

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Establecimiento de un sistema de infección de células
troncales y progenitoras neurales embrionarias con lentivirus
recombinantes que expresan las isoformas Dp71d_{Δ71} y
Dp71d_{Δ71-74}”**

TESIS

Que presenta:

IBQ. OSIRIS TAIS MARTINEZ VAZQUEZ.

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS.

En la especialidad de:

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.

Director de tesis:

Dra. SILVIA CECILIA IRENE MONTAÑEZ OJEDA.

Durante el desarrollo del presente trabajo la alumna OSIRIS TAIS MARTINEZ VAZQUEZ fue becaria del consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro 922801. La tesis fue apoyada con los proyectos CONACYT: CB-2017-2018 A1-S-24868 y ECOS-NORD- ANUIES-CONACYT 276330.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda y con la asesoría de la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz de este departamento y el Dr. José Romo Yáñez del Instituto Nacional de Perinatología

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por otorgarme una beca para continuar mis estudios y al CINEVESTAV por abrirme sus puertas para mi desarrollo profesional y personal.

A mis padres, Enrique Martínez Santos y Luz María Vázquez Morales, por creer en mí en todo momento, por brindarme su apoyo incondicional durante toda mi trayectoria escolar, por ser una fuente de inspiración y superación personal, por brindarme su amor, comprensión y consuelo. Gracias por ser mi fortaleza, por quienes he logrado dar cada paso en la vida y por quienes continuaré siempre.

A mi hermano Enrique Addi Isaí Martínez Vázquez †, por su apoyo y ánimo constante a lo largo de mi trayectoria académica, por creer en mi incluso cuando yo no lo hice, por estar conmigo en los momentos más difíciles.

A mis hermanas Isis Martínez y Anelsy Martínez, por estar conmigo en cada momento, por mostrarme el significado de la hermandad, por enseñarme a confiar en mí y a enfrentar cualquier dificultad.

A mi abuelita Rosario, por su amor, por su calidez humana y por ser un ejemplo de fortaleza para mí.

A mi mejor amigo y amor de mi vida, Edgar Iván Arteaga Galindo †, por enseñarme a valorar cada oportunidad en la vida, por ser mi motivación constante y un ejemplo de superación personal. Por darme fortaleza a lo largo de este proceso y no dejarme caer, por estar conmigo cuando más lo necesite.

A la Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda por brindarme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, por permitirme desarrollar en el ámbito de la investigación, por su apoyo, su guía y su paciencia. Agradezco enormemente su enseñanza durante la realización de este proyecto, que fue realmente enriquecedora tanto a nivel personal como profesional.

A los doctores Rosa María Bermúdez Cruz y José Romo Yáñez por su asesoría, sugerencias y comentarios para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Jorge Aragón Medrano y a la M en C. Sandra Paúl Gonzáles por enseñarme la forma de trabajo dentro del laboratorio, por compartir su conocimiento conmigo, por sus consejos, paciencia y guía.

A los auxiliares de laboratorio Biol. Alejandra Sánchez Trujillo y Q.B.P. Víctor Ceja Orozco por su colaboración durante el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos Alejandra Mejía, Enrique Silva, y a mis compañeros de maestría, por su acompañamiento, por ser una fuente de motivación y por brindarme su apoyo durante este proceso.

A mis compañeros de laboratorio Alejandra, Coztli, Pablo, Cande, Mayram por brindarme su apoyo y hacer muy agradable mi estancia en el laboratorio.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	I
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Distrofia Muscular de Duchenne.....	1
1.2 Gen DMD.....	2
1.2.1 Distrofinas.....	4
1.2.1.1 La distrofina Dp427.....	4
1.2.1.2 Distrofina Dp71.....	5
1.3 Las células troncales.....	10
1.3.1 Las células troncales y progenitoras neurales (CTPN).....	11
1.4 Lentivirus.....	13
1.5 Antecedentes directos.....	14
2. HIPÓTESIS	15
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo general.....	16
4.2 Objetivos específicos.....	16
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1 Aislamiento y cultivo de células troncales y progenitoras neurales (CTPN) embrionarias.....	18
6.1.1 Obtención del tejido neuroepitelial.....	18
6.1.2 Cultivo de CTPN.....	19
6.2 Caracterización de los vectores de expresión pHAGE-Dp71d _{Δ71} y pHAGE-Dp71d _{Δ71-74}	20
6.2.1 Amplificación por PCR de la región codificante de los plásmidos de expresión.....	20

6.2.2 Secuenciación	21
6.3 Producción de lentivirus recombinantes que expresan la proteína GFP y las isoformas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74	23
6.3.1 Determinación de la capacidad de infección de las partículas lentivirales recombinantes	26
6.4 Infección de CTPN embrionarias con las partículas lentivirales recombinantes	26
6.5 Western blot	28
6.6 Inmunofluorescencia	29
7. RESULTADOS	31
7.1 Aislamiento y cultivo de células troncales y progenitoras neurales (CTPN) embrionarias	31
7.2 Caracterización de los vectores de expresión pHAGE-Dp71d Δ 71 y pHAGE-Dp71d Δ 71-74 y producción de lentivirus recombinantes que expresan la proteína GFP y las isoformas Dp71 Δ 71 y Dp71 Δ 71-74	32
7.2.1 Amplificación por PCR de la región codificante de los plásmidos de expresión pHAGE-Dp71d Δ 71 y pHAGE-Dp71d Δ 71-74	32
7.2.2 Secuenciación de los plásmidos de expresión pHAGE-Dp71d Δ 71 y pHAGE-Dp71d Δ 71-74	33
7.2.3 Prueba de la capacidad de infección de las partículas lentivirales	39
7.2.3 Expresión las proteínas GFP, Dp71 Δ 71 y Dp71 Δ 71-74 en células HEK293 infectadas con las partículas lentivirales recombinantes	41
7.3 Curva de resistencia a geneticina	42
7.4 Infección de CTPN embrionarias con las partículas lentivirales recombinantes que expresan la proteína GFP	43
8. DISCUSION	46
9. CONCLUSIONES	50
10. PERSPECTIVAS	51
11. REFERENCIAS	52
ANEXOS	59

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AQP4	Canal de agua aquaporina-4
Pb	Pares de bases
B27	B27 supplement
CTPN	Células Troncales y Progenitoras Neurales
DAPC	Complejo de proteínas asociado a distrofina
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
DMEM	Eagle's minimal essential médium
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dp	Distrofina
EGF	Epidermal Growth Factor
FBS	Suero fetal bovino
FGF2	Human Basic Fibroblast Growth Factor
G418	Sal disulfato G418
mRNA	RNA mensajero
NGF	Factor de crecimiento neural
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
rTetR	Proteína TetR reversa
TetO	Elemento de respuesta a tetraciclina

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la debilidad muscular predominante en la Distrofia Muscular de Duchenne.....	1
Figura 2. El gen DMD, sus promotores y productos.....	3
Figura 3. Estructura y sitios de unión de la distrofina Dp427.....	4
Figura 4. Interacción entre la distrofina y el complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (DGC).....	5
Figura 5. Estructura y sitios de unión de la distrofina Dp71.....	6
Figura 6. Isoformas de la distrofina Dp71, su clasificación y nomenclatura.....	7
Figura 7. Dominio carboxilo terminal de los tres grupos de Dp71.....	7
Figura 8. Componentes que regulan las propiedades de las células troncales..	10
Figura 9. División simétrica y asimétrica de células troncales.....	11
Figura 10. Trayecto de una célula totipotente hasta una célula neural especializada.....	12
Figura 11. Diferenciación de células troncales y progenitoras neurales (CTPN)..	13
Figura 12. Diagrama de estrategia experimental.....	17
Figura 13. Morfología de los embriones de rata E14.....	18
Figura 14. Mapa genético de los plásmidos utilizados para la producción de partículas lentivirales.....	24
Figura 15. Evaluación de la capacidad de infección de las partículas virales recombinantes que expresan GFP en HEK293.....	26
Figura 16. Caracterización de los vectores pHAGE-Dp71d _{Δ71} y pHAGE-Dp71d _{Δ71-74} por medio de PCR..	33
Figura 17. Alineamiento de la secuencia de Dp71d _{Δ71} codificada por el plásmido pHAGE-Dp71d _{Δ71}	36
Figura 18. Alineamiento de la secuencia de Dp71d _{Δ71-74} codificada por el plásmido pHAGE-Dp71d _{Δ71-74}	39
Figura 19. Curva de resistencia a geneticina de las CTPN embrionarias.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de células sembradas por volumen total de la caja de cultivo.....	20
Tabla 2. Secuencia de los iniciadores empleados en los diversos ensayos de PCR, región que se amplifica, tamaño del producto y condiciones de reacción.	22
Tabla 3. Lista de anticuerpos utilizados en Western Blot e Inmunofluorescencia.....	30
Tabla 4. Características de los cultivos primarios de CTPN embrionarias.....	31

RESUMEN

Introducción. La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad genética recesiva asociada a mutaciones en el gen DMD. Esta enfermedad se caracteriza por la debilidad muscular progresiva de los pacientes; además, el 30% de ellos presentan déficit cognitivo. El gen DMD es uno de los genes más grandes del genoma humano, está constituido por 79 exones y su transcripción está regulada por 7 promotores, generando así distrofinas de diferente tamaño. Dp71 es una distrofina de expresión ubicua, aunque se expresa mayormente en cerebro y retina. La Dp71 es uno de los productos más pequeños del gen DMD, tiene una masa aparente de 71 kDa, y su transcripción está regulada por el promotor localizado en el intrón 62 de dicho gen. El mRNA de Dp71 sufre procesamientos alternativos lo que produce diversas isoformas. Su función se ha asociado a diversos procesos celulares como la proliferación y diferenciación de células de tipo neural, sin embargo, se desconoce el papel de cada isoforma. Con el objetivo de contribuir al estudio de las isoformas de Dp71 y su función en el SNC, en este proyecto se utilizó la transfección viral como una técnica eficiente para sobreexpresar a las isoformas Dp71d_{Δ71} y Dp71d_{Δ71-74}, en CTPN embrionarias; modelo celular que resulta difícil de transfectar por técnicas convencionales y que es de interés para conocer la función de estas distrofinas durante el desarrollo neural. **Materiales y métodos.** Se cultivaron células troncales y progenitoras neurales (CTPN) embrionarias aisladas de la región dorso medial de las vesículas telencefálicas de rata Wistar (E14). Se produjeron partículas lentivirales que expresan la proteína GFP y las isoformas Dp71d_{Δ71} y Dp71d_{Δ71-74} por medio de una cotransfección de tres plásmidos: un plásmido que codifica para la envoltura viral (pMD2-VSV-G), un plásmido de empaquetamiento de los componentes virales (psPAX2) y un plásmido de expresión (pHAGE-GFP, pHAGE-Dp71d_{Δ71} o pHAGE-Dp71d_{Δ71-74}). Se infectaron las células HEK293 y CTPN embrionarias con las partículas lentivirales producidas y se corroboró la infección por medio de Western Blot e inmunofluorescencia. **Resultados.** Se obtuvo el cultivo primario de CTPN embrionarias, observando que uno de los parámetros críticos para su correcta obtención es la disección de las vesículas telencefálicas. Se produjeron partículas lentivirales utilizando los vectores de expresión pHAGE-GFP, pHAGE-Dp71d_{Δ71} y pHAGE-Dp71d_{Δ71-74} que expresan la proteína GFP y las isoformas Dp71d_{Δ71} y Dp71d_{Δ71-74}, respectivamente. Estas partículas infectaron exitosamente a las células HEK293 en condiciones de 72 h de infección y 48 h de inducción con Doxiciclina (1 μg/mL). Los resultados del Western Blot utilizando los anticuerpos primarios anti GFP y anti Myc indican que células HEK293 expresan la proteína GFP y las isoformas Dp71d_{Δ71} y Dp71d_{Δ71-74}, además, se pudo observar con microscopio de epifluorescencia la expresión de la proteína GFP. El porcentaje de células HEK293 infectadas con las partículas lentivirales fue del 61%. Las partículas virales también infectaron exitosamente a las CTPN embrionarias en condiciones de 96 h de infección y 8 días de inducción con Doxiciclina (1 μg/mL). La dosis de genética efectiva para la selección de CTPN embrionarias infectadas exitosamente es de 0.06 μg/mL. **Conclusiones.** Se obtuvo el cultivo primario de CTPN. La infección de células HEK293 con las partículas lentivirales construidas permite la expresión exitosa de las proteínas GFP, DP71d_{Δ71} y DP71d_{Δ71-74}. La infección de CTPN con las partículas lentivirales construidas conlleva a la expresión exitosa de la proteína GFP. La expresión de las proteínas GFP, DP71d_{Δ71} y DP71d_{Δ71-74} responde a la inducción con Doxiciclina. La expresión de la proteína GFP en células troncales y progenitoras neurales embrionarias requiere un periodo más largo de inducción (9 días), con Doxiciclina en comparación a las células HEK293.

ABSTRACT

Introduction. Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a recessive genetic disease due to the mutations in the DMD gene. DMD is characterized by progressive muscle weakness and 30% of patients have cognitive deficit. The DMD gene is one of the largest genes of the human genome, it is made up of 79 exons and its transcription is regulated by 7 promoters, thus generating dystrophins of different sizes. Dp71 is one of the smallest products of the DMD gene with an apparent mass of 71KDa, whose transcription is regulated by the promoter located in intron 62 of the DMD gene. Dp71 is a ubiquitously expressing dystrophin, although it is mostly expressed in the brain and retina. The Dp71 mRNA undergoes alternative splicing which produces various isoforms. Its function has been associated with various cellular processes such as: proliferation and differentiation of neural cells, however, the role of each isoform is unknown. For this reason, in this project we use viral transfection as an efficient technique to overexpress the Dp71d_{Δ71} and Dp71d_{Δ71-74} isoforms in embryonic CTPNs; cell model that is difficult to transfect by conventional techniques, to contribute to the understanding of the role of both isoforms in CNS development processes. **Materials and methods.** Embryonic neural progenitor/stem cells were isolated and cultured from the dorsal medial region of Wistar rat telencephalic vesicles (E14). Lentiviral particles expressing the GFP protein and the Dp71d_{Δ71} and Dp71d_{Δ71-74} isoforms were produced by means of a cotransfection of three plasmids: an envelope plasmid (pMD2-VSV-G), a packaging plasmid (psPAX2) and an expression plasmid (pHAGE-GFP, pHAGE-Dp71d_{Δ71} or pHAGE-Dp71d_{Δ71-74}). HEK293 cells and embryonic CTPNs were infected with the lentiviral particles produced and the infection and protein expression were confirmed by means of Western Blot and Immunofluorescence. **Results.** The primary culture of embryonic CTPN was obtained, observing that one of the critical steps for getting a proper culture is the telencephalic vesicles dissection. Lentiviral particles were produced using the expression vectors pHAGE-GFP, pHAGE-Dp71d_{Δ71} and pHAGE-Dp71d_{Δ71-74} to express the GFP protein and the isoforms Dp71d_{Δ71} and Dp71d_{Δ71-74}, respectively. These particles successfully infected HEK293 cells under conditions of 72 h of infection and 48 h of induction with Doxycycline (1 µg / mL). The results of the Western Blot using the anti-GFP and anti-Myc antibodies indicate that HEK293 cells express the GFP protein and the isoforms Dp71d_{Δ71} and Dp71d_{Δ71-74}, in addition, the expression of the GFP protein was observed with epifluorescence. The percentage of HEK293 cells infected with the lentiviral particles is 61%. The particles successfully infected the embryonic CTPN under conditions of 96 h of infection and 8 days of induction with Doxycycline (1 µg / mL). The effective dose of geneticin for the selection of successfully infected embryonic CTPN was 0.06 µg / mL. **Conclusions.** The primary culture of embryonic neural progenitors/stem cells was obtained successfully. Infection of HEK293 cells with the recombinant lentiviral particles leads to the successful expression of the GFP, DP71d_{Δ71} and DP71d_{Δ71-74} proteins. Infection of CTPN with the recombinant lentiviral particles leads to successful expression of the GFP protein. The expression of the GFP, DP71d_{Δ71} and DP71d_{Δ71-74} proteins respond to the induction with Doxycycline. Expression of the GFP protein in embryonic neural progenitors/stem cells required a longer induction period (9 days) with Doxycycline, compared to HEK293 cells under the conditions used.

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Distrofia Muscular de Duchenne

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es un trastorno neuromuscular genético recesivo asociado al cromosoma X, que se presenta en edad temprana, afectando a 1 de cada 3500 varones nacidos. Este padecimiento se caracteriza por el debilitamiento y degeneración progresiva de los músculos, lo que conlleva a la dificultad para desarrollar actividades locomotrices, además, es común que los niños afectados por esta enfermedad presenten déficit cognitivo, ya que al menos 30% de ellos tienen un coeficiente intelectual $IQ < 70$ (Emery, 1996).

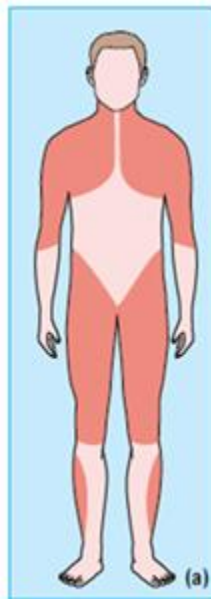


Figura 1. Distribución de la debilidad muscular predominante en la Distrofia Muscular de Duchenne. a) Zonas señaladas con color rojo, indican las regiones en donde se presenta la debilidad muscular en pacientes con DMD (Emery, 1996).

El gen *DMD* se identificó y asoció con la enfermedad debido a que la sintomatología de los pacientes se genera por la expresión anormal de su producto principal, la distrofina 427, denominada también como distrofina de longitud completa (Dp427), así como de sus productos adicionales, las distrofinas: Dp260, Dp140, Dp116, Dp71

y Dp40 (Murray *et al.*, 1982; Kunkal *et al.*, 1985; Ray *et al.*, 1985; Hoffman *et al.*, 1987).

La baja expresión de la distrofina Dp71, se ha asociado al menos con dos fenotipos no musculares de la DMD, déficit cognitivo y disfunción de la retina. Este primer fenotipo se ha observado en pacientes con DMD, ya que presentan un coeficiente intelectual por debajo del promedio de la población (<70) (Emery, 1996; Tadayoni *et al.*, 2012).

1.2 Gen DMD

El gen DMD, que codifica para la distrofina, se localiza en la banda Xp21 del brazo corto del cromosoma X y mide aproximadamente 2.5 Mb de longitud, es uno de los genes humanos más largos, abarcando el 1.5% del cromosoma X y el 0.1% del genoma humano (Koenig *et al.*, 1987; Tadayoni *et al.*, 2012). Este gen está constituido por 79 exones que codifican para un transcrito primario de 1.4 kb (Roberts *et al.*, 1992). La regulación del gen *DMD* es muy compleja ya que posee 7 promotores que generan productos independientes cuya expresión es tejido-específica (Sadoulet-Puccio y Kunkel, 1996); el promotor que se expresa en el músculo se denomina (M), en la retina (R), en el cerebro (B), en las células de Purkinje (P), en las células de Schwann (S), en el sistema nervioso central (B3) y un promotor general (G) cuya expresión es ubicua (Muntoni *et al.*, 2003).

La transcripción que da lugar a la distrofina de longitud completa, Dp427, se encuentra regulada por tres de los promotores: Dp427-M que se expresa en músculo, Dp427-B en corteza cerebral e hipocampo y Dp427-P en células de Purkinje (Blake *et al.*, 2002). Los cuatro promotores internos restantes regulan la transcripción de las distrofinas de menor tamaño (Muntoni *et al.*, 2003), que se expresan en diferentes tejidos y son nombradas acorde a su peso molecular: Dp260 (expresada predominantemente en retina) (Pillers *et al.*, 1993; D'Souza *et al.*, 1995), Dp140 (expresada en SNC y riñones) (Lidov *et al.*, 1995), Dp116 (cuya expresión

ha sido detectada en sistema nervioso periférico) (Byers *et al.*, 1993), Dp71 (que se expresa de manera ubicua y en niveles altos, en tejidos de naturaleza no muscular como cerebro y retina) (Aragón *et al.*, 2018) , y Dp40 (de expresión ubicua, particularmente en cerebro) (Doorenweerd *et al.*, 2017).

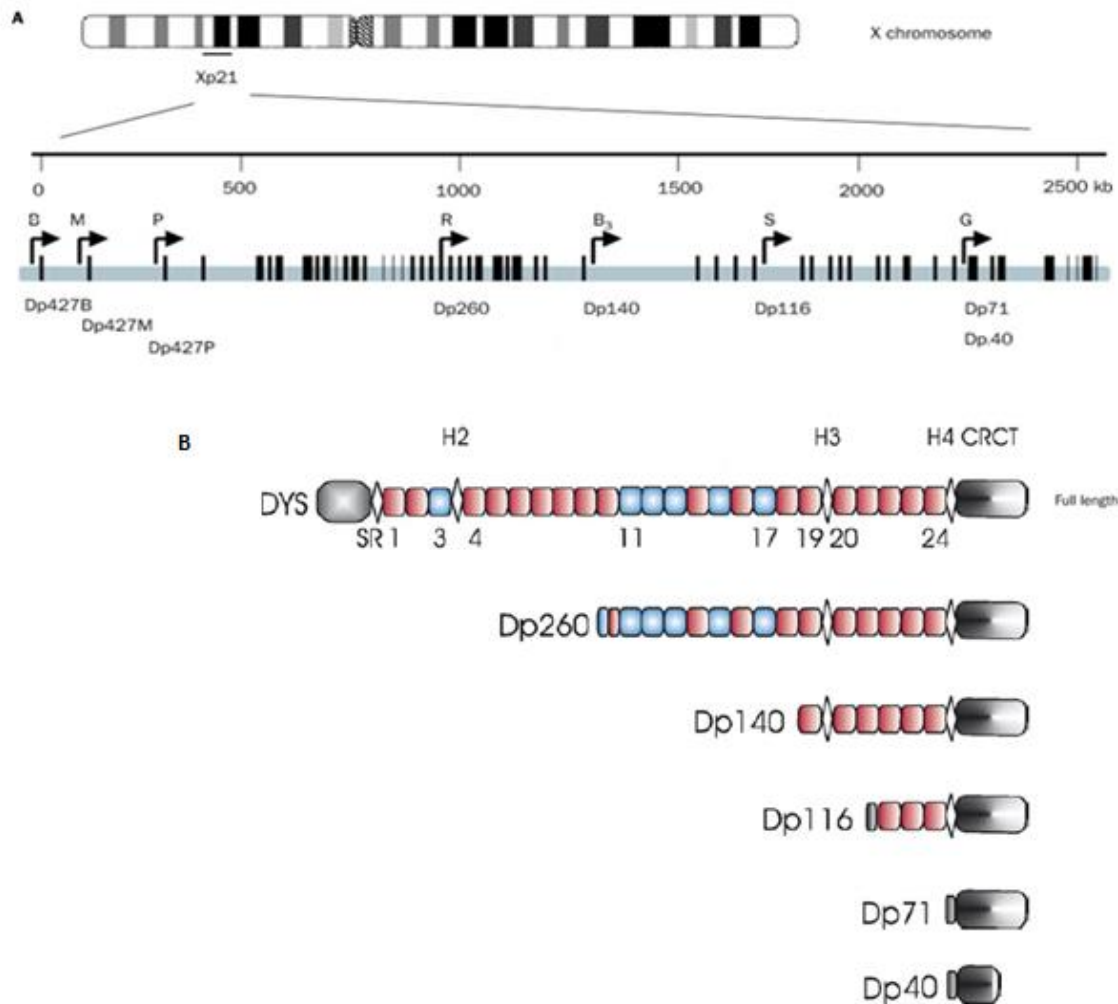


Figura 2. El gen DMD, sus promotores y productos. A) Representación del gen DMD, que se localiza en Xp21, y sus promotores. B) Representación esquemática de los productos del gen DMD. (H1-H4) Regiones tipo bisagra. (SR) Dominio tipo varilla. (CR) Dominio rico en cisteínas. (CT) Dominio carboxi-terminal. Se muestran los repetidos de espectrina ácidos en color rojo, y los repetidos de espectrina básicos en color azul. Los sitios de unión a glicoproteínas asociadas a Distrofina se muestran en escala de grises. Adaptación de Ervasti, 2006; Muntoni *et al.*, 2003.

1.2.1 Distrofinas

1.2.1.1 La distrofina Dp427

La distrofina es una proteína citoesquelética cuya función estructural es unir filamentos citoplasmáticos de actina a un complejo de glicoproteínas, mediante su interacción con ellas. Esta proteína de 3,685 residuos de aminoácidos, tiene una masa molecular aparente de 427kDa (longitud completa) y posee 4 dominios funcionales: el extremo N-terminal de unión a actina, un dominio central largo compuesto de repetidos tipo espectrina, una región rica en cisteínas y un extremo carboxilo terminal que se unen al complejo de glicoproteínas asociadas a distrofinas (DGC, por su siglas en inglés) (Durbeej y Campbell, 2002).

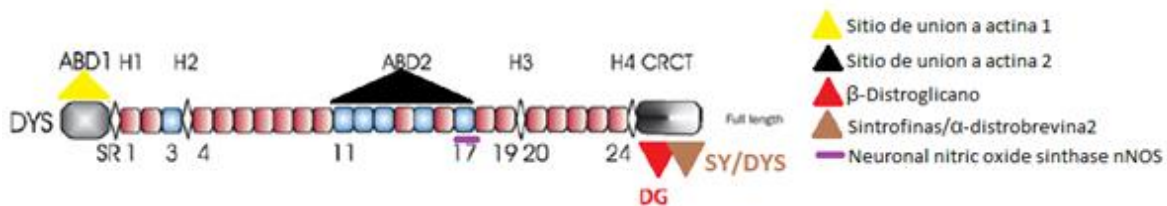


Figura 3. Estructura y sitios de unión de la distrofina Dp427. (H1-H4) Regiones tipo bisagra. (SR) Dominio tipo varilla. (CR) Dominio rico en cisteínas. (CT) Dominio carboxi-terminal. Los sitios de unión a glicoproteínas asociadas a Distrofina se muestran en escala de grises. Se resaltan los sitios de unión a actina en amarillo y negro, el sitio de unión a β -distroglicano en rojo, el sitio de unión a Sintrofinas/ α -distrobrevina2 en marrón, y el sitio de unión a nNOS en violeta. Adaptación de Ervasti, 2006; Fairclough et al., 2006.

DGC es un complejo de proteínas integrales de membrana, extracelulares y citoplasmáticas que forman un enlace crítico entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, manteniendo así la función normal del sarcolema (Ehmsen et al., 2002). El DGC del músculo, está conformado por distroglicano (α y β), sarcoglicano (α , β , γ y δ), sarcospan, sintrofina ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ y $\gamma 2$), y α -distrobrevina (Durbeej y Campbell, 2002).

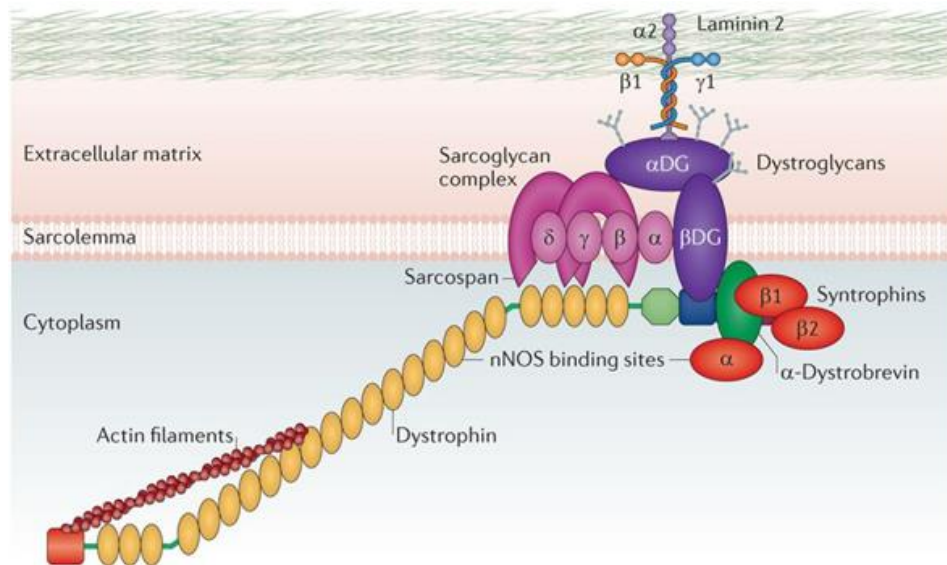


Figura 4. Interacción entre la distrofina y el complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (DGC). La distrofina se une por un lado a los filamentos de actina a través del dominio N-terminal y por otro al DGC, manteniendo así un enlace crítico entre el citoesqueleto y la matriz extracelular de la fibra muscular (Fairclough et al., 2013).

En el sarcolema, la distrofina Dp427 co-localiza con las proteínas del complejo, formando así, parte de un gran sistema hetero-oligomérico de glicoproteínas que sirve para estabilizarlo y protegerlo del estrés repetitivo que sufre durante la contracción muscular (Ervasti, 2007).

En el cerebro, la distrofina también co-localiza con proteínas del DGC distintas a las expresadas en músculo, como: β -distrobrevina, ϵ -sarcoglicano y γ -sintrofina. Además, co-localiza con receptores ácido γ -aminobutírico tipo A (GABA_A) participando en una transducción de señal sináptica eficiente (Kueh et al., 2008)

1.2.1.2 Distrofina Dp71

Dp71 es uno de los productos más pequeños del gen *DMD*, que se expresa a partir de un transcrito primario de mRNA de 6.5kb y pesa aproximadamente 70.8 kDa (Laderfein et al., 1992; Hugnot et al., 1992). A diferencia de la distrofina Dp427, esta proteína no contiene el dominio largo de repetidos de espectrina ni el extremo N-

terminal de unión a actina; sin embargo, conserva la región rica en cisteínas que a su vez está compuesta por tres dominios: WW, EF y ZZ, que en conjunto sirven para la unión a β -dístroglicano (Jung *et al.*, 1993).

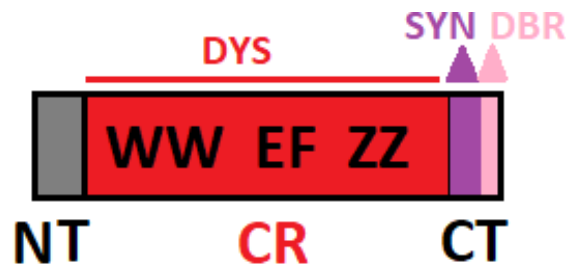


Figura 5. Estructura y sitios de unión de la distrofina Dp71. (NT) Dominio amino terminal. (CR) Dominio rico en cisteínas, constituido a su vez por un dominio WW, EF y ZZ, que en conjunto sirven para la unión a β -dístroglicano. (CT) Dominio carboxi-terminal. Se muestra el sitio de unión a β -dístroglicano en rojo y el sitio de unión a Sintrofina/ α -distrobrevina2 en morado y rosa, respectivamente. Adaptación de Ervasti, 2006; Fairclough *et al.*, 2006.

La expresión de Dp71 está regulada por el promotor que se localiza en la parte distal (intron 62) del gen *DMD*. La actividad del promotor de Dp71 es mayor durante la etapa perinatal y la expresión de esta proteína incrementa gradualmente desde la etapa embrionaria hasta la adultez, en donde es el producto del gen *DMD* con mayor expresión en el sistema nervioso central (Jung *et al.*, 1993; Sarig *et al.*, 1999).

Se han reportado una gran cantidad de isoformas de Dp71, resultado del procesamiento alternativo que sufre el transcrito primario del gen *DMD*. De manera general, las isoformas de esta proteína se clasifican en 3 grupos (Dp71d, Dp71f y Dp71e). El grupo -d- engloba a aquellas isoformas que tienen el exón 78, el grupo -f- a aquellas que no tienen el exón 78 y tienen un exón 79 alternativo, y el grupo -e- a aquellas que tienen una parte del intrón 77 y no tienen el exón 78 y 79. Cada una de estas isoformas había sido nombrada hasta 2018 de una forma particular, sin embargo, Aragón y colaboradores 2018 propusieron una nueva nomenclatura para las isoformas encontradas hasta esa fecha (Figura 6) (Aragón *et al.*, 2018). El procesamiento alternativo del exón 78 o la ausencia de este, así como del intrón 77

En el año 2000, González y colaboradores observaron en células HeLa, C2C12 y N1E-115 que el procesamiento alternativo del exón 71 y/o 78, determina la sublocalización de Dp71. Los resultados indicaron que las isoformas que no contienen en su estructura los aminoácidos codificados por el exón 71 y 78 se localizan únicamente en citoplasma, mientras que las que contienen el exón 71 y/o 78, se localizan en el núcleo (González *et al.*, 2000). A pesar de que la función de cada isoforma de Dp71 hasta el momento se desconoce, de manera general se sabe que la proteína juega un papel fundamental en el desarrollo del sistema nervioso central (Lenk *et al.*, 1993).

Diversos estudios han sugerido que Dp71 participa en la diferenciación y proliferación de células tipo neurales (Acosta *et al.*, 2004; Merino-Jiménez *et al.*, 2016; Herrera-Salazar *et al.*, 2016). En el año 1996, Cisneros y colaboradores publicaron la primera evidencia de que la proteína Dp71 participa en el proceso de diferenciación de células PC12, al observar que durante dicho proceso se presenta un aumento de Dp71 tanto a nivel de mRNA como de proteína. Por su parte, en 2003, Márquez y colaboradores reportaron la localización subcelular de dos de los tres grupos de isoformas reportadas a la fecha (Dp71d y Dp71f), utilizando anticuerpos específicos para cada uno de los grupos. Los resultados indicaron que la localización de los dos grupos de isoformas en células PC12 es distinta, y esta cambia a lo largo del proceso de diferenciación. Los autores también observaron que la cantidad de Dp71f se incrementó durante el proceso de diferenciación neuronal, mientras que la de Dp71d permaneció constante. Un año más tarde, en 2004, Acosta y colaboradores, utilizando secuencias antisentido, sugirieron que la deficiencia en los niveles de la proteína Dp71 conduce a una disminución de la capacidad de diferenciación de las células PC12. Además, descubrieron que la sobreexpresión de Dp71d confiere nuevamente a las células dicha capacidad, hecho que no sucede con la sobreexpresión de Dp71f.

Por otro lado, se han realizado una serie de estudios en células PC12 que corroboran que los grupos de Dp71 participan en procesos diferentes (Cerna *et al.*, 2006; Romo-Yáñez *et al.*, 2020; Villarreal-Silva *et al.*, 2010; García-Villegas *et al.*,

2016; Merino-Jiménez *et al.*, 2016). En 2016, Merino-Jiménez y colaboradores, estudiaron el efecto de la sobreexpresión una isoforma de Dp71 que no contiene los exones 78 y 79, Dp71 Δ 78-79, en células PC12-C11 diferenciadas con NGF, y observaron que la sobreexpresión de Dp71 Δ 78-79 promueve la diferenciación al estimular el alargamiento de neuritas por medio de la regulación positiva y fosforilación de HspB1. Por su parte, en el mismo año, Herrera-Salazar y colaboradores, evaluaron el efecto de la sobreexpresión de la mutante de Dp71 sin los exones 78 y 79, utilizando un sistema de expresión inducible con doxiciclina en células PC12 Tet-On. Los resultados demuestran que la expresión inducible de la mutante de Dp71 produce un aumento en la tasa de crecimiento de células PC12 Tet-On, lo que sugiere su participación en el proceso de proliferación de estas células.

La mayoría de los estudios sobre la función de Dp71 no considera el funcionamiento de cada una de las isoformas pertenecientes a un grupo particular, por lo que, en 2016, en nuestro grupo de trabajo se decidió estudiar a dos isoformas pertenecientes al grupo d: Dp71d Δ 71(Dp71a) y Dp71d Δ 71-74(Dp71c). Se analizó el efecto de la sobreexpresión de éstas, encontrando que cada una causa un efecto diferente en los procesos de diferenciación y proliferación de células PC12 (León-Moreno, 2016).

Por otra parte, también se ha sugerido la participación de Dp71 en la diferenciación y proliferación de células troncales/progenitoras neurales (Romo-Yáñez *et al.*, 2020; Paúl-González, 2014), así como en el mantenimiento de la homeostasis del cerebro al actuar conjuntamente con proteínas similares a las del complejo DAPC (Anderson *et al.*, 2002). Además, también se ha sugerido que juega un papel regulatorio en la función y organización sináptica glutamatérgica (Hendriksen *et al.*, 2015; Daoud *et al.*, 2008), por lo que su baja o nula expresión reduce la plasticidad sináptica, modifica la densidad de sinapsis, y aumenta la transmisión glutamatérgica, generando así alteraciones caracterizadas por deficiencias en el aprendizaje espacial y en la memoria que se asocian a un daño cognitivo severo (Daoud *et al.*, 2008).

1.3 Las células troncales

Las células troncales son células progenitoras de diferentes tipos celulares que poseen 2 propiedades específicas: autorenovación y pluripotencia. La autorenovación es la capacidad de multiplicarse infinitamente por medio de división simple para su preservación, mientras que la pluripotencia le confiere a la célula la capacidad de diferenciarse a células altamente especializadas a través de un proceso denominado diferenciación (Arrigui y Risso, 2017), en donde la célula pluripotente es dirigida hacia un linaje celular particular por medio de estímulos o señales moleculares que recibe en el microambiente en el que se desarrolla. De entro de estos estímulos se encuentran interacciones entre célula-célula, señales de factores difusibles, así como factores físicos del medio (Singh *et al.*, 2019).

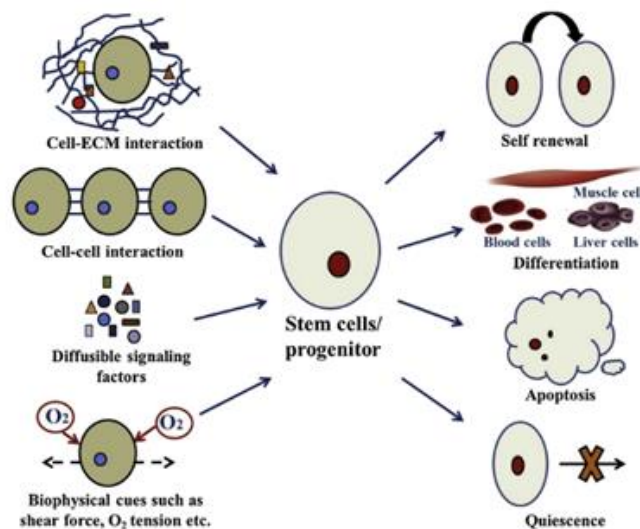


Figura 8. Componentes que regulan las propiedades de las células troncales. Se muestran las interacciones entre célula-célula, célula-señales de factores difusibles, célula-factores físicos del medio, que dirigen a la célula hacia autorenovación, diferenciación, apoptosis o quiescencia (Singh *et al.*, 2019).

La autorenovación y pluripotencia se controlan por medio de división celular, ya sea simétrica o asimétrica. La división simétrica genera dos células hijas con las mismas características que las células troncales, mientras que la división asimétrica da lugar

a una célula troncal y una célula progenitora con un potencial limitado de auto renovación (Arrigui y Risso, 2017).

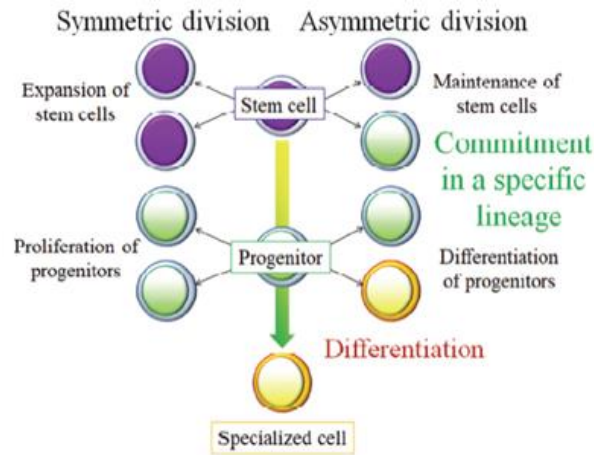


Figura 9. División simétrica y asimétrica de células troncales. Se muestra la división simétrica, que genera 2 células hijas con las mismas características que la célula madre, mientras que la división asimétrica genera una célula troncal y una célula progenitora (Arrigui y Risso, 2017).

Las células troncales se clasifican en 3 grupos: las células troncales inducidas, las células troncales embrionarias, y las células troncales adultas o tejido-específicas. Las células troncales embrionarias se generan a los pocos días de la fertilización, y durante la etapa de pre-implantación y se localizan en la región denominada “masa celular interna”, mientras que las adultas se localizan en órganos y tejidos del cuerpo y se encargan de reparar/ mantener el tejido en donde se encuentran (Arrigui y Risso, 2017).

1.3.1 Las células troncales y progenitoras neurales (CTPN)

Las células troncales y progenitoras neurales son las encargadas de la neurogénesis en embriones y adultos. Las células troncales neurales embrionarias provienen del ectodermo, y se localizan en la cresta y corteza neural, durante el desarrollo embrionario. mientras que las adultas se localizan en el cerebro, en la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales y la zona subgranular, cerca

del giro dentado del hipocampo (Vieira et al., 2018; Pontious et al., 2008; Arrigui y Risso, 2017).

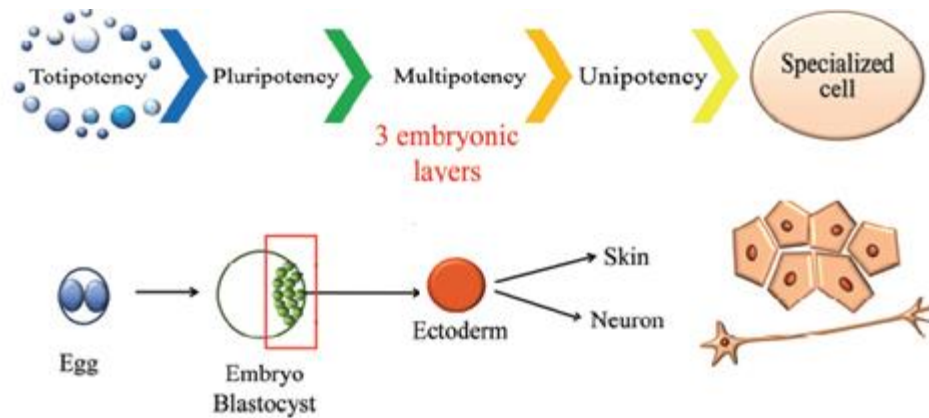


Figura 10. Trayecto de una célula totipotente hasta una célula neural especializada. Se muestra como la potencialidad de la célula disminuye conforme transcurre el periodo de la embriogénesis (Arrigui y Risso, 2017).

Durante el inicio de la embriogénesis del ratón, el neuroepitelio se extiende a lo largo de la superficie ventricular del tubo neural y cerca del décimo día del desarrollo, se forman las células gliales radiales, que se diferencian en células progenitoras neurales intermedias y forman nichos neurogénicos, para finalmente diferenciarse en líneas celulares neurales como astocitos, oligodendrocitos y neuronas funcionales (Vieira et al., 2018).

El proceso de diferenciación de las células troncales neurales a células somáticas, durante la embriogénesis, se encuentra regulado por interacciones intrínsecas de varias moléculas como factores de transcripción, cofactores, reguladores de la cromatina, ncRNAs, entre otros (Young, 2011). Durante la diferenciación, las neuronas y células gliales expresan marcadores específicos, tales como: MAP2/ β III-tubulina para neuronas, GFAP/GS para astrocitos, y APC/Nogo-A para oligodendrocitos (Ghanavatinejad et al., 2019).

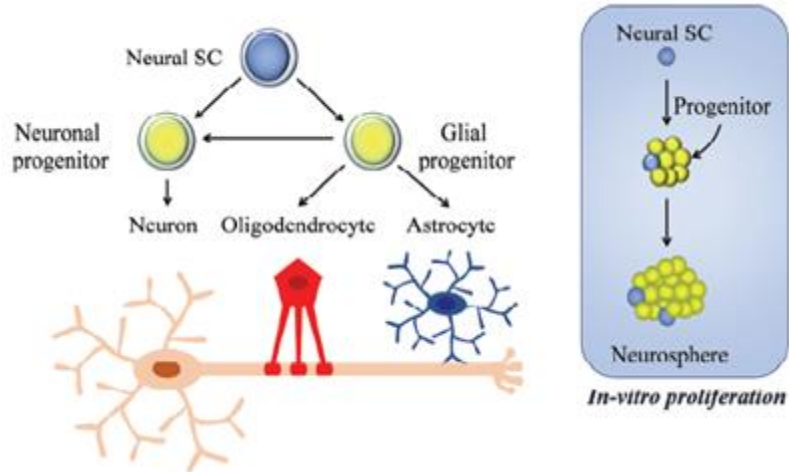


Figura 11. Diferenciación de células troncales y progenitoras neurales (CTPN). Se muestra la diferenciación de las CTPN a astrocitos, oligodendrocitos y neuronas funcionales, además se representa el proceso de proliferación in-vitro de las CTPN a la derecha de la figura (Arrigui y Riso, 2017).

1.4 Lentivirus

Los lentivirus son retrovirus, cuya infección se asocia a macrófagos y linfocitos. En la actualidad, los lentivirus se utilizan comúnmente como herramienta para transferir genes debido a que pueden integrarlos eficientemente en el genoma de huésped. Se han desarrollado vectores derivados de lentivirus, que mantienen la capacidad del virus parental para infectar células en división y en no división, pero no conservan el potencial de infección ni replicación. Este sistema se ha desarrollado con la finalidad de utilizar a los lentivirus en aplicaciones terapéuticas (Vigna y Naldini, 2000).

La formación de partículas virales se realiza mediante la co-transfección de tres plásmidos, dos de los cuales brindan las funciones de empaquetamiento para el vector lentiviral utilizando señales transcripcionales no asociadas a las del virus. Uno de los dos plásmidos, plásmido de empaquetamiento, expresa a las proteínas Gag, Pol, Tat y Rev que participan en el proceso de empaquetamiento. La expresión de estas proteínas está regulada por el promotor de citomegalovirus. Cuando se introduce esta construcción en el genoma de la célula huésped se generan

partículas virales no infecciosas. El segundo plásmido contiene en su estructura a la secuencia que codifica para la glicoproteína VSV-G, que genera la envoltura del lentivirus. El tercer plásmido, que contiene en su estructura a la secuencia del gen que se pretende transferir y expresar, expresa también al RNA requerido para el empaquetamiento eficiente, reverso-transcripción e integración al genoma de las células infectadas (Naldini *et al.*, 2000).

1.5 Antecedentes directos

Un número importante de investigaciones relacionadas con el funcionamiento de la proteína Dp71 en el sistema nervioso central, se han realizado utilizando células PC12 como modelo celular. Adicionalmente, nuestro grupo de trabajo ha caracterizado los patrones de expresión a nivel de mRNA de distrofinas en células troncales/ progenitoras neurales no diferenciadas y diferenciadas utilizando los factores HA (histamina) y CNTF (factor neurotrófico ciliar), que promueven la diferenciación neuronal y astrocítica, respectivamente. Y se ha observado que tanto en las CTPN diferenciadas como no diferenciadas está presente el mRNA de la distrofina Dp71 y su nivel permanece constante, lo que ha sugerido su participación en etapas tempranas de la diferenciación de las CTPN. Nuestro grupo de trabajo también ha observado que el mRNA de la Dp71 en las CTPN sufre procesamiento alternativo de los exones 71, 71-74 y 78, generando varias isoformas de esta proteína. En 2014, Paúl-Gonzales identificó la expresión, a nivel de mRNA, de 5 isoformas: Dp71, Dp71a, Dp71b, Dp71ab y Dp71 Δ 74 en CTPN diferenciadas y no diferenciadas, encontrando que el porcentaje de expresión de estas 5 isoformas es diferente (Paúl-González, 2014). Además, se han estudiado los patrones de expresión de las distrofinas y DAPC en células troncales neurales diferenciadas y no diferenciadas, y se ha observado que las distrofinas y DAPC son expresadas y reguladas durante el proceso de diferenciación, lo que ha sugerido que dichas proteínas juegan un papel importante en el desarrollo del cerebro (Romo-Yañez *et al.*, 2020).

Por otra parte, nuestro grupo de trabajo ha estudiado la expresión de isoformas de Dp71 en cerebro y retina, observado que se expresan a nivel de mRNA de forma diferente en cada uno de ellos. Se ha demostrado que los transcritos de las isoformas del grupo d son mayormente expresados en cerebro, mientras que la expresión de los transcritos de las isoformas del grupo f es mayor en retina. También se ha demostrado la expresión, a nivel de mRNA, de nuevas isoformas de Dp71, cuyo transcrito sufre procesamiento alternativo en los exones 71,71 y 74,71 y 73-74, y, 74 y 78 (Aragón *et al.*, 2018).

Nuestro grupo de trabajo cuenta con los vectores lentivirales recombinantes que permiten la expresión de dos de las isoformas de Dp71 pertenecientes al grupo d: pHAGE-Dp71d Δ 71 y pHAGE-Dp71d Δ 71-74. Sin embargo, hasta la fecha no se ha probado la eficiencia de estos vectores en líneas celulares neurales. Se sabe que los vectores lentivirales, pueden generar una infección eficiente y expresión estable en diversos tipos de células, además de que pueden llegar a representar una estrategia de gran importancia en terapia génica de diversas enfermedades.

2. HIPÓTESIS

La infección de células troncales y progenitoras neurales embrionarias con lentivirus recombinantes es eficiente y permite la expresión de las isoformas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74.

3. JUSTIFICACIÓN

La Dp71 es una proteína de gran importancia en el funcionamiento del sistema nervioso central cuya baja o nula expresión se asocia con el déficit cognitivo que presentan el 30% de los pacientes con distrofia muscular de Duchenne, sin

embargo, a pesar de que esta distrofina se ha relacionado con diversos procesos, se desconoce la función de cada isoforma.

En este proyecto se pretende utilizar la transfección viral como una técnica eficiente para la sobreexpresión de las isoformas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74, en CTPN embrionarias; modelo celular que resulta difícil de transfectar por técnicas convencionales. De esta manera se contribuirá a la futura comprensión de la función de ambas isoformas en el funcionamiento y desarrollo del SNC.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Sobreexpresar las isoformas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 en células troncales y progenitoras neurales utilizando lentivirus recombinantes.

4.2 Objetivos específicos

- Obtener el cultivo primario de células troncales y progenitoras neurales embrionarias.
- Comprobar la presencia de los insertos de Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74, en los vectores de expresión pHAGE-Dp71d Δ 71 y pHAGE-Dp71d Δ 71-74, respectivamente.
- Producir los lentivirus recombinantes que expresan las proteínas Dp71d Δ 71, Dp71d Δ 71-74 y GFP en células HEK293.
- Determinar la eficiencia de infección en células HEK293 y CTPN embrionarias.
- Infectar a las células CTPN embrionarias con los lentivirus recombinantes que expresan las proteínas GFP, Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

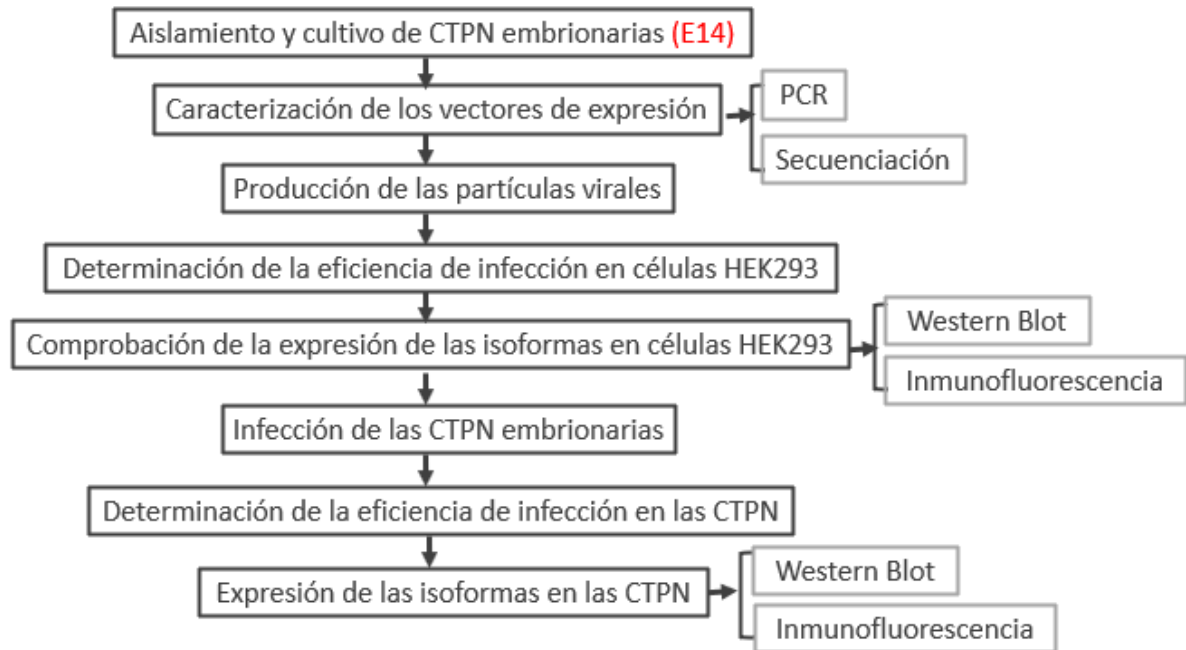


Figura 12. Diagrama de estrategia experimental.

Para sobreexpresar las isoformas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 en células troncales y progenitoras neurales embrionarias utilizando lentivirus recombinantes, primeramente, se aislaron las células troncales y progenitoras neurales (CTPN) del tejido neuroepitelial de la región dorso-medial de las vesículas telencefálicas de embriones de rata Wistar de 14 días de gestación, etapa en que las CTPN tienen la capacidad de diferenciarse a neuronas, astrocitos u oligodendrocitos. Una vez desarrollado el cultivo, las CTPN fueron infectadas con los lentivirus recombinantes producidos en células HEK por la co-transfección de los plásmidos psPAX2, pMD2-VSG-G y los que expresan las proteínas Myc/Dp71d Δ 71, Myc/Dp71d Δ 71-74 y GFP, utilizando lipofectamina. Se determinó la eficiencia de transfección de las partículas virales producidas en células HEK293 y en CTNP embrionarias por Western Blot e Inmunofluorescencia. Las CTPN infectadas se seleccionaron con geneticina, la sobreexpresión de las isoformas recombinantes Myc/Dp71d Δ 71 y Myc/Dp71d Δ 71-74 se analizó por inmunofluorescencia y Western Blot utilizando el anticuerpo contra la bandera Myc.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Aislamiento y cultivo de células troncales y progenitoras neurales (CTPN) embrionarias.

6.1.1 Obtención del tejido neuroepitelial

Se sacrificó por decapitación a las ratas Wistar de 14 días de gestación (E14) en un área limpia y desinfectada con etanol al 75%, posteriormente se realizó un corte en la zona abdominal con tijeras de disección estériles liberando a los embriones del saco vitelino. Los embriones se colocaron en una caja de Petri de vidrio con solución de Krebs (NaCl 121.5 mM, KCl 4.8 mM, KH₂PO₄ 0.95 mM, NaHCO₃ 25.47 mM, Glucosa 14.26 mM, BSA 0.3%, MgSO₄ 0.03%, rojo fenol, pH 7.4), en hielo. Con ayuda del microscopio estereoscópico se realizó la disección de las vesículas telencefálicas de los embriones y una vez que se separaron estas vesículas, se expuso la parte ventral y se cortó la región dorso-medial de ambas vesículas. Finalmente, se colocó el tejido en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con solución de Krebs estéril fría.

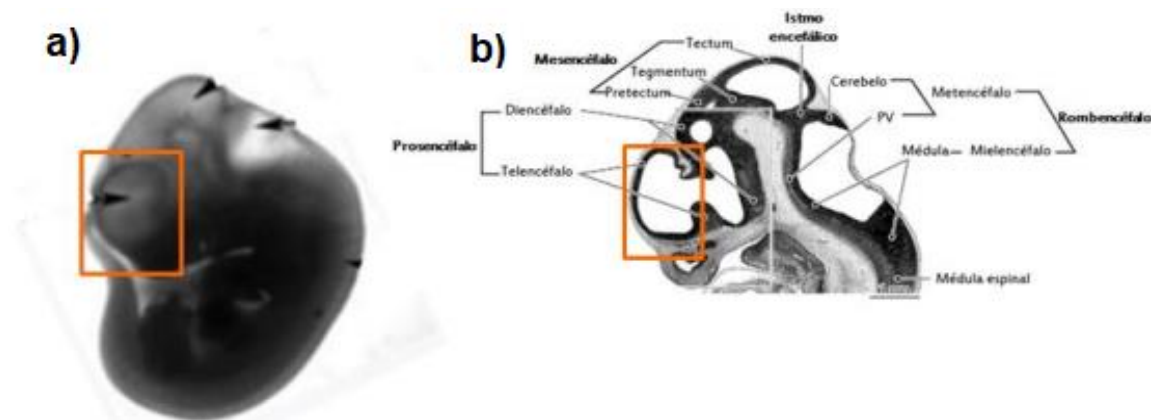


Figura 13. Morfología de los embriones de rata E14. a) Embrión de rata E14 visto a través del microscopio estereoscópico. Las vesículas telencefálicas (señaladas por el recuadro) se observan como un par de estructuras casi esféricas que se encuentran en la parte anterior de la cabeza, justo arriba del ojo. b) Corte sagital de un embrión de rata E14 en donde se señalan todas las estructuras que conforman el SNC de los embriones en este estadio de desarrollo. El recuadro señala la región de la cual se obtuvo el tejido para el cultivo primario de las CTPN (Paúl-González, 2012).

6.1.2 Cultivo de CTPN

Una vez que se realizó la disección de todos los embriones, el tejido obtenido se dejó precipitar en el tubo Eppendorf, y se retiró el sobrenadante con una pipeta. Enseguida, se agregó 1 mL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4) estéril y se centrifugó a 150 g durante 2 minutos. Posteriormente se retiró cuidadosamente el PBS y se resuspendieron las células en 500 µL de medio DMEM-F12, pipeteando 10-20 veces con una micropipeta de 1000 µL para disociar el tejido, cuidando de no introducir burbujas de aire en la suspensión celular. Se dejó reposar el tubo en posición vertical durante 3-5 min, el sobrenadante se recuperó evitando tomar el tejido no disociado del fondo del tubo y se transfirió a otro tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril.

Al tubo con el tejido no disociado se le agregaron 500 µL de medio DMEM-F12. Los 2 pasos anteriores se repitieron, colocando el nuevo sobrenadante en el mismo tubo en donde se había colocado el sobrenadante anterior. Se centrifugó la suspensión celular 5 min a 150 g y posteriormente se retiró el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1 mL de medio DMEM-F12. De esta suspensión celular se tomaron 10 µL y se mezclaron con 10 µL de colorante azul de tripano. Se colocaron 10 µL de la mezcla en una cámara de Neubauer para contar el número de células viables (células que no incorporan el colorante y que presentan birrefringencia). A partir de las células contadas, se calculó el número de células por mililitro, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{No. de células contadas}}{\text{No. de cuadros contados (4)}} \times \text{dilución}(1:2) \times 10,000 = \frac{\text{Células}}{\text{ml}}$$

Finalmente, las células se sembraron (Pasaje 0 (P0)) en cajas de cultivo de acuerdo con el cuadro 1. Las cajas estuvieron previamente tratadas con Fibronectina (0.5 mg/mL) y Poli-L- Ornitina (0.01%), y fueron incubadas a 37°C toda la noche.

Tabla 1. Número de células sembradas por volumen total de la caja de cultivo.

Caja de cultivo	Volumen total	No. de Células viables
p60	3.0 mL	8×10^5
p30	1.5 mL	5×10^5 /pozo
4 pozos	0.5 mL/pozo	1.5×10^5 /pozo

Se complementó con medio DMEM-F12 para obtener el volumen necesario y se suplementó con FGF2 20 μ g/mL, EGF 20 μ g/mL y B27 al 2%, diariamente. El cambio de medio se realizó cada tercer día.

Se realizó el pase de células (P1) cada 4 días aproximadamente o cuando alcanzaron una confluencia de alrededor del 90%. Para ello, se retiró el medio de cultivo de las cajas y se agregó 1 mL de PBS para lavar las células, teniendo cuidado de no despegarlas. Enseguida, se retiró el PBS y se agregaron 500 μ L de accutasa para una caja p60 (300 μ L para una p30), la caja se incubó de 3 a 5 min a 37°C. Si al cabo de este tiempo no se habían despegado todas las células, se añadió 1 mL de medio DMEM-F12 y se enjuagó la caja con la pipeta para despegar completamente las células. Las células se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL en dónde se añadieron 5 mL de medio DMEM-F12 para inactivar la accutasa y se centrifugó 5 minutos a 150 g. Una vez centrifugado, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de células en 1 mL de medio DMEM-F12. Finalmente se contaron las células y se sembraron en cajas nuevas como se indica anteriormente.

6.2 Caracterización de los vectores de expresión pHAGE-Dp71d Δ 71 y pHAGE-Dp71d Δ 71-74

6.2.1 Amplificación por PCR de la región codificante de los plásmidos de expresión

Se amplificó la región codificante de los plásmidos pHAGE-Dp71d Δ 71 y pHAGE-Dp71d Δ 71-74 (construidos por Kevin Duarte en el Instituto de Neurociencias de la Universidad Paris Sur, Francia), para corroborar la presencia de la secuencia codificante para las isoformas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 en los vectores de expresión

pHAGE mediante la técnica de PCR. Para ello, se preparó una mezcla de reacción con 5 µL de Buffer PCR 10X, 3.5 µL de MgCl₂ 25 mM, 1.0 µL de mix de dNTPs (2 mM cada uno), 0.3 µL de Taq DNA Polimerasa (2 U/µL), 1.5 µL (200 ng/µl) de cada uno de los primers específicos para la caracterización de Dp71: rDp71F (ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACG) y rDp71dR (CTACATTGTGTCCTCTCTCATTGGC) (Cuadro 2), 1.0 µg del producto a amplificar y se ajustó a un volumen de 50 µL con agua MQ estéril; las condiciones de amplificación empleadas se describen en el Cuadro 2. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.8% a 100 V durante 1.5 horas.

6.2.2 Secuenciación

Se realizó la secuenciación automática de los fragmentos de las isoformas de Dp71 presentes en los vectores de expresión, en el laboratorio de secuenciación del Departamento de Genética y Biología Molecular, mediante el uso del kit PRISMTM Ready Reaction DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Se prepararon reacciones con 8 µl del mix de reacción Terminator Ready Reaction Mix que contiene AmpliTAQ DNA Polimerasa FS, dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dUTP), ddNTPs (A-terminador con colorante dicloro-R6G, C-terminador con colorante dicloro-ROX, G-terminador con colorante dicloro-R110, T-terminador con colorante dicloro-TAMRA), MgCl₂ y Buffer Tris-HCl pH 9.0; se añadieron 500 ng de DNA, 800 ng de cada primer (Cuadro 2) y se ajustó cada reacción a un volumen de 20 µl con agua MQ estéril. La reacción se llevó a cabo en un termociclador y los productos obtenidos se precipitaron con 80 µl de isopropanol al 75%, incubando 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugando a 14,000 rpm durante 20 minutos. La pastilla obtenida se lavó con 250 µl de isopropanol al 75% centrifugando 8 minutos a 14,000 rpm. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se secó la pastilla en un secador de vacío durante 15 minutos a 30°C. Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando el programa Clustal Omega de EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

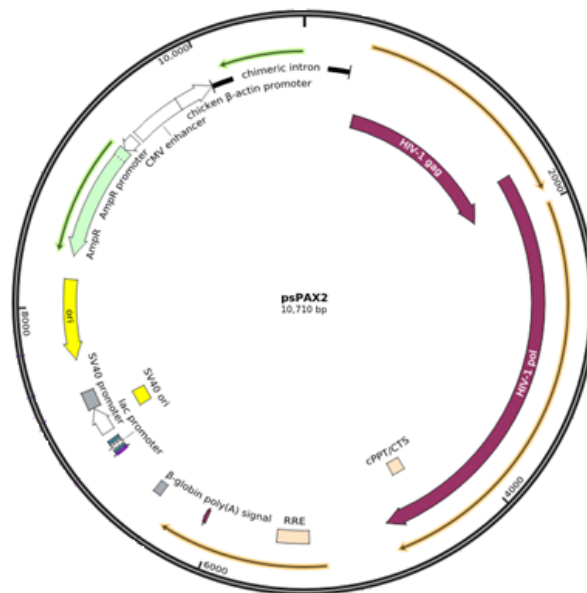
Tabla 2. Secuencia de los iniciadores empleados en los diversos ensayos de PCR, región que se amplifica, tamaño del producto y condiciones de reacción.

DNA amplificado	Iniciador	Secuencia	Región que se amplifica	Tamaño del producto de PCR	Condiciones
Dp71d_{Δ71} y Dp71d_{Δ71-74}	rDp71F	ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACG	Exón 1	1,812 pb y 1,521 pb, respectivamente	95 °C/5 min, 95 °C/30 s y 68 °C/3 min, 35 ciclos y 72° C/5 min.
	rDp71dR	CTACATTGTGTCCTCTCTCATTGGC	Exón 79		
Dp71d_{Δ71} y Dp71d_{Δ71-74} secuenciación	rDp71F	5'ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACG	Exón 1	-----	94°C/5min, 94°C/30s, 55°C/30s, 60°C/4min, 40 ciclos y 72°C/7min.
	rEx69F	5' CATGGTAGAGTACTGCACTCCG	Exón 69		
	Ex67F	CAGTTGGGTGAAGTTGCCTCCTTTG	Exón 67		
	rEx75R	5' AGGAGACGGCAGTGGGGACAG	Exón 75		
	rEx77F	5' CCTTCCCTAGTTCAAGAG	Exón 77		
rEx79R	5'TTATTCTGCTCCTTCTTCATCTGTCATGACTG	Exón 79			

6.3 Producción de lentivirus recombinantes que expresan la proteína GFP y las isoformas Dp71d_{Δ71} y Dp71d_{Δ71-74}

Se colocaron las células HEK293 en una botella ventilada de 25 cm², en una relación de 15x10⁶ células/25 cm² (Día 1). A los dos días posteriores (Día 3), cuando las células alcanzaron una confluencia del 80%, se inició la transfección. Para ello se preparó en un primer tubo, una mezcla (mezcla de DNA) de 200 μL de Optimem (Gibco), 2.4 μg de psPAX2 (Cat. #12260), 1.2 μg de pCMV-VSG-G (Cat. #8454) y 1.8 μg de los vectores lentivirales (pHAGE-GFP, pHAGE-Dp71d_{Δ71}, pHAGE-Dp71d_{Δ71-74} o pLenti CMV GFP Cat. #1744).

a)



b)



c)

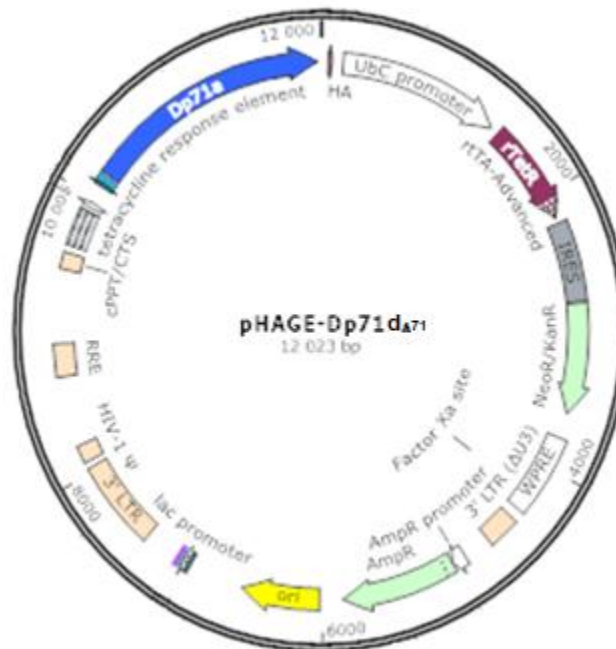


Figura 14. Mapa genético de los plásmidos utilizados para la producción de partículas lentivirales. a) Plásmido de empaquetamiento (psPAX2) b) Plásmido de envoltura (pMD2-VSV-G) y c) Plásmido de expresión pHAGE-Dp71d Δ 71, que codifica para la isoforma Dp71d Δ 71 unida al epítipo Myc; el vector de expresión pHAGE es un plásmido modificado, que una vez insertado en el genoma de la célula blanco regula la inducción de la expresión del inserto. La expresión del inserto opera mediante el sistema Tet-On, que es un sistema de regulación que permite la activación de expresión de genes mediante la adición de antibióticos de la familia de la tetraciclina (por ejemplo, Doxiciclina) (Das et al., 2016).

En un segundo tubo, se preparó la mezcla de 200 μ L de Optimem (Gibco) y 15 μ L de Lipofectamina 2000. Esta última mezcla se incubó 5 min a temperatura ambiente. Una vez incubada, la mezcla de DNA se adicionó a la mezcla de Lipofectamina 2000 (mezcla de transfección) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, en seguida se completó el volumen a 1 mL con Optimem y se incubó 5 min a temperatura ambiente.

El medio de crecimiento de las células HEK293 se reemplazó por 4 mL de DMEM-Glutamax + 10% FBS fresco a temperatura ambiente y una vez incubada la mezcla de transfección, ésta se depositó en el frasco (frasco transfectado), dejando caer sobre la pared contraria y mezclando suavemente sobre la base. Las células del frasco transfectado se dejaron en recuperación, incubando durante 7 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se revisaron las células al microscopio para verificar que estuvieran bien (forma estrellada y adheridas) y se cambió el medio de transfección por 5 mL del medio de proliferación de las CTPN (DMEM-F12) fresco y sin factores de crecimiento. Al transcurrir aproximadamente 15 h, se realizó la primera cosecha, deslizando suavemente el sobrenadante por las paredes de un tubo falcón y se almacenó a 4 °C. Una vez recolectado el primer sobrenadante se añadieron 5 mL de medio de cultivo fresco para realizar otra cosecha. Se realizó la segunda cosecha de la misma forma, aproximadamente 10 h después de haber colectado la primera y esta se almacenó a 4 °C. Se añadieron nuevamente 5 mL de medio de cultivo fresco para realizar una última cosecha.

Finalmente, se realizó la tercera cosecha de la misma forma aproximadamente 15 h después de haber colectado la segunda, para tener un volumen total de 18 mL. El sobrenadante total recolectado, que contiene los virus, se filtró con pirinola de 0.45 μ m para eliminar los restos celulares.

6.3.1 Determinación de la capacidad de infección de las partículas lentivirales recombinantes

Para poder establecer un método de infección de las células blanco (CTPN embrionarias), fue necesario probar primeramente la capacidad de infección de las partículas lentivirales producidas utilizando a las células HEK293 como modelo celular. Es por ello que se infectaron células HEK293 en pozos de 13 mm utilizando diferentes proporciones de partículas lentivirales (que expresan la proteína GFP), respecto al medio de crecimiento (1:1, 2:1, 3:1) durante 72 h y se llevó a cabo la inducción de la expresión de la proteína GFP con doxiciclina (1 µg/ml) durante 48 h.

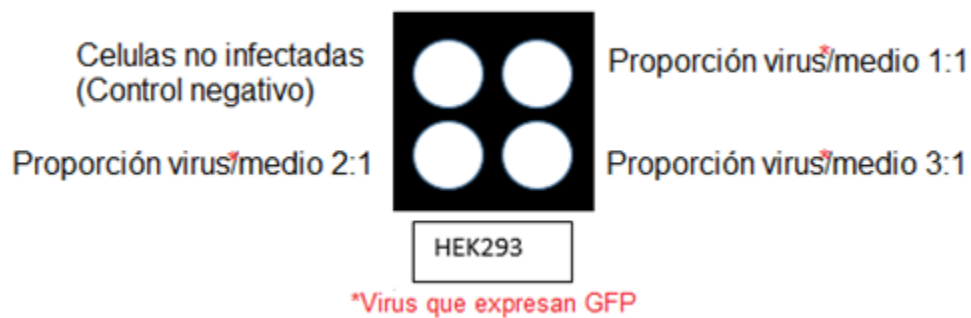


Figura 15. Evaluación de la capacidad de infección de las partículas virales recombinantes que expresan GFP en HEK293.

Trascurrido ese tiempo, se observaron los pozos en un microscopio de epifluorescencia y con base en la marca GFP se eligió la proporción de virus que tuviera una mejor marca para posteriormente infectar a las células blanco.

6.4 Infección de CTPN embrionarias con las partículas lentivirales recombinantes

La infección de las CTPN embrionarias se realizó cuando el cultivo alcanzó una confluencia del 60%, para ello, se añadió al medio de crecimiento fresco de las células adheridas, las partículas virales purificadas que expresan la proteína GFP

en la proporción que resulto mejor en la prueba de capacidad de infección (proporción 1:1 virus/medio) y se indujo la expresión de la proteína GFP con Doxiciclina (1 µg/ml) hasta observar marca de fluorescencia en el microscopio de epifluorescencia. Las células infectadas se seleccionaron por medio de la resistencia a una dosis específica de geneticina. Para seleccionar esta dosis, se sembraron CNTP embrionarias en pozos de 1.5 mL recubiertos con Poliornitina. Estas células se cultivaron con medio DMEM-F12, factores de crecimiento y geneticina en diferentes concentraciones (3.75, 7.5, 15, 30 y 60 ng/mL) durante 8 días. Transcurrido este tiempo, las células se cosecharon y se cuantificaron en cámara de Neubauer, para ello se utilizaron 10 µl de las células cosechadas mezcladas con 10 µl de azul tripáno, esta mezcla se colocó en la cámara y se observó con el objetivo 40x del microscopio de inversión y se contabilizaron las células viables en los cuatro cuadrantes grandes de las esquinas de la cámara, enseguida se calculó el número de células con la siguiente fórmula:

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

Posteriormente se calculó el porcentaje de viabilidad utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{\# \text{ células viables}}{\# \text{ células totales}} (100)$$

Finalmente se graficó el porcentaje de viabilidad respecto a la dosis de geneticina y se seleccionó aquella dosis en que se alcanzó la mortalidad del 80% de la población celular en 8 días.

6.5 Western blot

Las células se lavaron agregando PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4) en la caja de cultivo y realizando movimientos delicados para evitar despegarlas. Posteriormente se removió el PBS empleado y se adicionó nuevo, y con una espátula se raspó la caja de cultivo para despegar las células. Enseguida, se recuperó la mezcla con una pipeta colocándola en un tubo para centrifuga y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en buffer de extracción frío con inhibidores de proteasas (Tris HCl 250mM, EDTA 1mM, pH 8.0, cóctel de inhibidores de proteasas al 1X de Roche Inc.). La mezcla se incubó 30 min en hielo, y después se clarificó el lisado, centrifugando a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante (o mezcla de proteínas) se transfirió a un tubo nuevo.

Finalmente, a la mezcla de proteínas, se le adicionó buffer de muestra (Tris HCl 75mM, SDS 15%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 5%, Azul bromofenol 0.001%), se hirvió durante 5 min y se conservó a -20 °C para la electroforesis.

Se preparó la solución del gel SDS (Acrilamida 29.2%, Bisacrilamida 0.8%, Trizma 1.5 M, Tris-base, H₂O, SDS 10%, APS 10%, TEMED) a la concentración deseada (8-10%) y se agregó en la cámara formadora del gel, evitando la formación de burbujas de aire. Una vez solidificado, el gel se removió de la cámara formadora y se colocó sobre la cámara de electroforesis que ya contenía el buffer de corrida 1X (Trizma, SDS y glicina). Este regulador debió cubrir completamente al gel. Una vez conectada la cámara de electroforesis a la corriente eléctrica, se agregaron tanto las muestras problema como el marcador de peso sobre los pozos y se corrió el gel con un voltaje bajo (≈100 V) durante aproximadamente 40 min o hasta antes de que el colorante rebase el borde inferior del gel. Para llevar a cabo la transferencia, se utilizó papel filtro y esponja, impregnados con el buffer de transferencia, así como una membrana de nitrocelulosa, las muestras corridas en el gel por electroforesis fueron transferidas de de 18-20 h a 70-80 mA. Una vez concluida la transferencia, se bloqueó la membrana con una solución de leche baja en grasa al 5%+TBS-T

durante 2 h. Posteriormente se enjuagó la membrana con TBS-T y se incubó con los anticuerpos primarios: mAb anti Myc, pAb anti GFP, mAb anti- β -actina durante 18-24 hrs a 4°C. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó tres veces con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón IgG (A10668) o cabra anti-conejo IgG (A10547) conjugado con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se volvió a lavar la membrana tres veces con TBS-T y se reveló en un cuarto oscuro, para la detección de las bandas inmunorreactivas se utilizó el sistema Western Lightning ECL-Plus (Perkin-Elmer, Inc.)

6.6 Inmunofluorescencia

Se crecieron las CTPN embrionarias sobre cubreobjetos pretratados con poli-L-ornitina y fibronectina. Posteriormente las células se mezclaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 2 min, seguido de PFA al 2% durante 20 min adicionales. Enseguida, se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con suero de gelatina en PBS, durante 1 h. Las células se incubaron 24 h a 4 °C con los anticuerpos primarios diluidos en PBS+ suero de cabra normal al 10%: mAb anti myc y pAb anti GFP, y se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG Alexa Fluor 488 (A21202) o anti-conejo IgG Alexa Fluor 594 (A21207). Se realizaron lavados con PBS para remover entre cada paso las soluciones de anticuerpos. Finalmente se tiñeron los núcleos de las células con DAPI (10 ng/mL, Sigma).

El montaje se realizó con el medio de montaje Vectashield (Vector laboratories, Inc.), y las muestras se observaron con un objetivo de inmersión de aceite 63X en un microscopio Leica de epifluorescencia unido a un sistema confocal (Leica) utilizando los filtros apropiados. De cada imagen, se escanearon 10-15 secciones z ópticas (0.4 μ m de espesor) y se seleccionaron secciones representativas para obtener la distribución de las diferentes proteínas en las CTPN. Las imágenes se analizaron utilizando el software Leica Application Suite AF (Leica).

Tabla 3. Lista de anticuerpos utilizados en Western Blot e Inmunofluorescencia.

	Anticuerpo	Dilución
Anticuerpos primarios	Monoclonal de ratón anti Myc	1:400 WB 1:200 IF
	Polyclonal de conejo anti-GFP	1:200 WB 1:100 IF
	Monoclonal de ratón anti-actina	1:300 WB
Anticuerpos secundarios	Cabra anti-ratón IgG conjugado con peroxidasa (A10668)	1:10,000 WB
	Cabra anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa (A10547)	1:10,000 WB
	Alexa Fluor 488 anti-conejo IgG (A21202)	1:300 IF
	Alexa Fluor 594 Anti-ratón IgG (A21207)	1:200 IF

IF: inmunofluorescencia, WB: Western blot

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento y cultivo de células troncales y progenitoras neurales (CTPN) embrionarias

Se realizó el cultivo primario de células troncales y progenitoras neurales en repetidas ocasiones con la finalidad de estandarizar el proceso de cultivo de las aisladas de la región dorso medial de las vesículas telencéflicas de embriones de rata Wistar (E14).

Los cultivos primarios se realizaron en el laboratorio de acuerdo con lo descrito en la sección de materiales y métodos. Se empleó el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM F12), que es un medio basal que permite el cultivo de células troncales y progenitoras neurales, manteniendo sus propiedades de auto renovación y multipotencialidad.

Tabla 4. Características de los cultivos primarios de CTPN embrionarias.

Fecha de la solicitud de animales	Cantidad solicitada	Especificaciones	Fecha de inicio del cultivo	Total de embriones	Células obtenidas	Observaciones
04-sep-19	2	Rata(s) Wistar hembra(s) a la(s) que se le(s) midio impedancia/posible(s)	18-sep-19	23	20,000,000	Las células cultivadas presentaron una morfología diferente a la esperada, su proliferación fue lenta y no sobrevivieron al 1er pasaje.
03-oct-19	1	gestante(s)	17-oct-19	12	3,800,000	Las células parecían proliferar, sin embargo, al paso de una semana comenzaron a morir.
13-nov-19	1		27-nov-19	11	7,200,000	Las células proliferaron adecuadamente, y sobrevivieron el primer pasaje.

7.2 Caracterización de los vectores de expresión pHAGE-Dp71d_{Δ71} y pHAGE-Dp71d_{Δ71-74} y producción de lentivirus recombinantes que expresan la proteína GFP y las isoformas Dp71_{Δ71} y Dp71_{Δ71-74}

7.2.1 Amplificación por PCR de la región codificante de los plásmidos de expresión pHAGE-Dp71d_{Δ71} y pHAGE-Dp71d_{Δ71-74}

Como se ha descrito anteriormente, para lograr la sobreexpresión de las isoformas Dp71d_{Δ71} y Dp71d_{Δ71-74} se produjeron partículas lentivirales utilizando tres plásmidos: un plásmido de envoltura (pMD2-VSV-G), un plásmido de empaquetamiento (psPAX2) y tres plásmidos de expresión pHAGE-Dp71d_{Δ71}, pHAGE-Dp71d_{Δ71-74} y pHAGE-GFP que codifican para las isoformas, Dp71d_{Δ71}, Dp71d_{Δ71-74} y GFP, respectivamente. Antes de comenzar la producción de partículas lentivirales, se corroboró la presencia de las secuencias correspondientes a las isoformas en los vectores pHAGE-Dp71d_{Δ71} y pHAGE-Dp71d_{Δ71-74} por medio de PCR. Para esto se amplificó la región codificante de cada uno de los vectores de expresión utilizando los iniciadores rDp71F y rEx79R que en conjunto amplifican desde el exón 1 hasta el exón 79 de las isoformas del grupo Dp71d.

Los productos de PCR se corrieron por electroforesis en geles de agarosa para visualizar los productos obtenidos en la reacción. En la Figura 16 se aprecia un fragmento de DNA de 1,812 pb (a) que corresponde a la secuencia codificante de la isoforma Dp71d_{Δ71} y dos fragmentos de DNA de 1521 pb que corresponden a las secuencias codificantes de la isoforma Dp71d_{Δ71-74} de dos diferentes clonas, clona 9 (b) y clona 17 (c).

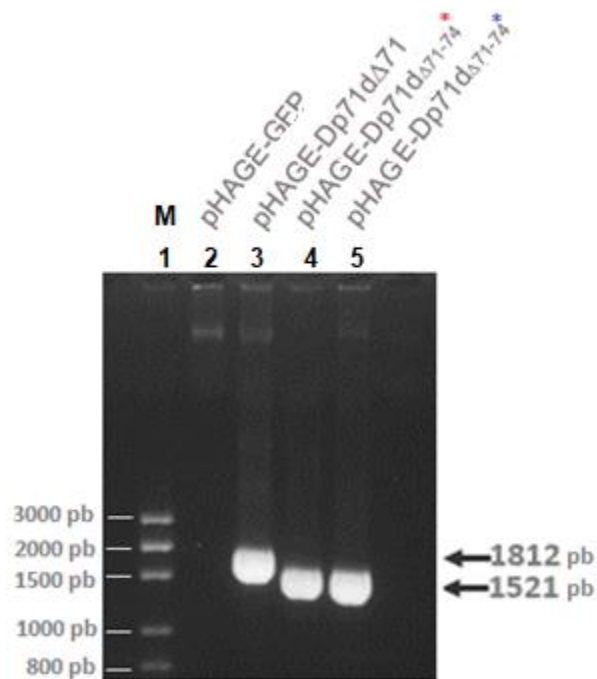


Figura 16. Caracterización de los vectores pHAGE-Dp71d Δ 71 y pHAGE-Dp71d Δ 71-74 por medio de PCR. Se llevó a cabo la amplificación de las secuencias de Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 y los productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.8%. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (M)Ladder (100 pb-3000 pb). En el segundo carril no se observa algún fragmento de DNA. En el tercer carril se aprecia el fragmento de cDNA de 1,812 pb correspondiente a la secuencia de Dp71d Δ 71. En el cuarto carril se muestra el fragmento de cDNA de 1,521 pb correspondiente a la secuencia de Dp71d Δ 71 clona 9* y en el quinto carril el fragmento de cDNA de 1,521 pb correspondiente a la secuencia de Dp71d Δ 71 clona 17*.

7.2.2 Secuenciación de los plásmidos de expresión pHAGE-Dp71d Δ 71 y pHAGE-Dp71d Δ 71-74

Para corroborar que las secuencias de las isoformas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 fueran correctas, se secuenciaron los plásmidos pHAGE-Dp71d Δ 71 y pHAGE-Dp71d Δ 71-74, mediante una secuenciación automática tipo Sanger. Los resultados de la secuenciación se analizaron por alineamiento con las secuencias de Dp71d Δ 71 (NM_012698.3) y Dp71d Δ 71-74 (NM_001005246.1) de *Rattus norvegicus* reportadas en NCBI, utilizando los programas ClustalX y Chromas. En las Figuras 17 y 18 se

muestran los alineamientos de las secuencias de Dp71d_{Δ71} y Dp71d_{Δ71-74}. Los resultados indican que las secuencias presentes en los plásmidos pHAGE-Dp71d_{Δ71} y pHAGE-Dp71d_{Δ71-74} corresponden a la región codificante de las isoformas Dp71d_{Δ71} y Dp71d_{Δ71-74} de *Rattus norvegicus*, respectivamente.

a)

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

NM_012898.3          ATCAGCCGACACCTCARRGC CCACGACACCCAAACACCTTGGTTGGGACCATCCCAAATG
pHAGE-Dp71dΔ71      ATGAGGGGACACCTCARRGGCCACGGACCCCAAACACCTTGGTTGGGACCATCCCAAATG
*****

NM_012898.3          ACAGAGCTCTACCAGTCTTTAG CTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGACT
pHAGE-Dp71dΔ71      ACAGAGCTCTACCAGTCTTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGACT
*****

NM_012898.3          GCCATGARAGCTCAGAAGACTCCAGAGGCCCTTTGCT TGGATCTCTTGGAGCCTGTCAGCT
pHAGE-Dp71dΔ71      GCCATGARAGCTCAGAAGACTCCAGAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGGAGCCTGTCAGCT
*****

NM_012898.3          GCATGTGACGCCCTTGGACCGGCACAACCTCARGCRAAATGATCAGGCCATGGATATCCTG
pHAGE-Dp71dΔ71      GCATGTGACGCCCTTGGACCGGCACAACCTCARGCRAAATGATCAGGCCATGGATATCCTG
*****

NM_012898.3          CAGATAATTAACCTGTTTGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGGCACAACAATTTG
pHAGE-Dp71dΔ71      CAGATAATTAACCTGTTTGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGGCACAACAATTTG
*****

NM_012898.3          GTCAAATGTCCCTCTCTGTGTGGATA TGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATAC
pHAGE-Dp71dΔ71      GTCAAATGTCCCTCTCTGTGTGGATA TGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATAC
*****

NM_012898.3          GGACGARACAGGGAGGATCCCGTGTCCCTGCT TTTAAAATGGCATTCTTTCTGTGTGTAAR
pHAGE-Dp71dΔ71      GGACGARACAGGGAGGATCCCGTGTCCCTGCT TTTAAAATGGCATTCTTTCTGTGTGTAAR
*****

NM_012898.3          GCACACTGGAAAGACAAAGTACAGATACCTTTTTCARAGCAAGTGGCCRAATTCAAACCGGCTTT
pHAGE-Dp71dΔ71      GCACACTGGAAAGACAAAGTACAGATACCTTTTTCARAGCAAGTGGCCRAATTCAAACCGGCTTT
*****

NM_012898.3          TGTGACCCAGCCGTAGACTGGGTCTTCTCTTCTGCATGATTCATTCRAATCCCAAGACAGTTG
pHAGE-Dp71dΔ71      TGTGACCCAGCCGTAGACTGGGTCTTCTCTTCTGCATGATTCATTCRAATCCCAAGACAGTTG
*****

NM_012898.3          GGTCAAGTTGCCCTCCTTTGGGGGCACTAACATTCAGCCGAGTCTCAGGAGCCTGTTCCAG
pHAGE-Dp71dΔ71      GGTCAAGTTGCCCTCCTTTGGGGGCACTAACATTCAGCCGAGTCTCAGGAGCCTGTTCCAG
*****

NM_012898.3          TTTGCCAATAATAAACCTGAGATTGAAGCCGCTCTCTCTCTGACTGGATGGCTGTGGAA
pHAGE-Dp71dΔ71      TTTGCCAATAATAAACCTGAGATTGAAGCCGCTCTCTCTCTGACTGGATGGCTGTGGAA
*****

NM_012898.3          CCCCAGTCTATGGTGTGGCTGCCGGTCTTTGCACAGAGTGGCTGCTGCTGAACAGCCCAAG
pHAGE-Dp71dΔ71      CCCCAGTCTATGGTGTGGCTGCCGGTCTTTGCACAGAGTGGCTGCTGCTGAACAGCCCAAG
*****

```

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{v1}
CTACAGAAC
 CATCAGGCCAAGTGTAAACATCTGTAAGGAGTGTCCAAATCATTGGATTCAAGGTACAGAGC

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{v1}
CTGAARCACTTTAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTARG
 CTGAARCACTTTAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTARG

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{v1}
GGCCATAAAATGCACCTACCCCATGCTAGAGTACTGCACCTCCGACTACATCTGGAGAGAT
 GGCCATAAAATGCACCTACCCCATGCTAGAGTACTGCACCTCCGACTACATCTGGAGAGAT

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{v1}
GTTGCTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAACAAATTTGGAAACAAAGGATTTTTGGGAG
 GTTGCTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAACAAATTTGGAAACAAAGGATTTTTGGGAG

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{v1}
CATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAAACATGGAAAC
 CATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAAACATGGAAAC

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{v1}
CCTGCCCTCGTCCCCCCAGCTTTCCACCCGATGATACTCATTCCAGCATTGACCAATTA
 CCTGCCCTCGTCCCCCCAGCTTTCCACCCGATGATACTCATTCCAGCATTGACCAATTA

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{v1}
GCTAGCAGGCTAGCAGAAATGCAAAACAGCAATGCATCTTATCTAARTGATAGCATCTCT
 GCTAGCAGGCTAGCAGAAATGCAAAACAGCAATGCATCTTATCTAARTGATAGCATCTCT

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{v1}
CCTAATGAGACCTAGATGATGAACATTTGTTAATCCAGCATTACTGCCAAAGTTTGARC
 CCTAATGAGACCTAGATGATGAACATTTGTTAATCCAGCATTACTGCCAAAGTTTGARC

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{v1}
CAGGACTCCCCCCTGAGCCAGCCCTGCTAGTCCCTGCCACATCTTGATTTCTTTAGAGAGT
 CAGGACTCCCCCCTGAGCCAGCCCTGCTAGTCCCTGCCACATCTTGATTTCTTTAGAGAGT

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{v1}
GAGGAAAGAGCCGAGCTAGACAGAAATCCTAGCCAGTCTTTGAGGAAAGAAACAGAAATCTG
 GAGGAAAGAGCCGAGCTAGACAGAAATCCTAGCCAGTCTTTGAGGAAAGAAACAGAAATCTG

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{v1}
CAAGCAGAAATATGATCGTCTGAAACAGCAGCATGAGCATAAAGGCCCTGTCCCCACTGCCG
 CAAGCAGAAATATGATCGTCTGAAACAGCAGCATGAGCATAAAGGCCCTGTCCCCACTGCCG

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{v1}
TCTCCTCCTGAGATGATGCCCACTCTCCCCAGAGTCCCAGGGATGCTGAACTCATTTGCT
 TCTCCTCCTGAGATGATGCCCACTCTCCCCAGAGTCCCAGGGATGCTGAACTCATTTGCT

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{v1}
GAGGCCAAGCTACTGCCCCACACAAAGCCAGCTCTGAAAGCCAGGATGCAAAATCCTGGAR
 GAGGCCAAGCTACTGCCCCACACAAAGCCAGCTCTGAAAGCCAGGATGCAAAATCCTGGAR

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{v1}
GACCCCAATAAACAACTGGAGTCTCAGTTACATAGACTGAGCCAGCTCCTGGAGCAA
 GACCCCAATAAACAACTGGAGTCTCAGTTACATAGACTGAGCCAGCTCCTGGAGCAA

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{Δ71}

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{Δ71}

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{Δ71}

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{Δ71}

NM_012898.3
pHAGE-Dp71d_{Δ71}

b)



Figura 17. Alineamiento de la secuencia de Dp71d_{Δ71} codificada por el plásmido pHAGE-Dp71d_{Δ71}. a) Alineamiento de las secuencias del exón 1al 79. Cada color resalta la secuencia de cada uno de los diferentes exones. b) Representación esquemática de los exones de Dp71d_{Δ71}. Cada rectángulo simboliza a un exón, y el color corresponde al mismo que resalta la secuencia de cada uno de ellos en el alineamiento.

a)

NM_012698.3
Dp71da71-74
ATGAGGGACACCTCAAAGGCCACGAGACCCAAACAACTTGTGGGACCATCCCCAAATG
ATGAGGGACACCTCAAAGGCCACGAGACCCAAACAACTTGTGGGACCATCCCCAAATG

NM_012698.3
Dp71da71-74
ACAGAGCTCTACCAGTCTTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGACT
ACAGAGCTCTACCAGTCTTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGACT

NM_012698.3
Dp71da71-74
GCCATGAAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGGACCTGTCAGCT
GCCATGAAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGGACCTGTCAGCT

NM_012698.3
Dp71da71-74
GCATGTGACGCCCTTGGACCAGCACAACTCAAGCAAATGATCAGCCCATGGATATCCTG
GCATGTGACGCCCTTGGACCAGCACAACTCAAGCAAATGATCAGCCCATGGATATCCTG

NM_012698.3
Dp71da71-74
CAGATAATTAAGTGTGGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAAGGCACAAATTTG
CAGATAATTAAGTGTGGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAAGGCACAAATTTG

NM_012698.3
Dp71da71-74
GTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATAC
GTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATAC

NM_012698.3
Dp71da71-74
GGACGAAACAGGAGGATCCGTGTCTCTTTTAAACTGGCATCATTTCTCTGTGTAA
GGACGAAACAGGAGGATCCGTGTCTCTTTTAAACTGGCATCATTTCTCTGTGTAA

NM_012698.3
Dp71da71-74
GCACACTTGGAAACAACTACAGATACCTTTTCAAGCAAAGTGGCAAAGTTCAACCGGCTTT
GCACACTTGGAAACAACTACAGATACCTTTTCAAGCAAAGTGGCAAAGTTCAACCGGCTTT

NM_012698.3
Dp71da71-74
TGTGACCAGCGTAGACTGGGTCTTCTTCTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTTG
TGTGACCAGCGTAGACTGGGTCTTCTTCTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTTG

NM_012698.3
Dp71da71-74
GGTGAAGTTGCCCTCCTTTGGGGGAGTAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTCCAG
GGTGAAGTTGCCCTCCTTTGGGGGAGTAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTCCAG

NM_012698.3
Dp71da71-74
TTTCCCAATAATAAACCTGAGATTGAAGCCGCTCTCTTCTTCACTGGATCCGTCTGGA
TTTCCCAATAATAAACCTGAGATTGAAGCCGCTCTCTTCTTCACTGGATCCGTCTGGA

NM_012698.3
Dp71da71-74
CCCCAGTCTATGGTGTGGCTGCCCGCTTTGCACAGAGTGGCTGCTGCTGAACACAGCCAA
CCCCAGTCTATGGTGTGGCTGCCCGCTTTGCACAGAGTGGCTGCTGCTGAACACAGCCAA

NM_012698.3
Dp71da71-74
CATCAGCCCAAGTGTAAACATCTGTAAAGGAGTGTCCAATCATTCGATTCAGCTACAGAAGC
CATCAGCCCAAGTGTAAACATCTGTAAAGGAGTGTCCAATCATTCGATTCAGGTTACAGAAGC

NM_012698.3
Dp71da71-74
CTGAACACTTTAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTCTGGCCGAGTTCCTAAG
CTGAACACTTTAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTCTGGCCGAGTTCCTAAG

NM_012698.3
Dp71da71-74
GGCCATAAAATGCCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCCACTCCGACTACATCTGGAGAGAT
GGCCATAAAATGCCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCCACTCCGACTACATCTGGAGAGAT

NM_012698.3
Dp71da71-74
GTTCCGTGACTTTGCCAAGGTAAGTGAATAACAATTTCCAAACCAAAAGGTATTTTGGGAGC
GTTCCGTGACTTTGCCAAGGTAAGTGAATAACAATTTCCAAACCAAAAGGTATTTTGGGAGC

NM_012698.3
Dp71da71-74
CATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGCAACATGGAAACG
CATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGCAACATGGAAACG

NM_012698.3
Dp71da71-74
AAATCTGCAAGCAGAATATGATCGTCTGAAGCAGCAGCATGAGCATAAAGGCCCTGTCCCC
AAATCTGCAAGCAGAATATGATCGTCTGAAGCAGCAGCATGAGCATAAAGGCCCTGTCCCC

NM_012698.3
Dp71da71-74
ACTGCCGTCTCCTCCTGAGATGATGCCACCTCTCCCCAGAGTCCCAGGGATGCTGAAC
ACTGCCGTCTCCTCCTGAGATGATGCCACCTCTCCCCAGAGTCCCAGGGATGCTGAAC

NM_012698.3
Dp71da71-74
CATTGCTGAGGCCAAGCTACTGCGCCAACACARAGGACGCTCTGGAGCCAGGATGCAAA
CATTGCTGAGGCCAAGCTACTGCGCCAACACARAGGACGCTCTGGAGCCAGGATGCAAA

NM_012698.3
Dp71da71-74
CCTGGAGACCACAAATAAACAACTGGAGTCTCAGTTACATAGACTGAGCCAGCTCCTGG
CCTGGAGACCACAAATAAACAACTGGAGTCTCAGTTACATAGACTGAGCCAGCTCCTGG

NM_012698.3
Dp71da71-74
AGCAAACCCAGGCTGAGGCCAAGGTGAATGGCACCACGGTGTCTCTCCTTCTACCTCGCT
AGCAAACCCAGGCTGAGGCCAAGGTGAATGGCACCACGGTGTCTCTCCTTCTACCTCGCT

NM_012698.3
Dp71da71-74
GCAGAGGTCAGATAGCAGTCAAGCTATGCTGCTCCGAGTGGTTGGCAGTCAAACCTCAGA
GCAGAGGTCAGATAGCAGTCAAGCTATGCTGCTCCGAGTGGTTGGCAGTCAAACCTCAGA

NM_012698.3
Dp71da71-74
ATCTATGGCTGAGGAAGATCTTCTGAGTCTCCCCAGGACACAAAGCACAGGCTTAGAAGA
ATCTATGGCTGAGGAAGATCTTCTGAGTCTCCCCAGGACACAAAGCACAGGCTTAGAAGA

NM_012698.3
Dp71da71-74
AGTGATGGAGCAACTCAACAACCTCCTCCCTAGTTCAAGAGCAAGAAATGCCCCCTGGAAA
AGTGATGGAGCAACTCAACAACCTCCTCCCTAGTTCAAGAGCAAGAAATGCCCCCTGGAAA

NM_012698.3
Dp71da71-74 |
GCCAATGAGAGAGGACACAATGTAG
GCCAATGAGAGAGGACACAATGTAG

b)



Figura 18. Alineamiento de la secuencia de $Dp71d_{\Delta71-74}$ codificada por el plásmido pHAGE- $Dp71d_{\Delta71-74}$. a) Alineamiento del exón 1 al exón 79. Cada color resalta la secuencia de cada uno de los diferentes exones. b) Representación esquemática de los exones de $Dp71d_{\Delta71}$. Cada rectángulo simboliza a un exón, y el color corresponde al mismo que resalta la secuencia de cada uno de ellos en el alineamiento.

Una vez comprobada la secuencia de los insertos de las isoformas $Dp71d_{\Delta71}$ y $Dp71d_{\Delta71-74}$ presente en los plásmidos de expresión pHAGE- $Dp71d_{\Delta71}$ y pHAGE- $Dp71d_{\Delta71-74}$, respectivamente, se procedió a producir las partículas virales siguiendo el procedimiento que se describe en el apartado 6.3 de la sección de Materiales y Métodos.

7.2.3 Prueba de la capacidad de infección de las partículas lentivirales

Para poder establecer un método de infección de las CTPN embrionarias, fue necesario probar la capacidad de infección de las partículas lentivirales en el mismo modelo celular en el que se produjeron. Para esto se infectaron células HEK293 en diferentes relaciones virus/medio (1:1, 2:1, 3:1) con las partículas lentivirales que codifican para la proteína GFP, durante 72 h y se indujo la expresión de dicha proteína con Doxiciclina (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 h. Una vez transcurrido este tiempo, las células se observaron en el microscopio de epifluorescencia, y las imágenes obtenidas de fluorescencia y campo claro, de 3 campos diferentes de cada condición, se traslaparon para contar las células que presentaron la marca de GFP (Figura 20). De las imágenes tomadas, se eligió una imagen de campo claro y campo oscuro de cada condición para mostrarla en el presente trabajo (Figura 21). Posteriormente se calculó el porcentaje de transfección con base al número de células que presentan la marca de la proteína GFP respecto al total de células observadas en un campo.

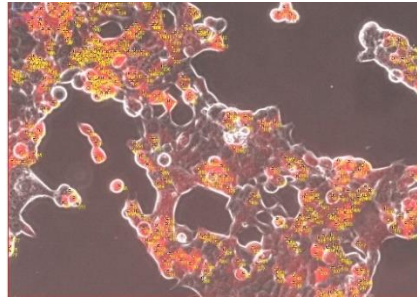


Figura 20. Conteo de células HEK293 que presentan la marca de GFP. Traslape de la imagen de fluorescencia y campo claro de uno de los campos de las células infectadas en relación 1:1 virus/medio con las partículas que expresan la proteína GFP; se muestra una marca en color rojo intenso en las células que fueron infectadas eficientemente. El conteo de células que presentan esta marca fue considerado para el cálculo del porcentaje de transfección de acuerdo a como se describe en la sección de materiales y métodos.

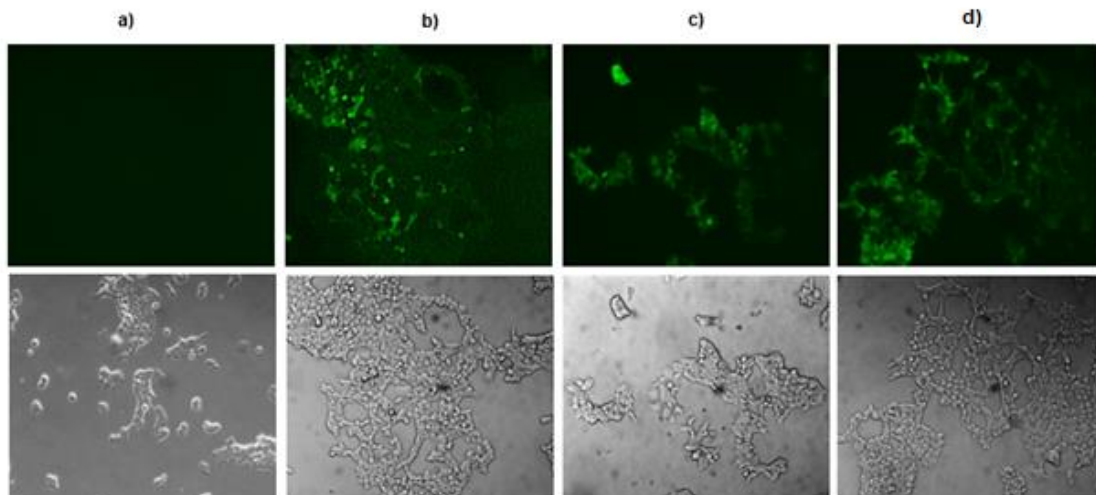


Figura 21. Células HEK293 infectadas con diferentes proporciones de partículas lentivirales GFP respecto al medio. a) Células no infectadas (control negativo). b) Células infectadas en proporción virus medio 1:1. c) Células infectadas en proporción virus/ medio 2:1. d) Células infectadas en proporción virus/ medio 3:1. En la parte superior se observan las imágenes de campo oscuro mientras que en la parte inferior se aprecian las imágenes de campo claro.

El porcentaje de transfección fue de 61%, 65% y 60% para la proporción virus/medio 1:1, 2:1 y 3:1, respectivamente. Tomando en cuenta estos resultados, se eligió la relación virus/medio 1:1 para infectar a las células blanco CTPN embrionarias, ya que, a esta relación se alcanza un porcentaje de infección similar a las otras dos proporciones probadas, para utilizar una menor cantidad de partículas virales.

7.2.3 Expresión las proteínas GFP, Dp71 Δ 71 y Dp71 Δ 71-74 en células HEK293 infectadas con las partículas lentivirales recombinantes

Para comprobar la expresión de las proteínas GFP, Dp71 Δ 71 y Dp71 Δ 71-74 en células HEK293 infectadas con las partículas lentivirales recombinantes, se sembraron 400,000 células HEK293 (80% de confluencia) en cuatro pozos de 1.5 mL. Las células del primer pozo se utilizaron como control negativo (sin infectar), mientras que los tres pozos restantes se infectaron con las partículas lentivirales producidas que expresan las proteínas GFP, Dp71 Δ 71 y Dp71 Δ 71-74, en proporción virus/medio 1:1 durante 72 h y se indujo la expresión de las proteínas con Doxiciclina (1 μ g/ml) durante 48 h. Por otra parte, se sembraron 400,000 células HEK293 en otros tres pozos y se infectaron con las partículas lentivirales recombinantes que expresan las proteínas GFP, Dp71 Δ 71 y Dp71 Δ 71-74 bajo las mismas condiciones, sin embargo, en estas no se indujo la expresión de las proteínas con Doxiciclina. Una vez que las células alcanzaron una confluencia cercana al 95%, se cosecharon, se extrajo proteína y se hizo el análisis de la expresión de las proteínas mediante Western Blot siguiendo el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos.

Los resultados del Western Blot utilizando el anticuerpo anti-Myc muestran la expresión de las isoformas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74, solamente en las células HEK293 infectadas y tratadas con doxiciclina (Figura 22a). Las isoformas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 se expresan unidas al epítotope Myc (bandera que facilita su rastreo), por tal motivo, estos resultados indican que ambas isoformas están siendo expresadas. Mientras que los resultados del Western Blot utilizando los anticuerpos anti-GFP muestran la expresión de la proteína GFP solamente en las células HEK293 infectadas y tratadas con doxiciclina. Por otra parte, los resultados del Western Blot utilizando el anticuerpo anti-actina (Figura 22c y 22d) muestra la expresión de la proteína actina empleada como control de carga.

Estos resultados, en conjunto, muestran que las partículas virales producidas tienen la capacidad de infectar a las células HEK293 exitosamente. Además, se corrobora que la inducción con Doxiciclina es necesaria para lograr la expresión de las proteínas GFP, Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74.

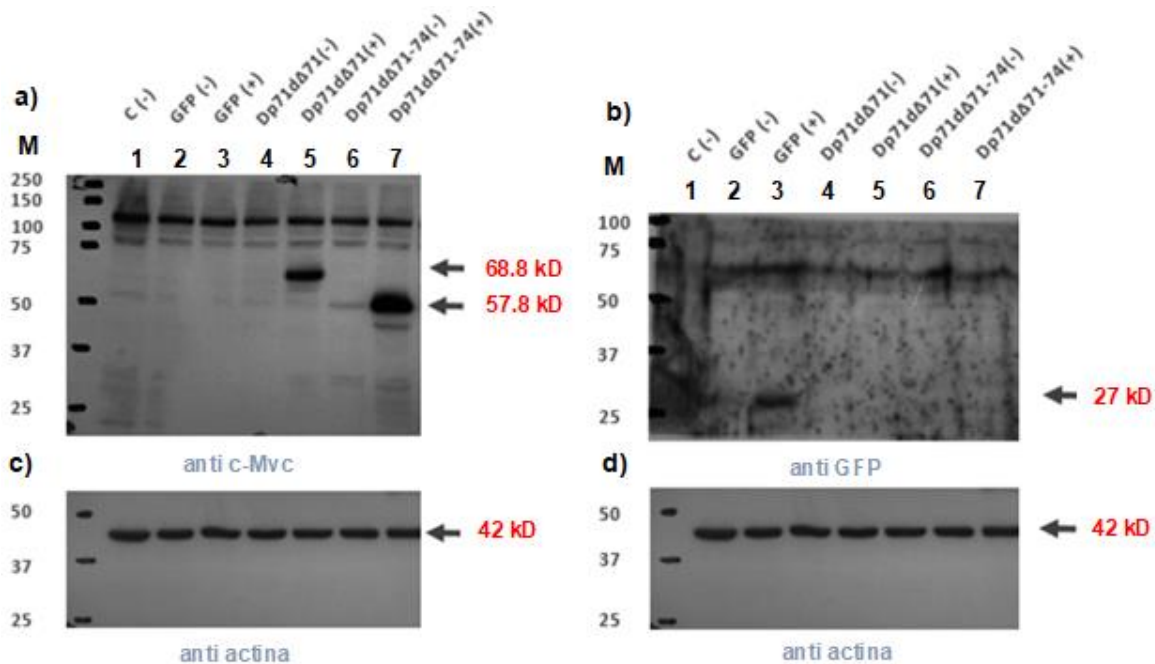


Figura 22. Expresión de las proteínas expresadas en células HEK293. a) Se muestran los resultados del Western Blot utilizando el anticuerpo anti Myc. En esta figura se aprecian 7 carriles, el primero de ellos corresponde a las células HEK293 no infectadas (control negativo), el segundo, cuarto y sexto carril corresponden a las células HEK293 infectadas con las partículas virales que expresan la proteína GFP, Dp71 Δ 71 y Dp71 Δ 71-74, respectivamente, sin inducción con Doxiciclina (-). Mientras que el tercer, quinto y séptimo carril corresponden a las a las células HEK293 infectadas con las partículas virales que expresan la proteína GFP, Dp71 Δ 71 y Dp71 Δ 71-74, respectivamente, con inducción con Doxiciclina (+). b) Resultados del Western Blot utilizando el anticuerpo anti-GFP. En esta figura se aprecian siete carriles que corresponden a las mismas condiciones antes mencionadas. c) y d) resultados del Western Blot utilizando el anticuerpo anti-actina. A la izquierda de cada figura se muestra el marcador de peso molecular(M) en kDa.

7.3 Curva de resistencia a geneticina

Los vectores de expresión pHAGE-Dp71 Δ 71 y pHAGE-Dp71 Δ 71-74 contienen un gen de resistencia a geneticina que permite la selección de las CTPN que fueron infectadas exitosamente y que corresponden a transfectantes estables. Tomando en cuenta esto, fue necesario conocer la dosis de geneticina en la que las células no infectadas (sin el plásmido) no pudieran sobrevivir. Para ello, se cultivaron CTPN embrionarias con medio DMEM-F12, con factores de crecimiento y diferentes concentraciones de geneticina (G418-disulfuro): 3.75, 7.5, 15, 30 y 60 ng/mL durante 8 días, como se indica en Materiales y Métodos. Transcurrido este tiempo

las células se despegaron con accutasa y se contaron en cámara de Neubauer. Con los resultados se elaboró una curva de resistencia a geneticina graficando el porcentaje de viabilidad respecto a la concentración de geneticina, para seleccionar la concentración de dicho antibiótico en la cual se alcanzó la mortalidad del 80% de la población celular. En la Figura 19, se puede apreciar que a la concentración de 60 ng/mL ocurre una mortalidad del 80% de la población celular. Esta concentración fue utilizada para seleccionar a las células infectadas con las partículas virales recombinantes que expresan a las isoformas Dp71 Δ 71 y Dp71 Δ 71-74.

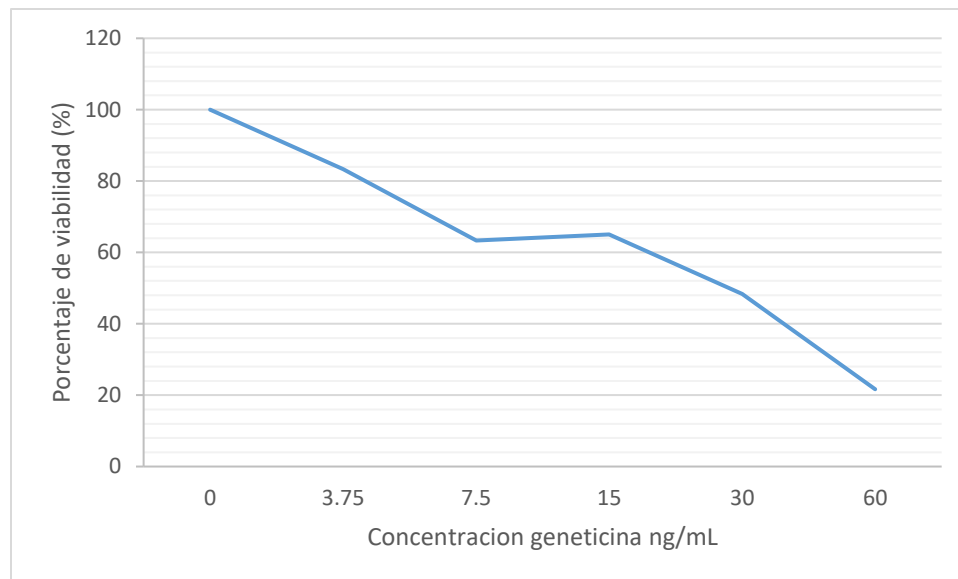


Figura 19. Curva de resistencia a geneticina de las CTPN embrionarias. Se muestra la variación del porcentaje de viabilidad (%) respecto a la concentración de geneticina (ng/mL). Se observa que al aumentar la concentración de geneticina disminuye el porcentaje de viabilidad, además, se aprecia que a la concentración de 60 ng/mL se alcanza el 80% de muerte celular o bien, el 20% de viabilidad.

7.4 Infección de CTPN embrionarias con las partículas lentivirales recombinantes que expresan la proteína GFP

Se sembraron 30,000 CTPN embrionarias en cajas de cuatro pozos y se dejaron crecer con medio DMEM-F12 y factores de crecimiento. Cuando el cultivo alcanzó una confluencia del 60%, las CTPN embrionarias se infectaron con las partículas que expresan la proteína GFP en relación 1:1 virus/medio, durante 72 h y se indujo

la expresión de la proteína GFP durante 48 h, tal y como se indica en el protocolo de infección de las células HEK293. Al transcurrir este tiempo, las células se analizaron en el microscopio de epifluorescencia, sin embargo, no se observó la marca de la proteína GFP. Considerando la observación anterior, se decidió alargar el periodo de inducción hasta observar la marca de fluorescencia de la proteína GFP, para determinar el tiempo de inducción necesario para las células blanco. Para observar la expresión de la proteína GFP en las CTPN embrionarias fue necesario una inducción durante nueve días.

En la Figura 23b se muestran las imágenes obtenidas del microscopio de epifluorescencia al noveno día de inducción de las CTPN embrionarias infectadas a las que se les indujo la expresión de la proteína GFP con Doxiciclina. En esta imagen, se puede apreciar la fluorescencia emitida por la proteína GFP, mientras que en las CTPN embrionarias infectadas, que no fueron inducidas con Doxiciclina (Figura 23c) no se observa la marca de dicha proteína. Estos resultados indican que las CTPN embrionarias requieren un periodo más largo de inducción con Doxiciclina (al menos nueve días) en comparación con las células HEK293. Además, se comprueba que es necesaria la inducción con Doxiciclina para lograr la expresión de la proteína GFP en las células infectadas.

Por otra parte, se analizó si el medio de cultivo con el que se produjeron las partículas virales (medio de las células HEK293) afectaba el crecimiento de las CTPN embrionarias, ya que tiene una composición química distinta al medio de crecimiento de las CTPN embrionarias (DMEM-F12) y ambos se mezclan en proporción 1:1 al momento de realizar el proceso de infección. En la Figura 23d se puede apreciar la imagen de campo claro de las CTPN embrionarias cultivadas con medio DMEM-F12 y medio DMEM en proporción 1:1. En esta figura se puede apreciar que las CTPN embrionarias parecen tener daños en la membrana, sin embargo, mantienen una morfología similar a la del control negativo (Figura 23a), lo que indica que la presencia del medio DMEM provoca una alteración a las CTPN embrionarias, aunque no parece ser considerable. Además, no se aprecia

fluorescencia, debido a que las células no fueron infectadas y, por tanto, tampoco inducidas.

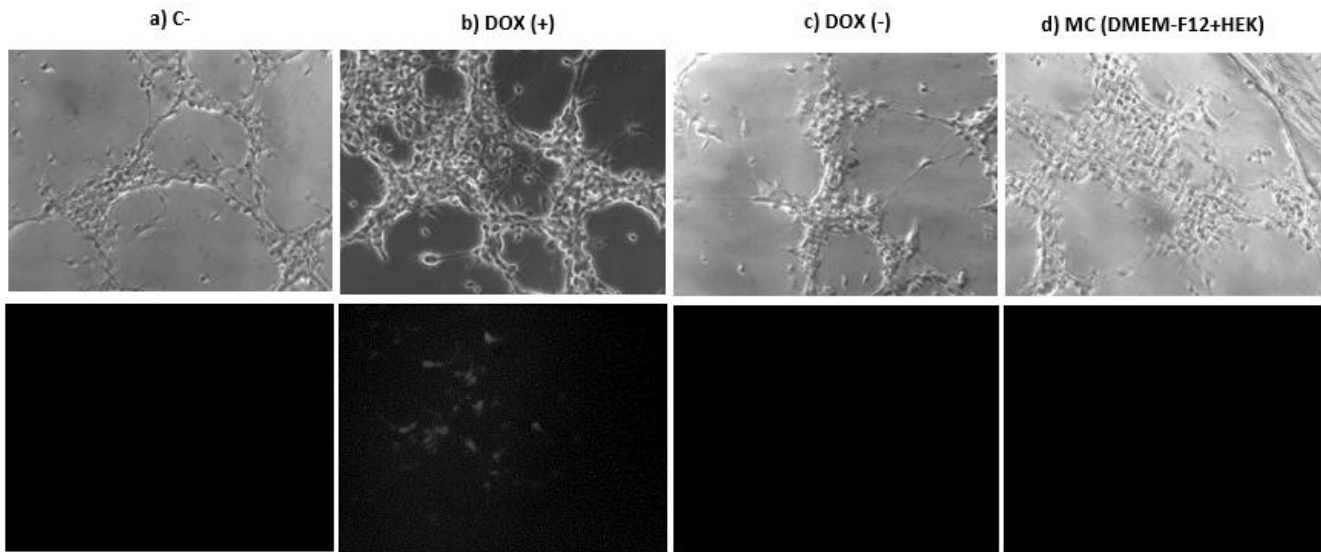


Figura 23. Infección de las CTPN embrionarias con las partículas lentivirales que expresan a la proteína GFP. a) Células no infectadas (control negativo). b) Células infectadas en proporción virus medio 1:1 e inducidas con Doxiciclina durante nueve días. c) Células infectadas en proporción virus medio 1:1 sin inducción con Doxiciclina durante nueve días d) Células crecidas durante 72 h con medio DMEMF-12 Y DMEM en proporción 1:1. En la parte superior se observan las imágenes de campo claro mientras que en la parte inferior se aprecian las imágenes de campo oscuro.

8. DISCUSIÓN

El estudio de las células troncales y progenitoras neurales embrionarias ha incrementado en los últimos años debido a su importancia dentro del área de investigación del desarrollo, sin embargo, resulta ser un modelo celular difícil de cultivar. En este trabajo, se cultivaron las células troncales y progenitoras neurales embrionarias de rata Wistar (E14), durante al menos 3-5 pasajes, utilizando medio de cultivo DMEM-F12 y los factores de crecimiento FGF2, EGF y B12, que en conjunto permitieron mantener a las células en proliferación sin ser diferenciadas. Los cultivos producidos fueron analizados en microscopio y se observó que la morfología del cultivo es distintiva al de las células troncales no diferenciadas, sin embargo, es necesario probar la multipotencialidad de éstas por inmunofluorescencia utilizando los marcadores Sox2 y Nestina. Por otra parte, durante el establecimiento de las condiciones para el cultivo de CTPN embrionarias, se pudo determinar que un paso crítico para la obtención de un cultivo primario exitoso es la disección de las vesículas telencefálicas. Esto puede deberse a que si se realiza la disección de forma incorrecta se toman células de otro tipo, como lo pueden ser células epiteliales, que una vez cultivadas compiten con las CTPN embrionarias por la captación de los nutrientes presentes en el medio de cultivo; lo que conlleva a la muerte de las CTPN embrionarias. Probablemente esta es la razón por la que los primeros cultivos realizados en este trabajo no fueron exitosos (Cuadro 4), sin embargo, una vez que se identificó y corrigió el problema en la disección, fue posible obtener cultivos de CTPN embrionarias de forma exitosa.

Antes de comenzar la producción de las partículas lentivirales para infectar a las CTPN embrionarias cultivadas, se decidió corroborar la presencia de los insertos de Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 en los plásmidos pHAGE, llevando a cabo la determinación de la secuencia nucleotídica. Al analizar los resultados de dicho ensayo con los programas Clustal y Chromas, se estableció que los plásmidos pHAGE-Dp71d Δ 71 y pHAGE-Dp71d Δ 71-74 poseen las secuencias que codifican para las isoformas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74, respectivamente. Esto debido a que las secuencias

codificantes analizadas de ambos plásmidos, son homologas a las secuencias de las isoformas Dp71d_{Δ71} (NM_012698.3) y Dp71d_{Δ71-74} (NM_001005246.1) de *Rattus norvegicus* registradas en la base de datos NCBI.

La capacidad de infección de las partículas lentivirales producidas se corroboró antes de infectar a las células blanco con la finalidad de establecer condiciones adecuadas de infección y para poder comparar la capacidad de infección en dos modelos celulares diferentes. Por tal motivo, se infectaron células HEK293 siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos, previamente desarrollado en nuestro grupo de trabajo. Las células HEK293 resultan ser un modelo celular fácil de transfectar y de cultivar, motivo por el cual también fueron utilizadas para la producción de las partículas virales en el presente trabajo (Martínez-Salazar, 2007). Para facilitar el estudio de la capacidad de infección de las partículas lentivirales producidas en células HEK293, se realizó el procedimiento utilizando las partículas que expresan la proteína GFP, que por su naturaleza emite fluorescencia propia y, por ende, su expresión facilita su rastreo en la célula al observarse en un microscopio de epifluorescencia. De acuerdo con los resultados de la infección de las células HEK293 con las partículas lentivirales producidas que expresan la proteína GFP, pudimos establecer, primeramente, que las partículas producidas tienen la capacidad de infectar a las células HEK293 exitosamente, ya que en las células infectadas se pudo apreciar la expresión de la proteína GFP. Esto ocurre debido a que las partículas lentivirales actúan como vehículos que logran introducir el material genético exógeno que transportan dentro una célula huésped, e insertarlo en el genoma del huésped con ayuda de la maquinaria proteica de la célula hospedera (Vigna y Naldini, 2000). Además, fue posible establecer que fue eficiente, ya que las partículas virales producidas lograron infectar alrededor del 60% de la población celular total, en cualquiera de las tres relaciones virus/medio probadas (1:1, 2:1, 3:1). Considerando que los porcentajes de infección son muy similares entre las proporciones virus/medio probadas, se decidió seleccionar la relación 1:1 como la indicada para ser utilizada en el protocolo de infección de las células blanco, debido a que utiliza menor cantidad de partículas virales y, por tanto, esta condición hace más rentable el proceso de infección.

Por otra parte, los resultados anteriores se reafirmaron por Western Blot (Figura 22), en donde se puede apreciar que se expresa la proteína GFP en las células HEK293 infectadas con las partículas lentivirales producidas (Figura 22b). Por otra parte, se puede establecer que las partículas lentivirales producidas que expresan las isoformas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74, infectan exitosamente a las células HEK293, ya que se aprecia la expresión de ambas isoformas al utilizar el anticuerpo anti-myc (Figura 22a), ya que ambas isoformas se expresan unidas al epítipo myc, como bandera para facilitar su rastreo.

Asimismo, se corrobora que la inducción con Doxiciclina es necesaria para la expresión de las proteínas GFP, Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74, dado que, no se observa la expresión de las proteínas cuando las células HEK293 infectadas no son tratadas con Doxiciclina (Figura 22a). Esto se debe a que, el vector de expresión pHAGE-GFP es un plásmido modificado, que una vez insertado en el genoma de la célula blanco requiere de la inducción de la expresión del inserto. La expresión del inserto (en este caso GFP) opera mediante el sistema Tet-On; el sistema Tet-On es un sistema de regulación que permite la activación de expresión de genes mediante la adición de antibióticos de la familia de la tetraciclina (por ejemplo, Doxiciclina). Este sistema consiste en una proteína reverse-TetR (rTetR), y un promotor llamado elemento de respuesta a tetraciclina (TetO). La tetraciclina induce el cambio de conformación de la rTetR, lo cual le permite a esta proteína unirse al promotor para permitir la expresión del gen (Das *et al.*, 2016).

Finalmente, se llevó a cabo la infección de las CTPN embrionarias en cultivo, siguiendo el mismo protocolo de infección de las células HEK293 y tomando en cuenta la proporción virus/medio elegida. De acuerdo con los resultados, podemos establecer que las partículas lentivirales recombinantes que expresan la proteína GFP poseen la capacidad de infectar a las CTPN embrionarias. Sin embargo, a pesar de que con el protocolo de infección previamente establecido en células HEK293, se observa que 48h de inducción con Doxiciclina fueron suficientes para observar la expresión de la proteína GFP. En el caso de las células blanco esta condición fue distinta, ya que, las CTPN infectadas requirieron mínimo 9 días de

inducción con Doxibicilina para observar la expresión de GFP en dichas células. A pesar de que se logra observar la marca fluorescente de la proteína GFP en las células CTPN embrionarias (Figura 23b), la eficiencia de infección parece ser menor a la observada en las células HEK293 (Figura 21b). Es posible que esto se deba a que las CTPN embrionarias están siendo infectadas con menor eficiencia respecto a las células HEK293. Las CTPN embrionarias son un modelo celular que por sus características resulta difícil de transfectar, es por ello que se han probado diferentes tecnologías como la nucleofección, electroporación, así como el uso de nanopartículas magnéticas, sin embargo, estas resultan ser muy costosas (Adams *et al.*, 2013; Bertram *et al.*, 2012; Pickard *et al.*, 2011). No obstante, es posible que las CTPN embrionarias requieran un mayor tiempo de infección, por lo que sería recomendable probar tiempos de infección más largos, para observar si el porcentaje de infección mejora.

Por otra parte, es necesario corroborar la expresión de la proteína GFP por Inmunofluorescencia y Western Blot. Además, se requiere llevar a cabo la infección de las CTPN embrionarias con las partículas lentivirales que expresan las isoformas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74, para comprobar que las infectan eficientemente. Al igual que en las células HEK293, es necesario corroborar la expresión de ambas isoformas por Inmunofluorescencia y Western Blot.

9. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo el cultivo primario de células troncales y progenitoras neurales embrionarias.
2. La infección de células HEK293 con las partículas lentivirales recombinantes permite la expresión eficiente de las proteínas GFP, DP71d Δ 71 y DP71d Δ 71-74.
3. La infección de CTPN con las partículas lentivirales recombinantes permite la expresión de la proteína GFP.
4. La expresión de las proteínas GFP, DP71d Δ 71 y DP71d Δ 71-74 de los vectores lentivirales recombinantes responde a la inducción con Doxiciclina.
5. La expresión de la proteína GFP en células troncales y progenitoras neurales embrionarias requiere de 9 días de inducción con Doxiciclina, en comparación a las células HEK293 que requieren 2 días de inducción.
6. El porcentaje de células HEK293 infectadas con las partículas lentivirales recombinantes es del 61%.
7. El porcentaje de CTPN embrionarias infectadas no se pudo calcular, debido a la morfología compleja de las células.
8. La dosis efectiva de geneticina para la selección de CTPN infectadas es de 60 ng/mL.

10. PERSPECTIVAS

- Probar la multipotencialidad de las CTPN embrionarias cultivadas, por inmunofluorescencia con los marcadores SOX2 y Nestina.
- Calcular la eficiencia de la infección lentiviral en células troncales y progenitoras neurales.
- Comprobar la expresión de Dp71d $_{\Delta 71}$ y Dp71d $_{\Delta 71-74}$ en células troncales y progenitoras neurales por Inmunofluorescencia y Western Blot, utilizando el anticuerpo anti Myc.
- Analizar el efecto de la sobreexpresión de Dp71d $_{\Delta 71}$ y Dp71d $_{\Delta 71-74}$ en la diferenciación de CTPN embrionarias por inmunofluorescencia y Western blot, utilizando los marcadores MAP2 y/o β III-tubulina para neuronas y GFAP para astrocitos.

11. REFERENCIAS

- Acosta R, Montañez C, Fuentes-Mera L, Gonzalez E, Gómez P, Quintero-Mora L, Mornet D, Alvarez-Salas, Cisneros B. (2004). Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Experimental Cell Research* 296(2):265-75.
- Adams C F, Pickard M, Chari D M. (2013). Magnetic nanoparticle mediated transfection of neural stem cell suspension cultures is enhanced by applied oscillating magnetic fields. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9(6): 737-41.
- Anderson J L, Rae C, Head S I, Morley J W. (2002). Brain function in Duchenne Muscular Distrophy. *Brain*, 125:4-13.
- Aragon J, Gonzáles-Reyes M, Romo-Yañez J, Vacca O, Aguilar-González G, Rendon A, Vaillend C, Montañez C. (2018). Dystrophin Dp71 Isoforms Are Differentially Expressed in the Mouse Brain and Retina: Report of New Alternative Splicing and a Novel Nomenclature for Dp71 Isoforms. *Molecular Neurobiology*, 55(2):1376-1386.
- Arrigui N, Risso C. (2017). Stem cells. *Therapeutic Innovations under control* (págs. 1-45).
- Austin R C, Morris G E, Howard P L, Klamut H J, Ray P N. (2000). Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain. *Neuromuscular Disorders*, 10(3):187–93.
- Bertram B, Wiese S, Holst A. (2012). High-efficiency transfection and survival rates of embryonic and adult mouse neural stem cells achieved by electroporation. *Journal of Neuroscience Methods*, 209(2):420-27.
- Blake D J, Weir A, Newey S E, Davies K E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(2):291-329.

- Byers T J, Lidov H G, Kunkel L M. (1993). An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nature Genetics*, 4(1):77–81.
- Cerna J, Cerecedo D, Ortega A, García-Sierra F, Centeno F, Garrido E, Mornet D, Cisneros B. (2006). Dystrophin Dp71f Associates with the β 1-Integrin Adhesion Complex to Modulate PC12 Cell Adhesion. *Journal of Molecular Biology*. 954-965.
- Cisneros B, Rendon A, Genty V, Aranda G, Marquez F, Mornet D, Montañez C. (1996). Expression of dystrophin Dp71 during PC12 cell differentiation. *Neuroscience Letters*, 213(2):107-10.
- Das A T, Tenenbaum L, Berhout B. (2016). Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Current Gene Therapy*, 16(3):156-67.
- D'Souza V N, Nguyen T M, Morris G E, Karges W, Pillers D A, Ray P N. (1995). A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Human Molecular Genetics*, 4(5):837–42.
- Daoud F, Candelario-Martínez A, Billard J M, Avital A, Khelifaoui M, Rozenvald Y, Guegan M, Mornet D, Jaillard D, Nudel U, Chelly J, Martínez-Rojas D, Laroche S, Yaffe D, Vaillend C. (2008). Role of Mental Retardation-Associated Dystrophin-Gene Product Dp71 in Excitatory Synapse Organization, Synaptic Plasticity and Behavioral Functions. *PloS One*, 4(8):906-910.
- Doorenweerd N, Mahfouz A, Putten M, Kaliyaperumal R, t' Hoen A C P, Hendriksen J G M, Aartsma-Rus A, Verschuuren J J G M, Niks E H, Reinders M J T, Kan H E, Lelieveldt B P F. (2017). Timing and localization of human dystrophin isoform expression provide insights into the cognitive phenotype of Duchenne muscular dystrophy. *Scientific Reports* 7: 12575.

- Durbeej M, Campbell K P. (2002). Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12(3):349–361.
- Ehmsen j, Poon E, Davies K. (2002). The dystrophin-associated protein complex. *Journal of Cell Science*, 115, 2801–2803.
- Emery A E H. (1996). Muscular Dystrophy-the facts. *Neuromuscular Disorders*, 5(6):521.
- Emery A E H. (1998). The muscular dystrophies. *The Lancet*, 359 (9307):687-95.
- Ervasti J M. (2007). Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1772(2):108-117.
- Fairclough R, Wood M J, Davies K E. (2013). Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nature Reviews Genetics*, 14(6):373-378.
- Ghanavatinejad F, Pourteymour Z, Tabrizi F, Omidghaemi S, Sharifi E, Møller G S, Jami M S (2019). Protein biomarkers of neural system. *Journal of Otology*, 14(3):77-88.
- González E, Montañez C, Ray P N, Howard P L, García-Sierra F, Mornet D, Cisneros B. (2000). Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS Letters* 498(3):209-214.
- Hendriksen G F, Hoogland G, Schipper S, Hendriksen G M, Vles S H, Aalbers W M. (2015). A possible role of dystrophin in neuronal excitability: A review of the current literature. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 51:255-262.
- 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 78–79 stimulates cell proliferation. *Neural report*, 27(1):6-11.

- Hoffman E P, Brown Jr R H, Kunkel LM. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51(6):919-28.
- Hugnot J P , Gilgenkrantz H, Vincent N, Chafey P, Morris G E, Monaco A P, Berwald-Netter Y, Koulakoff A, Kaplan J C, Kahn A. (1992). Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding 75 kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(16):7506-7510.
- Ibrahim Sammour. (2019). Stem Cells: Classification, Characterization and Sources. *Encyclopedia of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7-13.
- Jung D, Filliol D, Metz-Boutigue M H , Rendon A. (1993). Characterization and subcellular localization of the dystrophin protein 71(Dp71) from brain. *Neuromuscular Disorders*, 3(5-6):515-518.
- Koenig M, Hoffman E P, Bertelson C J, Monaco A P, Feener C, Kunkel L M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, 50(3):509-17.
- Kueh S L, Head S I, Morley J W. (2008). GABA(A) receptor expression and inhibitory post-synaptic currents in cerebellar Purkinje cells in dystrophin-deficient mdx mice. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 35(2):207–10.
- Kunkel L M, Monaco A P, Middlesworth W, Ochs H D, Latt S A. (1985). Specific cloning of DNA fragments absent from DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(14):4778-82.
- Lederfein D, Levy Z, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. (1992). A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne Muscular Dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(12):5346-5350.

- Lenk U, Hanke R, Thiele H, Speer A. (1993). Point mutations at the carboxy terminus of the human dystrophin gene: implications for an association with mental retardation in DMD patients. *Human Molecular Genetics*, 2(11):1877-81.
- León-Moreno L C. (2016). Estudio del efecto de la sobreexpresión de las distrofinas Dp71a y Dp71c en las células PC12. *CINVESTAV*, 1-89.
- Lidov H G, Selig S, Kunkel L M. (1995). Dp140: a novel 140kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Human Molecular Genetics*, 4(3):329–35.
- Martinez-Salazar V S. (2007). Optimización del cultivo de células HEK293 en suspensión para su crecimiento y producción de Adenovirus. Santiago de Chile. 1-116.
- Marquez F G, Cisneros B , Garcia F, Ceja V , Velázquez F, Depardón F, Cervantes L, Rendón A , Mornet D, Rosas-vargas H, Mustre M, Montañez C. (2003). Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience*, 118(4):957-66.
- Merino-Jimenez C, Aragón J, Ceja V, Rodriguez-Martinez G, Cazares-Raga F E, Chardonnet S, Pionneau C , Rendon A, Montañez C. (2016). Dp71delta 78-79 Dystrophin Mutant Stimulates Neurite Outgrowth In Pc12 Cells Via Upregulation And Phosphorylation Of Hspb1. *Proteomics*.
- Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *The lancet neurology*, 2(12):732-740.
- Murray J M, Davies K E, Harper P S, Meredith L, Mueller C R, Williamson R. (1982). Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, 300:69-71.
- Naidoo Michael y Anthony Karen. (2020). Dystrophin Dp71 and the Neuropathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Neurobiology*, 57:1748-1767.

- Pickard M R, Barraud P, Chari D M. (2011).The transfection of multipotent neural precursor/stem cell transplant populations with magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 32(9):2274-84.
- Pillers D A, Bulman D E, Weleber R G , Sigesmund D A, Musarella M A , Powell B R, Murphey W H, Westall C, Panton C, Becker L E. (1993). Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nature Genetics*, 4(1):82–86.
- Pontious A, Kowalczyk T, Englund C., Hevner R.F. (2008). Role of intermediate progenitor cells in cerebral cortex development. *Developmental Neuroscience*, 30 (1-3):24–32.
- Ray P N, Belfall B, Duff C, Logan C, Kean V, Thompson MW, Sylvester J E , Gorski J L, Schmickel R D, Worton R G. (1985). Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, 318(6047):672-5.
- Roberts R G, Coffey A J, Bobrow M., Bentley D R. (1993). Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics*, 16(2):536–538.
- Romo-Yáñez J, Rodríguez-Martínez G, Aragón J, Siqueiros-Márquez L, Herrera-Salazar A, Velasco I, Montanez C. (2020). Characterization of the expression of dystrophins and dystrophin-associated proteins during embryonic neural stem/progenitor cell differentiation. *Neuroscience letters*, (736):1-21.
- Sadoulet-Puccio H M, Kunkel LM. (1996). Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathology*, 6(1):25-35.
- Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. (1999). Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene:differential activity of the Dp71 promoter during development. *Human Molecular Genetics*, 8(1):1-10.

- Singh A, Yadav C B, Tabassum N, Bajpeyee A K, Verma V. (2019). Stem cell niche: Dynamic neighbor of stem cells. *European Journal of Cell Biology*, 98(2-4):1-9.
- Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso L E, Cisneros B. (2012). Dystrophin Dp71: The Smallest but Multifunctional Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene. *Molecular neurobiology*, 45(1):43-60.
- Vieira M, Santos A K, Vasconcellos R, Goulart V A M, Parreira R, Kihara A, Ulrich H, Resende R. (2018). Neural stem cell differentiation into mature neurons: neurons: Mechanisms of regulation and biotechnological applications. *Biotechnology advances*, 36(7):1946-1970.
- Vigna E y Naldini L. (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *The Journal of Gene Medicine*. 2(5): 308-16.
- Young R A. (2011). Control of the embryonic stem cell state. *Cell*, 144(6):940–954.

ANEXOS

>NM_012698.3 Rattus norvegicus dystrophin (Dmd), transcript variant Dp71a, mRNA
AGTGCTTTCGGCTGCGAGCCTGGGCGGCGGCTTGACTTTCGGGGAGCCCCGTGGCTCGGACAAGCTTA
CTCCTCCGCGCTAAGCGCCCTCCCCTGACTGCCTGTGAAATCCTTACAACCATGAGGGAAACACCTCAAAG
GCCACGAGACCCAAACAATTGTTGGGACCATCCAAAATGACAGAGCTTACCAGTCTTTAGCTGACCT
GAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGACTGCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCTTG
GATCTCTTGAGCCTGTCAGCTGCATGTGACGCCTTGGACCAGCACAACTCAAGCAAAATGATCAGCCCA
TGGATATCCTGCAGATAAATACTGTTTGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACAACAATTT
GGTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATACGGGACGAACA
GGGAGGATCCGTGCTCTGTCTTTTAAACTGGCATCATTTCTCTGTGTAAAGCACACTTGAAGACAAGT
ACAGATACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGCTTTTGTGACCAGCGTAGACTGGGTCTTCTTCT
GCATGATTCTATTCAAATCCAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCCTCTTTGGGGCAGTAACATTGAGCCG
AGTGTGAGGAGCTGTTCCAGTTTCCAATAATAAACCTGAGATTGAAGCCGCTCTCTCCTTGACTGGA
TGGTCTGGAACCCAGTCTATGGTGTGGCTGCCGGTCTTGACAGAGTGGCTGCTGCTGAAACAGCCAA
GCATCAGGCCAAGTGAACATCTGTAAGGAGTGTCCAATCATTGGATTGAGGTACAGAAGCCTGAAACAC
TTTAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTAAGGGCCATAAAATGCACTACC
CCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATCTGGAGAAGATGTTCTGACTTTGCCAAGGTAAGTAA
CAAATTTGAAACAAAAGGTATTTTGGCAAGCATCCCCGAATGGGCTACCTCCAGTGCAGACTGTGTTA
GAGGGGGACAACATGAAACGCCTGCCTCGTCCCCCAGCTTTCACACGATGATACTCATTACGCATTG
AGCATTATGCTAGCAGGCTAGCAGAAATGGAAAACAGCAATGGATCTTATCTAAATGATAGCATCTCTCC
TAATGAGAGCATAGATGATGAACATTTGTTAATCCAGCATTACTGCCAAAGTTTGAACCAGGACTCCCC
CTGAGCCAGCCTCGTAGTCTGCCAGATCTTGATTTCTTAGAGAGTGAGGAAAGAGGGGAGCTAGAGA
GAATCCTAGCAGATCTTGAGGAAGAAAACAGAAATCTGCAAGCAGAATATGATCGTCTGAAGCAGCAGCA
TGAGCATAAAGGCTGTCCCACTGCCGTCTCCTCCTGAGATGATGCCACCTCTCCCAGAGTCCCAGG
GATGCTGAACTCATTGCTGAGGCCAAGCTACTGCGCCAACACAAAGGACGTCTGGAAGCCAGGATGCAAA
TCCTGGAAGACCACAATAAAACAAGTCTCAGTTACATAGACTGAGGCAGCTCTGGAGCAACCCCA
GGCTGAGGCCAAGGTGAATGGCACCACGGTGTCTCTCCTTCTACCTCGCTGCAGAGGTCAGATAGCAGT
CAGCCTATGCTGCTCCGAGTGGTTGGCAGTCAAACCTCAGAATCTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTC
CTCCCAGGACACAAGCACAGGGTTAGAAGAAGTATGGAGCAACTCAACAACCTCTCCCTAGTTCAAG
AGGAAGAAATGCCCTGGAAAGCCAATGAGAGAGGACACAATGTAGGAAGCCTTTTCCACATGGCAGATG
ATTTGGCAGAGCGATGGAGTCTTAGTTTCAAGTCATGATAGATGAAGAAGGAGCAGAATAA

>NM_001005246.1 Rattus norvegicus dystrophin (Dmd), transcript variant Dp71c, Mrna

GCTTGACTTTCGGGGAGCCCCGTGGCTCGGACAAGCTTACTCTCCGCGCTAAGCGCCCTCCCCTGACTG
CCTGTGAAATCCTTACAACCATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACGAGACCCAAACAACCTGTTGGGACCA
TCCAAAATGACAGAGCTCTACCAGTCTTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGACT
GCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGAGCCTGTCAGCTGCATGTGACG
CCTTGGACCAGCACAACTCAAGCAAAATGATCAGCCCATGGATATCCTGCAGATAATTAACCTGTTTAC
TACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACAAATTTGGTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGT
CTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATACGGGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCTGTCTTTAAAACG
GCATCATTTCTCTGTGTAAGCACACTTGAAGACAAGTACAGATACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTC
AACCGGCTTTTGTGACCAGCGTAGACTGGGTCTTCTTCTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTTG
GGTGAAGTTGCCTCCTTTGGGGGAGTAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTCCAGTTTGCCAATA
ATAAACCTGAGATTGAAGCCGCTCTTCTTCTGACTGGATGCGTCTGGAACCCAGTCTATGGTGTGGCT
GCCGGTCTTGACAGAGTGGCTGCTGCTGAAACAGCCAAGCATCAGGCCAAGTGAACATCTGTAAGGAG
TGCCAATCATTGGATTGAGTACAGAAGCCTGAAACACTTTAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTT
TTTCTGGCCGAGTTGCTAAGGGCCATAAAATGCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATC
TGGAGAAGATGTTGCTGACTTTGCCAAGGTAAGTAAACAAATTTGAAACAAAAGGTATTTTGCAGAA
CATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAAACAAATCTGCAAG
CAGAATATGATCGTCTGAAGCAGCAGCATGAGCATAAAGGCTGTCCCACTGCCGTCTCCTCTGAGAT
GATGCCACCTCTCCCAAGTCCCAGGGATGCTGAACTCATTGCTGAGGCCAAGCTACTGCGCCAACAC
AAAGGACGTCTGGAAGCCAGGATGCAAATCCTGGAAGACCACAATAAACTGGAGTCTCAGTTACATA
GACTGAGGCAGCTCCTGGAGCAACCCAGGCTGAGGCCAAGTGAATGGCACCACGGTGTCTCTCCTTC
TACCTCGTGCAGAGGTCAGATAGCAGTACGCTATGCTGCTCCGAGTGGTTGGCAGTCAAACCTCAGAA
TCTATGGGTGAGGAAGATCTTCTGAGTCTCCCAAGGACACAAGCACAGGGTTAGAAGAAGTATGGAGC
AACTCAACAACCTCTCCCTAGTTCAAGAGGAAGAAATGCCCTGGAAAGCCAATGAGAGAGGACACAAT
GTAGGAAGCCTTTTCCACATGGCAGATGATTTGGGCAGAGCGATGGAGTCTTAGTTTCAGTCATGATAG
ATGAAGAAGGAGCAGAATAAATGTTTTACAACCTCTGACCCCGCATGGTTTTTATAATATTCGTACAAC
AAAGAGGATTAGACAGTAAGCGTTTACAAGAAATAAATCTATATTTTTGTGAAGGGTAGTGGTACTATAC
TGATAGTTTCAGTAGTTTCTAAGTCTGTTATTGTTTTGTTAAACAATGGCAGGTTTTACACGTCTATGCAA
TTGTACAAAAAGTTAAAAGAAAACATGTAATCTTGATAGCTAAATAACTTGCCATTTCTTTATATGG
AACGCATTTTGGGTTGTTTAAAAATTTATAACAGTTATAAAGAAAGATTGTAAACTAAAGTGTGCTTTAT
AAAAAAGT