de ambos grupos de isoformas es distinta; Dp71f se encuentra localizada en citoplasma y periferia celular, mientras que Dp71d se encuentra en citoplasma y núcleo. Se ha reportado que la localización de esta distrofina cambia durante la diferenciación; Dp71f se localiza mayormente en el cono de crecimiento neural y las varicosidades axonales, por su parte, Dp71d se relocaliza principalmente en el núcleo.

Por otro lado, cuando se realizó un silenciamiento de toda la familia de isoformas de Dp71, se encontró que la capacidad de respuesta a la diferenciación de células PC12 con NGF (Factor de crecimiento neural) y AMPc (Adenosín monofosfato cíclico) se ve disminuida (Acosta, *et al.*, 2004). En otro estudio realizado por Villarreal y colaboradores (2011), observaron que en células PC12, cuando se realiza un silenciamiento de Dp71, hay un retraso en el ciclo celular en la fase de transición de G0/G1 a S, además, la expresión

de laminina B1 y  $\beta$ -dístroglicano en el huso mitótico y el puente citoplasmático, necesario para proliferación celular, se encuentran disminuidas.

En un estudio realizado por Herrera y colaboradores (2016) se encontró que células PC12 Tet-On que expresan a la mutante Dp71 $\Delta$ 78-79 proliferan 3 veces más rápido en comparación con las células control (células con el vector vacío) y no responden a NGF. Además, la presencia de la mutante aumenta la expresión de Dp71d $\Delta$ 71 endógena, así como de PCNA (Antígeno nuclear de células en proliferación) y FAK (Cinasa de adhesión focal). Sin embargo, cuando se realizó un análisis de las células PC12-C11 que expresan esta mutante (Dp71 $\Delta$ 78-79) se observó un aumento en el crecimiento de neuritas mediante la regulación y fosforilación de HspB1 (proteína de choque térmico beta-1) comparado con células PC12 (Merino, *et al.*, 2016).

Por otro lado, la sobreexpresión de Dp71e $\Delta$ 71 en células PC12 Tet-On estimula la diferenciación neuronal, incrementando el número de células con neuritas y la longitud de las neuritas, además, hay un incremento en la expresión de las proteínas HspB1, S100A6 y K8, involucradas en estructura de citoesqueleto, de la proteína HCNP involucrada en síntesis de neurotransmisores y Tiroxina Hidroxilasa (TH) usada comúnmente como marcador de diferenciación neuronal (García, *et al.*, 2019).

Debido a la diversidad de procesos en los que está involucrada Dp71, es necesario realizar estudios específicos para determinar la función de cada una de las isoformas. En particular existe un gran interés por dos isoformas del grupo Dp71d: Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74, dado que González y colaboradores (en preparación) observaron que ambas son fundamentales en el desarrollo del cerebro. La Dp71d $\Delta$ 71-74 carece de los exones del 71 al 74, causando una deleción de 330 pb que afecta una región de la proteína que codifican para 110 aminoácidos del dominio de unión a sintrofinas, que es fundamental para la unión con transportadores, canalés iónicos, etc. (Tayadoni, *et al.*, 2012). Un estudio realizado por León (2016), determinó que la sobreexpresión de la Dp71d $\Delta$ 71 estimula la proliferación celular y disminuye la tasa de diferenciación

inducida por NGF en células PC12 Tet-On, además, el nivel de expresión de los marcadores de proliferación celular PCNA y Ciclina B1 se encuentran elevados, mientras que  $\beta$ 3-tubulina y HspB1 se expresan en niveles más bajos, por otro lado, la sobreexpresión de Dp71d $\Delta$ 71-74 disminuye la proliferación celular y aumenta la tasa de diferenciación en presencia de NGF, formando neuritas multipolares.

Por lo tanto, estudiar a las isoformas Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 y su participación en la proliferación y diferenciación celular, podrá dar una visión más clara sobre el papel que desempeñan, además de ser un precedente para el estudio del desarrollo embrionario del cerebro.

Las líneas celulares son útiles para estudiar la función de genes y proteínas, dada su disponibilidad ilimitada, proliferación, tipo celular uniforme, por tanto, reproducibilidad de los resultados alta y fáciles de manipular genéticamente a comparación de cultivos primarios, tejidos u organismos enteros (Tadayoni, *et al.*, 2012). La línea celular PC12 es el modelo empleado por excelencia para el estudio de las diferentes isoformas de la Dp71.

### **Línea celular PC12**

La línea celular PC12, derivada de feocromocitoma adrenal de rata, tiene la propiedad de responder al tratamiento con el factor de crecimiento neural (NGF) diferenciándose a células tipo neuronas. Por ello, es una herramienta para el estudio de la división celular, diferenciación neuronal y crecimiento de neuritas en el desarrollo del sistema nervioso (Greene, *et al.*, 1976; Ravni, *et al.*, 2006).

Las células PC12 tienen apariencia redonda y contienen vesículas cromafines. Estas células proliferan lentamente bajo condiciones de cultivo normales, se multiplican de forma logarítmica, tienen un tiempo de división de 48 a 72 horas para células con pasajes tardíos y de 96 horas en células con pasajes tempranos (Greene, 1982).

En presencia de un estimulante del crecimiento celular, las células PC12 sobreexpresan marcadores de proliferación celular como PCNA (antígeno de proliferación celular) y marcadores del ciclo celular como Ciclina B1 y CDKs (Sun, *et al.*, 2014).

Por otro lado, cuando a las células PC12 se les estimula con NGF, se produce un cambio drástico en el fenotipo y adquieren propiedades de neuronas simpáticas. Las células cesan la proliferación, extienden neuritas y se convierten en material eléctricamente excitable. El NGF induce diferenciación mediante la unión con el receptor TrkA (tropomiosina cinasa A), (Kaplan, *et al.*, 1994) desencadenando la acción de numerosas cascadas de señalización como la vía de Raf/MEK/MAP (Kao, *et al.*, 2001) y la PLC $\gamma$ /PKC (Kim, *et al.*, 1991), que inhiben la proliferación y promueven el crecimiento neuronal. En este sentido, NGF provoca un arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 (Rudkin, 1989) y provoca la sobreexpresión de Ciclina D que inhibe la síntesis de DNA (Marampon, *et al.*, 2008) y aumenta la concentración de proteínas como  $\beta$ 3 tubulina (Joshi, *et al.*, 1989).

Esta línea celular se ha considerado como modelo de estudio en investigaciones relacionadas con la función, localización y expresión de la Dp71, ya que expresan varias isoformas de la proteína, como la Dp71d $\Delta$ 71, Dp71d $\Delta$ 71-74, Dp71f $\Delta$ 71 y Dp71e $\Delta$ 71 (Saint Martin, *et al.*, 2012, Aragón, *et al.*, 2016), cuyos patrones de expresión y localización se modifican, en algunos casos, durante la diferenciación celular (Márquez, *et al.*, 2003, Aragón, *et al.*, 2015).

En células PC12, Dp71 interactúa con  $\beta$ -dístroglicano,  $\beta$ 1-syntrophina,  $\beta$ -dístrobrevina y  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -sarcoglicano. La composición de Dp71-DAPC cambia durante la diferenciación neuronal inducida por NGF, donde Dp71 se asocia con  $\beta$ -dístroglicano,  $\alpha$ 1-sintrofina,  $\beta$ -dístrobrevina,  $\delta$ -sarcoglicano y nNOS en células diferenciadas (Villarreal, *et al.*, 2010; Romo, *et al.*, 2007). Particularmente, en esta línea celular, las isoformas de Dp71d se localizan en el núcleo (Márquez, *et al.*, 2003).

Sin embargo, la línea celular PC12 suele presentar dificultades para aceptar material genético exógeno por distintas metodologías, por lo cual, el estudio y optimización de estas es fundamental para la investigación y posteriores aplicaciones terapéuticas.

### **Métodos de transfección**

La transfección se define como la introducción de material genético externo en células eucariotas mediante vectores. Existen diversas técnicas que van desde métodos físicos como la electroporación, microinyección y biobalística, pasando por los métodos químicos como el uso de liposomas, fosfato de calcio, polietilenglicol; para finalizar con métodos biológicos como los virus recombinantes.

Entre los métodos más utilizados se encuentra el uso de liposomas, fosfato de calcio o polietilenglicol, dado que presentan buenas eficiencias de transfección, son baratos, sencillos y rápidos. Sin embargo, existen líneas celulares que presentan dificultades para captar material genético exógeno por estos medios, tal es el caso de las células PC12, de manera que, los virus recombinantes se presentan como una alternativa óptima.

Los virus son elementos genéticos con capacidad infectiva que se pueden replicar independientemente del material genético de la célula huésped, utilizando su maquinaria de replicación. Dado nuestro interés en las transfecciones mediadas por virus, ahondaremos más sobre su naturaleza y ocupación como método en la transfección.

### **Vectores Virales**

Para poder utilizar partículas virales como vectores de expresión es necesario transformarlos en virus deficientes en replicación dentro de la célula blanco, de tal manera que el vector viral sólo será capaz de ensamblarse en células de empaquetamiento (líneas celulares específicas para ensamblar y producir partículas virales con los genes de interés), y cuando llegue a la célula blanco, únicamente inserte el gen de interés. Estas partículas se conocen como virus recombinantes (Legorreta, *et al.*, 2012).

Los virus recombinantes son una herramienta eficiente en la transgénesis y permiten sobreexpresar proteínas en diferentes tipos celulares. Entre los virus recombinantes con aplicaciones en transgénesis, se pueden encontrar diferentes tipos: los adenovirus, los retrovirus, los virus adenoasociados, los lentivirus, además de otros virus de DNA o RNA (Tabla 1).

Vectores Virales				
Vector	Material Genético	Capacidad del Transgén	Tropismo	Tipo del Vector
<b>No envueltos</b>				
Adenovirus	DNA de doble cadena	8 kb	Amplio	Episomal (circular) fuera del genoma del hospedero
AVV	DNA de doble sencilla	<5 kb	Amplio	Episomal (circular) fuera del genoma del hospedero
<b>RNA Envueltos</b>				
Retrovirus	RNA	8 kb	Células en división	Integrado al genoma del hospedero
Lentivirus	RNA	8 kb	Amplio	Integrado al genoma del hospedero

Tabla 1. **Cuadro comparativo de vectores virales más utilizados.** Modificado de Legorreta, et al., 2012.

#### Lentivirus como vector viral

La amplia utilización de los lentivirus como vectores se debe a que posee una gran estabilidad funcional y estructural de las formas integradas del vector.

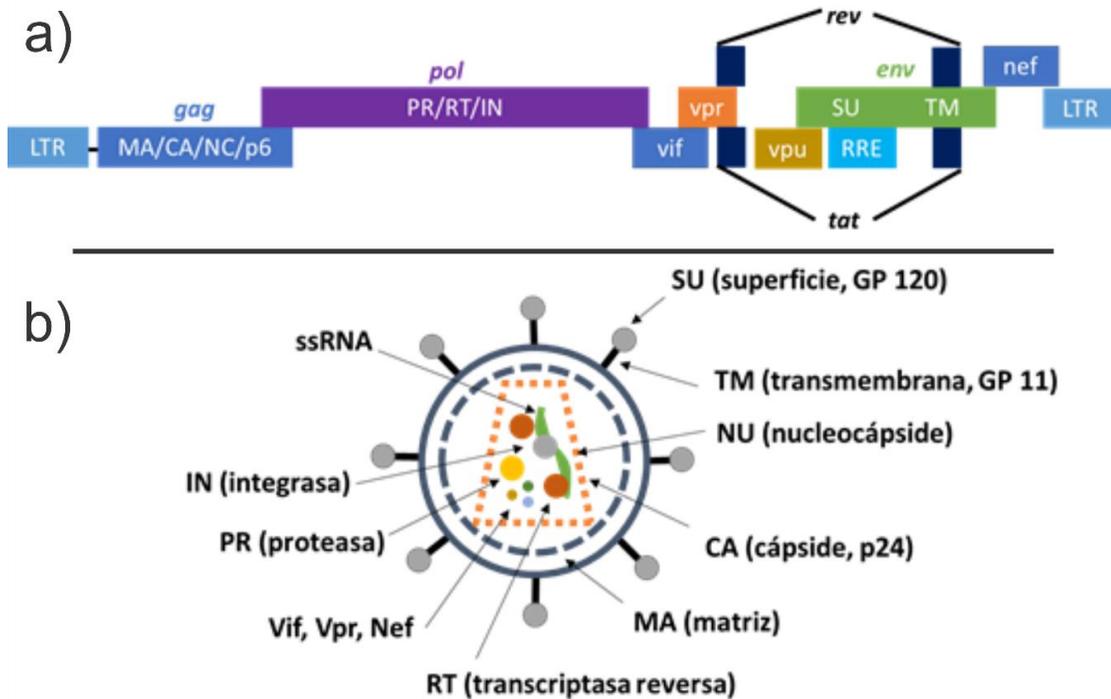
Los lentivirus son miembros de la familia *Retroviridae* (retrovirus) que se caracterizan por el uso de una reverso transcriptasa (RT) y una integrasa (IN) para una inserción estable de la información genómica viral en el genoma del hospedero. Estos virus, a diferencia de los retrovirus, pueden replicarse en células quiescentes como en división e infectar una amplia gama de tipos celulares.

Los lentivirus contienen RNA como material genético, y cuando infectan a una célula, el RNA se retrotranscribe a DNA de doble cadena, el cual puede

integrarse en cualquier parte del genoma de la célula huésped (aunque existen ciertos lugares de inserción preferenciales) (Young, *et al.*, 2006).

Desde hace más de dos décadas, los lentivirus se han modificado genéticamente como una herramienta utilizada para introducir material genético a las células que son difíciles de transfectar por otros métodos, con el fin de expresar o inhibir la expresión de una proteína. A lo largo de los años, gracias al estudio de estas herramientas se ha logrado que los lentivirus sean más seguros y efectivos. En general, los vectores de lentivirus ofrecen diversas ventajas, incluyendo: integración en el genoma del hospedero, capacidad de infectar células en división y células que no se dividen, amplio rango de tropismo celular, la habilidad de transportar elementos genéticos completos, integración en sitios seguros del genoma y un sistema sencillo para producción y manipulación del vector (Campeau, *et al.*, 2009).

Gran parte de los vectores lentivirales utilizados actualmente están basados en el genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El VIH tiene un genoma de una sola cadena de RNA en sentido positivo, que codifica para 9 proteínas virales, tres de los mayores marcos abiertos de lectura contiene genes para proteínas esenciales: *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica para proteínas del core viral, el gen *pol* codifica para un conjunto de enzimas requeridas para la replicación viral y el gen *env* codifica para la proteína de superficie gp160. El genoma posee una señal de dimerización del genoma de RNA y empaquetamiento “ $\psi$ ”, se localiza entre la región 5’LTR y el gen *gag*. (Figura 3)



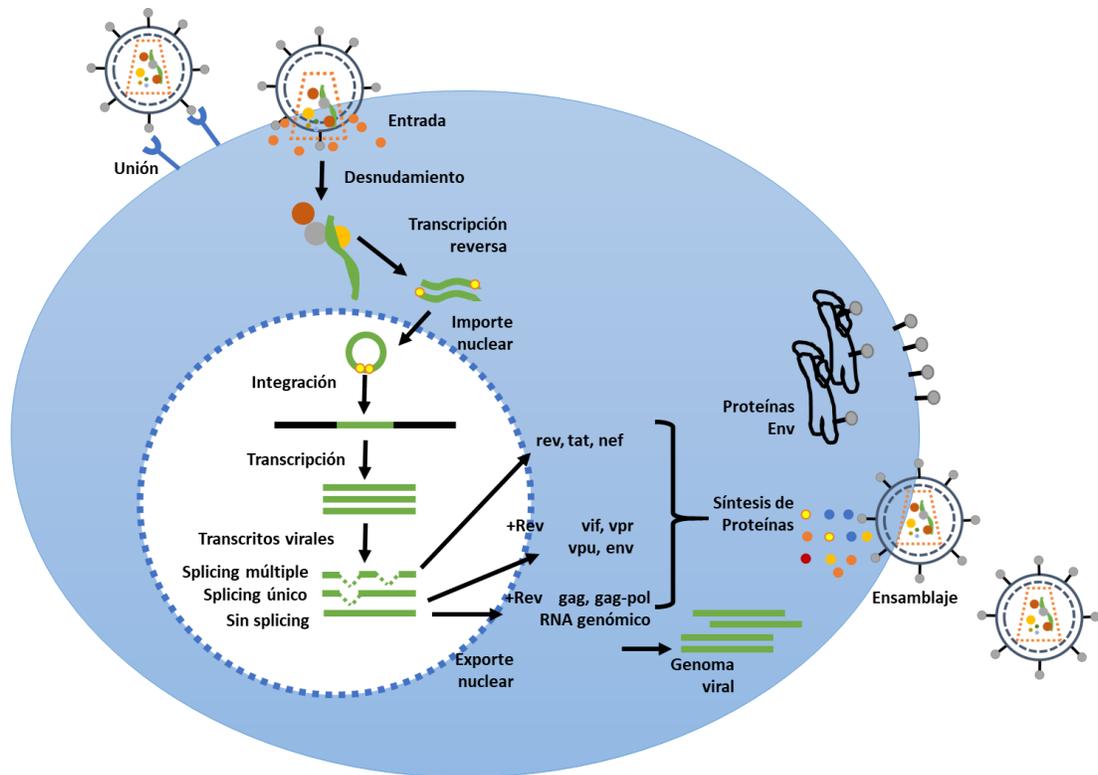
**Figura 3. Representación esquemática del genoma viral y la estructura del virión VIH-1.** **a)** El genoma viral codifica para tres genes estructurales (*gag*, *pol*, *env*), reguladores (*rev* y *tat*) y accesorios (*vif*, *vpr* y *nef*) flanqueados por repeticiones terminales largas (LTR). El precursor de Gag consiste en diferentes proteínas: proteína de matriz MA, proteína de cápside CA, proteína de nucleocápside NC y p6. La proteína precursora Gag-pol codifica para tres enzimas de replicación esenciales: RT, IN y PR. La glicoproteína de envoltura del VIH-1 codifica el precursor de la envoltura de poliproteína (gp160), que finalmente es escindido por PR para generar dominios virales SU y TM. También está indicado el RRE, que se encuentra en la región *env* del genoma del VIH. **b)** Dos RNA virales monocatenarios, RT, IN, PR y CA, así como proteínas accesorias, están rodeados por CA. La membrana viral interna y las membranas virales externas se recubren con MA y Env respectivamente. Modificado de Sakuma, et al., 2012

De manera natural, el ciclo de infección por el virus del VIH se inicia mediante la unión de SU a su receptor primario CD4 y a su correceptor CXCR4 (receptor de quimiocina CXC 4), expresado en linfocitos T o CCR5 en monocitos/macrófagos, células dendríticas y linfocitos T activados. Tras el reconocimiento del receptor, TM cambia la conformación para facilitar la fusión de la membrana del VIH con la célula huésped, lo que conduce a la entrada del virus (Figura 5). Una vez que ha entrado el virus, libera el genoma viral y las proteínas MA (proteína de matriz), RT, IN y Vpr en el citoplasma. La cadena de RNA (+) se convierte en DNA de doble cadena mediante la proteína RT viral. Este DNA proviral se importa al núcleo y se integra en el genoma del

hospedero mediante la IN viral. (Fanales-Belasio, *et al.*, 2009; Warrilow, *et al.*, 2009)

Una vez que se integra el DNA proviral, los LTR que cubren los extremos del genoma viral regulan la transcripción y poliadenilación del RNAm viral. El LTR en el extremo 5' del genoma actúa como un potenciador y un promotor para la transcripción por la RNA polimerasa II de la célula huésped. El LTR en el extremo 3' del genoma estabiliza los transcritos al mediar su poliadenilación.

La actividad promotora basal del 5'-LTR es mínima en ausencia del transactivador Tat viral. En ausencia de Tat, la transcripción inicial es ineficaz y produce RNAm virales que se cortan y empalman en múltiples transcripciones cortas. Estas breves transcripciones codifican las proteínas no estructurales Tat, Rev y Nef que facilitan eventos posteriores en el ciclo de vida viral. Tat recién sintetizado se une a TAR (elemento de respuesta de transactivación) en el extremo 5' del RNAm del VIH-1 y transactiva y amplifica la transcripción de otras proteínas virales estructurales (Wei, *et al.*, 1998). Mientras tanto, Rev se une al RRE (elemento de respuesta a Rev) en las transcripciones virales para facilitar la exportación nuclear de transcripciones y genomas virales empalmados o no empalmados individualmente (Malim, *et al.*, 1989). Los transcritos producidos por el procesamiento alternativo codifican Env, Vif, Vpr y Vpu, mientras que los RNA virales sin procesamiento alternativo se utilizan para la traducción de Gag y Pol y como RNA genómicos para virus de progenie. Los genomas y proteínas virales exportados se ensamblan en la membrana plasmática. Después de la liberación de la célula huésped, la multimerización de Gag y Gag-Pol activa la PR viral que convierte estos viriones inmaduros en virus infecciosos maduros (Haseltine, *et al.*, 1988).



**Figura 5. Diagrama esquemático del ciclo de vida del VIH-1.** Al entrar en la célula, las proteínas de la cápside no están recubiertas, lo que da como resultado la liberación del genoma de RNA y enzimas virales (RT, IN y PR). El RNA (+) usando RT, se convierte en DNA de doble cadena en el citoplasma y se importa al núcleo seguido de la integración en el genoma del huésped. Después de la transcripción, los RNAm virales son procesados por la maquinaria celular. Durante el ciclo de vida viral temprano, solo los RNAm virales completamente empalmados (*tat*, *nef* y *rev*) se pueden exportar desde el núcleo al citoplasma. Después de sintetizar *Rev*, la proteína *Rev* se importa al núcleo y se exporta el RNAm empalmado individualmente (es decir, *vif*, *vpr*, *vpu* y *env*) y sin empalmar (es decir, *gag* y *gag-pol*), que contiene RRE como elemento *cis* del núcleo a través de la interacción con la proteína *Rev*. Una vez que se sintetizan los RNAm virales (la mayoría de las proteínas virales se sintetizan en el citosol y las proteínas *Env* se sintetizan a través del retículo endoplásmico), el genoma viral y las proteínas se ensamblan en la membrana plasmática. A continuación, se liberan nuevas partículas de VIH de la célula huésped. Inmediatamente después de la gemación del virus, la multimerización de *Gag* y *Gag-Pol* activa la PR viral, que conduce a los reordenamientos estructurales y da lugar a los viriones infecciosos maduros. Modificado de Sakuma, et al., 2012.

### Producción de vectores lentivirales

Para producir vectores lentivirales se utilizan partes del genoma del VIH y se eliminan las regiones que permiten que el virus se replique, de modo que, al momento de la producción, se generen partículas virales que sólo puedan infectar a la célula blanco y no tengan la capacidad de replicarse.

Generalmente, la producción de estas partículas virales se realiza en células con una gran capacidad de transfección, como la línea celular HEK 293 T, derivada de HEK 293 con el antígeno T SV40 que resulta ser más eficiente para transfección, utilizando un sistema de expresión de tres plásmidos: un plásmido que le servirá de empaquetamiento, un plásmido de envoltura de la partícula viral y un plásmido de expresión, donde está insertado el gen de interés (Figura 6).

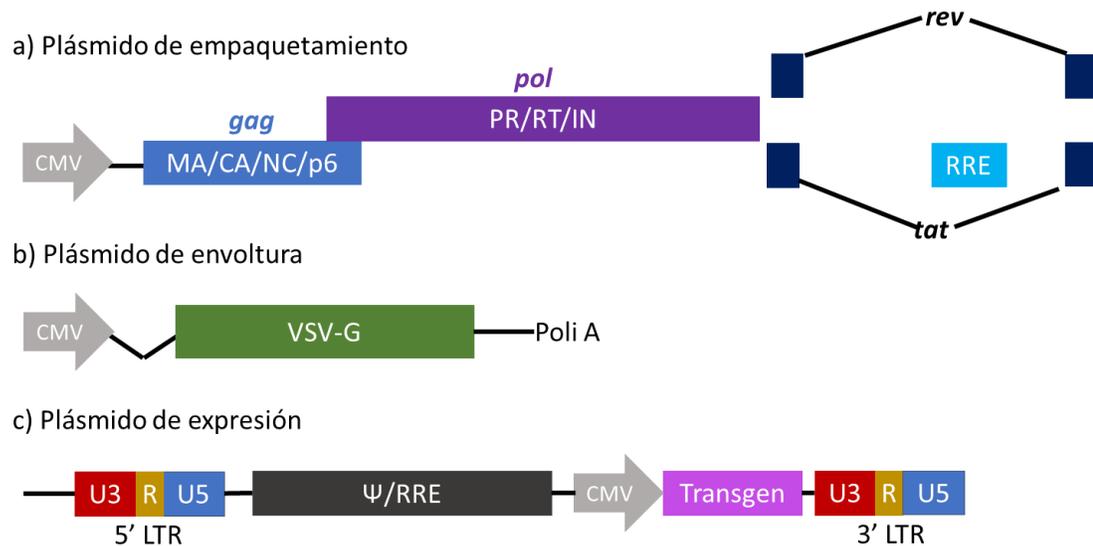


Figura 6. **Plásmidos usados para producir vectores lentivirales.** **a)** Plásmido de empaquetamiento (psPAX2), que contiene los genes *gag* y *pol*, y una región RRE. **b)** Plásmido de envoltura (pMD2.G), con un gen que codifica para la proteína VSV-G. **c)** Plásmido de expresión (pHAGE) que contiene regiones 5' y 3' LTR, un gen que codifica para la señal  $\Psi$  y el transgén de interés

### Plásmido pPAX2

El plásmido pPAX2 es utilizado para el empaquetamiento de las partículas virales dado que contiene los genes *gag* y *pol* del HIV-1 (figura 7). El gen *gag* (Antígeno específico de grupo) produce las proteínas estructurales del virus (Ondarza, N., 1994). El gen *pol*, por su parte, produce diferentes proteínas, entre ellas: una retrotranscriptasa, que transcribe el RNA viral en DNA de doble cadena; una integrasa/endonucleasa, que integra el DNA producido por la retrotranscriptasa al genoma de la célula hospedero; y una proteasa, cuya función es cortar a las proteínas en segmentos, dado que los genes *gag* y *pol*

no producen proteínas en su forma final sino se sintetizan primero como un precursor de proteína llamado poliproteína.

Además, el plásmido contiene a la proteína Rev, la cual es útil para el exporte del RNAm viral, dado que se une a la secuencia RRE (elemento de respuesta Rev) y recluta proteínas como exportina-1 (XPO1/CRM1) y Ran-GTP mediante su secuencia de exporte nuclear (NES). De manera que, el RNAm puede ser transportado al citoplasma para producir las proteínas virales restantes o empaquetar el genoma viral. (Pollard, *et al.*, 1998).

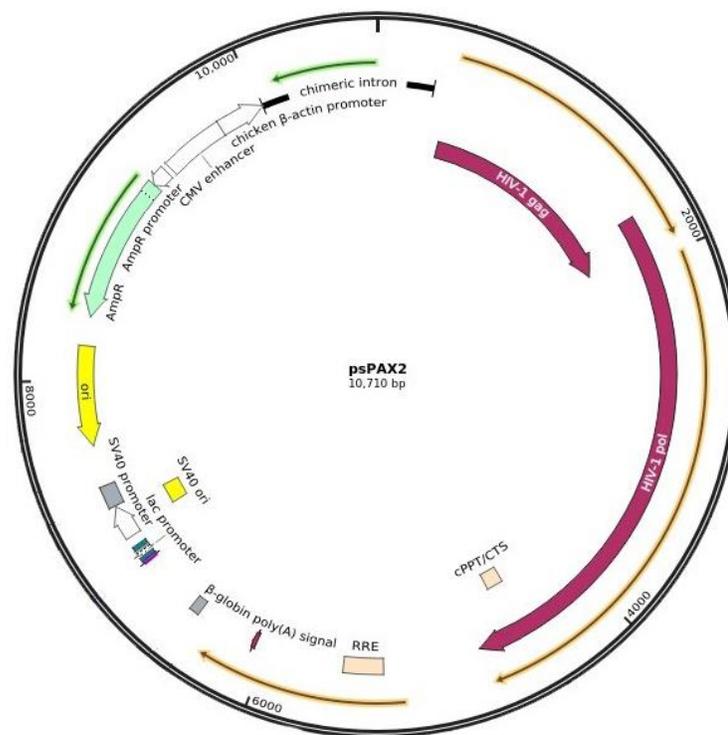


Figura 7. **Plásmido psPAX2**. El plásmido contiene 10710 pb, con los genes gag y pol del HIV-1, la secuencia RRE y un gen de resistencia a ampicilina.

### Plásmido pMD2.G

El plásmido pMD2.G contiene la información para expresar a la proteína de la estomatitis vesicular G (VSV-G), una proteína de envoltura tipo III de fusión viral, esencial para la infección viral, ya que se une a la fosfatidilserina presente en la membrana celular y permite la fusión con la envoltura del virus para liberar el genoma viral en las células (Figura 8).

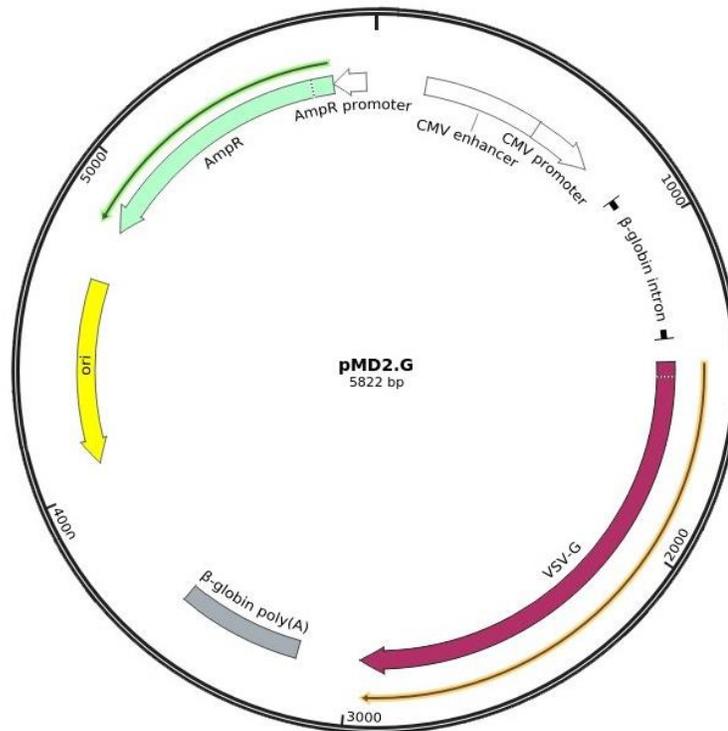


Figura 8. **Plásmido pMD2.G.** El plásmido contiene 5822 pb, codifica para la proteína VSV-G y un gen de resistencia a ampicilina

### Plásmido pHAGE

El plásmido pHAGE es un vector de expresión utilizado para incrementar la expresión de genes presentes en vectores virales. Contiene la señal  $\psi$  para el empaquetamiento del genoma; un elemento regulatorio postranscripcional del virus Woodchuck Hepatitis (WPRE), que es una secuencia de DNA que, al transcribirse, crea estructuras terciarias que incrementan la expresión; además del elemento de respuesta Rev (RRE) para el exporte nuclear del RNAm mediante una vía dependiente de REV.

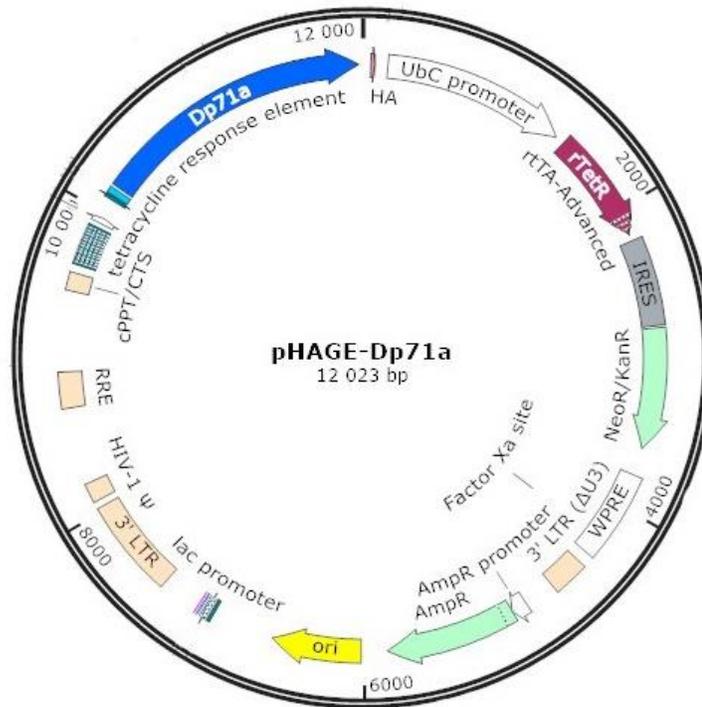


Figura 9. **Plásmido pHAGE-Dp71 $\Delta$ 71**. El plásmido contiene 12023 pb y la secuencia de la isoforma Dp71 $\Delta$ 71, una señal de dimerización  $\psi$ , un elemento WPRE, el RRE, rTetR y el elemento de respuesta a tetraciclina.

Además, este plásmido está modificado de tal forma que, al ser insertado en el genoma de la célula blanco, la expresión del DNA de interés opere mediante el sistema Tet-On. El sistema Tet-On es un sistema de regulación que permite la activación de la expresión de genes mediante la adición de antibióticos de la familia de la tetraciclina (como por ejemplo doxiciclina), consiste en una proteína reverse-TetR (rTetR) y un promotor llamado elemento de respuesta a tetraciclina ( $P_{tet}$ ) que incluye al operador (TetO). En presencia de tetraciclina, la rTetR cambia de conformación, lo cual le permite unirse al promotor para permitir la expresión del gen (Das, *et al.*, 2016) (Figura 10).



Figura 10. **Sistema Tet-On** presente en plásmido **pHAGE**. La proteína *rTetR* no se une al promotor *TetO* en ausencia de un efector (tetraciclina). La unión de *rTetR* con tetraciclina provoca un cambio conformacional que le permite unirse al *TetO*. Modificado de Das, et al., 2016

## **Justificación**

Mutaciones en el gen DMD que alteran a la Dp71 están relacionadas con el deterioro cognitivo en pacientes con DMD sugiriendo que Dp71 tiene una función determinante en el cerebro. Las células PC12 se han usado como modelo de estudio de la función de Dp71 ya que pueden diferenciarse a células tipo neuronas. Debido a que las células PC12 son difíciles de transfectar, es relevante explorar la infección con vectores lentivirales como método alternativo para la transferencia y expresión eficiente de las isoformas de Dp71 en estas células.

## **Hipótesis**

La infección utilizando vectores lentivirales/Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 permitirá una mejor expresión de estas isoformas en células PC12.

## Objetivos

### Objetivo general

Infectar células HEK293 y PC12 con lentivirus recombinantes y evaluar la expresión de Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 en estas células.

### Objetivos particulares

- Comprobar la presencia de los insertos de Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 en el vector pHAGE.
- Producir vectores lentivirales en células HEK 293.
- Determinar la eficiencia de transfección de células HEK 293 y PC12 con vectores lentivirales.
- Analizar la expresión de las proteínas Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 en células HEK 293 y PC12.

## **Materiales y métodos**

### **Cultivo de líneas celulares**

Las células PC12 se mantuvieron en cultivo en cajas de 25 cm<sup>2</sup> en DMEM con 10% de suero de caballo inactivado por calor, suero fetal bovino (FBS) al 5%, 100 U/mL de penicilina, 1 mg/mL de estreptomicina y 0.25 de µg/mL micostatina; a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> (Aragón, *et al.*, 2011).

Las células HEK 293 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>.

### **Amplificación de los fragmentos Dp71d<sub>Δ71</sub> y Dp71d<sub>Δ71-74</sub> en el vector pHAGE**

Los vectores pHAGE-Dp71d<sub>Δ71</sub>, pHAGE-Dp71d<sub>Δ71-74</sub> y pHAGE-GFP con las secuencias de las proteínas Dp71d<sub>Δ71</sub>, Dp71d<sub>Δ71-74</sub> y GFP respectivamente, fueron donaciones del Dr. Cyrille Vaillend del departamento de Neurosciences Cognitives et des Réseaux del Institut des Neurosciences Paris-Saclay, Francia. Por este motivo, como primer paso se realizó una comprobación de la presencia de las secuencias de interés en los plásmidos proporcionados. Las reacciones de PCR para corroborar la presencia de las secuencias de las isoformas Dp71d<sub>Δ71</sub>, Dp71d<sub>Δ71-74</sub> en los plásmidos pHAGE-Dp71d<sub>Δ71</sub> y pHAGE-Dp71d<sub>Δ71-74</sub> y en el DNA genómico de las células transfectadas y seleccionadas se llevaron a cabo utilizando: 5 µl de buffer PCR 10X, 0.3 µl de Taq DNA Polimerasa (2 U/µl), 3.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µl de dNTPs (2 mM c/u), 200 ng µl de los oligos rDp71F, y rDp71dR (Tabla 2) para corroborar la presencia de las isoformas en los plásmidos pHAGE y 200 ng de los oligos hEx69F y hEx75R (Tabla 2) para el DNA genómico, 1 µg de producto a amplificar y el volumen de agua estéril para completar 50 µl. La reacción se realizó en el termociclador Veriti (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 seg y 68 °C por 3 minutos con una temperatura final de 72° C por 7 minutos para comprobación

del inserto de Dp71 en los plásmidos. Para la comprobación de la inserción en el DNA genómico de las PC12, las condiciones fueron: 95 °C por 5 min y 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 58 °C por 30 s y 72 °C por 30 s y una temperatura final de 72 °C por 7 min.

Los productos amplificados se guardaron a -20 °C para su posterior análisis. Una alícuota de cada reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% con buffer TBE (45 mM Tris-borato, 1mM EDTA) preteñido con bromuro de etidio al 1%.

### **Secuenciación de los fragmentos clonados en los vectores pHAGE**

Los vectores pHAGE-Dp71d<sub>Δ71</sub> y pHAGE-Dp71d<sub>Δ71-74</sub> se secuenciaron utilizando el kit Big Dye™ Terminator (Applied Biosystems), colocando en un tubo: 8 µl de la mezcla “Terminator Ready Reaction Mix”, 800 ng del iniciador correspondiente (Tabla 2), 50 ng de DNA y agua destilada estéril para un volumen final de 20 µl. La reacción se realizó en el termociclador Veriti (Applied Biosystems) empleando las condiciones: 94 °C por 5 min, 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 60 °C por 4 min y una temperatura final de 72 °C por 10 min.

Lista iniciadores		
Etiqueta	Secuencia	Blanco
rDp71F	5' ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACG	Exón 1
rDp71dR	5' CTACATTGTGTCCTCTCTCATTGGC	Exón 79
hEx69F	5' CATAAAATGCACTATCCCATGGT	Exón 69
hEx75R	5' ATGGGGACAGGCCTTTATG	Exón 75
rEx69R	5' CAAAGGAGGCAACTTCACCCAACTG	Exón 69
Ex67F	5' CAGTTGGGTGAAGTTGCCTCCTTTG	Exón 67
Ex75R	5' AGGAGACGGCAGTGGGGACAG	Exón 75
rEx77F	5' CCTTCCCTAGTTCAAGAG	Exón 77

Tabla 2. **Lista de iniciadores utilizados en las diferentes reacciones de PCR.**

Se precipitaron los productos de secuenciación utilizando 80 µl de isopropanol al 75% y mezclando con vórtex, posteriormente la reacción se incubó por 15 min a temperatura ambiente, se centrifugó por 15 min a 12,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se realizó un segundo lavado con 250 µl de isopropanol al 75%, se mezcló, se centrifugó por 5 min a 10,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Las muestras se secaron al vacío durante 10 a 15 min. Finalmente se secuenciaron mediante electroforesis capilar.

La secuencia obtenida fue analizada con los programas Chromas y ClustalX2 para determinar la homología con las proteínas Dp71d<sub>Δ71</sub> y Dp71d<sub>Δ71-74</sub> de *Rattus norvegicus* reportadas en NCBI.

### **Cuantificación de células**

La determinación del número de células se realizó en una cámara de Neubauer; se cosecharon las células y se utilizaron 10 µl de ellas para mezclarlas con 10 µl de azul de tripano. Se contaron las células viables en los cuatro cuadrantes grandes de las esquinas de la cámara con el objetivo 40x del microscopio de inversión (Zeiss Axiovert 40 C). Posteriormente, se calculó el número de células y la viabilidad celular con las siguientes fórmulas:

$$\text{No de células} = \frac{\text{No. de células}}{4} (\text{dilución (1: 2)})(10,000)$$

El número de células obtenido corresponderá a 1 ml de cultivo. Los resultados fueron graficados en una curva de viabilidad.

### **Curva de viabilidad en presencia de genética.**

Se sembraron 60,000 células por pozo en cajas de 4 pozos, en cada pozo se colocaron dosis de 0 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml y 800 µg/ml de disulfato G418. Las células se cultivaron durante 8 días, realizando cambios de medio cada 3 días.

Al concluir los 8 días se realizó la cuantificación de la viabilidad celular normalizada de cada dosis, en cámara de Neubauer con azul de tripano utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad normalizada} = \frac{\text{No. células con dosis } X}{\text{No. células con dosis } 0}$$

De esta forma, se eligió la dosis que mata al 80% de la población celular con el fin de seleccionar correctamente a las células transfectadas y reducir el riesgo de citotoxicidad causada por el antibiótico en las células PC12.

### **Producción de partículas virales**

Los vectores virales del presente trabajo son partículas incapaces de replicarse, que presentan la proteína de la estomatitis vesicular G (VSV-G) en la cápside y tienen como material genético RNA; fueron producidas con los vectores psPAX2 (Cat. #12260), pMD2.G (Cat. #12259) y pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71, pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71-74 o pHAGE-GFP (donación del Dr. Cyrille Vaillend del departamento de Neurosciences Cognitives et des Réseaux del Institut des Neurosciences Paris-Saclay, Francia). La producción de las partículas virales se realizó en células HEK 293, sembrando 6.5x10<sup>5</sup> células/25cm<sup>2</sup> en frascos de cultivo ventilados e incubados por 48 h. Pasado este tiempo, se retiró el medio y se colocó medio fresco.

Se preparó una mezcla de 20 µl de lipofectamina 2000 con 200 µl de Optimem (Gibco) y una mezcla de DNA con 200 µl de Optimem, 2.4 µg de psPAX2 (expresa proteínas necesarias para el ensamblaje del virión), 1.2 µg del plásmido pMD2.G (expresa proteínas necesarias para la envoltura del virus) y 1.8 µg de los plásmidos pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71, pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71-74 o pHAGE-GFP, que codifican para las proteínas Dp71d $\Delta$ 71, Dp71d $\Delta$ 71-78 y GFP respectivamente. Ambas mezclas fueron incubadas por 5 minutos, posteriormente mezcladas e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos y se añadieron 600 µl de OptiMEM. La mezcla de transfección se agregó a las células HEK 293 y se incubó por 7 h. Finalmente se cambió el medio de transfección por 5 ml de medio de crecimiento (DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino). Se incubó por 15 h y pasado este tiempo se realizó la primera cosecha, se colocó medio de crecimiento y las células restantes se incubaron por 10 h, posteriormente se realizó la segunda cosecha, se incubó por 15 h más y se realizó la tercera cosecha.

El sobrenadante viral se pasó por un filtro de 0.45 µm, posteriormente se concentró colocándolo en un tubo Amicon Ultra (Amicon Ultra Centrifugal filters Ultracel-30K Millipore Referencia. UFC903024), centrifugándolo por 4000 rpm por 10 minutos.

Los vectores virales obtenidos vv-GFP, vv-Dp71d $\Delta$ 71 y vv-Dp71d $\Delta$ 71-74 que fueron generados con los plásmidos pHAGE-GFP, pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71 y pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71-74 respectivamente se conservaron a 4°C.

### **Infección de células HEK293 y PC12 con las partículas virales.**

Se cultivaron células (10,000 células por pozo de HEK293 y 25,000 por pozo de PC12) durante 24 hrs. Se preparó medio DMEM con 10% de suero de caballo inactivado por calor, suero fetal de ternera (FCS) al 5%, 100 U/ml de penicilina, 1 mg/ml de estreptomina y 0.25 µg/ml micostatina y se añadió el ultrafiltrado viral a una proporción virus:medio 1:1, 2:1 ó 3:1. Las células fueron incubadas con este medio durante 48 h, posteriormente, se realizó un cambio por medio fresco. Para la expresión de las proteínas, las células fueron

inducidas con 1 µg/ml de Doxiciclina, las HEK 293 por 36 h, mientras que las PC12 sin seleccionar por 6 días y las seleccionadas por 24 h. La eficiencia de infección se obtuvo utilizando un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse TE2000-U), una cámara digital (DMX1200 F) y el programa ImageJ.

### **Selección de células PC12 infectadas**

Una vez infectadas las células PC12 con los vectores virales se seleccionaron con 800 µg/ml de geneticina durante 8 días, con cambio de medio cada 2 días. Al finalizar los 8 días, se colocó medio nuevo en las células PC12, manteniéndose con una dosis de 400 µg/ml para mantener las células resistentes a geneticina.

### **Extracción de DNA genómico**

Se obtuvo DNA genómico de las células PC12-Dp71d<sub>Δ71</sub>, PC12-Dp71d<sub>Δ71-74</sub> y PC12-GFP utilizando el método de extracción Fenol-Cloroformo. A la pastilla celular se le añadieron 500 µl de buffer de lisis (500 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM de EDTA y 0.5% de Sarcosil) y 5 µl de RNAsa A (10 mg/ml), y se incubó durante 1 h a 37°C. Se agregaron 5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml), posteriormente se incubó por 1 h a 65 °C. A la suspensión se le añadió 1 volumen de Fenol saturado con Tris-HCl pH 8, incubando a temperatura ambiente durante 5 min y se añadió medio volumen de cloroformo, incubando 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min, la fase acuosa fue recuperada y lavada con 1 volumen de cloroformo, la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min, el sobrenadante se transfirió a otro tubo para purificar el DNA, el cual fue precipitado con 2 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/2 volumen de acetato de amonio 7.5 M durante toda la noche a -20 °C. Pasado el tiempo, la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C. La pastilla de DNA purificado fue lavada con etanol al 70% y centrifugada a 12,000 rpm por 15 min. La fase acuosa se decantó y la pastilla se dejó secar por 5 min a temperatura ambiente. Las muestras del DNA purificado se disolvieron con agua destilada estéril. La integridad del DNA genómico fue verificada con un gel de agarosa al 0.8% y la concentración del DNA en la

muestra fue obtenida con ayuda de un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™). El DNA obtenido fue almacenado a 20 °C para su posterior análisis.

### **Inmunofluorescencia indirecta**

Las células HEK 293 cultivadas a 50% de confluencia fueron crecidas en cubreobjetos tratados previamente con poli-L-Lisina al 10%, posteriormente se fijaron con 1 volumen de metanol durante 2 minutos, se lavó con PBS, los cubreobjetos se bloquearon y permeabilizaron utilizando una solución de bloqueo (Tritón 0.3% y 0.2% de gelatina en PBS) por 1 hora. Posteriormente, los cubreobjetos fueron incubados con anti c-myc (dilución 1:200) durante 24 h a 4°C; transcurrido el tiempo de incubación, se dieron tres lavados de 5 min con PBS, se colocaron los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos: anti-rabbit policlonal con Alexa 594 a 1:200 y anti-mouse monoclonal con Alexa 488 a 1:300 para detectar la señal del anticuerpo primario y se incubaron en oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente; se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos. Se colocó DAPI a 1:1000 y se incubó durante 5 minutos, se realizaron 3 lavados más con PBS por 5 minutos, se realizó un último lavado con agua Mili Q durante 15 minutos. Posteriormente, se montó el cubreobjetos en medio de montaje Vectashield (Vector laboratories, Inc). La obtención de las imágenes se llevó a cabo mediante microscopía confocal empleando el microscopio Leica® TCS SPE utilizando el objetivo 63x. Para cada imagen se hicieron cortes con un intervalo de 0.3 µm y se escogió el plano ecuatorial para mostrar la presencia de las proteínas analizadas.

Lista de anticuerpos		
Etiqueta	Dilución	Naturaleza
Anti-Myc	1:200 IF 1:500 WB	Monoclonal ratón
Antirabbit acoplado a Alexa 594	1:200 IF	Policlonal conejo
Antimouse, acoplado a Alexa 488	1:300 IF	Monoclonal ratón

Tabla 3. **Anticuerpos utilizados.**  
*IF: Inmunofluorescencia, WB: Western blot*

### Extracción de proteínas

Las células PC12-Dp71d $\Delta$ 71, PC12-Dp71d $\Delta$ 71-74 y PC12-GFP fueron cosechadas y lavadas con PBS. La pastilla celular fue resuspendida en 150  $\mu$ l de Buffer de extracción (Tris HCl 250 mM a pH 8 y EDTA 1 mM a pH 8) con coctel de inhibidores de proteasas 1X. La muestra fue sonicada con un pulso de 15 s, una amplitud de 50%, y un descanso de 30 s durante 2 min y 30 s. Posteriormente, para separar las proteínas de los restos celulares, las muestras fueron centrifugadas por 5000 rpm durante 5 min a 4 °C. Las proteínas contenidas en el sobrenadante fueron transferidas a un tubo nuevo y almacenadas a -20 °C.

### Western blot

Del extracto total de proteína obtenido, 20  $\mu$ g fueron homogeneizados en el buffer de muestra Laemmli (75 mM Tris HCl, 15% de SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 20% de glicerol y 0.001% de azul de bromofenol), se dejó hervir durante 10 min. Posteriormente, las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% con 100 V durante 1:30 h.

Las proteínas fueron electrotransferidas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa con 22 V a 4 °C durante 18 h. Para corroborar la presencia de las proteínas en la membrana, se realizó una tinción de las membranas con rojo de Ponceau 1:5 (agua destilada) por 5 minutos. El exceso se lavó con PBS, la membrana fue incubada con TBS-T 1X con leche 5% con

agitación por 2 h. Posteriormente se lavó la membrana con TBS-T por 5 min en el agitador. Se incubó la membrana con 500 µl del anticuerpo primario anti-myc a 1:500 en TBS-T durante 24 h a 4°C. La membrana se lavó 3 veces con TBS-T por 10 minutos en el agitador. Posteriormente, la membrana se incubó con 20 ml de anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa de rábano, a 1:5000 con TBS-T y leche al 5% en agitación durante 1:30 h y se lavó con TBS-T. El revelado de la membrana se hizo adicionando el sustrato de la enzima (Western Lightning® Plus-ECL de PerkinElmer) cuya reacción emite luz, se colocó una placa de revelado por encima de la membrana, ésta se veló en la zona donde se llevó a cabo la reacción lo cual permitió visualizar la proteína de interés.

## Resultados

### Caracterización de los vectores pHAGE-Dp71d<sub>Δ71</sub> y pHAGE-Dp71d<sub>Δ71-74</sub>.

El primer paso realizado en el proyecto fue corroborar la presencia de los fragmentos de las isoformas Dp71d<sub>Δ71</sub> y Dp71d<sub>Δ71-74</sub> en los vectores pHAGE-Dp71d<sub>Δ71</sub> y pHAGE-Dp71d<sub>Δ71-74</sub>. Para esto se realizó una reacción de PCR con cada uno de los vectores aislados de bacterias previamente transformadas, utilizando los iniciadores rDp71F y rDp71dR. Estos iniciadores amplifican desde el exón 1 hasta el exón 79 del grupo Dp71d, además se utilizó un vector con GFP. En la figura 11, carril 2 se muestra un fragmento de aproximadamente 1814 pb correspondiente al inserto presente en el vector pHAGE-Dp71d<sub>Δ71</sub>. En los carriles 3 y 4 se observa un fragmento de aproximadamente 1523 pb, que proviene del vector pHAGE-Dp71d<sub>Δ71-74</sub> presente en los vectores provenientes de las clonas de *E. coli* 9 y 17 respectivamente, previamente aisladas. Esto indica que las secuencias de estas isoformas están presentes en los vectores analizados. No se observa ningún amplificado en el vector pHAGE-GFP.

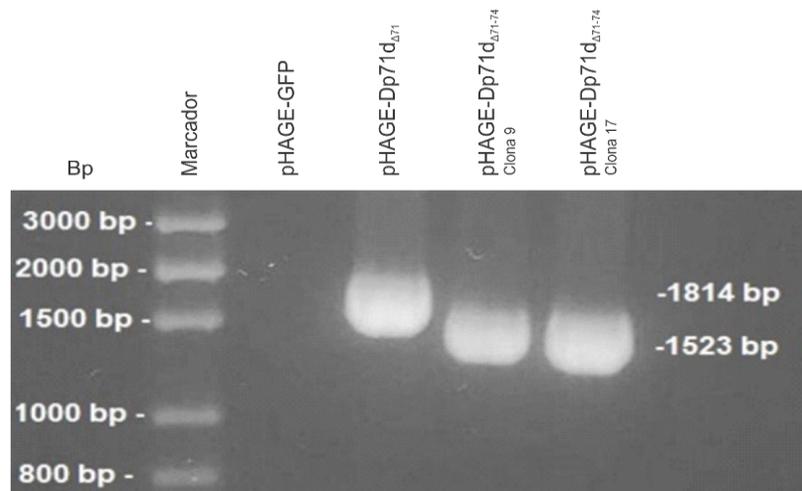


Figura 11. **Amplificación de las secuencias de Dp71d<sub>Δ71</sub> y Dp71d<sub>Δ71-74</sub> presentes en los plásmidos pHAGE.** Se realizó una reacción de PCR utilizando los iniciadores rDp71F y rDp71dR como se indica en Materiales y Métodos. En el carril 1, se observa el marcador de peso molecular HyperLadder™ 1kb(M); en el carril 2 el plásmido pHAGE-GFP usado como control negativo; en el carril 3, el plásmido pHAGE- Dp71d<sub>Δ71</sub> que presenta una banda de 1814 pb correspondiente a Dp71d<sub>Δ71</sub>; en el carril 4 y 5, el plásmido pHAGE- Dp71d<sub>Δ71-74</sub> clona 9 y pHAGE- Dp71d<sub>Δ71-74</sub> clona 17, respectivamente, que presentan una banda de 1523 pb correspondiente a Dp71d<sub>Δ71-74</sub>.

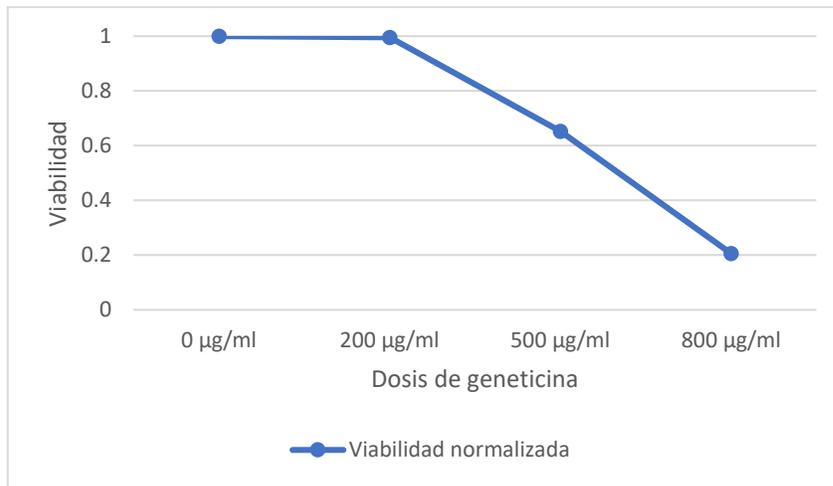
### **Secuenciación de los fragmentos presentes en los vectores pHAGE-Dp71 $\Delta$ 71 y pHAGE-Dp71 $\Delta$ 71-74.**

Una vez observada la presencia de los fragmentos de las isoformas en los vectores pHAGE-Dp71 $\Delta$ 71 y pHAGE-Dp71 $\Delta$ 71-74, se procedió a verificar su identidad, mediante una secuenciación automatizada, utilizando los iniciadores que se muestran en la tabla 2, que permiten la amplificación del exón 1 al exón 79 del grupo Dp71d. Los resultados de la secuenciación se compararon con las secuencias Dp71 $\Delta$ 71 (NM\_012698.3) y Dp71 $\Delta$ 71-74 (NM\_001005246.1) de *Rattus norvegicus* reportadas en NCBI, utilizando el programa Chromas para interpretar los resultados de la lectura del electroferograma y ClustalX2. Los resultados obtenidos se muestran en el Anexo 1 donde podemos observar que las secuencias son idénticas, lo cual confirma la presencia de los fragmentos de las isoformas Dp71 $\Delta$ 71 y Dp71 $\Delta$ 71-74 en los vectores pHAGE-Dp71 $\Delta$ 71 y pHAGE-Dp71 $\Delta$ 71-74 respectivamente.

### **Curva de resistencia a Geneticina**

El plásmido pHAGE de expresión, contiene un gen de resistencia a geneticina que es útil para seleccionar las células infectadas con los vectores lentivirales. Para esto, es indispensable conocer la dosis mínima de geneticina, en la que las células sin el plásmido mueren, sin comprometer a las que sí lo contengan, Por este motivo, se realizó una curva de resistencia a geneticina para determinar la dosis óptima del antibiótico necesaria para la selección de las transfectantes estables. Para esto, se cultivaron 60,000 células PC12 por pozo, con diferentes dosis del disulfato G418 (0, 200, 500 y 800  $\mu$ g/ml), durante 8 días como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Además, se determinó la viabilidad celular y se normalizó con respecto al control sin geneticina que correspondió al 100%. En la figura 12 podemos observar una viabilidad de las células de solo el 20.62% a la dosis de 800  $\mu$ g/ml,

concentración que fue utilizada posteriormente para la selección de las células infectadas con el vector de expresión pHAGE.



**Figura 12. Curva de resistencia a geneticina.** Las células PC12 fueron cultivadas en presencia de diferentes dosis de geneticina (0, 200, 500 y 800 µg/ml), como se indica en Materiales y Métodos. Después de 8 días, se determinó la viabilidad de las células. La dosis de 0 µg/ml se utilizó como control, a 200 µg/ml se obtuvo una viabilidad de 99.59%, a 500 µg/ml de 65.24% y a 800 µg/ml de 20.62%.

### Infección de células HEK 293

Previo a realizar experimentos de infección con la línea celular PC12, debido a su dificultad para ser transfectadas, se decidió utilizar la línea celular HEK 293 para estandarizar el método de transfección e infección con los vectores lentivirales. Se produjeron los vectores lentivirales en las células HEK 293, como se describe en Materiales y Métodos y se realizó un primer ensayo de infección con las partículas virales con GFP, a las que se les denominaron vv-GFP, para la infección de las células HEK 293 se utilizaron las siguientes proporciones 1:1, 2:1 y 3:1 (volumen de partículas virales concentrado con respecto al medio de cultivo DMEM para células HEK 293) (Figura 13).

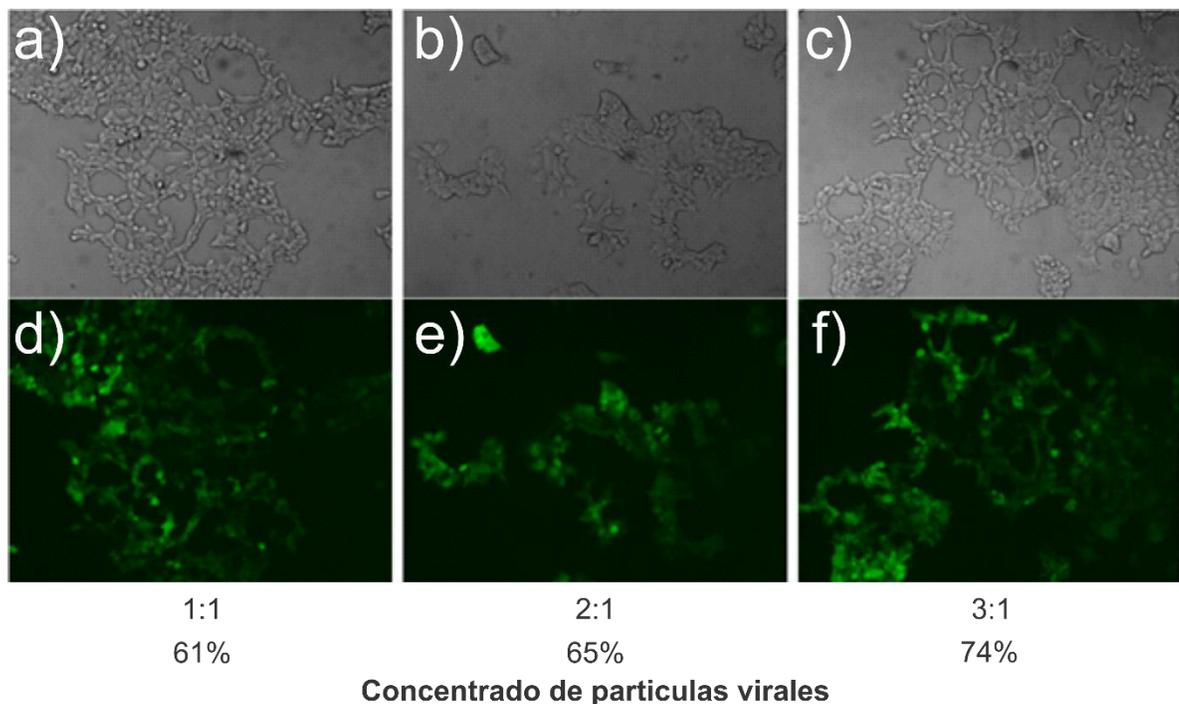


Figura 13. **Transfección en células HEK 293 con diferentes proporciones de partículas virales.** Las células HEK 293 fueron infectadas con diferentes volúmenes de partículas virales/medio DMEM (1:1, 2:1 y 3:1) e inducidas con doxiciclina durante 36 h. La concentración 1:1 mostró una eficiencia de infección del 61%, la 2:1 de 65% y la 3:1 de 74%. a), b) y c) muestran imágenes obtenidas en campo claro y d), e) y f) en epifluorescencia. Las células infectadas se cuantificaron utilizando ImageJ.

Los resultados obtenidos mostraron diferentes eficiencias de infección: 61% para la proporción 1:1, 65% para 2:1 y 74% para 3:1. Dado que se observó

una mayor eficiencia de infección con la proporción 3:1, se optó por utilizar ésta para las siguientes infecciones de células HEK293 y PC12.

Posteriormente se realizó la infección de las células HEK 293 empleando los vectores lentivirales vv-Dp71d $\Delta$ 71 y vv-Dp71d $\Delta$ 71-74, de forma independiente durante 2 días, transcurrido este tiempo se realizó la inducción de la expresión de las proteínas Dp71 con 1  $\mu$ g/ml de doxiciclina durante 3 días, las líneas celulares resultantes se denominaron HEK293-Dp71d $\Delta$ 71 y HEK293-Dp71d $\Delta$ 71-74, respectivamente. Para comprobar la expresión de las proteínas y observar su localización celular se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando la bandera c-myc presente en las proteínas recombinantes Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74. Las células HEK 293 infectadas con el vector vv-Dp71d $\Delta$ 71 (HEK293- Dp71d $\Delta$ 71) presentan una morfología aplanada y con bordes irregulares (figura 14 y 15), la cual contrasta con la morfología esférica que exhiben las células HEK 293 transfectadas con el vector vv-Dp71d $\Delta$ 71-74 (HEK293-Dp71d $\Delta$ 71-74) (figura 16).

Se puede observar en las células HEK293-Dp71d $\Delta$ 71 la localización de la isoforma Dp71d $\Delta$ 71 mayoritariamente en el citoplasma, además de presentarse en algunos casos en el núcleo y su periferia.

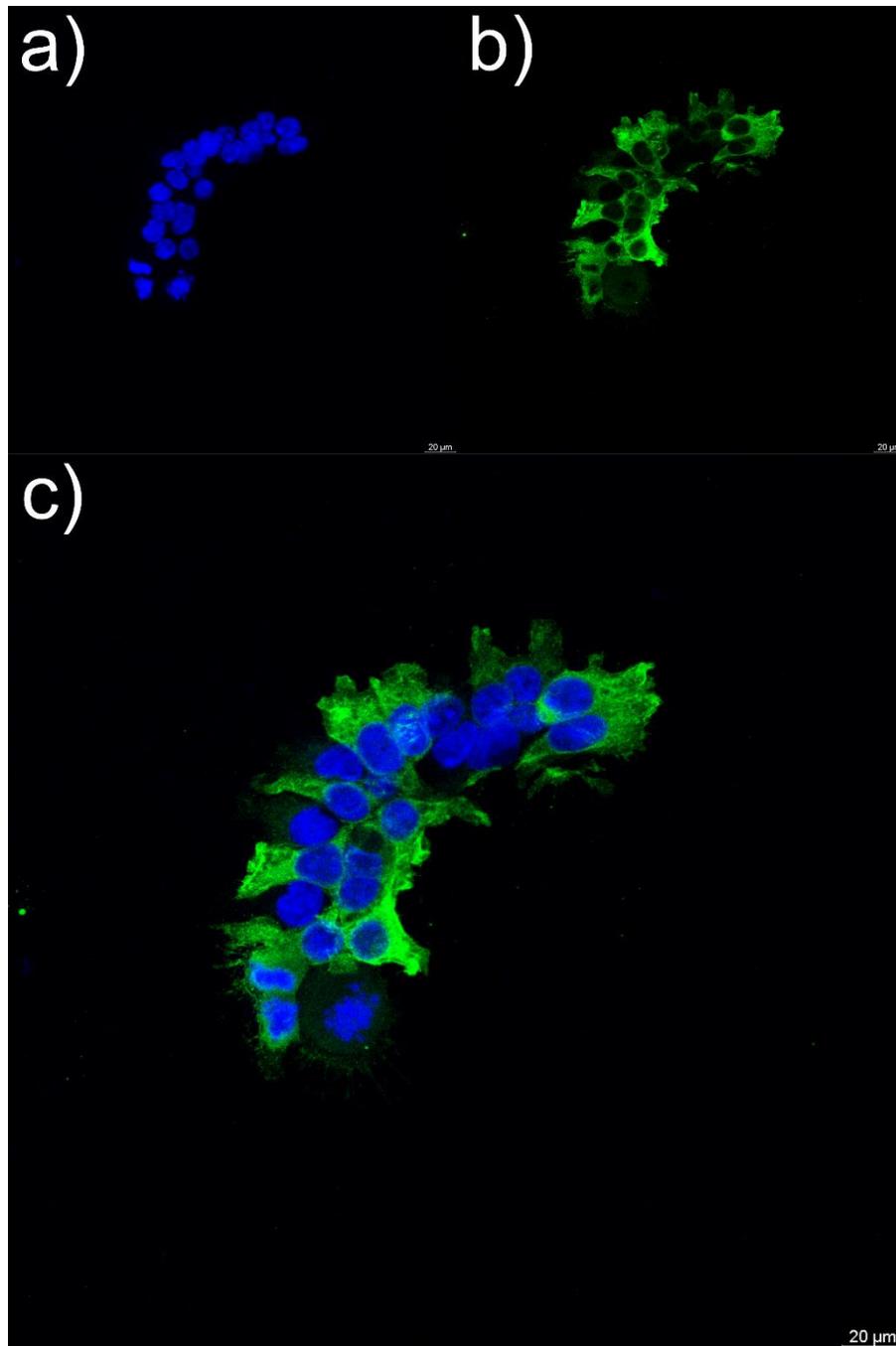
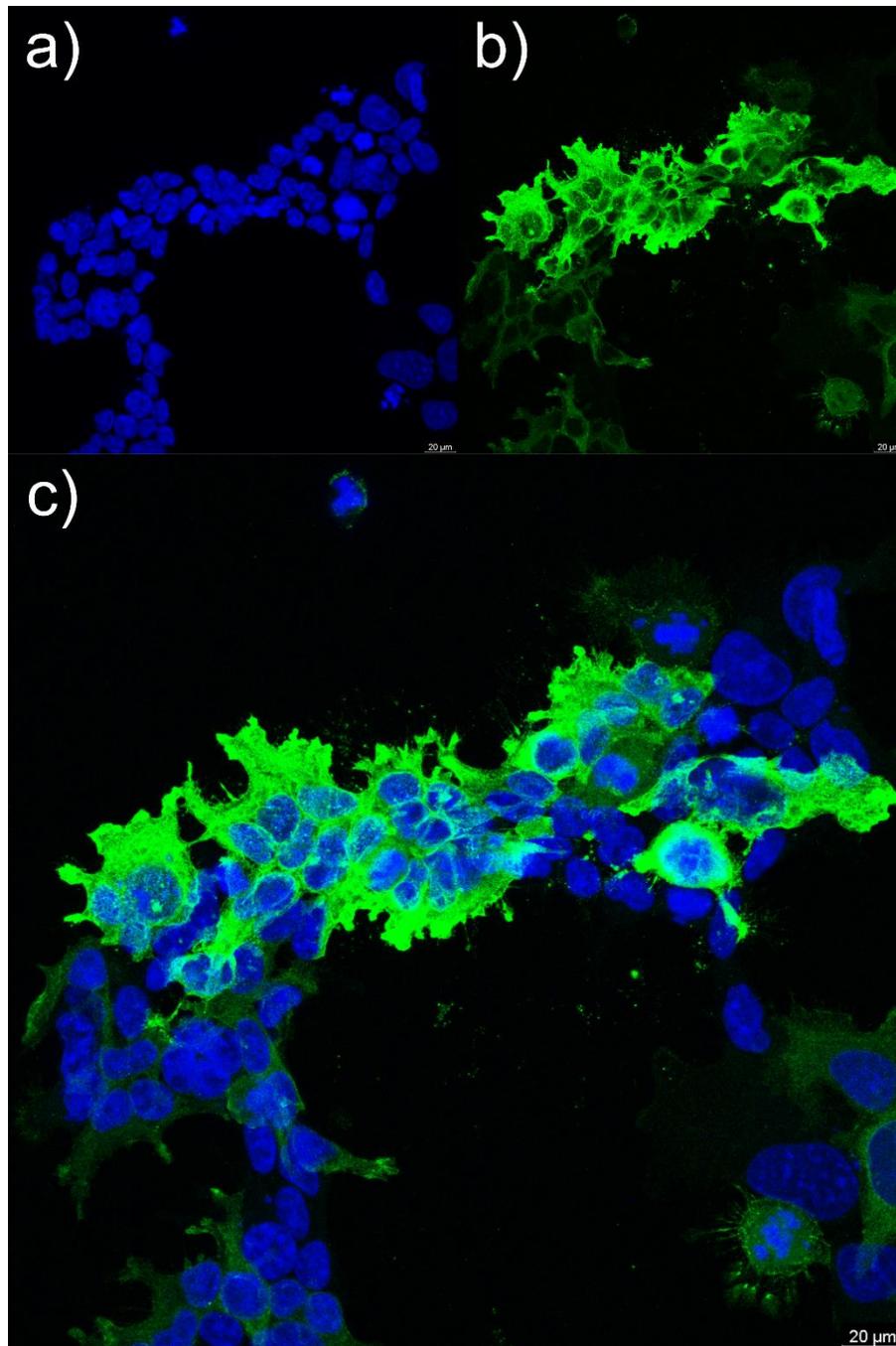
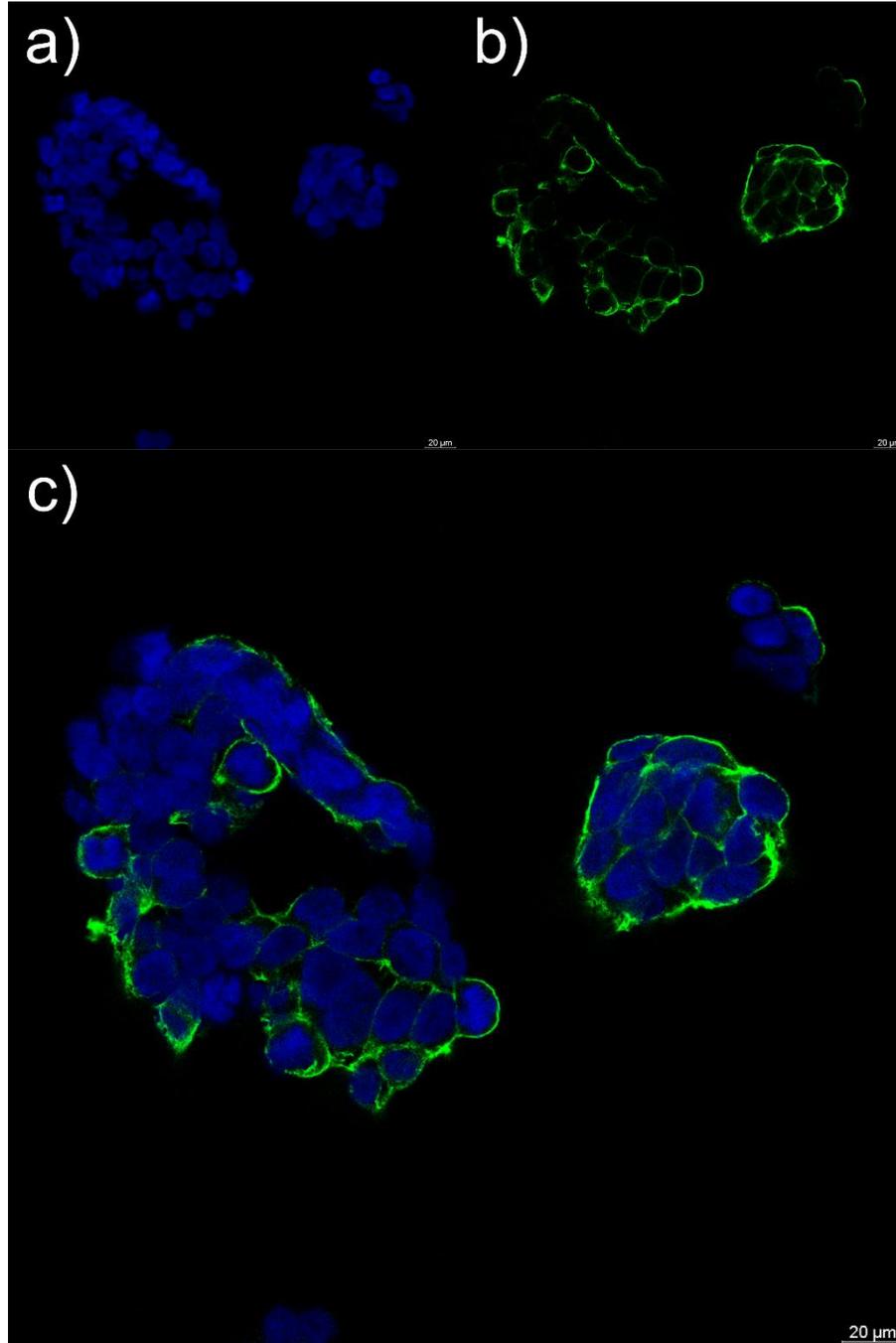


Figura 14. **Expresión y distribución de myc-Dp71d<sub>Δ71</sub> recombinante en células HEK 293.** Células HEK293-Dp71d<sub>Δ71</sub> cuya expresión fue inducida con 1 μg/ml doxiciclina durante 3 días. a) Núcleos teñidos con DAPI en azul, b) Dp71d<sub>Δ71</sub> con bandera c-myc, en verde, c) Merge de la marca de la bandera c-myc y los núcleos. Se muestra la barra de ampliación.



**Figura 15. Expresión y distribución de myc-Dp71 $\Delta$ 71 recombinante en células HEK 293.** Células HEK293-Dp71 $\Delta$ 71 cuya expresión fue inducida con 1  $\mu$ g/ml doxiciclina durante 3 días. a) Núcleos teñidos con DAPI en azul, b) Dp71 $\Delta$ 71 con bandera c-myc, en verde, c) Merge de la marca de la bandera c-myc y los núcleos. Se muestra la barra de ampliación.

Por otra parte, las células HEK293-Dp71 $\Delta$ 71-74 forman cúmulos celulares, observándose a la isoforma Dp71 $\Delta$ 71-74 casi exclusivamente en la periferia celular.

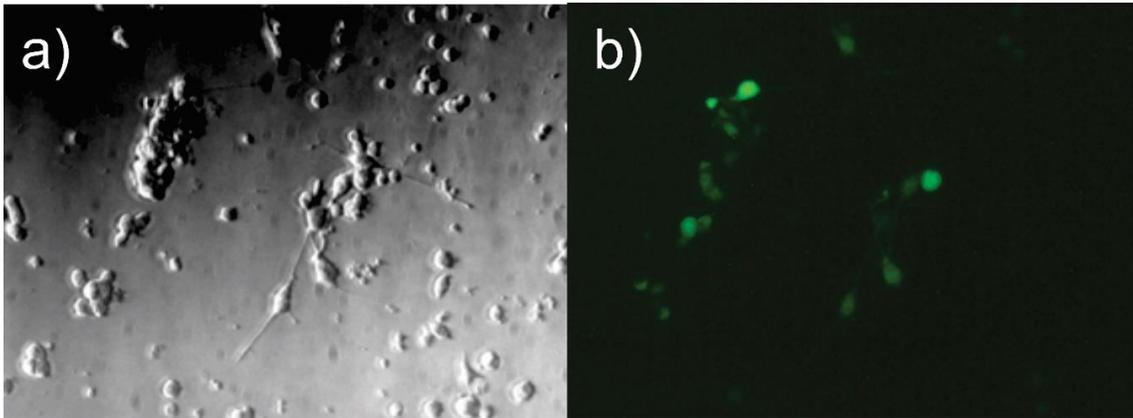


**Figura 16. Expresión y distribución de myc-Dp71 $\Delta$ 71-74 recombinante en células HEK 293.**

Células HEK293-Dp71 $\Delta$ 71-74 cuya expresión fue inducida con 1  $\mu$ g/ml doxiciclina durante 3 días. a) Núcleos teñidos con DAPI en azul, b) Dp71 $\Delta$ 71-74 con bandera c-myc, en verde, c) Merge de la marca de la proteína y los núcleos. Se muestra la barra de amplificación

### **Generación de células PC12 estables que expresan GFP, Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74.**

Una vez estandarizado el método de infección en células HEK 293 se procedió a realizar los ensayos de infección en las células PC12 con los vectores lentivirales vv-GFP, vv-Dp71d $\Delta$ 71 y vv-Dp71d $\Delta$ 71-74. En el primer caso, la eficiencia de infección se determinó mediante la expresión de la proteína GFP y correspondió al 30.85%, como se muestra en la figura 17.



*Figura 17. Expresión de GFP en células PC12 infectadas con las partículas virales. Las células PC12 fueron infectadas con vv-GFP. Se indujo la expresión de la proteína recombinante con 1  $\mu$ g/ml de doxyciclina durante 6 días, obteniéndose una eficiencia de transfección de 30.58%. a) Células PC12 en campo claro. b) Células PC12 infectadas que expresan GFP (en epifluorescencia). Las células infectadas se cuantificaron utilizando ImageJ.*

Las células infectadas se sometieron a un tratamiento con 800  $\mu$ g/ml de geneticina, con el fin de seleccionar únicamente las células que integraron en su genoma el vector recombinante. Una vez seleccionadas, las células se cambiaron a un medio fresco y se dejaron crecer como se indica en materiales y métodos, generándose 6 grupos celulares, es decir, 2 grupos para cada proteína, a los cuales se denominaron: 1.PC12-GFP, 2.PC12-GFP, 1.PC12-Dp71d $\Delta$ 71, 2.PC12-Dp71d $\Delta$ 71, 1.PC12-Dp71d $\Delta$ 71-74 y 2.PC12-Dp71d $\Delta$ 71-74.

### **Identificación de las secuencias Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 en células PC12**

Una vez realizada la transfección estable de la línea celular PC12 se procedió a comprobar la presencia de las secuencias de Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 en el genoma de las células PC12. Para ello, se realizó una PCR del DNA genómico de las líneas celulares recombinantes con el fin de observar si los fragmentos

de DNA que codifican para las Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 fueron insertados en el genoma de estas células.

En la figura 18 se observan muestras de los grupos celulares 1.PC12-Dp71d $\Delta$ 71, 2.PC12-Dp71d $\Delta$ 71 y 1.PC12-GFP, donde en el carril 5 y 6 se confirma la presencia de un fragmento de 530 pb que corresponde a Dp71d $\Delta$ 71, además, en el carril 7 se puede observar que en la muestra perteneciente a la clona 1.PC12-Dp71d $\Delta$ 71-74 se observan dos bandas, una que correspondería a Dp71d $\Delta$ 71 (de 530 pb) y otra a Dp71d $\Delta$ 71-74 (de 239 pb), lo cual denota una contaminación cruzada, en el carril 8 no hay presencia de bandas lo que indica que el en grupo celular 1.PC12-GFP no presenta las secuencias para Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74.

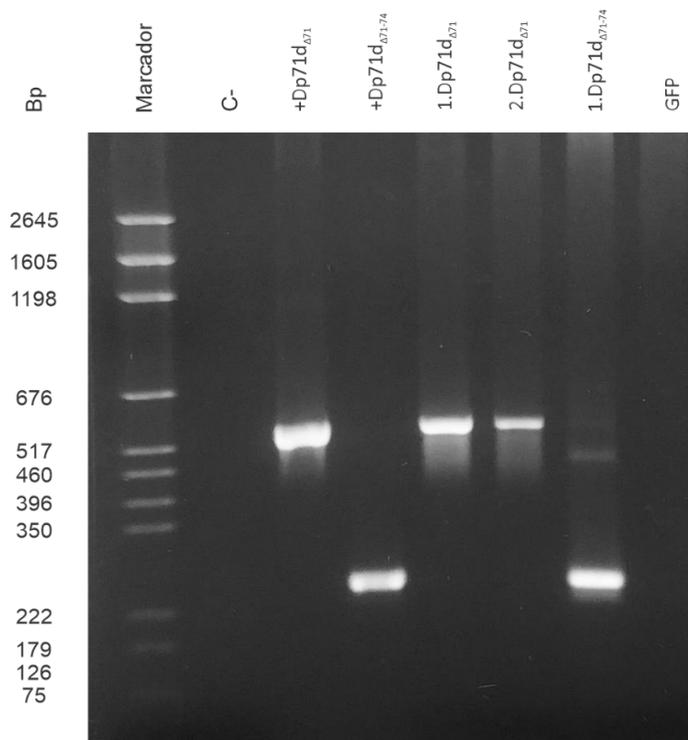
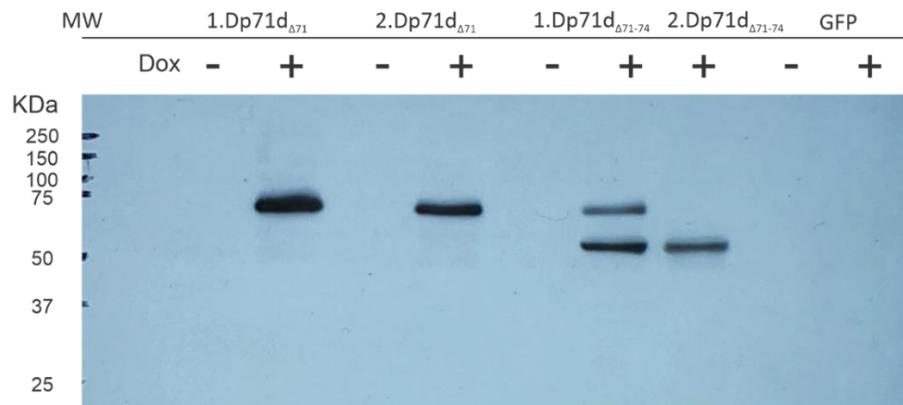


Figura 18. **Amplificación de las secuencias de Dp71d $\Delta$ 71, Dp71d $\Delta$ 71-74 a partir del DNA genómico de las células PC12.** Se aisló el DNA de grupos de células infectados con vectores lentivirales que expresan: Dp71d $\Delta$ 71, Dp71d $\Delta$ 71-74 y GFP. Carril 1 se observa el marcador de peso molecular pGEM® DNA Marker; el carril 2 es un control negativo; el carril 3 con pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71 es el control positivo para Dp71d $\Delta$ 71 y presenta una banda de 530 pb; el carril 4 con pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71-74 es el control positivo para Dp71d $\Delta$ 71-74 y presenta una banda de 239 pb; los carriles 5 y 6, las clonas 1.PC12-Dp71d $\Delta$ 71 y 2.PC12-Dp71d $\Delta$ 71, respectivamente, que presentan bandas de 530 pb; el carril 7, la clona 1.PC12-Dp71d $\Delta$ 71-74 con dos bandas, una de 530 pb y otra de 239 pb; y el carril 8 la clona 1.PC12-GFP sin banda.

Finalmente, para verificar la expresión de las proteínas Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74, se realizó un Western Blot de las clonas de las células PC12 transfectadas establemente y tratadas con Doxiciclina, se usó la clona 1.PC12-GFP como control negativo (figura 19). En los carriles 2 y 4 se observa la presencia de la proteína recombinante Dp71d $\Delta$ 71 con un peso molecular de 68.5 kDa en las clonas 1.PC12-Dp71d $\Delta$ 71 y 2.PC12-Dp71d $\Delta$ 71 en presencia de doxiciclina. Por otro lado, la clona 2.PC12-Dp71d $\Delta$ 71-74 expresa la isoforma recombinante de Dp71d $\Delta$ 71-74 con un peso molecular de 58 kDa en presencia de doxiciclina. Sin embargo, el grupo 1.PC12-Dp71d $\Delta$ 71-74 presenta dos bandas correspondientes a las dos isoformas en estudio, lo cual es atribuible a una contaminación con Dp71d $\Delta$ 71 debido a un mal manejo. Asimismo, ninguna banda fue detectada en ausencia de Doxiciclina, lo cual indica baja expresión basal sin el efector; y en la clona 1.PC12-GFP indicando que no hay contaminación cruzada. Con ello, puede inferirse que, a pesar de la contaminación cruzada, los resultados de la transfección y selección de clonas recombinantes estables de las células PC12 fueron exitosos y además el sistema de inducción con doxiciclina funciona de manera eficiente.



**Figura 19. Expresión de las proteínas recombinantes Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 en las células PC12.** Se realizó un Western blot utilizando el extracto de proteínas de los grupos de células PC12- Dp71d $\Delta$ 71, Dp71d $\Delta$ 71-74 y GFP sin tratar (-) y tratados (+) con doxiciclina (500 ng/ml) durante 24 h. El carril 1 (MW) corresponde al marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; los carriles 2 y 3, el grupo 1.PC12-Dp71d $\Delta$ 71 sin y con doxiciclina, este último con una banda de 68.5 kDa para Dp71d $\Delta$ 71; los carriles 4 y 5, el grupo 2.PC12-Dp71d $\Delta$ 71 sin y con doxiciclina, este último con una banda de 68.5 kDa para Dp71d $\Delta$ 71; los carriles 6 y 7, el grupo 1.PC12-Dp71d $\Delta$ 71-74 sin y con doxiciclina, este último con dos bandas una 68.5 kDa para Dp71d $\Delta$ 71 y otra de 58 kDa para Dp71d $\Delta$ 71-74; el carril 8, el grupo 2.PC12-Dp71d $\Delta$ 71-74 con doxiciclina, con una banda de 58 kDa para Dp71d $\Delta$ 71-74; los carriles 9 y 10, el grupo 1.PC12-GFP sin y con doxiciclina, donde no se detecta ninguna señal.

## Discusión

Algunos pacientes con distrofia muscular de Duchenne presentan alteraciones en el sistema nervioso central. Estos síntomas tienen una relación directa con mutaciones en la parte distal del gen DMD, afectando a las isoformas Dp71 y posiblemente Dp40, proteínas relacionadas con procesos de proliferación y diferenciación celular.

La línea celular PC12 es un modelo ampliamente utilizado para estudiar la diferenciación y función neuronal; sin embargo, el estudio de la distribución y función de las isoformas de las distrofinas Dp71 y Dp40 ha presentado limitantes debido a la dificultad de esta línea celular para ser transfectada eficientemente, utilizando métodos convencionales. Esta problemática ha sido reportada en diversos estudios como el realizado por Lee y colaboradores (2008) compararon la eficiencia de transfección de las células PC12 con lipofectamina y polietilenimina (PEI), observando una eficiencia de transfección de entre el 14 y el 15% respectivamente, además reportaron que el uso de PEI en altas concentraciones presentaba efectos citotóxicos en las células. Asimismo, Aragón y colaboradores en 2011, reportaron una eficiencia de transfección en células PC12 entre el 2 y el 3% utilizando lipofectamina. Considerando esto y otros trabajos, es claro que existe la necesidad de buscar alternativas de transfección de las células PC12, para estudiar la función de las isoformas Dp71 en este modelo celular.

En este sentido, cabe mencionar que se ha estudiado ampliamente el uso de vectores basados en diferentes virus para promover la transfección, por ejemplo, Naldini y colaboradores en 1996 compararon la eficiencia de transfección de células HeLa y 208F con vectores basados en VIH y en MLV (virus de leucemia murina) en diferentes etapas del ciclo celular, obteniendo mejores eficiencias con el vector basado en VIH (97% en HeLa y 45% en células 208F), que las obtenidas utilizando el vector basado en MLV (8% en HeLa y 11% en células 208F). Además, Miyoshi y colaboradores en 1997 realizaron un estudio donde compararon las eficiencias de transfección en

retina de ratones Fischer 344 (adultos y crías), entre dos vectores virales, uno basado en el VIH y otro en el MLV, producidos utilizando fosfato de calcio, donde se mostraron eficiencias mayores al 80% utilizando el vector basado en VIH; además, se ha logrado transfectar células dentríticas derivadas de médula ósea en modelos murinos con vector pHR' CMV LacZ obteniendo eficiencias de 80% (Metharom *et al.* 2001). El objetivo de este trabajo fue establecer un método para mejorar la eficiencia de introducción y expresión de material genético por medio de la infección con vectores lentivirales recombinantes basados en VIH. Los vectores utilizados fueron producidos con un sistema de expresión de tres plásmidos (pMD2.G, psPAX2 y pHAGE modificado que contenía la proteína recombinante), con los cuales se obtuvieron eficiencias de infección de hasta el 74% con la línea celular HEK 293 y hasta el 30.85% en células PC12 (Figura 13 y 17). Si bien, la eficiencia resultante es menor que las obtenidas por Naldini y colaboradores en 1996 y Miyoshi y colaboradores en 1997, esto se puede atribuir entre otras cosas, a que las preparaciones de virus presentaran un título viral menor al obtenido en los otros trabajos o a que la probabilidad de entrada del plásmido de expresión pHAGE (12 kb) fue menor debido a su tamaño o tipo de secuencias insertadas (Hornstein, *et al.*, 2016, Pezzoli *et al.*, 2017), además de las células utilizadas, dado que las células HEK 293 T resultan ser más eficientes que las HEK 293 para la transfección ya que poseen el antígeno T SV40 que inhibe p53 (Ahuja, *et al.*, 2005) y previene la activación de la respuesta inmune innata intracelular; además, permite que los plásmidos que contienen el origen de replicación SV40 se repliquen dentro de la célula transfectada (DuBridgde *et al.*, 1987), mejorando los títulos virales.

Una vez analizada la eficiencia de transfección, se obtuvieron transfectantes estables para evaluar el efecto de la expresión de las proteínas recombinantes Dp71 $\Delta$ 71 y Dp71 $\Delta$ 71-74 en procesos de proliferación y diferenciación. Se utilizó el sistema Tet-On, el cual se basa en el uso de doxiciclina para inducir la expresión del gen de interés permitiendo tener un control de la expresión de esta proteína. La expresión de las proteínas se logró empleando una dosis de

500 ng/ml de doxiciclina. Además, se demostró que el sistema tiene un nivel bajo de expresión de las proteínas recombinantes en ausencia del efector (Figura 19). Estos resultados contrastan con los reportados por León, 2016, cuya expresión basal de las isoformas, es decir, sin inducción con Doxiciclina, era mayor en el sistema Tet-On, efecto que puede atribuirse al uso de diferentes líneas celulares; mientras que en el presente trabajo se utilizaron células PC12 (ATCC® CRL-1721™), el trabajo realizado por León en 2016 fue realizado con células PC12 Tet-On.

Al inducir la expresión de las isoformas Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 en células HEK 293, se observó una localización de Dp71d $\Delta$ 71 en el citoplasma y la periferia celular, mientras que la Dp71d $\Delta$ 71-74 se localiza casi exclusivamente en la periferia de las células. Lo cual es concordante con la localización de las isoformas Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 en células PC12 reportadas por León, 2016 y Aragón *et al.* 2016.

Por otro lado, Nishida y colaboradores en 2016, observaron la localización celular de las isoformas Dp71f y Dp71f $\Delta$ 71 mayoritariamente en el núcleo en células HEK 293, lo cual puede indicar una relación entre presencia del exón 78 en las isoformas de Dp71d, y la localización celular en el citoplasma y la periferia; mientras que la ausencia del exón favorece una localización nuclear. La localización celular de la Dp40 esta mediada por los dominios EF1/EF2, que se encuentran en los exones 65/67 respectivamente, en las prolinas 93 y 170, los cuales se ha visto que están involucrados en la colocalización con  $\beta$ -dístroglicano y la modulación de la localización periférica, citoplasmática o nuclear de Dp40 (Aragón, *et al.*, 2015).

Además, la isoforma Dp71 $\Delta$ 78-79, una isoforma de la Dp71 que carece de los exones 78 y 79 se localiza en la periferia de las células PC12, indicando que estos exones que corresponden al extremo C-terminal de la Dp71 participan en la localización en la periferia celular de células PC12 (Aragón, *et al.*, 2011); asimismo, Dp71d $\Delta$ 71, Dp71f $\Delta$ 71 y Dp71e $\Delta$ 71 (que carecen del exón 78, 79 y 78-79 respectivamente) se localizan en la periferia celular y en el citoplasma de

células PC12 Tet On no diferenciadas, mientras que las isoformas Dp71d $\Delta$ 71-74, y Dp71e $\Delta$ 71-74, que carecen de los exones 71 al 74, se localizan predominantemente en la periferia celular, sugiriendo que estos juegan un papel fundamental en la localización periférica (Aragón, *et al.*, 2015).

Calderilla-Barbosa y colaboradores en 2006, identificaron la participación de las serinas y treoninas en los exones 75 (S3538), 76 (S3616 y S3624) y 79 (T3685) como posibles sitios de fosforilación que pueden participar en la localización nuclear de Dp71d $\Delta$ 71. También se ha reportado que la región ZZ, puede ser la responsable de la localización nuclear de algunas isoformas de la Dp71d (Suarez-Sánchez, *et al.*, 2015). De modo que, es posible que los exones 78 y 79, correspondientes al dominio C-terminal (Ahn, *et al.*, 1993; Gao, *et al.*, 2015), también estén mediando la localización periférica y citoplasmática de la isoforma Dp71d $\Delta$ 71 en células HEK 293; y por otra parte que la ausencia de los exones 71 al 74, responsables de la unión a sintrofinas (Tadayoni, *et al.*, 2012), participen en la localización en la periferia celular de esta isoforma en las células HEK 293.

Por otra parte, en los resultados obtenidos, se pudo observar que la morfología de las células que sobreexpresan ambas isoformas es diferente, mientras que las células HEK 293 con Dp71d $\Delta$ 71 son células estrelladas que asemejan a neuronas multipolares, las HEK 293 con Dp71d $\Delta$ 71-74 son células redondas que se agrupan, lo cual es interesante, dado que las células HEK 293 tienen típicamente morfología epitelial; además contrasta con la morfología reportada en células PC12, (León, 2016), donde las células no presentan cambios morfológicos; esto puede deberse a que son líneas celulares distintas.

Las células HEK 293 son células derivadas de riñón embrionario con copias del gen temprano 1 (E1) de adenovirus tipo 5 (AD5) (Graham *et al.*, 1977; Lin *et al.*, 2014), en el gen beta-1-glicoproteína 4 específico del embarazo (PSG4), en el cromosoma 19. Diversos estudios sugieren que esta línea celular expresa neurofilamentos y más de 60 genes neuro específicos. (Shaw *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2005, Stepanenko *et al.* 2015). En particular, están

presentes proteínas como: subunidades de neurofilamentos (NF): ligero (NF-L), medio (NF-M), pesado (NF-H),  $\alpha$ -internexina; además de HspB1.

El NF-L media el crecimiento radial del axón, mientras que la  $\alpha$ -internexina es una proteína que pertenece al filamento intermedio tipo IV y se expresa durante desarrollo temprano del cerebro en neuronas. En células PC12 la expresión y fosforilación de neurofilamentos contribuyen a los procesos neurales (Clark *et al.*, 1991), además, se han visto involucrados en el control del calibre axonal (Hoffman *et al.*, 1988) y es utilizada para cuantificar el grado de diferenciación (Schimmelpfeng *et al.*, 2004).

La HspB1, proteína de choque térmico beta 1, funciona como chaperona molecular, ha sido descrita como parte del filamento dentro de dendritas o axones y en componentes de sinapsis (Schmidt *et al.*, 2012). En su estado fosforilado se encuentra involucrada en la reestructuración del citoesqueleto, la polimerización de actina y la formación de fibras de estrés que contribuye al crecimiento axonal (Guay *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2006; Clarke *et al.*, 2013), mientras que no fosforilado, se inhibe in vitro la polimerización de actina (Miron *et al.*, 1991).

En un estudio, Merino-Jiménez y colaboradores en 2016 compararon las células PC12-C11 las cuales expresan la isoforma mutante Dp71 $\Delta$ 78-79 que carece de los exones 71, 78 y 79 con las células PC12, donde las células PC12-C11 extendieron más neuritas a tiempos más cortos al ser diferenciadas con NGF (factor de crecimiento neural). Al realizar un análisis proteómico identificaron una disminución en la expresión de NF-L, que sugiere una alteración en el crecimiento de neuritas en células PC12-C11); además de un aumento de HspB1 fosforilada en la Ser86 posiblemente por una reestructuración del citoesqueleto de actina. De igual manera, la Dp71e $\Delta$ 71 (isoforma que retiene 34 pb del intrón 77 que impide la traducción de exones 78 y 79, produciendo un extremo C-terminal de 10 aminoácidos, sin el exón 71), estimula la diferenciación neuronal incrementando el porcentaje y tamaño de neuritas mediante el aumento de la expresión de HspB1 en células PC12

diferenciadas con NGF (García-Cruz, 2019). Además, se describió el efecto de la sobreexpresión de Dp40 y Dp40<sub>L170P</sub> (un cambio en el residuo 170 de leucina a prolina) en células PC12 Tet-On en la diferenciación utilizando NGF, asociado a una disminución de la expresión de NF-L y aumento de la  $\alpha$ -internexina y HspB1. (García-Cruz *et al.*, 2022)

Considerando lo anterior, el cambio morfológico visto en las células HEK 293 podría estar relacionado al cambio de expresión de la NF-L,  $\alpha$ -internexina y HspB1 presentes en estas células, provocado por la sobreexpresión de las isoformas Dp71 $\Delta$ <sub>71</sub> y Dp71 $\Delta$ <sub>71-74</sub> similar a los resultados obtenidos en diversos estudios realizados en células PC12 y PC12 Tet-On (García-Cruz, 2019) (García-Cruz *et al.*, 2022).

Por otro lado, las funciones de las distintas isoformas de la Dp71 aún no se conocen por completo; sin embargo, las Dp71 $\Delta$ <sub>71</sub> y Dp71 $\Delta$ <sub>71-74</sub> se han visto relacionadas con proliferación y diferenciación celular, respectivamente, en células PC12 Tet-On. (León, 2016); y como se ha mencionado anteriormente Dp71 $\Delta$ <sub>78-79</sub>, Dp71 $\Delta$ <sub>71</sub> y Dp40 juegan un papel en la diferenciación celular, relacionada con NF-L,  $\alpha$ -internexina, HspB1 y VAMP. (Merino, *et al.*, 2016; García-Cruz, *et al.*, 2019; García-Cruz, *et al.*, 2021) Además, se ha observado un cambio en el perfil de expresión de estas isoformas en el desarrollo del cerebro en ratones (González-Reyes, 2018).

Las diversas funciones que desempeñan las isoformas de la distrofina pueden deberse a la estructura que presentan; en la región C-terminal se encuentran diversos motivos los cuales les permiten interactuar con otras proteínas. En primer lugar, presentan dos motivos conservados de hélices superenrolladas, identificados como dominios de interacción proteína-proteína (Blake 1995), por otra parte, la región CR (región rica en cisteínas) contiene dos motivos de mano EF que permiten la unión a Ca<sup>+2</sup> intracelular (Koenig 1988), además de un motivo de dedos de zinc denominado ZZ (Ponting 1996). Todos estos motivos presentes dentro de la estructura de la proteína se han sugerido como posibles responsables de la asociación de la distrofina con las proteínas

extracelulares, membranales y citoplasmáticas que forman parte del complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC), como distroglicano, sintrofina y distrobrevina (Suzuki 1994).

Sin embargo, se requieren más estudios de los dominios de la proteína, utilizando mutaciones o deleciones, para poder determinar su papel real en la interacción con otras proteínas y realizando análisis de cómo se regulan los procesos de procesamiento alternativo para dar origen a las diferentes isoformas a partir de un mismo promotor.

Los resultados obtenidos en la presente investigación son congruentes con estudios previos acerca de las eficiencias de transfección usando vectores lentivirales, además de presentar la localización y morfología inducida por las isoformas de la Dp71 previamente reportadas, lo cual a posterior permitirá simular el estado de las células neuronales de pacientes con afectaciones cognitivas derivadas de las mutaciones del gen DMD. El estudio de estas isoformas en un sistema aislado nos permitirá un mejor entendimiento de sus funciones, por lo cual, se considera necesario realizar subsecuentes investigaciones acerca de ello.

## Conclusiones

1. Se transfectaron tanto células HEK 293 como PC12 con lentivirus recombinantes.
2. La transfección utilizando lentivirus recombinantes que expresan a las proteínas Dp71 mostró una mejor eficiencia en células HEK 293 donde el porcentaje de transfección obtenido fue del 74% en comparación con el 30.58 % obtenido en células PC12.
3. Se obtuvieron transfectantes estables que expresan las proteínas Dp71d $\Delta$ 71, Dp71d $\Delta$ 71-74 y GFP de forma independiente.
4. La inducción de la expresión de las proteínas recombinantes Dp71d $\Delta$ 71, Dp71d $\Delta$ 71-74 y GFP se realizó con una concentración de 1  $\mu$ g/ml y 500 ng/ml de doxiciclina.
5. En células HEK 293, la proteína Dp71d $\Delta$ 71 se localiza principalmente en el citoplasma y la periferia celular, mientras que la Dp71d $\Delta$ 71-74 se mantiene en la periferia de las células.
6. Las células HEK293 que sobreexpresan Dp71d $\Delta$ 71 presentan una morfología estrellada, mientras que las que sobreexpresan Dp71d $\Delta$ 71-74 son redondas.

## Perspectivas

Los datos obtenidos en el presente trabajo permitieron observar una mayor eficiencia de transfección de las células PC12 utilizando vectores lentivirales en comparación con otros métodos. Para optimizar la eficiencia de transfección con este tipo de vectores, se requiere cuantificar el número de partículas virales producidas. Como siguiente paso se plantea generar clonas de los grupos celulares 1.GFP, 1.Dp71d $\Delta$ 71 y 2.Dp71d $\Delta$ 71-74. Una vez obtenidas las clonas, observar y determinar la localización celular de las proteínas Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 en células PC12. Posteriormente se propone evaluar el efecto de la sobreexpresión de las proteínas en la proliferación celular y diferenciación neuronal de las células PC12, así como identificar los factores que intervengan en el efecto observado y las proteínas cuya expresión se vea afectada por la sobreexpresión de las isoformas Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 mediante espectrometría de masas. Por último, se sugiere identificar la unión de las isoformas Dp71d $\Delta$ 71 y Dp71d $\Delta$ 71-74 con otras proteínas mediante ensayos de Pull down para determinar complejos y de esa manera avanzar en el conocimiento de la función de estas proteínas.

## Referencias

Acosta R, Montañez C, Fuentes-Mera L, González E, Gómez P, Quintero-Mora L, *et al.* (2004). Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Exp Cell Res.* 296(2), 265-75.

Ahuja D, Sáenz-Robles M, Pipas J. (2005). SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene.* 24(52), 7729–7745.

Anderson J, Rogers R, Jarrett H. (1996). Ca<sup>2+</sup>-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem.* 271, 6605–6610.

Aragón J, González-Reyes M, Romo-Yáñez J, Vacca O, Aguilar-González G, Rendón A, Vaillend C, Montañez C. (2017). Dystrophin Dp71 Isoforms Are Differentially Expressed in the Mouse Brain and Retina: Report of New Alternative Splicing and a Novel Nomenclature for Dp71 Isoforms. *J Molecular Neurobiology.* 55, 1376-1386.

Aragón J, Martínez-Herrera A, Bermúdez-Cruz R M, Bazán M L, Soid-Raggi G, Ceja, V, Coy-Arechavaleta A, Alemán V, Depardón F, Montañez C. (2015). EF-hand domains are involved in the differential cellular distribution of dystrophin Dp40. *Neuroscience Letter.* 600, 115–120.

Aragón J, Martínez-Herrera A, Romo-Yáñez J *et al.* (2015). Identification of Dp71 isoforms expressed in PC12 cells: subcellular localization and colocalization with  $\beta$ -dystroglycan and  $\alpha$ 1-syntrophin. *J Mol Neurosci.* 58(2), 201–209.

Aragón, J, Romo-Yáñez J, Martínez-Herrera A, Ceja V, Rendon A, Montañez C. (2011). Characterization of Dp71 $\Delta$ 78-79, a novel dystrophin mutant that stimulates PC12 cell differentiation *Journal of Neurochemistry.* 119(4), 697-707.

Blake DJ, Kröger S. (2000) The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci.* 23, 92–99.

Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE, Knight AEe, Winder SJ, Kendrick-Jones J. (1995). Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci.* 20, 133–135.

Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.* 82(2), 291–329.

Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF. (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell.* 84, 757–767.

Campeau E, Ruhl VE, Rodier F, Smith CL, Rahmberg BL, Fuss JO, Campisi J, Yaswen P, Cooper PK, Kaufman PD. (2009). A Versatile Viral System for Expression and Depletion of Proteins in Mammalian Cells. *PLoS One.* 6, 4(8):e6529.

Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae C, Veres G, Manfred Schmidt M, Ina Kutschera I, Vidaud M, Abel U, Liliane Dal-Cortivo L, Caccavelli L, Mahlaoui N, Kiermer V, Mittelstaedt D, Bellesme C, Lahlou N, Lefrère F, Blanche S, Audit M, Payen E, Leboulch P, l'Homme B, Bougnères P, Von Kalle C, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, Aubourg P. (2009). Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy with a Lentiviral Vector in X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Science.* 326, 818-823.

Cimarelli A, Darlix JL. (2002). Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1166–1184.

Cisneros B, Rendon A, Genty V, Aranda G, Marquez F, Mornet D, *et al.* (1996). Expression of dystrophin Dp71 during PC12 cell differentiation. *Neurosci Lett.* 213(2), 107-10.

Clarke JP, Mearow KM. (2013). Cell stress promotes the association of phosphorylated HspB1 with F-actin. *PloS one.* 8, e68978.

Daoud F, Angeard N, Demerre B, Martie I, Benyaou R, Leturcq F, Cossee M, Deburgrave N, Saillour Y, Tuffery S, Urtizbera A, Toutain A, Echenne B, Frischman M, Mayer M, Desguerre I, Estournet B, Reveillere C, Penisson B, Cuisset JM, Kaplan JC, Heron D, Rivier F, Chelly J. (2009). Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Hum Mol Genet.* 18(20), 3779–3794.

DuBridg e R, Tang P, Hsia H, Leong P, Miller J, Calos M. (1987). Analysis of Mutation in Human Cells by Using an Epstein-Barr Virus Shuttle System. *Mol. Cel. Biol.* 7, 379–387.

Ervasti JM, Campbell KP. (1991). Membrane organization of the dystrophin–glycoprotein complex. *Cell.* 66(6), 1121–1131.

Ervasti JM. (2007). Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1772(2), 108-117.

Fairclough R, Wood MJ, Davies KE. (2013). Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nature Reviews Genetics.* 14(6), 373-378.

Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligo i B, Butto S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 46, 5–14.

García-Cruz C, Merino-Jiménez C, Ceja V, Aragón J, Siqueiros-Márquez L, Reyes-Grajeda J, Montañez C. (2019). The dystrophin isoform Dp71e $\Delta$ 71 is involved in neurite outgrowth and neuronal differentiation of PC12 cells. *J Proteomics.* 191, 80-87.

García-Cruz C, Merino-Jiménez C, Aragón J, Ceja V, González-Assad B, Reyes-Grajeda JP, Montañez C. (2022). Overexpression of the dystrophins Dp40 and Dp40<sub>L170P</sub> modifies neurite outgrowth and the protein expression profile of PC12 cells. *Sci Rep.* 12(1), 1410.

Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, Froehner SC. (1998). Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J. Neurosci.* 18, 128–137.

Greene L, Tischler A. (1982). PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research. In: Fedoroff S, Hertz L (eds) *Advances in cellular neurobiology*. Academic Press, New York, p 373.

Greene L, Tischler A. (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73(7), 2424-8.

González-Reyes M. (2018) Estudio de la expresión de las isoformas de la distrofina Dp71, durante el desarrollo del cerebro de ratón. (Tesis de doctorado) Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México.

Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie J N, Huot J, Landry J. (1997). Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *Journal of cell science*, 110, 357-368.

Haseltine, WA. (1988). Replication and pathogenesis of the AIDS virus. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 1, 217–240

Herrera-Salazar A, García-Villegas R, Aragón J, Sánchez-Trujillo A, Ceja V, Martínez-Herrera A, Merino-Jiménez C, Montañez C. (2016). Overexpression of mutant dystrophin Dp71 $\Delta$ 78–79 stimulates cell proliferation. *Neuro Report.* 27, 6–11.

Hoffman PN, Koo EH, Muma NA, Griffin JW, Price DL. (1988). Role of neurofilaments in the control of axonal caliber in myelinated nerve fibers. Intrinsic determinants of neuronal form and function. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 455,37, 389-402.

Hogan A, Shepherd L, Chabot J, Quenneville S, Prescott SM, Topham MK, Gee SH. (2001). Interaction of gamma 1-syntrophin with diacylglycerol kinase-zeta. Regulation of nuclear localization by PDZ interactions. *J. Biol. Chem.* 276, 26526–26533.

Hornstein B, Roman D, Arévalo-Soliz L, Engevik M, Zechiedrich L. (2016). Effects of Circular DNA Length on Transfection Efficiency by Electroporation into HeLa Cells. *PLoS One.* 11(12): e0167537.

Howard PL, Dally GY, Wong MH, Ho A, Weleber RG, Pillers DA, Ray PN. (1998). Localization of dystrophin isoform Dp71 to the inner limiting membrane of the retina suggests a unique functional contribution of Dp71 in the retina. *Hum Mol Genet.* 7(9), 1385–1391.

Joshi HC, Cleveland DW. (1989). Differential utilization of beta--tubulin isotypes in differentiating neurites. *J Cell Biol.* 109(2), 663--73.

Kameya S, Miyagoe Y, Nonaka I, Ikemoto T, Endo M, Hanaoka K, Nabeshima Y, Takeda S. (1999). Alpha1-syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. *J. Biol. Chem.* 274, 2193–2200.

Kao S, Jaiswal R, Kolch W, Landreth G. (2001). Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the MAPK cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells, *J. Biol. Chem.* 276, 18169–18177.

Kaplan D, Stephens R. (1994). Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J. Neurobiol.* 25, 1404– 1417.

Kim U, Fink D, Kim H, Park D, Contreras M, Guroff G, Rhee S. (1991). Nerve growth factor stimulates phosphorylation of phospholipase C-gamma in PC12 cells, *J. Biol. Chem.* 266, 1359– 1362.

Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Muller CR, Lindlof M, Kaariainen H *et al.* (1989). The molecular basis for

Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet.* 45(4), 498–506

Lee J, Ahn H, Kim K, Lee J, Kim M, Lee B, Khang G, Lee H. (2008). Polyethyleneimine-mediated gene delivery into rat pheochromocytoma PC-12 cells *J Tissue Eng Regen Med.* 2(5), 288-95.

León L, Montañez C. (2016) Estudio del efecto de la sobreexpresión de las distrofinas Dp71a y Dp71c en las células PC12. (Tesis de maestría) Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México.

Malim MH, Hauber J, Le, SY, Maizel, JV Cullen BR. (1989). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature.* 338, 254–257.

Marampon F, Casimiro MC, Fu M, Powell MJ, Popov VM, Lindsay J, *et al.* (2008). Nerve Growth factor regulation of cyclin D1 in PC12 cells through a p21RAS extracellular signal regulated kinase pathway requires cooperative interactions between Sp1 and nuclear factor-kappa B. *Mol Biol Cell.* 19(6), 2566-78.

Marquez FG, Cisneros B, Garcia F, Ceja V, Velazquez F, Depardon F, Cervantes L, Rendon A, Mornet D, Rosas-Vargas H, Mustre M, Montanez C. (2003). Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience.* 118(4), 957–966.

Merino-Jiménez C, Aragón J, Ceja V, Rodríguez-Martínez G, Cázares-Raga F, Chardonnet S, Pionneau C, Rendon A, Montañez C. (2016). Dp71 $\Delta$ <sub>78-79</sub> dystrophin mutant stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via upregulation and phosphorylation of HspB1. *Proteomics* 16, 1331–1340.

Miron T, Vancompernelle K, Vandekerckhove J, Wilchek M, Geiger B. (1991). A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. *The Journal of cell biology.* 114, 255-261.

Miyoshi H, Takahashi M, Gage F, Verma I. Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *PNAS*. 1997; 94(19):10319-10323.

Pezzoli D, Guipponi E, Mantovani D, Candiani G. (2017) Size matters for in vitro gene delivery: investigating the relationships among complexation protocol, transfection medium, size and sedimentation. *Sci. Rep.* 7, 44134.

Moizard MP, Billard C, Toutain A, Berret F, Marmin N, Moraine C. (1998). Are Dp71 and Dp140 brain dystrophin isoforms related to cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy? *Am J Med Genet.* 80(1), 32–41.

Morgan JE, Partridge TA. Muscle satellite cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2003; 35:1151-1156.

Munehira Y, Ohnishi T, Kawamoto S, Furuya A, Shitara K, Imamura M, Yokota T, Takeda S, Amachi T, Matsuo M, *et al.* (2004). Alpha1-syntrophin modulates turnover of ABCA1. *J. Biol. Chem.* 279, 15091–15095.

Nichols B, Takeda S, Yokota T. (2015). Non mechanical Roles of Dystrophin and Associated Proteins in Exercise, Neuromuscular Junctions, and Brains. *Brain Sci.* 5(3), 275–298.

Nishida A, Yasuno S, Takeuchi A, Awano H, Lee T, Niba ETE., Matsuo M. (2016). HEK293 cells express dystrophin Dp71 with nucleus-specific localization of Dp71ab. *Histochemistry and Cell Biology*, 146(3), 301–309.

Ondarza, N. (1994), *Biología molecular: antes y después de la doble hélice*, Siglo XXI, México.

Pollard V, Malim M. (1998). The Hiv-1 Rev Protein. *Annual Review of Microbiology.* 52, 491–532.

Ponting C, Blake D, Davies K, Kendrick-Jones J, Winder S. (1996). New putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends Biochem Sci.* 21, 11–13.

Ravni A, Bourgault S, Lebon A, Chan P, Galas L, Fournier A. (2006). The neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells: control by multiple transduction pathways. *J Neurochem.* 98(2), 321-9.

Romo-Yáñez J, Ceja V, Ilarraza-Lomeli 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, 82–97.

Rudkin B, Lazarovici P, Levi B, Abe Y, Fujita K, Guroff G. (1989). Cell cycle specific action of nerve growth factor in PC12 cells: differentiation without proliferation. *EMBO J.* 8(11), 3319-25.

Sadoulet-Puccio H, Rajala M, Kunkel L. (1997) Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 12413–12418.

Saint Martín A, Aragón J, Depardon-Benítez F, Sánchez-Trujillo A, Mendoza Hernández G, Ceja V, *et al.* (2012). Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy-terminal end. *FEBS J.* 279(1), 66-77.

Schimmelpfeng J, Weibezahn KF, Dertinger H. (2004). Quantification of NGF-dependent neuronal differentiation of PC-12 cells by means of neurofilament-L mRNA expression and neuronal outgrowth. *J. Neurosci. Methods.* 139, 299–306.

Schmidt T, Bartelt-Kirbach B, Golenhofen N. (2012). Phosphorylation-dependent subcellular localization of the small heat shock proteins HspB1/Hsp25 and HspB5/ $\alpha\beta$ -crystallin in cultured hippocampal neurons. *Histochemistry and cell biology.* 138, 407-418.

Strehle EM, Straub V. (2015). Recent advances in the management of Duchenne muscular dystrophy *Arch Dis Child.* 100:1173–1177.

Sun L, Carr AL, Li P, Lee J, McGregor M, Li L. (2014). Characterization of the human oncogene SCL/TAL1 interrupting locus (Stil) mediated Sonic hedgehog

(Shh) signaling transduction in proliferating mammalian dopaminergic neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 449(4), 444-8.

Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B. (2012). Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Neurobiol* 45(1), 43–60.

Toshie Sakuma T, Barry M, Ikeda Y. (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem. J.* 443, 603–618.

Villarreal-Silva M, Centeno-Cruz F, Suárez-Sánchez R, Garrido E, Cisneros B. (2011). Knockdown of dystrophin Dp71 impairs PC12 cells cycle: localization in the spindle and cytokinesis structures implies a role for Dp71 in cell division. *PLoS One.* 6(8), e23504.

Villarreal-Silva M, Suarez-Sanchez R, Rodriguez-Munoz R, Mornet D, Cisneros B. (2010). Dystrophin Dp71 is critical for stability of the DAPs in the nucleus of PC12 cells. *Neurochem Res.* 35(3), 366–373.

Warrillow D, Tachedjian G, Harrich D. (2009). Maturation of the HIV reverse transcription complex: putting the jigsaw together. *Rev. Med. Virol.* 19, 324–337.

Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH Jones KA. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell.* 92, 451–462.

Williams K L, Rahimtula M, Mearow K M. (2006). Heat shock protein 27 is involved in neurite extension and branching of dorsal root ganglion neurons in vitro. *Journal of neuroscience research.* 84, 716-723.

Yiu E, Kornberg A. (2015). Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Paediatrics and Child Health.* 51, 759-764.

Yokota T, Hosaka Y, Tsukita K, Kameya S, Shibuya R, Matsuda R, Wakayama Y, Takeda S. (2000). Aquaporin-4 is absent at the sarcolemma and at

perivascular astrocyte endfeet in alpha1-syntrophin knockout mice. *Proc. Jpn. Acad.* 76B, 22–27.

Young, LS, Searle, PF, Onion, D and Mautner, V. (2006). Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol.* 208, 299-318.

## Anexo

### Secuenciación de Dp71d $\Delta$ 71 del plásmido pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71

Alineamiento de Dp71d $\Delta$ 71 de *Rattus Norvegicus* de NCBI con número de referencia NM\_012698.3 con la secuencia de Dp71d $\Delta$ 71 presente en el vector pHAGE- Dp71d $\Delta$ 71.



1331  
 NM\_012698.3  
 Dp71d-D71

1401  
 NM\_012698.3  
 Dp71d-D71

1471  
 NM\_012698.3  
 Dp71d-D71

1541  
 NM\_012698.3  
 Dp71d-D71

1611  
 NM\_012698.3  
 Dp71d-D71

1681  
 NM\_012698.3  
 Dp71d-D71

1751  
 NM\_012698.3  
 Dp71d-D71

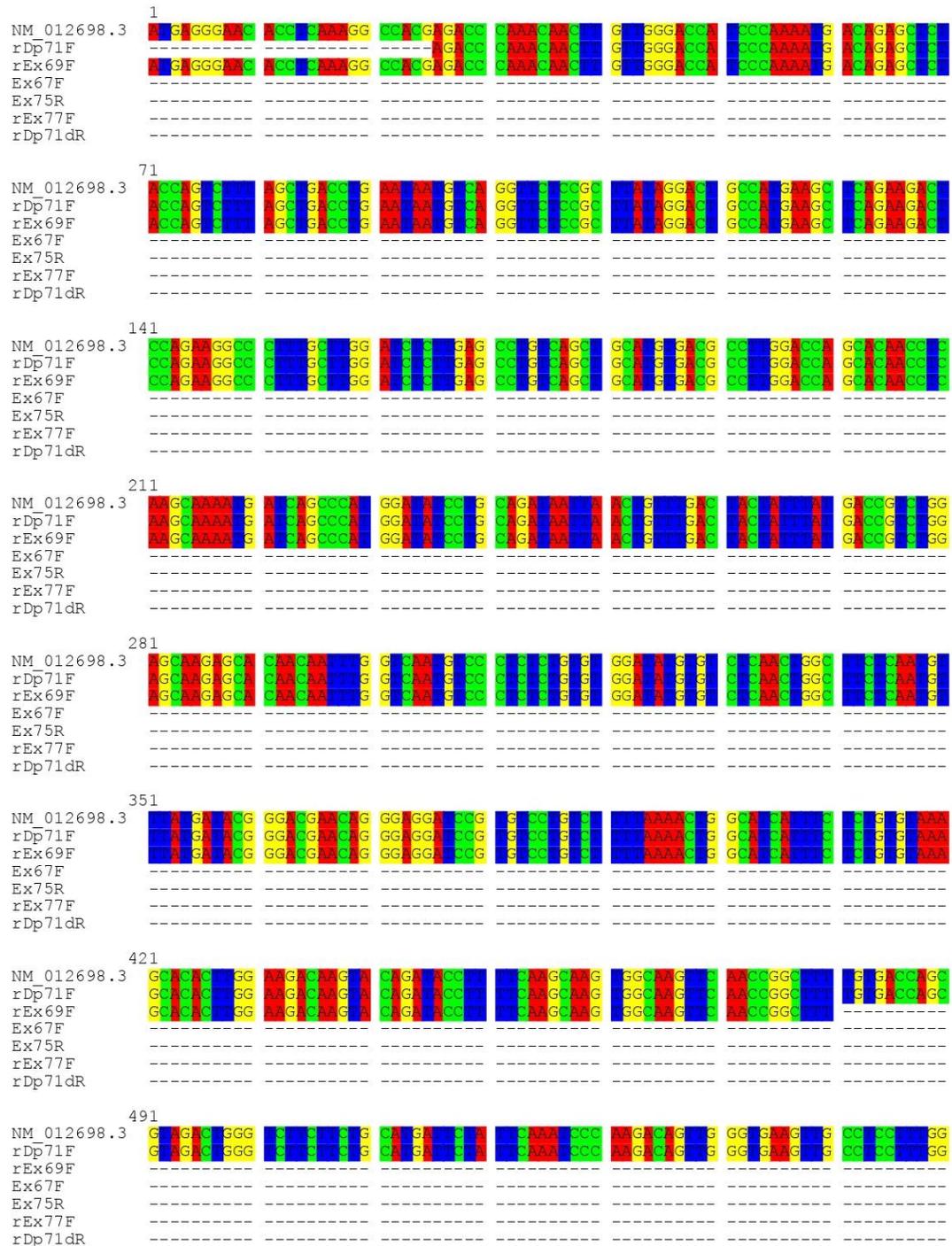
Ex 76

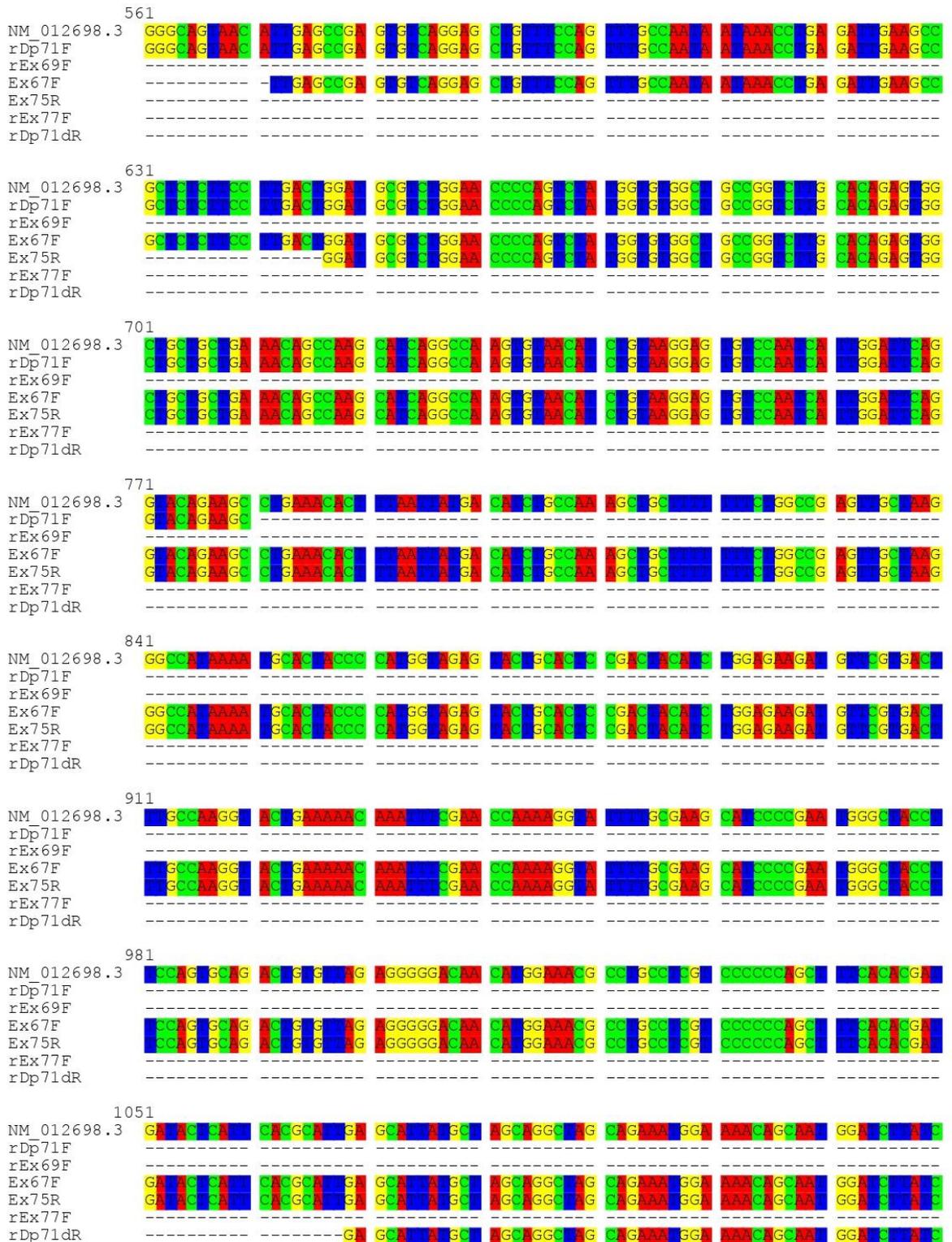
Ex 77

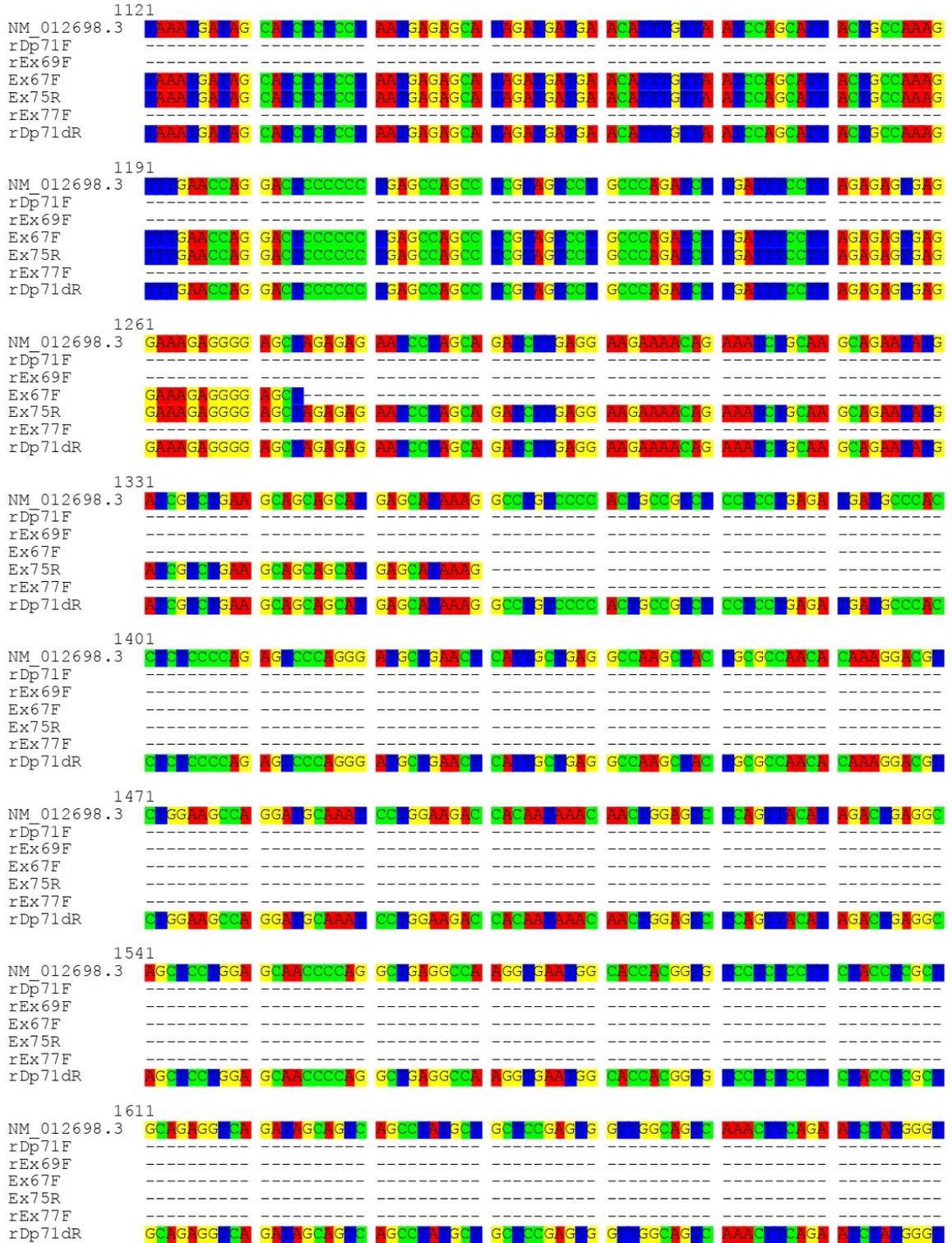
Ex 78

Ex 79

Alineamiento de Dp71d $\Delta$ 71 de *Rattus Norvegicus* de NCBI con número de referencia NM\_012698.3 con la secuenciación de Dp71d $\Delta$ 71 presente en el vector pHAGE- Dp71d $\Delta$ 71 con los primers rDp71F, rEx69F, Ex67F, Ex75R, rEx77F y rDp71dR.





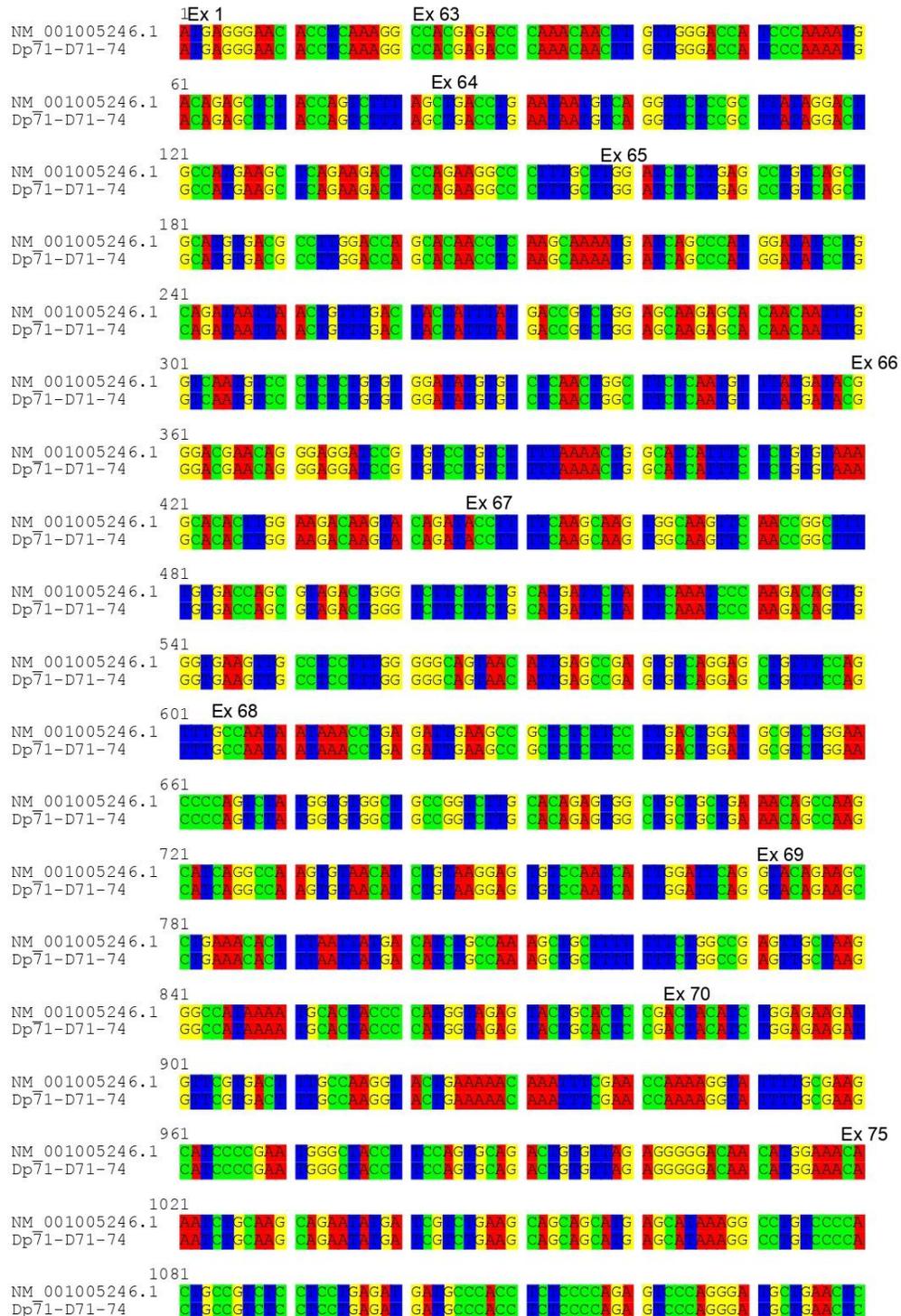


1681  
 NM\_012698.3 G G G A G A G C C G G G C C C C A G G A C A A G C A G G G A G A G A G G A G G A G C A A C C A A C A  
 rDp71F -----  
 rEx69F -----  
 Ex67F -----  
 Ex75R -----  
 rEx77F -----  
 rDp71dR G G G A G A G C C G G G C C C C A G G A C A A G C A G G G A G A G A G G A G G A G C A A C C A A C A

1751  
 NM\_012698.3 C C C C C C G G A G A A G G G A A G C C C C G G A A A G C C A A G A G A G G G C A C A A G A A G  
 rDp71F -----  
 rEx69F -----  
 Ex67F -----  
 Ex75R -----  
 rEx77F A C C C C C G G A G A A G G A A G A A A G C C C C G G A A A G C C A A G A G A G G C A C A A G A A G  
 rDp71dR A C C C C C G G A G A A G G A A G A A A G C C C C G G A A A G C C A A G A G A G G C A C A A G A A G

## Secuenciación de Dp71d $\Delta$ 71-74 del plásmido pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71-74

Alineamiento de Dp71d $\Delta$ 71-74 de *Rattus Norvegicus* de NCBI con número de referencia NM\_001005246.1 con la secuenciación de Dp71d $\Delta$ 71-74 presente en el vector pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71-74.



1141  
 NM\_001005246.1  
 Dp71-D71-74

1201  
 NM\_001005246.1  
 Dp71-D71-74

1261 Ex 76  
 NM\_001005246.1  
 Dp71-D71-74

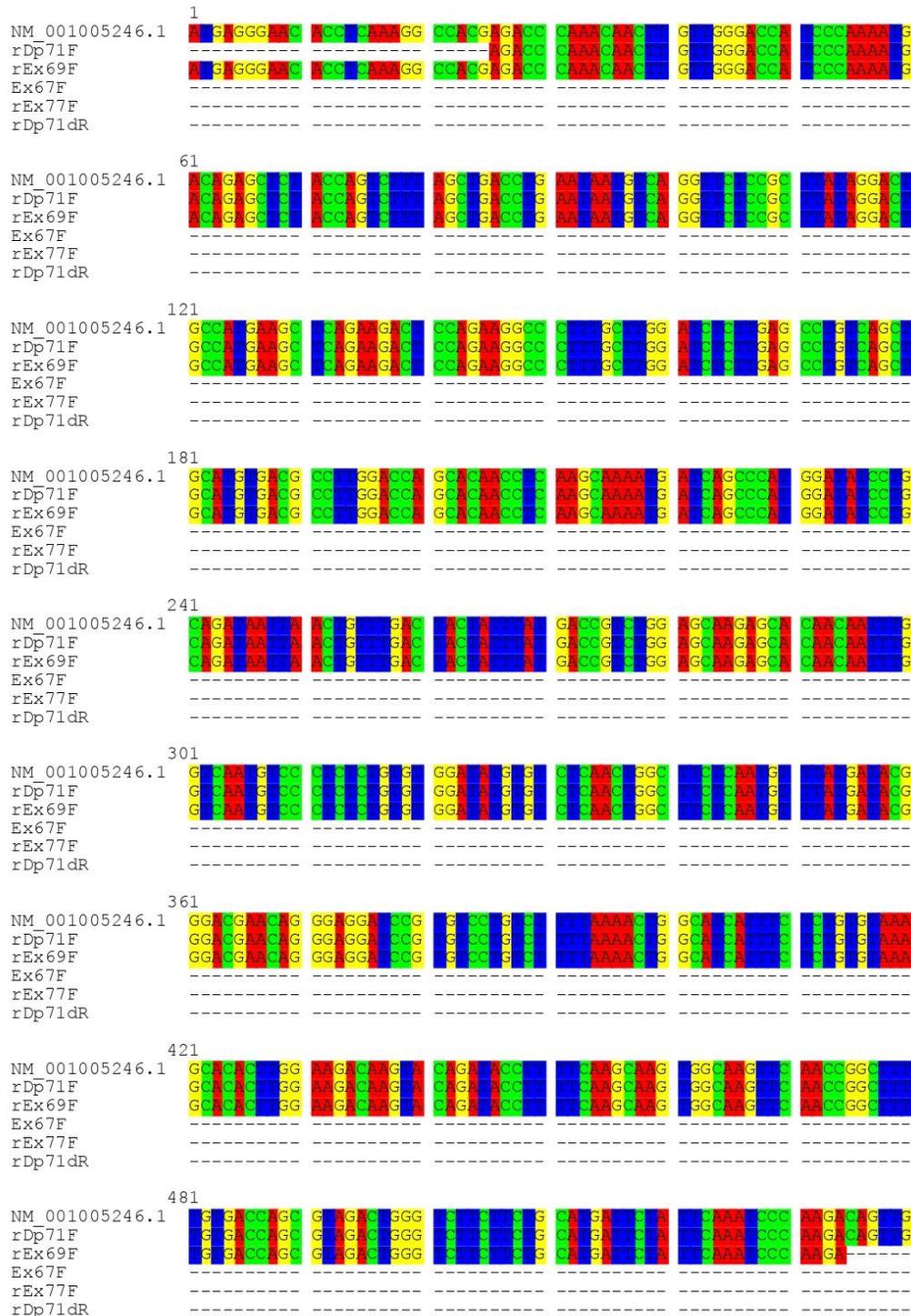
1321  
 NM\_001005246.1  
 Dp71-D71-74

1381 Ex 77  
 NM\_001005246.1  
 Dp71-D71-74

1441 Ex 78  
 NM\_001005246.1  
 Dp71-D71-74

1501 Ex 79  
 NM\_001005246.1  
 Dp71-D71-74

Alineamiento de Dp71d $\Delta$ 71-74 de *Rattus Norvegicus* de NCBI con número de referencia NM\_001005246.1 con la secuenciación de Dp71d $\Delta$ 71-74 presente en el vector pHAGE-Dp71d $\Delta$ 71-74 con los primers rDp71F, rEx69F, Ex67F, rEx77F y rDp71dR.





1141  
 NM\_001005246.1  
 rDp71F  
 rEx69F  
 Ex67F  
 rEx77F  
 rDp71dR

1201  
 NM\_001005246.1  
 rDp71F  
 rEx69F  
 Ex67F  
 rEx77F  
 rDp71dR

1261  
 NM\_001005246.1  
 rDp71F  
 rEx69F  
 Ex67F  
 rEx77F  
 rDp71dR

1321  
 NM\_001005246.1  
 rDp71F  
 rEx69F  
 Ex67F  
 rEx77F  
 rDp71dR

1381  
 NM\_001005246.1  
 rDp71F  
 rEx69F  
 Ex67F  
 rEx77F  
 rDp71dR

1441  
 NM\_001005246.1  
 rDp71F  
 rEx69F  
 Ex67F  
 rEx77F  
 rDp71dR

1501  
 NM\_001005246.1  
 rDp71F  
 rEx69F  
 Ex67F  
 rEx77F  
 rDp71dR

**Secuencias de las distrofinas Dp71d<sub>Δ71</sub> y Dp71d<sub>Δ71-74</sub> reportadas en NCBI.**  
>NM\_012698.3 *Rattus norvegicus* dystrophin (Dmd), secuencia codificante Dp71a.

ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACGAGACCCAAACAACCTGTTGGGACCATCCCAAAATGACAGAGCTCT  
ACCAGTCTTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAGACT  
CCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGAGCCTGTCAGCTGCATGTGACGCCTTGGACCAGCACAACTC  
AAGCAAAATGATCAGCCCATGGATATCCTGCAGATAATTAAGTGTGACTACTATTTATGACCGTCTGG  
AGCAAGAGCACAACAATTTGGTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGT  
TTATGATACGGGACGAACAGGGAGGATCCGTGCTCTTTTTAAACTGGCATCATTTCTCTGTGTAAA  
GCACACTTGAAGACAAGTACAGATACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGGCTTTTGTGACCAGC  
GTAGACTGGGTCTTCTTCTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCCTCCTTTGG  
GGGCGATAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTTCCAGTTTGCCAATAATAAACCTGAGATTGAAGCC  
GCTCTTCTCCTTGACTGGATGCGTCTGGAACCCAGTCTATGGTGTGGCTGCCGGTCTTGACAGAGTGG  
CTGCTGCTGAAACAGCCAAGCATCAGGCCAAGTGAACATCTGTAAGGAGTGTCCAATCATTGGATTGAG  
GTACAGAAGCCTGAAACACTTTAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTAAG  
GGCCATAAAATGCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATCTGGAGAAGATGTTTCGTGACT  
TTGCCAAGGTAAGTACTGAAAAACAATTTGAAACAAAAGGTATTTTGCAGCATCCCCGAATGGGCTACCT  
TCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAACGCCTGCCTCGTCCCCCAGCTTTCACACGAT  
GATACTCATTACGCATTGAGCATTATGCTAGCAGGCTAGCAGAAATGGAAAACAGCAATGGATCTTATC  
TAAATGATAGCATCTCTCCTAATGAGAGCATAGATGATGAACATTTGTTAATCCAGCATTACTGCCAAAG  
TTTGAACCAGGACTCCCCCTGAGCCAGCCTCGTAGTCCTGCCAGATCTTGATTTCTTAGAGAGTGAG  
GAAAGAGGGGAGCTAGAGAGAATCCTAGCAGATCTTGAGGAAGAAAACAGAAATCTGCAAGCAGAATATG  
ATCGTCTGAAGCAGCAGCATGAGCATAAAGGCCTGTCCCACTGCCGTCTCCTCCTGAGATGATGCCAC  
CTCTCCCAGAGTCCCAGGGATGCTGAACTCATTGCTGAGGCCAAGCTACTGCGCCAACACAAAGGACGT  
CTGGAAGCCAGGATGCAAATCCTGGAAGACCACAATAACAACCTGGAGTCTCAGTTACATAGACTGAGGC  
AGCTCCTGGAGCAACCCAGGCTGAGGCCAAGGTGAATGGCACCACGGTGTCTCTCCTTCTACCTCGCT  
GCAGAGGTCAGATAGCAGTCAGCCTATGCTGCTCCGAGTGGTTGCCAGTCAAACCTCAGAATCTATGGGT  
GAGGAAGATCTTCTGAGTCTCCCAGGACACAAGCACAGGGTTAGAAGAAGTATGAGCAACTCAACA  
ACTCCTTCCCTAGTTCAAGAGGAAGAAATGCCCTGGAAAGCCAATGAGAGAGGACACAATGTAG

>NM\_001005246.1 Rattus norvegicus dystrophin (Dmd), secuencia  
codificante Dp71c

ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACGAGACCCAAACAACCTGTTGGGACCATCCCAAATGACAGAGCTCT  
ACCAGTCTTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAGACT  
CCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGAGCCTGTCAGCTGCATGTGACGCCTTGGACCAGCACAACTC  
AAGCAAAATGATCAGCCCATGGATATCCTGCAGATAATTAACCTGTTTGACTACTATTTATGACCGTCTGG  
AGCAAGAGCACAAACAATTTGGTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGT  
TTATGATACGGGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCTGTCTTTAAAACCTGGCATCATTTCTCTGTGTA  
GCACACTTGAAGACAAGTACAGATACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGGCTTTTGTGACCAGC  
GTAGACTGGGTCTTCTCTGTCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCCTCCTTTGG  
GGGCAGTAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTCCAGTTTGCCAATAATAAACCTGAGATTGAAGCC  
GCTCTCTTCTTGACTGGATGCGTCTGGAACCCAGTCTATGGTGTGGCTGCCGGTCTTGACAGAGTGG  
CTGCTGCTGAAACAGCCAAGCATCAGGCCAAGTGTAAACATCTGTAAGGAGTGCCAATCATTGGATTGAG  
GTACAGAAGCCTGAAACACTTTAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTAAG  
GGCCATAAAATGCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATCTGGAGAAGATGTTTCGTGACT  
TTGCCAAGGACTGAAAAACAATTTGAAACAAAAGGTATTTTGCGAAGCATCCCCGAATGGGCTACCT  
TCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAAACAATCTGCAAGCAGAATATGATCGTCTGAAG  
CAGCAGCATGAGCATAAAGGCCTGTCCCACTGCCGTCTCCTCCTGAGATGATGCCACCTCTCCCCAGA  
GTCCCAGGGATGCTGAACTCATTGCTGAGGCCAAGCTACTGCGCCAACACAAAGGACGTCTGGAAGCCAG  
GATGCAAAATCCTGGAAGACCACAATAAACAACCTGGAGTCTCAGTTACATAGACTGAGGCAGCTCCTGGAG  
CAACCCAGGCTGAGGCCAAGGTGAATGGCACCAAGGTGTCCTCTCCTTCTACCTCGCTGCAGAGGTCAG  
ATAGCAGTCAGCCTATGCTGCTCCGAGTGGTTGGCAGTCAAACCTCAGAATCTATGGGTGAGGAAGATCT  
TCTGAGTCTCCCCAGGACACAAGCACAGGGTTAGAAGAAGTGATGGAGCAACTCAACAACCTCTCCCT  
AGT