



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE  
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

***“Caracterización del efecto de las proteínas mutantes  $Dp40_{\Delta L170}/Dp71f_{\Delta 71\Delta L170}$   
en la diferenciación de células PC12”***

**TESIS**

Que presenta:

**Luis Sanchez Perez**

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

En la especialidad de:

**GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Directora de la Tesis:

**Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda**

Ciudad de México

AGOSTO, 2022

## **Agradecimientos**

Este trabajo fue desarrollado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav bajo la dirección de la Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda.

Durante el desarrollo de este proyecto el Bt. Luis Sánchez Pérez, fue becado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). El desarrollo de esta tesis fue apoyado por los proyectos Conacyt CB 2017-2018 A1-S-24868 y Anuiés-Sep-Conacyt Ecos Nord 276330/ M16SO1.

Al Dr. Jorge Aragón Medrano por su invaluable apoyo y su inmejorable personalidad.

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

## Índice

RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
a. Enfermedades genéticas.....	1
i. Trastornos de un solo gen.....	5
ii. Trastornos cromosómicos .....	6
iii. Trastornos multifactoriales .....	8
2. ANTECEDENTES GENERALES .....	9
a. Distrofias musculares .....	9
b. Distrofia muscular de Duchenne .....	14
i. Gen <i>DMD</i> .....	14
ii. Expresión de las Distrofinas .....	17
iii. Distrofina de longitud completa (Dp427) .....	19
iv. Distrofina Dp260 .....	21
v. Distrofina Dp140 .....	22
vi. Distrofina Dp116 .....	22
vii. Distrofina Dp71 .....	23
viii. Distrofina Dp40 .....	23
ix. Dominios de la Distrofina.....	24
x. Fenotipo Muscular y del Sistema Nervioso de la DMD .....	31
xi. Diagnóstico de la DMD .....	32
xii. Tratamiento.....	33
3. ANTECEDENTES DIRECTOS .....	35
a. Distrofina Dp71 .....	35
b. Expresión y función de Dp40 y Dp71 en células PC12 .....	39
4. JUSTIFICACIÓN .....	45
5. HIPÓTESIS .....	45
6. OBJETIVOS.....	46
a. Objetivo general .....	46
b. Objetivos específicos.....	46
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	46
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49

<b>9. RESULTADOS</b> .....	52
<b>a. Caracterización del efecto de la proteína mutante Dp40<sub>ΔL170</sub> en la diferenciación de células PC12</b> .....	52
i. Secuenciación del plásmido de transfección.....	52
ii. Curva de proliferación celular .....	52
iii. Análisis morfométrico de las neuritas de células PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 <sub>ΔL170</sub> (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 <sub>ΔL170</sub> (C-26) .....	55
iv. Expresión de marcadores de diferenciación y proliferación en las células PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 <sub>ΔL170</sub> (pool), PC12 Tet-On/Dp40 <sub>ΔL170</sub> (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 <sub>ΔL170</sub> (C-26) .....	63
v. Localización de las proteínas Dp40wt, y Dp40 <sub>ΔL170</sub> en las células PC12 Tet-On.....	68
<b>b. Caracterización del efecto de la proteína mutante Dp71f<sub>Δ71ΔL170</sub> en la diferenciación de células PC12</b> .....	72
i. Expresión de la proteína mutante Dp71f <sub>Δ71ΔL170</sub> .....	72
ii. Secuenciación del plásmido de transfección pTRE2pur-Myc-Dp71f <sub>Δ71ΔL170</sub> ..	73
<b>10. DISCUSIÓN</b> .....	74
<b>11. CONCLUSIONES</b> .....	78
<b>12. PERSPECTIVAS</b> .....	79
<b>13. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	80

## Índice de Figuras

Figura 1 Ilustración del gen de la de la distrofina y sus formas reportadas en NCBI.....	16
Figura 2 Representación gráfica de la expresión tejido-especifica de las isoformas de la distrofina .....	19
Figura 3 Interacciones de la distrofina de longitud completa.....	29
Figura 4 Interacciones específicas de los dominios de la distrofina.....	30
Figura 5 Isoformas de Dp71. Se muestra la clasificación actual de las isoformas de Dp71. ....	37
Figura 6 Secuenciación del plásmido pTRE2pur-Myc-Dp40 $\Delta$ L170. ....	52
Figura 7 Gráfica de proliferación celular. ....	54
Figura 8 Gráfica del número de células cuantificadas al día 11 de proliferación para las líneas celulares pTRE2pur-Myc-Dp40 (wt), pTRE2pur-Myc-Dp40 $\Delta$ L170 (pool), pTRE2pur-Myc-Dp40 $\Delta$ L170 (C-23), pTRE2pur-Myc-Dp40 $\Delta$ L170 (C-26). Se observa que las líneas celulares pTRE2pur-Myc-Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y pTRE2pur-Myc-Dp40 $\Delta$ L170 (C-26).....	55
Figura 9 Micrografías representativas de células PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) sin diferenciar.....	56
Figura 10 Micrografías representativas de la comparación entre la línea celular PC12 Tet-On/Myc (vv) y PC12 Tet-On/Dp40wt tras 12 días de diferenciación con NGF. ....	57
Figura 11 Micrografía representativa de la comparación de las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40wt y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) tras 12 días de diferenciación .....	58
Figura 12 Micrografía representativa de la comparación de las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40wt y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) después de 12 días de diferenciaciónl.....	59
Figura 13 Micrografías representativas de las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40wt, Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) a 0, 3, 6, 9 y 12 días de diferenciación con NGF. ....	59
Figura 14 Cambio en la morfología a 12 días de diferenciación para las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26).....	60
Figura 15 Diferenciación de las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) a los 12 días de diferenciación.. ....	61
Figura 16 Complejidad de las neuritas observada en las células PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) a los 12 días de diferenciación. ....	62
Figura 17 Expresión de las proteínas FAK, NSE, NF-L, Dp40 y PCNA en las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26). ....	64
Figura 18 Expresión de la proteína FAK en las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26).....	65
Figura 19 Expresión de la proteína NSE en las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26).....	66
Figura 20 Expresión de la proteína NF-L en las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26).....	66
Figura 21 Expresión de la proteína Dp40 en las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26).....	67
Figura 22 Expresión de la proteína PCNA en las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26).....	67
Figura 23 Distribución del péptido myc y lamina A/C en células PC12 Tet-On/Myc (vv). ....	68
Figura 24 Distribución del péptido myc y lamina A/C en células PC12 Tet-On/Dp40wt.....	69
Figura 25 Distribución del péptido myc y lamina A/C en células PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) .....	70
Figura 26 Distribución del péptido myc y lamina A/C en células PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) .....	71

Figura 27 Expresión de la proteína Myc-Dp71f en las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 (wt), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-1), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-2) y PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-3) .....	72
Figura 28 Caracterización del plásmido de transfección de Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170.. .....	73

## Índice de Tablas

Tabla 1 Ejemplos de Trastornos genéticos y su clasificación. ....	3
Tabla 2 Patrones de herencia de algunas distrofias musculares.....	13
Tabla 3 Características Moleculares, composición y distribución de algunas variantes de las isoformas de la distrofina .....	17
Tabla 4 Ensayo de proliferación celular para las células PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26), los números indican la cantidad de células por mililitro. ....	53

## Abreviaturas

DMD	Distrofia muscular de Duchenne
BMD	Distrofia muscular de Becker
BSA	Albúmina de suero bovino
DAPC	Complejo proteico asociado a la distrofina
DGC	Complejo de distrofina- glucoproteína
FAK	Cinasa de adhesión focal
NF-L	Neurofilamento de cadena ligera
NSE	Enolasa específica de neurona
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
NGF	Factor de crecimiento neural
nNOS	Óxido nítrico sintasa neural
pb	Pares de bases
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico

## RESUMEN

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad genética de herencia ligada al cromosoma X. El fenotipo principal de la enfermedad es la degeneración muscular, sin embargo, este fenotipo suele estar acompañado de un déficit cognitivo importante en algunos individuos, de gravedad variable y que no correlaciona con la severidad del deterioro muscular. El deterioro cognitivo se ha ligado a la actividad de las isoformas más pequeñas del gen de la distrofina Dp71 y Dp40, debido a que las mutaciones que causan este fenotipo están presentes en las regiones distales del gen DMD y correlacionan con este fenotipo. Las distrofinas Dp40 y Dp71 son las isoformas del gen DMD que se expresan en mayores niveles en el sistema nervioso y están involucradas en el desarrollo adecuado de células neurales y de la glía. Recientemente se ha reportado una delección de la leucina 170 ( $\Delta L170$ ) de la Dp71, que causa un fenotipo de deterioro cognitivo sin deterioro muscular en los pacientes. Se ha estudiado el efecto de esta mutación en la función de la isoforma Dp40 durante la diferenciación de las células PC12 en presencia del factor de crecimiento neural (NGF) y se ha relacionado con la inhibición en la formación de neuritas, así como con la localización nuclear de la isoforma en células PC12 transfectadas transitoriamente. En este trabajo se analizó el efecto de la delección  $\Delta L170$  en la función de la isoforma Dp40 durante el proceso de diferenciación neural de células PC12 Tet-On transfectadas de manera estable con plásmidos que expresan a las proteínas Dp40 y Dp40 $\Delta L170$ , en presencia de NGF. Adicionalmente se comenzó la construcción de vectores de expresión de la mutante Dp71f $\Delta L170$ . En comparación con la línea celular PC12 Tet-On/Dp40, las clonas PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta L170$  (clona C-23 y clona C-26) mostraron una reducción en la proliferación en condiciones normales; en condiciones de diferenciación en presencia de NGF mostraron una disminución en el número y tamaño de las neuritas producidas. Se observó una distribución mayoritariamente nuclear de la proteína Dp40 $\Delta L170$  en comparación con la proteína Dp40 silvestre en células no diferenciadas, así como un retardo en la exportación de la distrofina Dp40 mutante al citoplasma durante la diferenciación neuronal. Por ensayos de western blot se observó un aumento en los marcadores de proliferación en las clonas PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta L170$  (C-23 y C-26), así como una disminución en los marcadores de diferenciación y un aumento en los marcadores que indican daño neuronal. En conclusión, la sobreexpresión de la distrofina Dp40 promueve la formación de neuritas de las células PC12-Tet-On, la cual se ve retardada y disminuida por la sobreexpresión de PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta L170$ .

## ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a genetic disease of X-linked inheritance. The main phenotype of the disease is the muscular degeneration; however, this phenotype could be accompanied by a significant cognitive deficit in some individuals with variable severity. This last phenotype does not correlate with the severity of muscle deterioration. Cognitive impairment has been linked to the activity of the smaller isoforms of the dystrophin gene Dp71 and Dp40, since the mutations that cause this phenotype are present in the distal regions of the DMD gene. Dystrophins Dp40 and Dp71 are the isoforms of the DMD gene that are expressed at higher levels in the nervous system and are involved in the proper development of neural cells and glia. A deletion of leucine 170 ( $\Delta L170$ ) in the region coding for Dp71, causes a cognitive impairment phenotype without muscle impairment in a family. The effect of this mutation on the function of the Dp40 isoform, during the differentiation of PC12 cells in the presence of neural growth factor (NGF), has been studied and has been related to the inhibition of neurite formation, as well as to the altered subcellular localization of the isoform in transiently transfected PC12 cells. In this work it was analyzed the effect of the  $\Delta L170$  deletion on the function of Dp40 and Dp40 $\Delta L170$  during the neural differentiation process of stably transfected PC12 Tet-On cells. Additionally, the construction of expression vectors for the mutant Dp71f $\Delta L170$  was started. Compared to the PC12 Tet-On/Dp40 cell line, clones PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta L170$  (C-23 and C-26) showed decreased proliferation under normal conditions. Under differentiation conditions in the presence of NGF, these clones showed a decrease in the number and size of neurites produced. A predominantly nuclear distribution of the Dp40 $\Delta L170$  protein compared to the wild-type Dp40 protein in undifferentiated cells was observed, as well as a delay in the export of the mutant dystrophin Dp40 to the cytoplasm during neuronal differentiation. Western blot assays showed an increase in proliferation markers in clones PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta L170$  (C-23 and C-26), as well as a decrease in differentiation markers and an increase in markers of neuronal damage. In conclusion, overexpression of dystrophin Dp40 promotes neurite formation and growth in PC12-Tet-On cells, while overexpression of PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta L170$  delay this process and reduces the neurite formation.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **a. Enfermedades genéticas**

En gran medida el desarrollo del proyecto del genoma humano fue realizado con la idea de encontrar las causas genéticas de las enfermedades más comunes (Ropers, 2007). Posteriormente, gracias a las novedosas tecnologías de secuenciación, las técnicas que permiten comparar genomas de forma masiva, así como los programas bioinformáticos que lo hacen posible, se ha descubierto que la realidad es más compleja de lo que se pensaba. Las respuestas a las preguntas planteadas no se encontraron solo con mapear el genoma humano, conforme se ha profundizado en la etiología de diversas enfermedades, haciendo uso de las nuevas herramientas moleculares, se ha descubierto que muchas de las enfermedades que anteriormente se creía que no estaban asociadas a desordenes genéticos, en realidad tienen uno o más componentes genéticos asociados. Se puede decir que nuestra constitución genética juega un papel, en mayor o menor medida, en todos los procesos patológicos, incluidos los trastornos comunes, como consecuencia de la multitud de diferencias en nuestro DNA (Jackson et al., 2018). El número creciente de enfermedades en esta situación llevaría no solo a la popularización del término “enfermedades genéticas” sino también a la necesidad de una clasificación más estricta o elaborada para su estudio. Según el Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano, un trastorno genético es una enfermedad causada en su totalidad o en parte por un cambio en la secuencia de DNA con respecto a una secuencia de referencia o consenso. Como se mencionó anteriormente, esta definición, por su naturaleza, engloba una amplia cantidad de enfermedades muy diferentes entre sí, situación que llevó a la clasificación basada en sus características genéticas.

La genética moderna distingue los trastornos genéticos heredables en trastornos mendelianos y complejos. El término trastornos mendelianos hace referencia a las variantes de un gen cuyo mecanismo de herencia puede ser explicado mediante la genética clásica (Lvovs et al., 2012), por otro lado, existen otros trastornos en los que claramente se observa una recurrencia familiar y presumiblemente tienen un

componente genético, pero sus patrones de herencia no pueden ser explicados por la segregación mendeliana clásica. Definir el gen causante de enfermedades no mendelianas es más difícil (Van Heyningen & Yeyati, n.d.) puesto que las enfermedades complejas pueden depender tanto de un componente genético que está determinado por la acción conjunta de varios genes polimórficos independientes como de otros factores (Lvovs et al., 2012). A la observación anterior debemos agregar que existen trastornos genéticos que fuera de ser provocados por uno o varios genes, el daño genético es tan representativo que puede ser observado en el siguiente nivel de organización genética, es decir, a nivel cromosómico. Dicho lo anterior y debido a la escala en la que observamos los cambios en la secuencia genética podemos distinguir tres grupos principales de trastornos genéticos: trastornos de un solo gen (trastornos monogénicos), trastornos cromosómicos (producidos por cambios en el número o estructura de cromosomas completos) y trastornos multifactoriales (de herencia multifactorial) (Mahdieh & Rabbani, 2013). Debemos tomar en cuenta que las clasificaciones son relativas, dependen de la perspectiva, se encuentran en constante evolución dependiendo de los recursos que existen para el estudio de los trastornos genéticos y se ven modificadas a medida que se va profundizando en el conocimiento de los padecimientos. Como ejemplo podemos mencionar que inicialmente la clasificación de los trastornos genéticos estaba dividida en 4 grupos principales, que eran los 3 grupos mencionados anteriormente (ejemplificados en la Tabla1) y además, como cuarto grupo, se incluían los trastornos genéticos mitocondriales; actualmente el grupo de los trastornos genéticos mitocondriales ha sido removido y posicionado dependiendo de las características del trastorno en particular, independientemente de que el material genético se encontrara en la mitocondria. A continuación, se muestran algunos ejemplos de trastornos genéticos ordenados según la clasificación previamente mencionada (Tabla 1).

Tabla 1 Ejemplos de Trastornos genéticos y su clasificación. Actualmente se pueden agrupar los trastornos en 3 categorías principales, que son: trastornos de un solo gen, trastornos cromosómicos y trastornos multifactoriales. Varios trastornos pueden incluirse en diferente clasificación dependiendo del subtipo del trastorno, o bien, del patrón de herencia para los diferentes genes causantes de la misma enfermedad.

Trastornos Genéticos	
De un solo gen	
Autosómico dominante	Acondroplasia (gen <i>FGFR3</i> ; cuando es heredada); Enfermedad renal poliquística autosómica dominante (gen <i>PKD1/PKD2</i> ); Síndrome de Charcot-Marie-Tooth (gen <i>GARS</i> en el tipo 2D); síndrome de Dercum (cuando es heredado); Hipercolesterolemia familiar (gen <i>LDL-R/APOB/PCSK9</i> ); Holoprosencefalia (puede haber mutación sin síntomas gen <i>SHH/ZIC2/SIX3/TGIF1</i> ); Enfermedad de Huntington (gen <i>HTT</i> ); Síndrome de Marfan (gen <i>FBN1</i> ); Distrofia miotónica (gen <i>DMPK / CNBP</i> ); Neurofibromatosis tipo 1 (gen <i>NF1</i> ); Neurofibromatosis tipo 2 (gen <i>NF2</i> ); Síndrome de Noonan (gen <i>PTPN11 / SOS1 / RAF1 / RIT1</i> ); Osteogénesis imperfecta (gen <i>COL1A1 / COL1A2</i> ); Enfermedad de Parkinson (gen <i>RRK2 / SNCA</i> ; cuando es heredada); Síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (gen <i>LMNA</i> ).
Autosómico recesivo	Fibrosis quística (gen <i>CFTR</i> ); Fiebre mediterránea familiar (gen <i>MEFV</i> ); Enfermedad de Gaucher (gen <i>GBA</i> ); Hemocromatosis (gen <i>C282Y/H63D</i> ); Citrulinemia (gen <i>ASS1</i> ); Aciduria argininosuccínica (gen <i>ASL</i> ); Deficiencia de arginasa (gen <i>ARG1</i> ); Acidemia propiónica (gen <i>PCCA / PCCB</i> ); Acidemia metilmalónica (gen <i>MMUT / MMAA / MMAB / MMADHC / MCEE/LMBRD1</i> ); Acidemia isovalérica (gen <i>IVD</i> ); Acidemia glutárica tipo I (gen <i>GCDH</i> ); Enfermedad de la orina con jarabe de arce (gen <i>BCKDHA / BCKDHB / DBT</i> ); Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (gen <i>ACADM</i> ); Deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa I (gen <i>CPT1A</i> ); Deficiencia de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (gen <i>HADHA</i> ); Tirosinemia (genes <i>FAH / TAT / HPD</i> ); Fenilcetonuria (gen <i>PAH</i> ); Homocistinuria (genes <i>CBS / MTHFR / MTR / MTRR / MMADHC</i> ); Galactosemia (genes <i>GALT / GALK1 / GALE</i> ); Intolerancia hereditaria a la fructosa (gen <i>ALDOB</i> ); Enfermedad de Parkinson (gen <i>PARK7 / PINK1 / PRKN</i> ; cuando es heredado); Síndrome de Polonia (cuando es heredado; gen desconocido); Anemia falciforme (gen <i>HBB</i> ); Atrofia muscular espinal (gen <i>SMN1</i> ); Enfermedad de Tay-Sachs (gen <i>HEXA</i> ); Trimetilaminuria (gen <i>FMO3</i> ); Enfermedad de Wilson (gen <i>ATP7B</i> )

Codominante	Deficiencia de alfa-1 antitripsina (gen SERPINA1); Factor V Leiden (gen F5, dominancia incompleta)
Ligado al cromosoma X	Distrofia muscular de Duchenne (gen DMD); Síndrome X frágil (gen FMR1); Hemofilia A (gen F8); Hemofilia B (gen F9); Deficiencia de ornitina transcarbamilasa (gen OTC); Deficiencia de piruvato deshidrogenasa (el patrón de herencia depende del gen, gen PDHA1); Porfiria (gen ALAS2; el patrón de herencia depende del gen); Inmunodeficiencia combinada grave (gen IL2RG)
Ligado al cromosoma Y	Infertilidad del cromosoma Y; Síndrome de Swyer (cuando aplique)
Mitocondrial	Encefalomiopatía mitocondrial; acidosis láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares (genes MT-ND1 / MT-ND5 / MT-TH / MT-TL1 / MT-TV); Epilepsia mioclónica con fibras rojas irregulares (gen MT-TK)
Sin patrón de herencia claro	Síndrome antifosfolípido
<b>Cromosómicos</b>	
Síndrome de Cri du chat (Cromosoma 5); síndrome de Down (Cromosoma 21); síndrome de Klinefelter (Cromosoma X); Síndrome de Turner (Cromosoma X); Síndrome velocardiofacial (Cromosoma 22)	
<b>Multifactoriales</b>	
Trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH); Autismo; Cáncer de mama; Cáncer de colon; Síndrome de Crohn; Síndrome de Duane; Cáncer de próstata; Retinitis pigmentosa; Melanoma	

Información recopilada del Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano y otras bases de datos gubernamentales (NCBI, NHI).

## **i. Trastornos de un solo gen**

Como se ha mostrado en la tabla 1, es más frecuente encontrar ejemplos de trastornos genéticos de un solo gen; hasta 2019 se contabilizaban más de 6000 enfermedades causadas por mutaciones de este tipo (Culver, 2019). Desde el establecimiento de las leyes de Mendel se ha intentado dilucidar los componentes genéticos de los múltiples fenotipos existentes, es decir, se han estudiado los factores genéticos asociados con las enfermedades desde mucho antes que el DNA, es por esta razón que los trastornos de un solo gen con patrones de herencia mendeliana han contribuido en gran medida a la identificación de genes y vías implicadas en enfermedades genéticas, y es también por esa razón que en estos casos, el análisis molecular predice el estado de la enfermedad de forma relativamente directa (Van Heyningen & Yeyati, n.d.). Dicho lo anterior, podemos entender que la causa de que los trastornos de un solo gen se encuentren entre los trastornos genéticos mejor conocidos, es que sus patrones de herencia son relativamente sencillos (recesivos o dominantes) y su origen genético relativamente simple (Genetic Alliance & District of Columbia Department of Health, 2010). En este punto cabe destacar que derivado de las leyes de Mendel, podemos encontrar una importante subdivisión en los trastornos de un solo gen que comprende el patrón que siguen para su herencia, así bien podemos distinguir los trastornos autosómicos dominantes, autosómicos recesivos, recesivos ligados al cromosoma X, dominantes ligados al cromosoma X y ligados al cromosoma Y (Mahdieh & Rabbani, 2013). En general, las enfermedades clasificadas en este grupo son causadas principalmente por un solo gen, sin embargo, hay varias situaciones en las que existen mutaciones diferentes que pueden dar como resultado la misma enfermedad, por ejemplo, para la homocistinuria la afección de cualquiera de los genes CBS, MTHFR, MTR, MTRR, MMADHC, entre otros genes, es la causa de su fenotipo (véase la Tabla 1 para más ejemplos). Incluso una misma mutación puede producir fenotipos no idénticos (Genetic Alliance & District of Columbia Department of Health, 2010) debido a que existen otros factores involucrados en la expresión como la epigenética. Otro hecho importante es que si un mismo trastorno está ocasionado por diferentes genes,

dependiendo de en cuál de estos genes nos enfoquemos, la misma enfermedad puede estar clasificada en diferentes grupos, ya que el patrón de herencia está en función del producto del gen.

Como se ha mencionado anteriormente los trastornos asociados con la herencia genética mitocondrial son causados por mutaciones en el DNA no nuclear de las mitocondrias y debido a que muchos de ellos suelen ser trastornos de un gen están englobados en esta categoría, radicando la diferencia en su patrón de herencia genética, que es ligado a la mitocondria.

## **ii. Trastornos cromosómicos**

Para su correcto ordenamiento, los genes se organizan en estructuras más grandes llamadas cromosomas, los cuales están compactados en el núcleo de cada célula. Dado que los cromosomas están constituidos por genes, las anomalías en el número o la estructura de los cromosomas pueden provocar enfermedades. Cada vez que una célula se divide, los cromosomas son replicados y posteriormente segregados a cada una de las células, este proceso es delicado y altamente regulado, lo que lo hace propenso a que cualquier falla se convierta en una potencial anomalía cromosómica grave para el desarrollo y viabilidad de esa célula. Cuando se produce una anomalía en una célula germinal o en la fecundación de estas, que no afecta la viabilidad de un producto, este generará todas las células con dicho trastorno cromosómico, así bien, entendemos que las anomalías cromosómicas generalmente ocurren debido a un problema con la división celular que no afecto la viabilidad en etapas tempranas del desarrollo. Para entenderlas más fácilmente podemos distinguir dos tipos de anomalías cromosómicas: numéricas o estructurales (Genetic Alliance & District of Columbia Department of Health, 2010).

### **Anomalías numéricas**

Como el termino lo indica, esta categoría corresponde a cualquier disparidad en el número de cromosomas dentro del núcleo de una célula. El genoma humano consta

de 23 pares de cromosomas en el núcleo de cada célula autosómica, cualquier diferencia en el número de cromosomas dentro del núcleo comparado con dicha referencia se conoce como aneuploidía (si la anomalía numérica no es múltiplo de 23 y sin distinguir si el número de cromosomas es menor a 46 o mayor) o poliploidía (si es en múltiplos de 23 y para lo cual cada caso es distinguido por un término propio). Una célula convencional con 46 cromosomas se dice que es diploide, pues contiene dos copias de esos 23 cromosomas. Si el trastorno cromosómico numérico se da en múltiplos de esos 23 cromosomas se les llama triploidía (si existen 3 copias de los 23 cromosomas, es decir 69 cromosomas) y tetraploidia (si existen 4 copias de los 23 cromosomas, es decir 92 cromosomas). Estas condiciones son difícilmente compatibles con la vida dado que comprometen la viabilidad del producto por completo, mientras las triploidías suelen llevar a abortos espontáneos en las etapas tempranas del desarrollo, las tetraploidías no son viables (Jackson et al., 2018) (Genetic Alliance & District of Columbia Department of Health, 2010).

#### Anormalidades estructurales

Por otra parte, las anomalías cromosómicas estructurales corresponden a las situaciones en las que el número de cromosomas es correcto, pero no su estructura, tamaño, orden o disposición; cada uno de los 23 cromosomas contienen un número de genes en un orden específico, cualquier anomalía en esa disposición corresponde a una anomalía cromosómica estructural. Los cromosomas están en constante movimiento, lo que puede provocar roturas en los mismos, existen mecanismos de reparación del DNA que reconocen las roturas de cromosomas y las reparan. Sin embargo, estos mecanismos ocasionalmente reparan cromosomas rotos de manera incorrecta (Jackson et al., 2018), por esta razón suele pensarse que dichas anomalías son el resultado de la rotura y la unión incorrecta de segmentos cromosómicos. Existe una variedad de anomalías cromosómicas estructurales que dan lugar a enfermedades y se pueden distinguir un par de subtipos. Los reordenamientos estructurales se definen como equilibrados si está presente el conjunto de cromosomas completo, aunque ordenado de una manera diferente. En el caso del reordenamiento estructural desequilibrado si hay

información adicional o faltante en alguno de los cromosomas, los reordenamientos desequilibrados pueden incluir deleciones, duplicaciones o inserciones de un segmento cromosómico (Genetic Alliance & District of Columbia Department of Health, 2010).

### **iii. Trastornos multifactoriales**

Los trastornos multifactoriales también se denominan de herencia compleja o poligénica, y en general se refiere a que no siguen patrones de herencia mendelianos, el concepto de “trastornos multifactoriales” hace alusión a la razón de dicha situación, y es que no se puede dar un patrón de herencia definido cuando se trata de varios genes distintos heredados independientemente. Se entiende que los trastornos de herencia multifactorial son causados por una combinación de variantes de múltiples genes, factores ambientales y otros procesos de regulación genética más complejos.

Como se revisó anteriormente, los patrones de herencia claros asociados con los trastornos monogénicos han facilitado la identificación de los cambios genéticos causantes de estas afecciones. Sin embargo, cada vez se estudian con mayor profundidad las contribuciones genéticas de trastornos multifactoriales complejos. Si bien, el impacto de una variante individual en un gen puede ser muy pequeño, cuando está presente junto con múltiples variantes en otros genes, en el contexto de un entorno particular, puede conducir a un mayor riesgo de enfermedad (Jackson et al., 2018).

## **2. ANTECEDENTES GENERALES**

### **a. Distrofias musculares**

El presente trabajo se enfoca en las distrofias musculares, un grupo heterogéneo de trastornos genéticos (de un solo gen en su mayoría), miogénicos, hereditarios que se caracterizan por un desgaste progresivo y debilidad de los músculos esqueléticos, con distribución y gravedad variables. Estos padecimientos se pueden subdividir en varios grupos, de acuerdo con la distribución de la debilidad muscular predominante (Emery, 2002). Las mutaciones genéticas causan disfunción o falta de proteínas que son esenciales para la estabilidad de las células musculares, lo que conduce a la destrucción progresiva y debilidad en los músculos (Theadom et al., 2014). Las distrofias musculares varían en sus características genéticas y bioquímicas, la distribución de la musculatura afectada, el grado de compromiso respiratorio y cardíaco y la afectación de otros sistemas orgánicos como los ojos y el sistema nervioso central, incluso existe variedad entre pacientes con el mismo trastorno y mutaciones genéticas, en la edad de aparición, gravedad, progresión, pronóstico y, por tanto, manejo óptimo (Carter et al., 2018). A la fecha se estima que los genes causantes de las distrofias musculares son más de 40 (Mercuri et al., 2019).

Existen diferentes tipos de distrofias musculares, a continuación, se muestra una descripción breve de algunos ejemplos para contextualizar las diferencias y similitudes; también se muestran algunos de los genes causantes para observar la variabilidad en el genotipo y consecuentemente en el patrón de herencia (Tabla 2).

#### **Distrofia muscular congénita**

Las distrofias musculares congénitas describen a niños sintomáticos en el primer año de vida o al nacer; a veces también antes del nacimiento (Mercuri et al., 2019). Los niños en este grupo presentan hipotonía y debilidad muscular al nacer o durante los primeros meses de vida. Se han reconocido varias formas diferentes, algunas

con y otras sin daño cognitivo significativo (F. Muntoni et al., 2002). A nivel celular las anomalías se dan en la matriz extracelular y en las proteínas de la membrana basal dando como resultado las variantes más comunes de distrofias musculares congénitas: colágeno 6, laminina 211 y el receptor celular  $\alpha$ -dístroglicano (Mercuri et al., 2019).

#### Distrofia muscular de Duchenne y Becker

Estas distrofias describen dos casos diferentes, su fenotipo es generado por anomalías en el mismo gen. La diferencia principal es que en la distrofia muscular de Duchenne el producto del gen está ausente o no es funcional, mientras que en la distrofia muscular de Becker el producto del gen es parcialmente funcional, esta última, por tanto, muestra un fenotipo similar al de Duchenne, pero menos agresivo.

La distrofia muscular de Duchenne se manifiesta en la infancia, después de los primeros años de vida, a menudo como un daño cognitivo leve en la adquisición de la deambulación, con dificultades para correr y, más tarde, para subir escaleras, caídas frecuentes, incapacidad para correr y subir escaleras y dificultad para levantarse del suelo. Es habitual cierto grado de deterioro mental, aproximadamente el 20% de los niños afectados tienen un coeficiente intelectual de menos de 70 (Mercuri et al., 2019; Mueller Emery AEH, 2004).

Como se mencionó anteriormente, en la distrofia muscular de Becker, la distribución del desgaste y la debilidad muscular es muy similar a la de la distrofia muscular de Duchenne, pero el curso de la enfermedad es más benigno, con una edad de inicio alrededor de los 12 años; algunos pacientes no presentan síntomas hasta mucho más tarde en la vida (Emery, 2002).

#### Distrofia muscular de Emery-Dreifuss

Esta distrofia se distingue por varias manifestaciones como contracturas tempranas, antes de que haya una debilidad clínicamente significativa de los tendones de

Aquiles, los codos y los músculos cervicales posteriores, con limitación inicial de la flexión del cuello, otra manifestación es el debilitamiento y la atrofia muscular progresiva con una distribución proximal en las extremidades superiores y distal en las inferiores al principio de la evolución de la enfermedad. Finalmente, surge la miocardiopatía, que va desde bradicardia sinusal, prolongación del intervalo PR, hasta bloqueo cardíaco completo (Emery, 1989; Mercuri et al., 2019).

#### Distrofia muscular distal

Como su nombre lo indica en esta distrofia muscular, la debilidad es principalmente distal. El trastorno se puede dividir en dos grupos principales: aparición tardía (más de 40 años) con herencia autosómica dominante, en donde está incluida la enfermedad de Welander; y de inicio temprano (menos de 30 años) con herencia autosómica recesiva (Nonaka, 1999).

#### Distrofia muscular facioescapulohumeral

Esta distrofia deriva su nombre de los grupos de músculos con debilidad progresiva que se ven afectados, principalmente: la cara y la cintura escapular, los extensores del pie y los músculos de la cintura pélvica. El deterioro mental no es una característica, pero pueden surgir enfermedades vasculares retinianas y pérdida de audición (Laforêt et al., 1998; Mercuri et al., 2019).

#### Distrofia muscular de cintura

Este tipo de distrofias musculares tienen una heterogeneidad clínica y genética muy amplia y sus características clínicas son similares a las de afecciones que no se consideran típicamente dentro de esta clasificación patológica, por ello es complicado su diagnóstico, suele identificarse por un patrón predominantemente proximal al inicio con preservación de los músculos faciales y extraoculares (Mercuri et al., 2019).

## Distroglicanopatías

Este es un grupo de condiciones extremadamente heterogéneo, la razón es que se agrupan en esta categoría todas las distrofias ocasionadas por la mutación de algún gen relacionado con los distroglicanos que conectan la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina, se entiende entonces que las distroglicanopatías primarias se deben a mutaciones puntuales homocigotas en el gen DAG1, mientras que las distroglicanopatías secundarias son causadas por mutaciones en al menos 15 genes que codifican para enzimas implicadas en la vía de glicosilación del  $\alpha$ -DG (Vélez Aguilera & Cisneros Vega, 2016). Clínicamente, la gravedad variable depende del efecto de las mutaciones recesivas individuales sobre el nivel de glicosilación de distroglicano. La reducción de la glicosilación del distroglicanos afecta, de manera jerárquica, primero a los músculos esqueléticos y cardíacos (Mercuri et al., 2019).

Tabla 2 Patrones de herencia de algunas distrofias musculares; tabla obtenida de (Carter et al., 2018) , los genes fueron cotejados con la base de datos de NCBI.

Distrofias Musculares		
Tipo de Distrofia	Patrón de Herencia	Gen afectado
Distrofia muscular congénita con deficiencia de merosina	Autosómico recesivo	<i>LAMA2</i>
Distroglicanopatías (Walker-Warburg, distrofia muscular de Fukuyama, enfermedad del músculo ojo-cerebro)	Autosómico recesivo	Múltiples
Distrofia muscular de Ullrich	Autosómico recesivo	<i>COL6A1, COL6A2, COL6A3</i>
Miopatía <i>SEPN1</i> (distrofia muscular con síndrome de columna rígida)	Autosómico recesivo	<i>SEPN1</i>
Distrofia muscular de Duchenne	Ligado cromosoma X al	<i>DMD</i>
Distrofia muscular de Becker	Ligado cromosoma X al	<i>DMD</i>
Distrofia muscular de Emery-Dreifuss	Depende del gen	<i>EMD, FHL1, LMNA, SYNE1, SYNE2</i>
Distrofia muscular de cintura	Autosómico recesivo dominante y	Múltiples
Distrofia facioescapulohumeral	Autosómico dominante	<i>DUX4, SMCHD1</i>
Distrofia miotónica	Autosómico dominante	<i>DMPK, CNBP</i>
Distrofia muscular oculofaríngea	Autosómico dominante	<i>PABPN1</i>

## **b. Distrofia muscular de Duchenne**

### **i. Gen *DMD***

Como se mencionó anteriormente, las distrofias musculares de Duchenne y Becker son causadas por anomalías en el gen *DMD*. El gen *DMD* se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma X (ChrXp21.2-p21.1), aproximadamente en la posición hg38 chrX: 31,119,222 - 33,339,388, tiene un tamaño de alrededor de 2,220,167 nt (2.2Mb), su conteo total es de 79 exones y se encuentra en la cadena complementaria (Kent et al., 2002), es el gen más grande descrito en los seres humanos, pues corresponde a aproximadamente el 0,1% del genoma humano total o aproximadamente el 1.5% de todo el cromosoma X. El 99% del gen de la distrofina está compuesto por intrones (Francesco Muntoni et al., 2003).

El estudio de la disposición de los exones en el gen *DMD*, y en general el análisis de miles de casos clínicos de pacientes con DMD ha llevado a un conocimiento más específico de la frecuencia de las mutaciones o anomalías que ocasionan la expresión aberrante de su producto, y es que, en realidad, la causa de la enfermedad no es una mutación específica, se ha observado una heterogeneidad amplia en las causas moleculares que llevan a un procesamiento erróneo del gen. En un estudio que recopiló más de 600 muestras de pacientes con DMD se detectó un reordenamiento en el 38,1%, así como deleciones en el 79% (de las cuales, 31 casos fueron deleciones de un solo exón y 157 casos fueron deleciones multiexónicas). También se detectaron duplicaciones en el 18.5% (de los cuales 12 casos involucraron exones s y 32 exones múltiples) y reordenamientos complejos en el 2.5%. Como se ha observado en otros estudios, una locación importante para las deleciones (que son la principal causa de procesamiento anómalo), denominada "hotspot" se identificó entre los exones 45 y 52, siendo el exón 46 el que se afectó con mayor frecuencia. Así mismo, se observó otro "hotspot" de deleciones entre los exones 8 y 13. Aunque para el caso de las duplicaciones la frecuencia parecía estar

distribuida de manera más uniforme en el gen, se observó un “hotspot” entre los exones 2 y 11 en el extremo 5 del gen (Oshima et al., 2009) (Bladen et al., 2015).

Las distrofias musculares ocasionadas por mutaciones en el gen *DMD* son trastornos genéticos recesivos ligados al cromosoma X, si bien actualmente es fácil de explicar el patrón de herencia que sigue la DMD, el inicio fue complicado debido a las inconsistencias que existían en algunos casos reportados de DMD (Bucher et al., 1980), conforme paso el tiempo dichas anomalías en los patrones de herencia pudieron ser explicadas por fenómenos como el mosaicismo germinal y las mutaciones postcigóticas (Wood & McGillivray, 1988).

Una de las peculiaridades de este gen es su patrón de expresión tan variado, es un gen muy grande, con un contenido de intrones importante, con varios promotores, y con mecanismos de procesamiento alternativo de sus transcritos muy complejos. Se conocen al menos siete promotores específicos de tejidos independientes, adicionalmente se conoce un sitio de poliadenilación alternativo, estas características generan la transcripción de múltiples variantes de la proteína (Jones et al., 2021). En otras palabras, los siete promotores distintos generan siete inicios alternativos de la transcripción dentro del mismo gen, además, se debe considerar el procesamiento alternativo que sufre cada uno de esos transcritos. Tomando en cuenta todas estas variables, las posibilidades de generar distintos transcritos es muy amplia, por lo que resulta necesario clasificar a las isoformas y variantes conocidas en diferentes categorías.

Para dividir los productos del gen *DMD* se utiliza el peso relativo de sus productos proteicos en unidades de masa molecular (Dáltones; Da), así bien, los nombres de los productos del gen DMD están conformados por las iniciales Dp, que proviene del nombre de la proteína codificada por el gen *DMD*, “Distrofina”, seguido de su peso relativo en kDa. Se conocen al menos ocho formas de distrofina (Dp427p, Dp427c, Dp427m, Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 y Dp40), como se mencionó anteriormente, cada una de estas formas podrá tener variantes que se distinguen por el procesamiento alternativo que ocurre en cada una, es decir, pueden presentar variaciones en la cantidad y orden de los exones que contienen (figura 1).

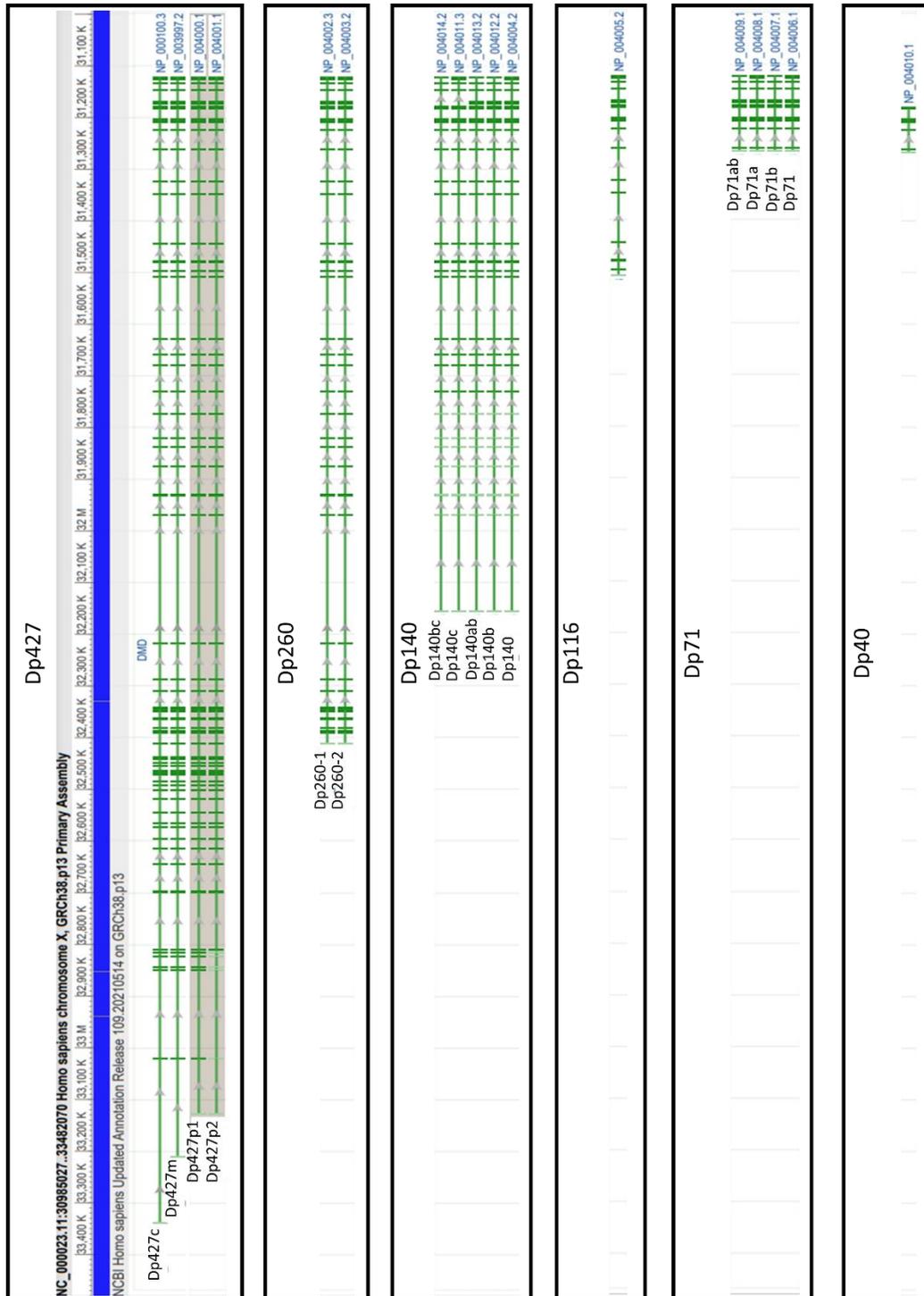


Figura 1 Ilustración del gen de la de la distrofina y sus formas reportadas en NCBI; cada recuadro negro integra las distrofinas del mismo tamaño relativo, el primer recuadro negro contiene 3 isoformas distintas (distinguidas por iniciar en diferentes exones) y cada uno de los recuadros siguientes contienen 1 isoforma distinta, además, las diferentes distrofinas que se encuentran dentro del mismo recuadro con el mismo inicio representan cada una de las variantes de las isoformas, las líneas verdes horizontales representan la extensión de cada variante dentro del gen DMD, las líneas verdes verticales pequeñas representan los exones; la imagen fue adaptada de (Doorenweerd, y otros, 2017) y obtenida del visor genético de NCBI.

## ii. Expresión de las Distrofinas

Las variantes de la distrofia pueden tener una expresión diferencial dependiente del tejido (Tabla 3) y de la etapa de desarrollo, por ejemplo, en lo que respecta al tejido, la distrofina de longitud completa Dp427m se expresa predominantemente en el músculo.

*Tabla 3 Características Moleculares, composición y distribución de algunas variantes de las isoformas de la distrofina*

Forma	No. total de exones	Transcrito (nt)	Proteína (aa)	Dominios	Localización (Tejido)
<b>Dp427</b>					
Dp427c	79	13854	3677	CH-DMD-rpt1 CH-DMD-rpt2	Cerebral
Dp427m	79	13992	3685		Muscular
Dp427p1	79	14000	3681	SPEC WW EFh-DMD ZZ-dystrophin	Neuronas de Purkinje
Dp427p2	79	14083	3562	CH-DMD-rpt2 SPEC WW EFh-DMD ZZ-dystrophin	
<b>Dp260</b>					
Dp260-1	51	9751	2344	SPEC WW EFh-DMD ZZ-dystrophin	Retina
Dp260-2	51	9894	2341		
<b>Dp140</b>					
Dp140bc	31	7054	1133	SPEC WW EFh-DMD ZZ-dystrophin	Cerebelo y Renal
Dp140c	32	7086	1115		Cerebelo
Dp140ab	34	7345	1230		Cerebelo y Renal
Dp140b	35	7384	1243		Renal
Dp140	36	7416	1225		Renal y Sistema Nervioso Central
<b>Dp116</b>					
Dp116	25	5627	956	SPEC WW EFh-DMD ZZ-dystrophin	Neurolemocitos

<b>Dp71</b>					
Dp71d	18	4676	617	EFh-DMD ZZ-dystrophin	Ubicua
Dp71d <sub>Δ71</sub>	17	4637	604		
Dp71d <sub>Δ74</sub>	17	-	-		
Dp71d <sub>Δ71,74</sub>	16	-	-		
Dp71d <sub>Δ71,73-74</sub>	15	-	-		
Dp71d <sub>Δ71-74</sub>	14	-	-		
Dp71f	17	4644	635		
Dp71f <sub>Δ71</sub>	16	4605	622		
Dp71f <sub>Δ74</sub>	16	-	-		
Dp71f <sub>Δ71-74</sub>	13	-	-		
Dp71e <sub>Δ71</sub>	15	-	-		
Dp71e <sub>Δ71-74</sub>	12	-	-		
<b>Dp40</b>					
Dp40	9	1618	340	EFh-DMD ZZ-dystrophin	Ubicua

Esta tabla fue realizada con datos de NCBI y (den Dunnen, 2006).

La mayoría de estas formas se expresan en el cerebro y existen varias hipótesis sobre su papel en los subtipos de neuronas y astrocitos (figura 2) (Doorenweerd, 2020). Por otro lado, en lo que respecta a la expresión de distrofinas dependientes de la etapa del desarrollo, esta como ejemplo un estudio que Morris y colaboradores (Morris et al., 1995) llevaron a cabo con varias muestras de tejido cerebral de pacientes de diferentes edades, la distrofina de longitud completa se expresa en niveles relativamente bajos en todas las etapas de la vida. Dp71 tiene una expresión intermedia en todas las etapas de la vida; existe muy poca o ninguna expresión de Dp260 y Dp116; y el contenido de Dp140 es especialmente alto durante etapas tempranas del desarrollo, antes del nacimiento (Morris et al., 1995). Incluso se ha estudiado el papel que juega la expresión diferencial de la distrofina y como está relacionada con algunos otros trastornos más complejos como algunos tipos de cánceres, incluidos sarcomas, leucemias, linfomas, tumores del sistema nervioso, melanomas y varios carcinomas. Se ha observado que el equilibrio o distribución que existe entre las formas de la distrofina en condiciones normales, algunas ocasiones cambia durante el cáncer. La proteína Dp71, por ejemplo, se mantiene típicamente en el cáncer, mientras que Dp427 de longitud completa, un probable

supresor de tumores, se inactiva con frecuencia en el cáncer debido a una pérdida recurrente de los exones 5'. Por lo tanto, la proporción de productos génicos cortos y largos puede ser importante en la tumorigénesis (Jones et al., 2021). Cabe destacar que al tratarse de trastornos tan complejos que afectan y se ven afectados por anomalías en circuitos génicos completos, resulta difícil proponer una correlación clara.

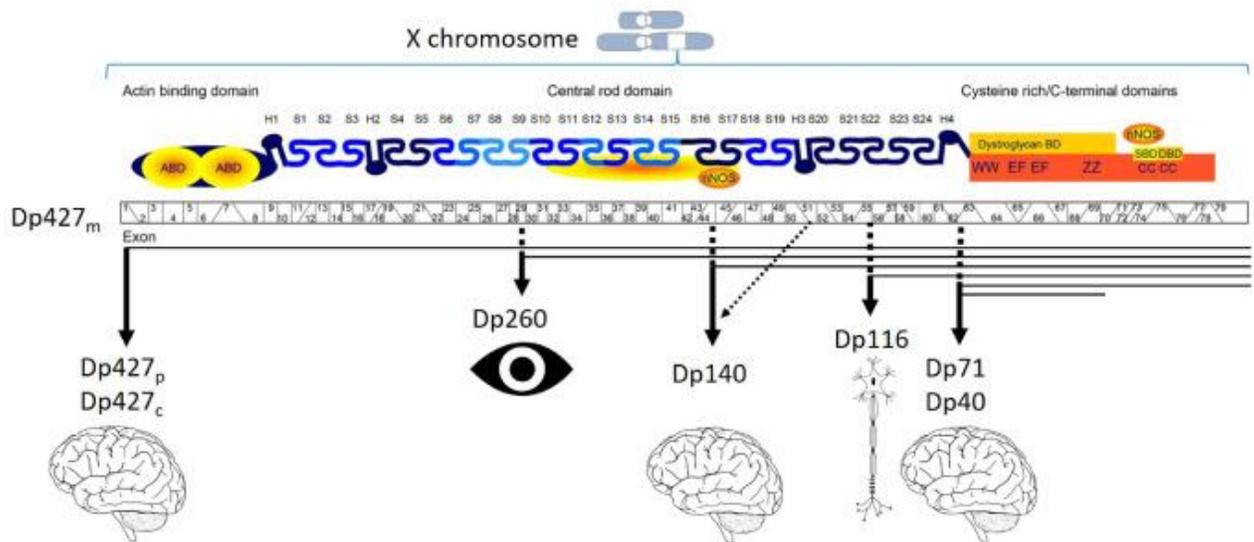


Figura 2 Representación gráfica de la expresión tejido-específica de las isoformas de la distrofina. La figura describe los dominios de la distrofina, así como los tejidos donde se expresa principalmente cada isoforma y el exón en el que comienza cada isoforma (Dooreuweerd, 2020).

### iii. Distrofina de longitud completa (Dp427)

El tejido muscular tiene varios niveles de organización, la unidad celular fundamental del tejido muscular son los miocitos, fibras musculares o miofibras, estas células musculares tienen una forma alargada (razón por la cual son referidas como “fibras”), son multinucleadas y su principal función es la actividad de contracción, que pueden realizar gracias a los cientos o miles de miofibrillas que se

encuentran en su citoplasma (Cretoiu, y otros, 2018), dichas miofibrillas están compuestas a su vez de aproximadamente 1,500 filamentos de miosina y 3,000 filamentos de actina adyacentes entre sí (sarcómeros). Al fluido contenido entre las miofibrillas (que también puede ser visto como el citoplasma de los miocitos) se le conoce como sarcoplasma y a la membrana de los miocitos se le conoce como sarcolema, que comprende a la bicapa lipídica y una capa fina de material polisacárido (Elsevier Connect, n.d.).

La distrofina de longitud completa (Dp427) funciona como conexión entre el citoesqueleto intracelular de una miofibra y la matriz extracelular asociándose a un gran complejo oligomérico transmembranal de glicoproteínas que se ubican en el sarcolema, por esta razón una de las principales funciones de la distrofina es la estabilización del sarcolema y la regulación mecánica durante la contracción muscular (Le et al., 2018), en su ausencia el sarcolema es vulnerable al estrés físico (Matsumura & Campbell, 1994). De forma general podemos entender que la distrofina se encuentra unida a los filamentos de actina citoplasmática en su extremo N-terminal y al complejo de glicoproteínas en su extremo C-terminal y funciona como un “puente” que integra la organización citoesquelética y la señalización celular en la periferia del músculo, además de proporcionar estabilidad sarcolémica y transmisión de fuerza contráctil a la región extracelular (Dowling et al., 2021). Debido a la importancia de la interacción entre la distrofina y el complejo glicoproteico, se le denomina complejo asociado distrofina-glicoproteína (DGC) o complejo proteico asociado a distrofina (DAPC).

El DAPC es un gran complejo que tiene funciones tanto de estabilización mecánica como de señalización en la mediación de interacciones entre el citoesqueleto, la membrana y la matriz extracelular. La desestabilización del DAPC en cualquiera de sus componentes conduce a la fragilidad y pérdida de integridad de la membrana, lo que eventualmente lleva a la degeneración del músculo esquelético característica de la DMD (Lapidos et al., 2004).

Para poder llevar a cabo todas las interacciones antes mencionadas, la distrofina de longitud completa contiene varios dominios funcionales: un dominio N-terminal

de unión a actina (ABD; conformado por dos dominios CH), un dominio de barra central que está formado por 24 repetidos de espectrina, una región rica en cisteína, que a su vez, está formada por un dominio WW, dos dominios EF-hand y un dominio ZZ. Próximo a la región rica en cisteína se encuentra el dominio C-terminal, cabe destacar que la distrofina contiene cuatro regiones bisagra que le confieren flexibilidad. La región rica en cisteína y la primera mitad del dominio C-terminal de la distrofina forman la interacción con la parte citoplasmática del beta-distroglicano. Esta región involucrada en la unión a beta-distroglicano incluye un dominio WW, dos motivos EF-hand y un dominio ZZ, siendo WW el principal dominio que media esta interacción (Rentschler et al., 1999), apoyado de los dominios EF-hand (Chung & Campanelli, 1999; Xin et al., 2000).

#### **iv. Distrofina Dp260**

Desde que se empezó a estudiar la DMD se reportaron anomalías en la retina de los pacientes con este padecimiento, se sabe que en ciertas regiones de la retina están presentes diferentes formas de la distrofina: Dp427, Dp260, Dp140 y Dp71 (Tokarz et al., 1998) La distrofina que se expresa en mayor nivel en la retina es la Dp260, aunque también se ha encontrado en otros tejidos como músculo y cerebro, es necesaria para una función normal de la retina (Richard C. et al., 1995), Por esta razón se dice que Dp260 es una isoforma de retina que se expresa de forma progresiva durante el desarrollo igual que la consolidación de las funciones sinápticas (Rodius et al., 1997). Cabe destacar que, en cuanto a su estructura proteica, Dp260 a diferencia de Dp427, carece de la sección N-terminal, y comienza con una secuencia corta propia, seguida del dominio de barra central. La sobreexpresión de Dp260 en células musculares de ratones con DMD disminuye algunos síntomas característicos de la enfermedad, sin embargo, no es suficiente para revertir por completo el fenotipo causado por la ausencia de Dp427 (Warner et al., 2002), Esto pone de manifiesto que la función de Dp60 no es la misma que la de DP427, aunque siguen compartiendo la influencia en la localización de beta-

distroglicano (Kameya et al., 1997), lo cual resulta congruente, pues la parte de la que carece con respecto a los dominios antes mencionados para Dp427, es el fragmento de unión a actina, pero conserva idéntico el resto de la proteína.

#### **v. Distrofina Dp140**

Inicialmente se creyó que el déficit cognitivo presente en los pacientes con DMD estaba asociado en su totalidad con la isoforma Dp140, pues dicha isoforma se expresaba en el sistema nervioso central y fue descubierta en tejido cerebral (Hart G.W. Lidov et al., 1995). conforme se realizó mayor investigación, se tuvieron evidencias de que el papel de Dp140 podría ser principalmente en etapas tempranas del desarrollo, previo al nacimiento (Morris et al., 1995) no en etapas adultas y no solamente en el cerebro, también en otros tejidos, como el riñón, lo que sugería que Dp140 también podía participar en la transducción de señales (Durbeej et al., 1997). En conjunto, estas investigaciones abrían la posibilidad de que existiera un fenotipo renal durante la DMD (H. G. W Lidov & Kunkel, 1998). Existen al menos 5 variantes de Dp140 que difieren en la región 5', pero conservan los dominios distales, dotando a las diferentes variantes de dominios de interacción diferentes, que podrían regular distintos niveles de expresión genética (Hart G.W. Lidov & Kunkel, 1997). Se sugiere que Dp140 es una isoforma involucrada en el correcto desarrollo del cerebro (Doorenweerd et al., 2014).

#### **vi. Distrofina Dp116**

La Dp116 es el tercer producto más pequeño del gen DMD (y el segundo con respecto al promotor) y a pesar de que comparte la región distal con las formas más grandes se conoce poco sobre ella (Matsuo et al., 2017). Esta distrofina se descubrió en tejido nervioso periférico, expresado principalmente en la membrana celular de células de Schwann (Byers et al., 1993), así como en la médula espinal (Mizuno et al., 1993). A diferencia de Dp140 que se expresa principalmente durante las etapas tempranas del desarrollo, Dp116 se detecta en etapas más tardías del

desarrollo, después del nacimiento (Julian et al., 1994). Dado que Dp116 conserva la región C-terminal de la distrofina, su función consiste en ensamblar un complejo proteico en células del sistema nervioso periférico (Imamura et al., 2000; Masaki et al., 2001). Como es usual entre las isoformas de la distrofina, Dp116 tampoco es eficiente para revertir el fenotipo distrófico ocasionado por la ausencia de la distrofina de tamaño completo en el músculo esquelético, aunque contribuye a mejorar algunas características como el crecimiento, la movilidad y la esperanza de vida (Judge et al., 2011). Recientemente se ha demostrado que, así como la localización de las mutaciones en el gen *DMD* pueden afectar en mayor medida a la forma que modifican y por tanto ver la repercusión en su función, los pacientes con deficiencia de Dp116 presentan fallas cardíacas con menor frecuencia que los pacientes con DMD cuyas mutaciones se localizan fuera de esta región (Yamamoto et al., 2018).

#### **vii. Distrofina Dp71**

La distrofina Dp71 es codificada por el promotor constitutivo más distal de todas las distrofinas (Lederfein et al., 1993), ubicado en el intrón 62. A diferencia de las demás distrofinas, Dp71 es ubicua y su presencia se detecta en tejidos no musculares como el cerebro, asociada a la membrana plasmática de células miogénicas mdx durante el desarrollo (Rapaport et al., 1993; Rapaportz et al., 1992). Se ha reportado que su presencia aumenta durante el desarrollo (Daniel Jung et al., 1993). Actualmente se cuenta con evidencias indiscutibles de su función en el correcto desarrollo neural. Por ser de especial interés para esta investigación, las particularidades de esta forma de la distrofina son discutidas a detalle más adelante.

#### **viii. Distrofina Dp40**

La distrofina Dp40 fue descubierta como la forma más corta de la distrofina (Tinsley et al., 1993), es transcrita a partir del mismo promotor que Dp71, pero tiene un sitio de paro de la traducción anticipado con respecto a la Dp71, al final del exón 70. La

función de Dp40 se ha asociado también al desarrollo cognitivo (Tozawa et al., 2012) debido a las mismas razones que Dp71, la ubicación de las mutaciones en pacientes con DMD y el deterioro cognitivo severo (Milic Rasic et al., 2015). Esta asociación se basa en que esta distrofina comparte la mayor parte de su estructura con Dp71, careciendo únicamente de una pequeña fracción C-terminal, de hecho, igual que Dp71, Dp40 es ubicua y se expresa durante el desarrollo neonatal temprano incrementando hasta la adultez (Fujimoto et al., 2014). Esta proteína se encuentra, de igual manera de manera semejante a Dp71, en el citoplasma, la periferia celular y pequeñas cantidades en el núcleo en células PC12 no diferenciadas (Aragón et al., 2015).

#### **ix. Dominios de la Distrofina**

Superfamilia del dominio de homología de calponina (CH)

Los dominios CH son motivos de unión de filamentos de actina (F-actina) y se pueden encontrar aislados o repetidos en tándem. Si bien su función principal radica en la unión a la actina, también pueden llevar a cabo funciones involucradas con la regulación. Los dominios CH suelen encontrarse en proteínas citoesqueléticas y de transducción de señales (Lu et al., 2020). En lo que respecta a las isoformas de la distrofina que contienen en la región N-terminal un dominio de unión a actina (ABD1), independientemente de las variaciones menores, el dominio se compone de dos dominios de homología de calponina en tándem, que son identificados como CH1 y CH2 (en función de su posición con respecto al extremo N-terminal de la distrofina). Se ha demostrado que el dominio CH2 aislado de la distrofina se une débilmente a F-actina en comparación con el dominio CH completo (CH1 y CH2 en tandem) y el dominio CH1 aislado se une a F-actina con una afinidad similar a la del dominio CH completo, mientras que el dominio CH1 aislado es muy inestable y es propenso a agregación y el dominio CH2 aislado es muy estable, similar al dominio CH completo. Es decir, dentro de la distrofina, CH1 se encarga de conferir la fuerza de unión a actina del dominio ABD y CH2 de estabilizar su estructura (Singh et al., 2015). Además de esto existen otros factores que no dependen del ABD de la

distrofina para su interacción, si bien, ambos dominios (CH1 y CH2) se complementan para mantener una interacción suficientemente fuerte y estable con la actina, se ha sugerido que, en gran medida, la interacción de la distrofina y la actina depende del estado estructural de la F-actina (Orlova et al., 2001). Es importante indicar que las diferencias menores que tienen los ABD de las diferentes isoformas de la distrofina que contienen dicho dominio tienen un impacto en su estructura y función (Upadhyay et al., 2020), si bien, los cambios de aminoácidos no afectan la estructura global de la proteína, si afectan su estabilidad termodinámica, siendo la isoforma del músculo más estable que la del cerebro y las isoformas de Purkinje. La forma del músculo se une a la actina filamentosa (actina F) con una afinidad menor en comparación con el cerebro y las isoformas de Purkinje, aunado a esto se reportó que todas las formas mostraron una mayor afinidad por la actina del músculo liso en comparación con la actina de otras fuentes. Los autores de este trabajo concluyen que las formas del dominio ABD que contiene dos repeticiones en tándem de CH podrían estar usando variaciones menores de secuencia para modular su estabilidad termodinámica y función de unión a actina, lo que conduce a una especificidad en las interacciones distrofina-actina en varios tejidos.

Adicionalmente se ha demostrado que, además de unirse a la F-actina, el ABD interactúa con la citoqueratina 19 contenida en los filamentos intermedios y esta interacción ha resultado específica de la distrofina. Otras proteínas con el ABD homólogo a la distrofina no interactúan con las citoqueratinas y a su vez el ABD de la distrofina no se asocia con otros filamentos que contienen diferentes tipos de citoqueratinas (Stone et al., 2005).

#### Dominio de Espectrina (SPEC)

Los dominios de espectrina se encuentran en varias proteínas alargadas involucradas en la estructura citoesquelética (espectrina, alfa-actinina y distrofina), y pueden encontrarse como dominios aislados o repetidos en tándem. Estos dominios forman mallas celulares resistentes mediante la reticulación de los

filamentos de actina, cada repetición del dominio de la espectrina está constituida por un conjunto de tres hélices. Las repeticiones se caracterizan por un residuo de triptófano en la posición 17 de la hélice A y una leucina en 2 residuos del extremo carboxilo de la hélice C. Aunque el dominio se produce en múltiples repeticiones, a diferencia de lo revisado para los dominios CH y con algunas pequeñas excepciones en la estabilidad mecánica de algunos repetidos (Glyakina et al., 2018), los dominios de repetición de espectrina son relativamente estables por sí mismos (Lu et al., 2020; Yan et al., 1993). Aunque su función no está del todo clara, se ha sugerido su presencia con fines estructurales y reguladores, coordinando las interacciones citoesqueléticas y funcionando como una central para la interacción y funcionamiento de otras estructuras multiproteicas complejas (Figura 4) (Djinovic-Carugo et al., 2002). Como se describió anteriormente para los dominios CH, los dominios de espectrina, dependiendo de la proteína donde se encuentren, pueden tener ligeras diferencias, por ejemplo, en su rapidez de plegamiento (Wensley et al., 2009).

En el caso de la distrofina se encuentran 24 repeticiones de tipo espectrina que funcionan separando los extremos amino y carboxilo (Percival, 2018), si bien, la parte encargada de unirse a la membrana y más específicamente al DAPC es el extremo C-terminal de la distrofina, se ha demostrado que algunos repetidos de espectrina tienen la facultad para unirse al sarcolema. La región central de los repetidos de espectrina comprendida entre los repetidos 10-15 se sugiere como un área que contribuye significativamente a la rigidez y la estabilidad del sarcolema a través de sus interacciones simultáneas con el citoesqueleto y la membrana lipídica (Sarkis et al., 2013). Se ha reportado la capacidad de unión al sarcolema en las regiones comprendidas entre los repetidos 1-3, 10-12 y C-terminales, de hecho, los repetidos C-terminales son capaces de restaurar el ensamblaje de DAPC en el sarcolema por sí solos, tarea que realiza la región C-terminal de la distrofina rica en cisteína (Zhao et al., 2016).

Dominio WW

Este dominio es conocido como tal por su característica de poseer dos triptófanos conservados separados por 20-22 aminoácidos y corresponde a un dominio globular de 38-40 aminoácidos. Su función es básicamente de nodo central de interacciones en un conjunto diverso de proteínas de señalización; se une a secuencias ricas en prolina específicas que contienen un motivo central Pro-Pro-x-Tyr. Esta unión suele tener afinidades relativamente bajas con una especificidad proporcionada por los bucles variables y los dominios vecinos (Lu et al., 2020).

En la distrofina, el dominio WW se ubica próximo a la región C-terminal de la proteína, en la región denominada rica en cisteína. En el músculo esquelético, la distrofina cerebral y las formas de la distrofina cerebral, como Dp140 o Dp116 se unen específicamente al beta-distroglicano. Los 15 aminoácidos C-terminales del beta-distroglicano son un sitio de unión con estructura Pro-Pro-x-Tyr que interacciona con el dominio rico en cisteína de la distrofina, así como una región pequeña inmediata anterior (la segunda mitad de la bisagra 4)(D. Jung et al., 1995; Rentschler et al., 1999). Esta interacción es de gran importancia en el papel de señalización celular del DAPC y está regulada por la fosforilación. La fosforilación de la tirosina de la mayoría de los 15 aminoácidos C-terminales del beta-distroglicano interrumpe su interacción con la distrofina y es precisamente el residuo de tirosina que está presente en el motivo de unión a WW de beta-distroglicano el más importante para interrumpir la interacción beta-distroglicano-distrofina (Ilsley et al., 2001).

Motivo EF-hand (EFh-DMD).

Es un motivo de unión a calcio de una superfamilia diversa de sensores de calcio y moduladores de señal de calcio; las proteínas que contienen estos dominios suelen contener dos EFh contiguos. En la mayoría de las proteínas, cuando se da la interacción con  $Ca^{2+}$  se induce un cambio conformacional en el motivo de EFh, exponiendo una amplia superficie hidrofóbica que permite que las proteínas interactúen con una variedad de proteínas diana, lo que lleva a la activación o inactivación de las mismas (Gribenko et al., 2001; Lu et al., 2020; Santamaria-Kisiel

et al., 2006). Muchas de las proteínas con estos dominios están relacionadas con actividades reguladoras intracelulares y extracelulares, dentro de las células son capaces de unir funcionalmente dos proteínas. También participan en la regulación de la fosforilación de proteínas y tareas múltiples como la dinámica de los componentes del citoesqueleto, los factores de transcripción, la homeostasis del  $Ca^{2+}$  y la proliferación y diferenciación celular. Cabe destacar que algunas proteínas extracelulares con dominios EFh estimulan la supervivencia y / o diferenciación neuronal y la proliferación de astrocitos y causan muerte neuronal por apoptosis (Donato, 2001).

### Motivo ZZ

El motivo ZZ coordina dos iones de zinc, y en la distrofina resulta esencial para mantener una interacción estable con el beta-distroglicano (Lu et al., 2020), de hecho, cuando existen mutaciones sin sentido en esta región, dan como resultado una expresión subarcolémica disminuida o ausente debido a la inestabilidad de la proteína, probablemente debido a un plegamiento incorrecto, o la interrupción de la unión con  $\beta$ -distroglicano a pesar de una expresión casi normal en la membrana, dependiendo de la mutación involucrada (Ishikawa-Sakurai et al., 2004; Vulin et al., 2014).

### Regiones Bisagra

Como se ha mencionado anteriormente la mayor parte de la distrofina de longitud completa se compone de 24 repeticiones similares a la espectrina, que separan las dos regiones especializadas de la proteína ubicadas en los extremos N-terminal y C-terminal. No obstante, existen cuatro regiones espaciadoras importantes en la estructura y disposición de la proteína que son conocidas como “regiones bisagra”, dos de estas secuencias espaciadoras están presentes al principio y al final del dominio de repeticiones, identificando la separación a nivel secuencia del dominio de barra central y los extremos especializados, los otros dos espaciadores no

repetidos se encuentran entre los elementos repetidos 3 y 4 y 19 y 20. Los espaciadores tienen un alto contenido de prolina y son sitios sensibles para la proteólisis y proveen de flexibilidad y resistencia a la membrana (Koenig & Kunkel, 1990).

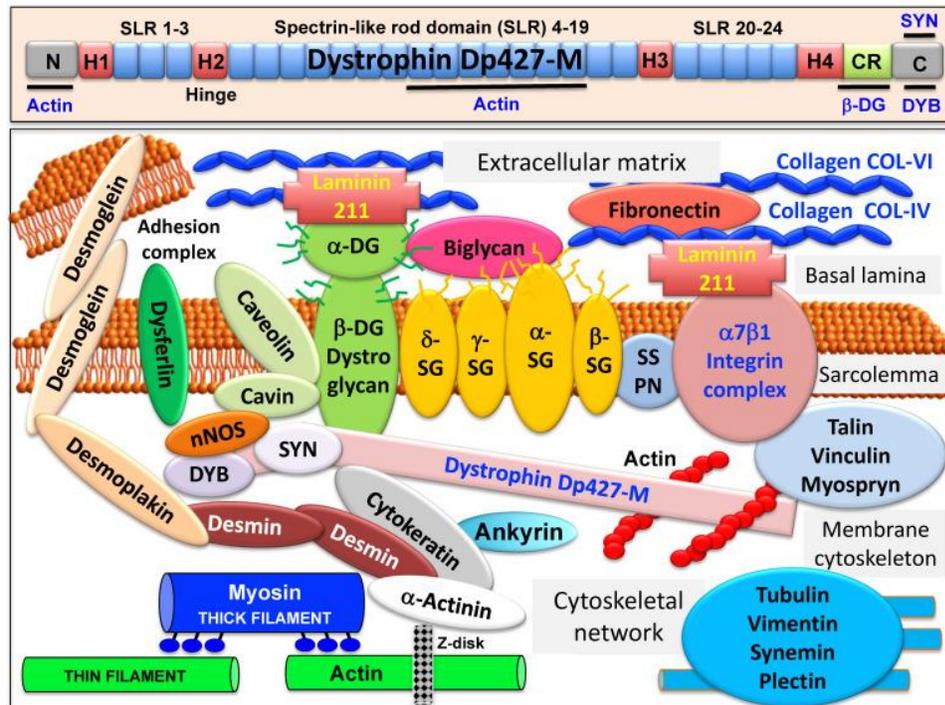


Figura 3 Interacciones de la distrofina de longitud completa. En la parte superior de la figura se encuentra una representación de la proteína distrofina, indicando en colores sus principales dominios y bajo ellos, las proteínas con las que interacciona. En la parte inferior de la figura se observan algunas de las proteínas con las que interacciona la distrofina. (Dowling et al., 2021).

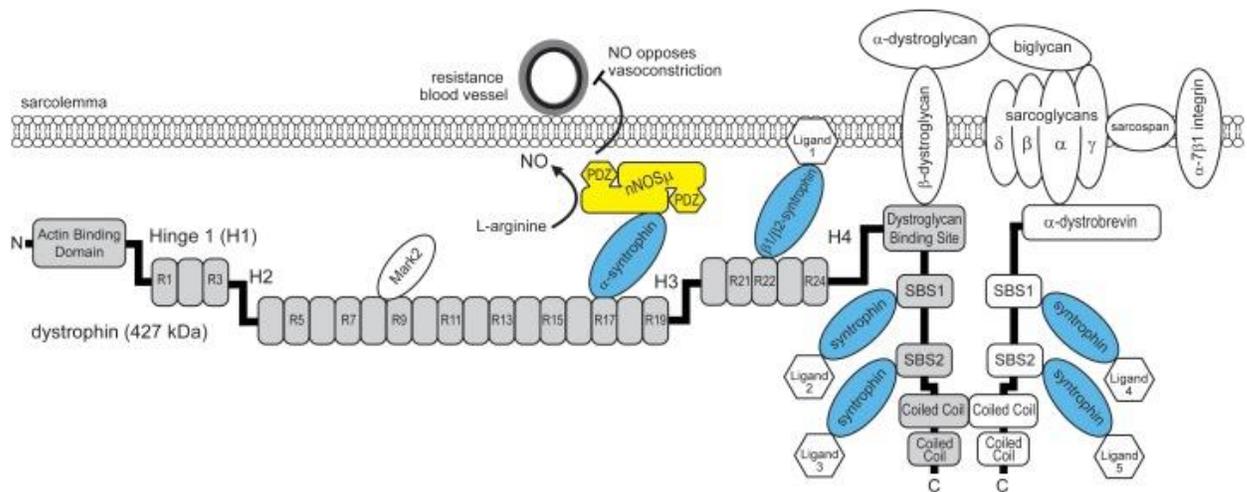


Figura 4 Interacciones específicas de los dominios de la distrofina. En gris se muestran los dominios de la distrofina y en blanco se muestran las proteínas del DAPC, también se pueden observar algunas interacciones específicas de repetidos de espectrina de la distrofina (Percival, 2018).

Es importante mencionar que dentro de la distrofina existen cuatro regiones hidrófobas importantes, en tres de ellas se encuentran las mutaciones características de fenotipos graves de DMD. Estas regiones incluyen el dominio CH2, el repetido de espectrina 16 y el dominio EFh y todas ellas se unen a proteínas del DAPC, la alteración de la cuarta región hidrófoba provoca un fenotipo menos grave y se localiza en la tercera bisagra (Liang et al., 2015).

Las formas más cortas de la distrofina, como ya se ha revisado, deben su menor tamaño a que se expresan a partir de diferentes promotores que están más alejados del extremo N-terminal, razón por la cual no contienen el dominio de unión a actina N-terminal. Mientras más lejano se encuentre el promotor carecen de un mayor número de repeticiones del dominio de barra central, de hecho, las isoformas más cortas Dp71 y Dp40 también carecen del dominio de varillas (Jones et al., 2021; Koenig et al., 1988).

## **x. Fenotipo Muscular y del Sistema Nervioso de la DMD**

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) se presenta en la infancia con problemas o retrasos en las actividades motoras o discapacidad física que suele ser progresiva, los niños afectados dependen de la silla de ruedas a los 12 años (Darras et al., 2000), En los casos más leves están presentes los fenotipos de aumento asintomático de la concentración sérica de creatina quinasa (CK) y calambres musculares. En los casos más severos la característica más distintiva de la distrofia muscular de Duchenne es una distrofia muscular proximal progresiva con pseudohipertrofia característica de las pantorrillas. En este padecimiento se afecta el miocardio, se presenta miocardiopatía en casi todas las personas con DMD después de los 18 años, adicionalmente existe una elevación masiva de los niveles de CK en la sangre y degeneración de miofibras con fibrosis e infiltración de grasa que se observa en una biopsia muscular. Los pacientes con DMD suelen tener una esperanza de vida de alrededor de 20 años (OMIM) (Nigro et al., 1983) siendo las principales causas de fallecimiento las complicaciones respiratorias y la miocardiopatía progresiva. A esto se agrega un fenotipo cognitivo variable, pues se han demostrado dificultades de aprendizaje y de comportamiento, a diferencia del desgaste muscular progresivo que es universal, no se observan las dificultades cognitivas en todos los pacientes con DMD, la gravedad es variable, no es progresiva y no tiene una correlación con la gravedad del fenotipo distrófico (Doorenweerd, 2020; Mirabella et al., 1993). Estas características pueden ser atribuidas al hecho de que la distrofina se expresa en neuronas dentro de regiones cerebrales específicas, incluido el hipocampo, que es una estructura asociada con el aprendizaje y la formación de la memoria (Rae & O'Malley, 2016). (Rae & O'Malley, 2016). Para el fenotipo cognitivo se ha reportado una diferencia significativa en el coeficiente intelectual medio a escala completa entre los pacientes con deleciones en los extremos 5' y 3' del gen, sin que ningún paciente con deleciones 5' tuviera retraso mental (K. M. D. Bushby et al., 1995).

El coeficiente intelectual promedio en las personas con DMD ronda los 82 puntos, lo cual coloca al grupo por debajo de la media normal que es de aproximadamente 100 puntos, incluso en pacientes que no tienen discapacidad intelectual algunas funciones cognitivas pueden verse comprometidas (Battini et al., 2018). Alrededor del 20% de la población con DMD presenta un coeficiente intelectual por debajo de los 70 puntos, lo que ya es considerado como retraso mental grave (Daoud et al., 2009). Varios estudios han demostrado que el coeficiente intelectual más afectado corresponde al desarrollo verbal, seguido de la discapacidad de aprendizaje y finalmente la discapacidad intelectual en general (Chamova et al., 2013; Sarrazin et al., 2014), lo que lleva a desordenes más complejos como el déficit de atención y la hiperactividad, en alrededor de un tercio de la población con DMD (Pane et al., 2012).

#### **xi. Diagnóstico de la DMD**

Debido a que la distrofia muscular de Duchenne es una enfermedad que afecta a 1 de cada 3600 a 6000 nacimientos de varones vivos (K. Bushby et al., 2010) puede considerarse una enfermedad “rara”, lo que presenta desventajas para su diagnóstico, ya que no es fácil o rutinario. El diagnóstico básicamente consiste en hallar los rasgos clínicos característicos, lo cual representa un reto debido a que se diagnostica en niños pequeños, así como una investigación de antecedentes familiares de afecciones similares para poder sospechar de una distrofia muscular. Adicionalmente suelen hacerse pruebas de laboratorio en busca de una concentración elevada de CK y dependiendo del grado de avance o la gravedad se pueden realizar biopsias y pruebas histológicas en busca de daño muscular. Finalmente se opta por las pruebas genéticas contundentes (Darras et al., 2000), entre las cuales se incluye el análisis por PCR y secuenciación, que suelen ser un desafío debido al tamaño del gen, pero necesarias para determinar el tipo específico de distrofia.

## **xii. Tratamiento**

En general, los tratamientos para las enfermedades genéticas se distinguen por ser complicados debido a la complejidad que conllevaría reemplazar en cada célula el material genético causante del fenotipo patológico. Por esta razón, generalmente los tratamientos suelen estar orientados a disminuir los síntomas graves de la enfermedad, como paliativos que ayuden al paciente a mejorar su calidad de vida.

El caso de la distrofia muscular de Duchenne, donde las afecciones son generalizadas y progresivas, los tratamientos actuales se centran en diferentes sintomatologías. Para el fallo cardíaco o cardiomiopatía a menudo se utilizan inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina para disminuir la presión arterial, en combinación con beta bloqueadores. Se ha demostrado que el uso combinado de estos medicamentos tiene un efecto benéfico en la supervivencia de los pacientes a largo plazo (Ogata et al., 2009) incluso en pacientes asintomáticos con disfunción ventricular izquierda. Frecuentemente los pacientes con DMD padecen escoliosis, para tratarla, se utilizan aparatos ortopédicos, cirugía, fusión espinal con injertos de varilla y hueso. Los tratamientos anteriores generalmente se usan en niños pequeños, mientras que la terapia de elección para personas de entre 5 y 15 años que padecen DMD es el tratamiento con corticosteroides (K. Bushby et al., 2010; Darras et al., 2000).

El avance en el estudio de la genética humana y las técnicas de biología molecular han permitido expandir las fronteras hacia posibles terapias nuevas, orientadas a corregir el origen de las enfermedades. Para la DMD es una tarea complicada debido a tres obstáculos principales; el gran tamaño del gen, la variabilidad de mutaciones que pueden ocasionar la enfermedad y su expresión ubicua. Aun considerando lo anterior, se ha trabajado en el desarrollo de estrategias para intentar evadir todos esos obstáculos, en primer lugar, se han generado versiones más cortas de la distrofina que pueden ser empaquetadas en un vector, dichas versiones son conocidas como mini-distrofina y micro-distrofina. Estas son proteínas a las que se les ha recortado la mayor parte de su dominio de barra central

(repetidos de espectrina), dejando únicamente los repetidos de espectrina que podrían tener interacciones importantes con el DAPC o con otras proteínas citoplasmáticas. La idea al desarrollar estas estrategias es hacer la proteína más pequeña, conservando los dominios más importantes, que en su mayoría se encuentran en los extremos de la proteína. Posteriormente, para poder hacer la transferencia genética al paciente, se utilizan metodologías de transferencia genética global, como es el caso de la transferencia mediada por virus adenoasociados (AAV) (Duan, 2018). Se han reportado otras estrategias que buscan restaurar la expresión del gen mutado lo más parecido a la versión consenso, para ello se ha propuesto el uso del sistema CRISPR/Cas para eliminar la región mutada del gen y devolver al marco de lectura el resto del gen aunque quede una versión más corta (Wang et al., 2017). (Wang et al., 2017). Recientemente y con esa misma finalidad se propone la terapia de salto de exones, que básicamente consiste en generar sondas que hibriden en la región mutada y sirvan de puente para omitir dicha región y continuar con el marco de lectura abierto. Si bien, todos estos avances han aportado una ventana de nuevas oportunidades, solamente se ha logrado “atenuar” los síntomas, lo cual podría deberse a varias razones, principalmente el hecho de que no se busca restaurar la distrofina en su longitud completa, sino, obtener una versión medianamente funcional. También prevalece la situación de que las transferencias genéticas sistémicas afectan en su mayoría a células en los más bajos niveles de potencialidad, generando una vida media limitada a estas terapias.

Finalmente, se debe resolver el obstáculo de que, al ser un gen tan grande, no existe una mutación puntual causante de la enfermedad, sino que hay muchas variantes reportadas que ocasionan el fenotipo distrófico, este problema podría resolverse si la terapia genética reemplazara el gen completo. Sin embargo, como se ha mencionado, debido al tamaño del gen, actualmente dicho planteamiento representa un obstáculo importante. Se podría pensar que una vez montado un sistema eficiente que use las terapias antes mencionadas, solo quedaría cambiar el sitio que se desea modificar. Gracias a la existencia de las bases de datos de la

enfermedad, se conoce que existen mutaciones que podrían beneficiarse potencialmente de las terapias genéticas antes mencionadas (Bladen et al., 2015).

### **3. ANTECEDENTES DIRECTOS**

La investigación de la distrofina comenzó con las formas de tamaño completo creyéndolas la única causa de la enfermedad y con el tiempo la información se fue ampliando hasta abarcar todas las formas conocidas a la fecha, estudiando los papeles que cada una desempeña y como cada forma contribuye al fenotipo característico de la DMD. Una de las formas que mayor importancia ha tomado por su papel en el déficit cognitivo es la distrofina Dp71

#### **a. Distrofina Dp71**

Desde la identificación de Dp71 se han realizado un gran número de estudios para identificar y caracterizar a sus isoformas, su expresión diferencial en estadios del desarrollo y tipos celulares, su localización celular, así como sus posibles interacciones y funciones.

Como se vio anteriormente, la Dp71 “de longitud completa” (también llamada apo-distrofina 1) tiene su promotor en el intrón 62 del gen *DMD* y cuenta con 18 exones, comenzando su traducción en el exón 63 y terminando en el exón 79 generando un transcrito de aproximadamente 4.6 kb, que se traduce en un producto proteico de alrededor de 600 aa. En comparación con las isoformas de tamaño completo, la Dp71 carece de todo el dominio de barra central que tiene las repeticiones de tipo espectrina y carece también del dominio N-terminal de unión a actina, esta isoforma solamente posee el dominio C-terminal y el dominio rico en cisteína.

Una característica de Dp71, como de la mayoría de las formas de la distrofina, es que a partir del procesamiento alternativo se pueden generar múltiples isoformas, que se dividen en al menos tres grupos de proteínas, dicho procesamiento alternativo involucra a los exones 71-74, 78 y el intrón 77. Esto lleva a una clasificación más elaborada (figura 5) que está dada, en principio, por la presencia

o ausencia del exón 78. La distrofina Dp71 se divide en 3 tres grupos de isoformas, denominados: Dp71d (se expresa principalmente en el cerebro) cuando contienen el exón 78, Dp71f (se expresa principalmente en la retina y cerebro (Garcia-Tovar et al., 2001)) cuando está ausente el exón 78 y Dp71e cuando están ausentes los exones 78 y 79 pero en su lugar está presente una región del intrón 77 y se expresa en células PC12 (Saint Martín et al., 2012). Cada grupo se puede subdividir, dependiendo de la presencia o ausencia de exones del 71 al 74. Cada una de estas isoformas se identifica con la letra del grupo al que pertenece (d, f, e) seguido de los exones del 71 al 74 de los que carece (Aragón et al., 2018).

Aunque las diferencias entre las isoformas de la Dp71 parecen menores, esta amplia generación de isoformas resulta en productos proteicos cuya función podría ser diferente. Por ejemplo, la isoforma identificada como Dp71f $\Delta$ 71 (Dp71ab; que pertenece al grupo f) está presente preferencialmente en el citoplasma, mientras que las isoformas que contienen los exones 71 y/o 78 (pertenecientes al grupo d) muestran una localización nuclear en algunos casos (González et al., 2000) (Aragón et al., 2018). Cabe destacar que dicha disposición no es precisamente estática, tomando en cuenta que existe tráfico de Dp71 entre el núcleo y el citoplasma mediado por la importina  $\alpha/\beta$  y exportina CRM1 (Suárez-Sánchez et al., 2014). Otro ejemplo que resalta las diferencias entre estos grupos es su localización subcelular en las neuronas, mientras ambos grupos pueden localizarse en el complejo de Golgi y en los núcleos neuronales, sólo Dp71d se ha reportado en neurofilamentos citoplásmicos (Aleman et al., 2001).

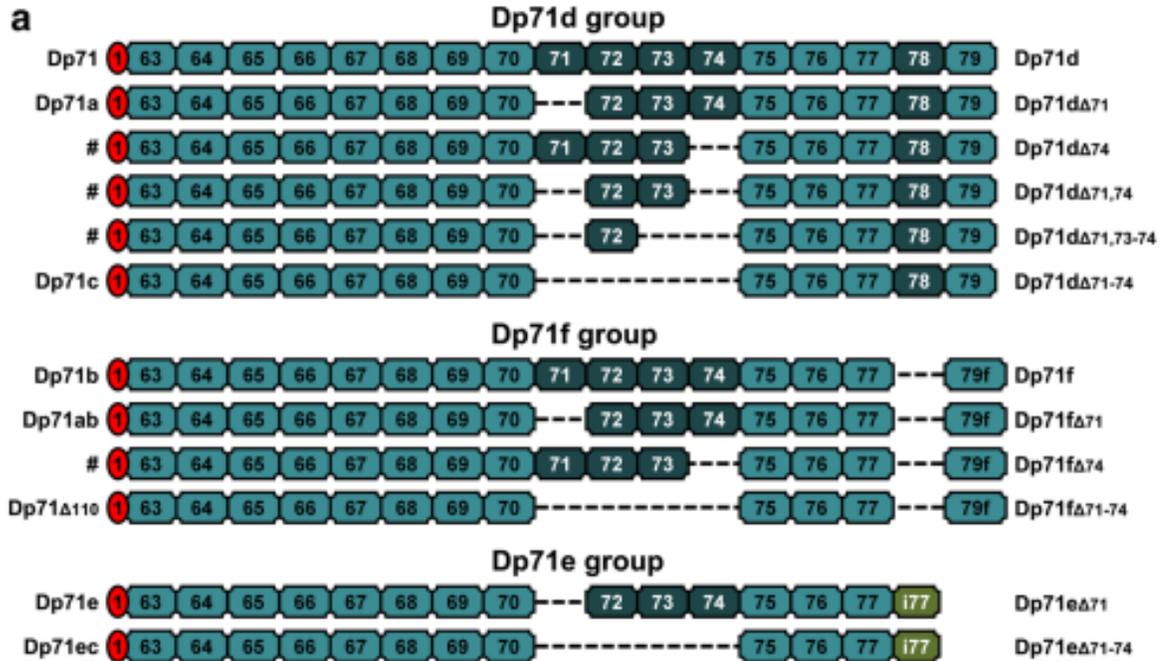


Figura 5 Isoformas de Dp71. Se muestra la clasificación actual de las isoformas de Dp71 debido al procesamiento alternativo, que incluye la división en 3 grupos dependiendo del exón 78, también se incluye la nomenclatura actual de lado derecho de la figura (Aragón et al., 2018).

Es de destacar que, a diferencia de la proteína de tamaño completo, Dp71 se expresa de forma importante en una variedad muy heterogénea de tejidos, es ubicua, en lo que respecta a la expresión de Dp71 en el músculo, está presente en las células precursoras del músculo esquelético participando con el citoesqueleto de actina (Howard et al., 1999). Sin embargo, a medida que se lleva a cabo la diferenciación en el músculo, su expresión disminuye debido al comportamiento de los factores de transcripción Sp1 y Sp3 (Enríquez-Aragón et al., 2005). La razón de esto es que Dp71 podría competir con las otras isoformas de la distrofina, bloqueando su actividad al disponerse en el sarcolema y resultando en un daño similar al fenotipo de la DMD (Leibovitz et al., 2002). A pesar de su reducido tamaño, Dp71 es el producto principal del gen DMD en el cerebro (D. Lederfein et al., 1992) estando sus isoformas bien reguladas durante el desarrollo neural (Ceccarini et al., 1997) y en general, teniendo una presencia importante en varios tejidos

pertenecientes al sistema nervioso central como células gliales y neuronas de la retina (Lumeng et al., 1999; Rodius et al., 1997). Así mismo, se ha detectado la función de Dp71 en muchos otros tejidos no musculares como, intestino, riñón, hígado, pulmón, bazo, estómago, testículo, timo y útero (Tokarz et al., 1998), por esta razón, se dice que su expresión es específica y diferente en cada tipo celular, así como su etapa de desarrollo (Sarig et al., 1999). A diferencia de otras formas más largas, Dp71 se expresa desde etapas tempranas del desarrollo, en células madre embrionarias pluripotentes (D. Rapaport et al., 1992) y en algunos tejidos como las células no neuronales derivadas del hipocampo de ratón (Fujimoto et al., 2014), permanece en la etapa postnatal y va aumentando su presencia gradualmente hasta la etapa adulta (Daniel Jung et al., 1993).

Dp71 al igual que sus isoformas más estudiadas, está unida a proteínas pertenecientes al DAPC en la periferia de la célula (Morris et al., 1995; Debora Rapaport et al., 1993) y en la fracción nuclear, sin embargo, a pesar de que los niveles de las proteínas asociadas a distrofina disminuyen cuando no se expresa Dp71 (Greenberg et al., 1996) y su presencia puede restaurar la formación del DAPC (Greenberg et al., 1994), la presencia de Dp71 no es suficiente para revertir el fenotipo distrófico clásico de degeneración muscular (Cox et al., 1994). Por esta razón, se ha sugerido la existencia de un DAPC nuclear con Dp71 como componente clave junto a beta-sarcoglicano, beta-distroglicano, alfa y beta-sintrofina, alfa/beta-distrobrevina y nNOS con las proteínas de la matriz nuclear lámina B1 y actina (Fuentes-Mera et al., 2006), demostrando que Dp71 puede jugar algún papel en la arquitectura y estabilidad nuclear (Percival, 2018; Rodríguez-Muñoz et al., 2008). En lo que respecta a las neuronas, Dp71 se localiza principalmente en membranas plasmáticas ocupando las densidades postsinápticas (donde la beta-distrobrevina también está enriquecida) (Hazai et al., 2006; Imamura & Ozawa, 1998), en los microsomas y en menor medida, en vesículas sinápticas y mitocondrias (Blake et al., 1999; Daniel Jung et al., 1993).

Estas observaciones llevaron a reforzar la teoría de que Dp71 forma parte de un complejo proteico asociado a distrofina en tejido no muscular (Richard C. et al.,

1995) y que desempeña funciones variadas que pueden extenderse a la señalización en el sistema nervioso central, orientando la investigación de Dp71 a uno de los fenotipos más relevantes de la distrofia muscular de Duchenne.

Cuando los pacientes con DMD muestran deterioro cognitivo, este se manifiesta en diferentes grados de severidad, que no necesariamente correlacionan con la severidad del deterioro muscular. En busca de la causa que generaba el deterioro cognitivo independiente, eventualmente se comenzó a ligar la función de Dp71 a dicho deterioro por hechos como su presencia en tejido del sistema nervioso central y al enfoque que tomó la investigación de Dp71 hacia el tejido neural. Se comenzó a obtener evidencias de que las mutaciones en el gen DMD de dichos pacientes, independientemente de si se trataba de deleciones, duplicaciones (M.-P. Moizard et al., 1998) o mutaciones puntuales (M. P. Moizard et al., 2000) solían encontrarse en las regiones más distales, que aparte de afectar a las isoformas largas, afectaban a Dp140, Dp116 y Dp71 (Kumagai et al., 2001), alterando principalmente la expresión de Dp71 (Daoud et al., 2009). Recientemente se ha fortalecido la evidencia que atribuye el déficit cognitivo a la pérdida de Dp71 tras encontrar alteraciones en la bomba SERCA2 y concentraciones elevadas de Ca<sup>2+</sup> citosólico en neuronas que presentaban una mutación en la región distal de la distrofina Dp71 (Ruggieri et al., 2019), así como alteraciones en la función de la sinapsis (Helleringer et al., 2018).

Los modelos de estudio que se utilizan para investigar el papel de las diferentes formas de la distrofina en la DMD deben reflejar adecuadamente el entorno en el que la forma participa o se desarrolla. Por esa razón se ha propuesto una amplia variedad de modelos de estudio de diferentes complejidades que van desde líneas celulares específicas y derivadas de pacientes, hasta animales transgénicos con modificaciones para cada isoforma. En lo que respecta al estudio de la Dp71 y su papel en el déficit cognitivo nuestro grupo investiga su función en la diferenciación neural en las células PC12, que expresan principalmente el producto de Dp40 y Dp71 de entre las distrofinas.

#### **b. Expresión y función de Dp40 y Dp71 en células PC12**

La línea celular PC12 deriva de una feocromocitoma de medula adrenal de una rata macho adulta, es decir, de un tumor suprarrenal. El origen embrionario de estas células es el ectodermo, capa germinal que también da paso a las neuronas y a la glía, por esta razón, las células PC12 responden reversiblemente al NGF. Después de unos días de tratamiento con este factor de crecimiento, las células frenan su crecimiento y comienzan a mostrar una morfología similar a la de las neuronas, incluyendo la extensión de neuritas, la formación de vesículas y el almacenamiento de neurotransmisores, representando un modelo útil para estudios neurobiológicos y neuroquímicos (Greene & Tischler, 1976). La línea PC12 también responde a la diferenciación con dexametasona, sin embargo, en este caso, presenta un mayor número de vesículas y con un tamaño mayor, lo que permite una gama aún más amplia de aplicaciones que incluyen estudios neurofarmacológicos y neurotoxicológicos (Westerink & Ewing, 2008). Existen otros modelos para estudiar a la distrofina a nivel neural, como es el caso de los astrocitos que durante su diferenciación inducida por dibutiril-cAMP, el dibutiril-cAMP modifica los niveles de Dp71, así como los de otras proteínas del DAPC (Imamura & Ozawa, 1998). Dadas sus características y tras demostrar que permitían regular la expresión de la Dp71 durante la diferenciación con el factor de crecimiento neural, las células PC12 han sido utilizadas como un modelo de estudio adecuado para investigar la función cerebral de las isoformas de Dp71 (Cisneros et al., 1996).

En lo que respecta a la isoforma Dp40, la información sobre su expresión y su comportamiento en células PC12 es limitada, aunque inicialmente las investigaciones enfocadas en los RNA mensajeros indicaban que existían al menos 2 tipos de Dp40 dependiendo de su localización (periferia celular o nuclear), y donde la diferencia a nivel proteico radicaba en los dominios EF-Hand (Martínez Herrera, 2015), más tarde se reportarían más variantes de la isoforma Dp40 en células PC12 diferenciadas (Dp40<sub>Δp67-70d</sub> y Dp40<sub>Δp65-p67</sub>) y no diferenciadas (Dp40<sub>Δ68</sub>) (Romero Flores, 2021). La localización de cada una de las variantes aún no está analizada, sin embargo se ha demostrado que en general la isoforma Dp40 puede utilizar la vía clásica de importación nuclear mediada por la importina  $\alpha/\beta$ , (Sánchez Juárez, 2016).

Recientemente se reportó una familia con una condición particular, con déficit cognitivo y ausencia de distrofia muscular, causado por una mutación en la región C-terminal de la distrofina que afecta a todas las formas, incluidas Dp71 y Dp40. Esta mutación corresponde a una delección de tres pares de bases que resulta en la pérdida de la leucina 3238 de la secuencia aminoacídica, la posición varía dependiendo de la bibliografía consultada, pero se refiere a la tercera leucina en la secuencia "LLLHDSI". En Dp40 y Dp71 se trata de la leucina 170 (L170) (De Brouwer et al., 2014). La importancia del aminoácido L170, fue reportada en la isoforma Dp40, la cual se localiza principalmente en la periferia celular y el citoplasma de las células PC12 no diferenciadas y diferenciadas, con presencia en el núcleo de células diferenciadas. Cuando L170 es remplazada por prolina (L170P), Dp40 se localiza principalmente en el núcleo en células diferenciadas y no diferenciadas, además, las células conservan una morfología redondeada sin proyección de neuritas tras la diferenciación con NGF, mostrando así que el aminoácido 170 puede tener un papel en la localización nuclear (Aragón et al., 2015). Cuando en lugar de ser sustituido, el aminoácido 170 es eliminado en células PC12 transfectadas transitoriamente, también se promueve la localización nuclear y se conserva la morfología redondeada (García-Cruz, et al., 2021). En condiciones en las que la proteína Dp40 es sobreexpresada en células PC12 aumenta el porcentaje de células que desarrollan neuritas, así como la longitud de las mismas, sin embargo, al sobreexpresar la mutante Dp40<sub>L170P</sub> en estas células, se reduce la longitud y el número de neuritas en comparación con células que sobreexpresan Dp40. La sobreexpresión de la mutante aumenta los niveles de  $\alpha$ -internexina y S100a6 (proteínas relacionadas con la estructura del citoesqueleto) (García-Cruz et al., 2022), haciendo de Dp40 un componente clave en el crecimiento de neuritas, que modula la actividad de proteínas involucradas en neurofilamentos y exocitosis de vesículas sinápticas.

Por su lado, se ha descrito información relacionada con la función de las isoformas de Dp71 en la diferenciación neural de las células PC12 inducida por NGF, en general, podemos decir que el papel de Dp71 durante la diferenciación es fundamental, aumentando su expresión del 40 al 60% (Cisneros et al., 1996). La

función de Dp71 involucra la formación de complejos distintos tras la diferenciación, que permiten reclutar nuevas proteínas para brindar funciones adquiridas a dichos complejos transmembranales, como la transducción de señales, la adherencia celular, etc. Cuando se induce la diferenciación neural de las células PC12 con NGF en ausencia o disminución de la expresión de Dp71, se afecta principalmente la diferenciación tardía, disminuyendo el crecimiento de neuritas, debido a la falta de adhesión, provocada por la disminución en la actividad de integrina beta1 con laminina, colágeno y fibronectina (Enríquez-Aragón et al., 2005). En esta condición también disminuye la expresión de proteínas pertenecientes al DAPC como la distrobrevina, haciendo evidente que para que se lleve a cabo la diferenciación neural adecuada en células PC12 (al menos a nivel morfológico) se requiere de la expresión apropiada del producto Dp71 (Acosta et al., 2004)

Es posible distinguir algunas diferencias entre los papeles que juegan los grupos Dp71d, Dp71f y Dp71e en la diferenciación neural de las células PC12 inducida por el factor de crecimiento neural.

Dp71d se considera una isoforma nuclear, debido a que tras la diferenciación de las células PC12 con NGF se reubica en el núcleo aumentando su presencia en este organelo, formando un complejo DAPC nuclear (con beta-distroglicano, beta-distrobrevina, epsilon-sarcoglicano y gamma-sintrofina 1) (Villarreal-Silva et al., 2010). Se ha reportado que la relocalización se debe a su fosforilación mediada por cinasas como CAMKII o PKC (Calderilla-Barbosa et al., 2006), detectándose en menor grado en el citoplasma y procesos neuríticos, acumulándose adicionalmente en los contactos célula-célula donde Dp71f está ausente (Marquez et al., 2003). Una vez en el núcleo, Dp71d ayuda en la diferenciación entre la periferia de la matriz nuclear y el centro de la estructura nucleoesquelética, lo que sugiere su participación en la arquitectura y disposición nuclear durante la diferenciación neural (Rodríguez-Muñoz et al., 2008).

Por su parte Dp71f es una isoforma citoplasmática, ya que tras la diferenciación de las células PC12 con NGF, disminuye en extractos nucleares y se traslada del citoplasma a los procesos neuríticos, siendo prominente en las varicosidades y el

cono de crecimiento (Marquez et al., 2003), donde funciona como un componente clave para mantener los complejos necesarios que ayudaran a la adhesión celular, localizándose con proteínas pertenecientes al DAPC como beta-distroglicano, sinaptofisina, así como componentes que participan en la adhesión (beta-integrina 1, FAK, alfa-actinina, talina, vinculina y actina) (Cerna et al., 2006).

Dp71e (Dp71e $\Delta$ 71) presenta una característica particular, pues se ha reportado su capacidad para hacer más eficiente el proceso de diferenciación neural en comparación con otras isoformas, se expresa en la periferia celular y no cambia su localización durante el proceso de diferenciación. Las células que expresan esta isoforma logran diferenciarse más eficientemente, aumentando notablemente la capacidad de proliferación celular y el porcentaje de células con neuritas, además de que estas tienen una longitud mayor. A este fenómeno lo acompaña la regulación diferencial de varias proteínas, sin embargo, se sugiere que lo que promueve el aumento de proliferación celular durante la diferenciación es la regulación positiva de Dp71 $\Delta$ 71, Up71,  $\beta$ -distroglicano, enolasa específica de neuronas, antígeno nuclear celular en proliferación y FAK, así como HspB1, S100A6 y K8 (proteínas de citoesqueleto) y neurotransmisores como HCNP y TH (Aragón et al., 2011; García-Cruz et al., 2019; Herrera-Salazar et al., 2016; Merino-Jiménez et al., 2016).

Como se ha indicado anteriormente, para el presente trabajo se utilizará la Dp40 y Dp40 $\Delta$ L170, así como la isoforma Dp71f $\Delta$ 71 y Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170, que carece de los exones 71 y 78. La función y mecanismos específicos de acción de Dp71f $\Delta$ 71 durante la diferenciación aún no se conocen con precisión, sin embargo, se han realizado varios estudios que permiten un mejor entendimiento. Dp71f $\Delta$ 71 únicamente conserva la región C-terminal de la distrofina, a partir de la región rica en cisteína, por esta razón tiene la capacidad de unirse a proteínas del DAPC como beta-distroglicano, alfa1-sintrofina, beta-distrobrevina y alfa, beta y gamma-sarcoglicanos en células PC12 no diferenciadas. Interesantemente, tras la diferenciación de las células PC12, la composición cambia y deja de asociarse con alfa, beta y gamma-sarcoglicanos para asociarse en su lugar con delta-sarcoglicano (Romo-Yáñez et

al., 2007) lo que nos permite suponer que conserva su función confiriendo estabilidad a los complejos transmembranales de unión a distrofina, también existe evidencia de que Dp71f $\Delta$ 71 se concentra en las puntas de las neuritas y el citoplasma (Romo-Yáñez et al., 2007). La composición particular de este nuevo complejo tras la diferenciación permite que la óxido nítrico (nNOS) sintasa neuronal se asocie con el complejo durante el tratamiento con NGF, esto aunado a su ubicación estratégica en las neuritas, abre la posibilidad de que su función se expanda a eventos de transducción de señales durante la diferenciación neuronal, lo que es congruente con su presencia predominante en el tejido cerebral y con su importancia para el adecuado desarrollo cognitivo. Adicionalmente se ha demostrado que Dp71f $\Delta$ 71 puede actuar como un potenciador de la proliferación celular, al ser sobre expresada en miocitos (Farea et al., 2020) y células PC12, así como un aumento en la producción de neuritas.

Como se vio anteriormente, otra característica que impide el crecimiento de neuritas en la diferenciación neural de PC12 es la falta de adhesión celular, causada por la ausencia de las proteínas de adhesión. La proteína Dp71f participa en la diferenciación de las células PC12 y podría que estabilizar los complejos necesarios en la adhesión.

Si bien Dp71f $\Delta$ 71 pertenece al grupo Dp71f, podemos establecer algunos hechos particulares de Dp71f $\Delta$ 71. Cuando las células PC12 están no diferenciadas Dp71f $\Delta$ 71 forma un complejo con beta-distroglicano, alfa1-sintrofina, beta-distrobrevina y alfa, beta y gamma-sarcoglicanos, sin embargo, cuando las células son diferenciadas con NGF Dp71f $\Delta$ 71 se asocia con beta-distroglicano, alfa1-sintrofina, beta-distrobrevina y delta-sarcoglicano (y con utrofina, sinaptofisina y acetilcolina cuando está en cocultivo) concentrándose en las puntas de las neuritas y el citoplasma (Ilarraza-Lomeli et al., 2007). Adicionalmente la nNOS se asocia con el complejo Dp71f $\Delta$ 71/DAPs durante la diferenciación, incrementando la posibilidad de que Dp71f $\Delta$ 71 esté involucrada, al menos indirectamente, en la transducción de señales (Romo-Yáñez et al., 2007).

En el presente trabajo se propone estudiar el efecto que tiene la delección de la leucina 170 ( $\Delta L170$ ) en la proteína Dp40 (Dp40 $\Delta L170$ ), así como en la proteína Dp71f $\Delta 71$  (Dp71f; Dp71 $\Delta 71\Delta L170$ ).

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

La distrofia muscular de Duchenne es una de las distrofias más comunes (Mah et al., 2016; Theadom et al., 2014) y se estima que al menos la mitad de los pacientes tienen mutaciones en la región distal del gen que afectan las formas cortas de la distrofina Dp40 y Dp71 (Bladen et al., 2015). Dp71 es el producto principal del gen *DMD* que se expresa en el cerebro, y en general en el sistema nervioso y se asocia con el déficit cognitivo que se presenta en la enfermedad. Recientemente se reportó una familia con déficit cognitivo en ausencia del fenotipo distrófico, ocasionado por la delección de L170 cuya alteración se encuentra en la secuencia de Dp71 y de Dp40. Esto hace imprescindible investigar el efecto que tiene dicha mutación en el proceso de diferenciación neural. Por tanto, en este trabajo se propone evaluar el efecto de la mutación  $\Delta L170$  en la función de las proteínas Dp40 y Dp71 durante la diferenciación neural de las células PC12 con el factor de crecimiento neural.

#### **5. HIPÓTESIS**

La proteína mutante Dp40 $\Delta L170$  y Dp71f $\Delta 71\Delta L170$  afectan la diferenciación neural inducida con NGF en las células PC12, disminuyendo la cantidad y el tamaño de las neuritas y provocando la relocalización de las proteínas Dp40 y Dp71f $\Delta 71$  al núcleo. Lo anterior evita que Dp40 y Dp71f $\Delta 71$  funcione correctamente durante la diferenciación.

## 6. OBJETIVOS

### a. Objetivo general

Caracterizar el efecto de la mutación  $\Delta L170$  en la función de la distrofina Dp40 /Dp71f $\Delta 71$  durante la diferenciación de las células PC12-Tet-On.

### b. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la distrofina Dp40 $\Delta L170$  sobre la morfología de las células PC12 Tet-On, durante el proceso de diferenciación inducido por NGF, y compararlo con los cambios promovidos por Dp40 silvestre.
2. Determinar la distribución subcelular de Dp40 $\Delta L170$  y relacionarla con la distribución de Dp40 en las células PC12 Tet-On/Dp40  $\Delta L170$  y PC12 Tet-On/Dp40, por ensayos de inmunofluorescencia.
3. Evaluar en las clonas PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta L170$  (C-23 y C-26), los niveles de expresión de las proteínas relacionadas con el proceso de diferenciación y proliferación: NSE, PCNA, FAK y NF-L.
4. Analizar clonas PC12 Tet-On/Dp71  $\Delta 71\Delta L170$  para determinar la localización y efecto de la distrofina Dp71  $\Delta 71\Delta L170$ .

## 7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la parte inicial del proyecto se llevó a cabo el cultivo y diferenciación a 12 días de las líneas celulares de PC12 Tet-On previamente transfectadas de manera estable con los siguientes plásmidos para Dp40: pTRE2pur-Myc, pTRE2pur-Myc-Dp40 (wt), pTRE2pur-Myc-Dp40 $\Delta L170$ . Así como de las líneas celulares de PC12 Tet-On transfectadas de manera estable con los siguientes plásmidos para Dp71f $\Delta 71$ : pTRE2pur-Myc, pTRE2pur-Myc-Dp71f $\Delta 71$  (wt), pTRE2pur-Myc-Dp71f $\Delta 71\Delta L170$ . De

esta manera se obtuvieron los cultivos celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-2), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-7); PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 (wt), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-1), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-2) y PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-3) de 0 y 12 días de diferenciación con NGF, induciendo la sobreexpresión de la proteína correspondiente con doxiciclina.

Adicionalmente se realizó la secuenciación de los plásmidos que fueron utilizados para transfectar a las células PC12, con la finalidad de corroborar que la secuencia plasmídica no tuviera mutaciones que impidieran la correcta sobreexpresión de la distrofina. La secuencia de los plásmidos utilizados para transfectar incluye un sitio de resistencia a puromicina, rio abajo se encuentra un sitio de respuesta a tetraciclina que permite controlar la expresión del elemento que se encuentra en seguida, que es una bandera de Myc con un sitio de múltiple clonación, permitiendo clonar cualquier proteína (en este caso las distrofinas mencionadas anteriormente) quedando fusionada a la bandera de Myc para su posterior monitoreo.

Por otro lado, se realizaron curvas de proliferación celular con las células PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-2), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-7) sin ningún tipo de inducción, es decir, sin NGF y con condiciones de +doxiciclina y -doxiciclina.

Se realizó la captura de micrográficas de 0 y 12 días para el análisis morfométrico de las células PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26), cuantificando la tasa de diferenciación, porcentaje de células con neuritas y longitud de neuritas, así como la complejidad relativa de las neuritas durante la diferenciación celular a 0 y 12 días después de la inducción con NGF. En seguida se realizó la extracción proteica de todas las líneas celulares en ambos puntos de inducción para la realización de experimentos de western blot. Se evaluó la expresión de 4 marcadores de diferenciación y proliferación, el primer marcador es FAK (cinasa de adhesión focal) que es una de

las principales moléculas involucradas en la señalización en los sitios de adhesión focal e interactúa con Dp71f, después se evaluó la expresión relativa de NSE (enolasa específica de neuronas), es una enzima que se expresa en las neuronas y la glía como un evento tardío en la diferenciación neural, este marcador permite identificar las células PC12 que se diferencian y es posible discriminar a las células que no se diferencian. El tercer marcador analizado fue NF-L (neurofilamento de cadena ligera), una proteína neural citoplasmática que forma parte del citoesqueleto se expresa en niveles altos en los axones y suele utilizarse como un marcador para varios desordenes neurológicos. Después se analizó la expresión relativa de Myc, que corresponde a la distrofina respectiva en cada línea celular. Finalmente se monitoreo la presencia de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), que es una proteína nuclear encargada de aumentar la procesividad de la polimerasa durante la división celular (durante las fases G1 y S) y eventos de reparación del DNA. Este marcador es de utilidad, como su nombre lo indica, para conocer como se ve afectada la velocidad y nivel de proliferación de las células PC12 que expresan la proteína mutante tras la diferenciación.

La parte final consistió en determinar la distribución subcelular en cada clona de Dp40, con respecto al control, para ello se realizó el análisis por inmunofluorescencia en las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) no diferenciadas y diferenciadas con NGF, para dicho ensayo se utilizó un anticuerpo primario contra Myc que indica en cada línea celular la distrofina respectiva, adicionalmente se utilizó un anticuerpo contra lámina A/C, una proteína encontrada en la periferia del núcleo.

En lo que respecta a las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 (wt), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-1), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-2) y PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-3) adicional a la secuenciación de los plásmidos utilizados para transfectar, se realizó un ensayo de western blot contra la bandera de Myc, con la finalidad de monitorear la presencia relativa de la distrofina respectiva en cada caso.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo y diferenciación celular

Todas las líneas celulares: PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-2), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-7); PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 (wt), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-1), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-2) y PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-3) fueron cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco, suplementado con suero de caballo inactivado por calor al 10% (Gibco, Rockville, MD, EE. UU.), suero fetal bovino al 5% (Gibco), penicilina 100 U/ml (Gibco), 1 mg/ml de estreptomina (Gibco), 250 ng/ml de micostatina y 100  $\mu$ g/ml de geneticina (G418) a 37 ° C al 5% de CO<sub>2</sub>. Para inducir las proteínas recombinantes, se utilizó doxiciclina 500 ng/ml, comenzando la inducción 24h antes de cualquier otro tratamiento o ensayo. Para la diferenciación, las células alcanzaron un nivel de confluencia de aproximadamente el 80% en placas de cultivo recubiertas de colágena o en cubreobjetos recubiertos previamente con poli-L-lisina. Posteriormente, las células se expusieron a 50 ng / ml de NGF 2.5S (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Para mantener la sobreexpresión de las proteínas recombinantes durante el proceso de diferenciación, el medio de cultivo fue suplementado con 500 ng/ml de doxiciclina y 50 ng/ml de NGF que se cambió cada tres días durante todo el proceso de diferenciación (Aragón et al., 2011).

### Análisis morfométrico del crecimiento de neuritas.

Se capturaron, en un experimento individual, las micrográficas de aproximadamente 20 campos para cada línea celular de los días 0 y 12 de diferenciación con NGF, con un microscopio (AX10 Zeiss) con el objetivo 10X. Para cuantificar la proporción de neuritas, se consideró que las neuritas tuvieran una longitud de al menos dos

cuerpos celulares. Se utilizó el software ZenPro de Zeiss para contar en al menos 100 células de cada línea celular, las neuritas y se midió su longitud (Aragón et al., 2011), adicionalmente se realizó la cuantificación de las neuritas con estructuras complejas o ramificaciones, clasificando como tal a las neuritas que no eran rectas.

#### Extracción de proteínas y análisis de Western blot

Se obtuvieron extractos de proteínas totales de todas las líneas celulares tanto no diferenciadas como diferenciadas de un experimento individual. Las concentraciones de proteínas se determinaron por el método de Bradford. El extracto de proteínas total fue resuspendido en buffer de muestra de electroforesis (Tris-HCl 75 mM, dodecilsulfato de sodio al 15%, b-mercaptoetanol al 5%, glicerol al 20%, azul de bromofenol al 0,001%). Se cargó un volumen aproximado de 60-80 µg de proteína en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico 12% para posteriormente transferirlas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche en polvo durante 2 h, seguido de una incubación con los anticuerpos primarios respectivos a 4°C. Las diluciones y lavados de anticuerpos se hicieron en solución salina tamponada con buffer tris Tween 20 al 0,05%. Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-β-actina. Para obtener la expresión relativa de cada proteína, la intensidad de la banda se cuantificó y se obtuvo la relación entre el valor de cada proteína y el de β-actina y se graficaron los resultados (García-Cruz, César, et al., 2021).

#### Ensayos de inmunofluorescencia indirecta

Las células en cultivo después de 24 horas de exposición a la doxiciplina se trataron con 50 ng / ml de NGF 2,5S (Invitrogen) durante 12 días. La permeabilización y fijación celular se realizó con Triton X-100 al 0,4% y paraformaldehído al 4%. Los cubreobjetos se bloquearon con gelatina al 0,5%. Los anticuerpos primarios (Lamina A/C y Myc) fueron incubados a 4°C y se usaron anticuerpos secundarios conjugados con Alexa488 o Alexa594 (Invitrogen) para detectar la señal del

anticuerpo primario, adicionalmente se incubo DAPI 1:1000 por un tiempo de 5 minutos, para indicar el área correspondiente al núcleo celular. El montaje de los cubreobjetos se realizó en medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EE. UU.). Las imágenes fueron tomadas con un objetivo de inmersión en aceite de 40x utilizando un microscopio confocal Leica TCS SPE8. De cada imagen, se escanearon aproximadamente 33 secciones ópticas en el eje Z (intervalos de 0,3  $\mu\text{m}$ ). Se eligieron secciones ecuatoriales en Z representativas y que correspondieran a la parte central del núcleo para mostrar la localización subcelular de las proteínas (García-Cruz et al., 2022).

## 9. RESULTADOS

### a. Caracterización del efecto de la proteína mutante Dp40 $\Delta$ L170 en la diferenciación de células PC12

Dados los antecedentes descritos anteriormente para la distrofina Dp40 como para la delección de la L170, se realizaron varios ensayos con la finalidad de establecer las bases en cuanto al efecto de la delección L170 en el efecto de la diferenciación de las células PC12. Los resultados de cada uno de los ensayos se muestran a continuación.

#### i. Secuenciación del plásmido de transfección

El plásmido pTRE2pur-Myc-Dp40 $\Delta$ L170 fue analizado para determinar que la secuencia del fragmento que expresa a la proteína Dp40 $\Delta$ L170 estuviera correcta. Los resultados de la secuenciación corroboran que la construcción se llevó a cabo adecuadamente, se secuenciaron 1382 bases que fueron alineadas con la secuencia teórica de un fragmento del plásmido y con la Dp40 (GenBank: KF154977.1), dichas bases corresponden a la parte final del elemento de respuesta a tetraciclina, así como a la región completa de la proteína Dp40 $\Delta$ L170 (figura 6).

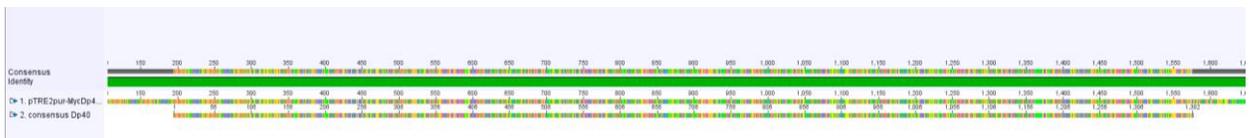


Figura 6 Secuenciación del plásmido pTRE2pur-Myc-Dp40 $\Delta$ L170. El plásmido utilizado para generar las clonas pool PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-2), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-7). La secuencia inferior es la secuencia consenso obtenida de los resultados de secuenciación, la secuencia que se encuentra en la parte central corresponde a la secuencia teórica (que proviene de GenBank: KF154977.1, agregándole la delección), en la parte superior se muestra el porcentaje de identidad de la parte alineada, el color verde representa las posiciones donde las bases coinciden.

#### ii. Curva de proliferación celular

Se realizó la curva de crecimiento y proliferación celular de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos, con la finalidad de evaluar el patrón de crecimiento de las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) en ausencia de inducción o estimuló externo, adicionalmente se realizó la misma curva en presencia de doxiciclina.

Las curvas de proliferación (Tabla 4) con doxiciclina comenzaron con 250,000 células/ml, al primer día se observa un periodo de adaptación, para el día 3 todas las líneas celulares comienzan a crecer con diferente tasa, sin embargo, para el día 5 se observa un decremento en la cantidad de células de las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26), siendo menor el decremento en esta última. Por su parte, las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40wt y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool) muestran un incremento en el número de células. Para los días 9 y 11 todas las líneas celulares mostraron un crecimiento, finalmente el número de células en cada una de las líneas celulares al día 11 fue el siguiente: PC12 Tet-On/Dp40wt (7120000 células/ml); PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool) (9180000 células/ml); PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) (3110000 células/ml); y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) (4630000 células/ml). En lo que respecta a la condición sin doxiciclina se puede observar un comportamiento similar, pero con un número menor de células puesto que tras 11 días de proliferación el número de células cuantificado es el siguiente: PC12 Tet-On/Dp40wt (3085000 células/ml); PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool) (8715000 células/ml); PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) (995000 células/ml); y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) (2460000 células/ml). (figura 7 y 8).

*Tabla 4 Ensayo de proliferación celular para las células PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26). Los números indican la cantidad de células por mililitro.*

días / dox	PC12 Tet- On/Dp40wt		PC12 Tet- On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool)		PC12 Tet- On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23)		PC12 Tet- On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26)	
	-	+	-	+	-	+	-	+
0	250000	250000	250000	250000	250000	250000	250000	250000

1	180000	365000	215000	270000	160000	175000	350000	370000
3	855000	1860000	1275000	1515000	517500	780000	1575000	2617500
5	1957500	3540000	2445000	3930000	795000	500000	1180000	2040000
9	2690000	6270000	6425000	6800000	860000	1975000	n/a	2805000
11	3085000	7120000	8715000	9180000	995000	3110000	2460000	4630000

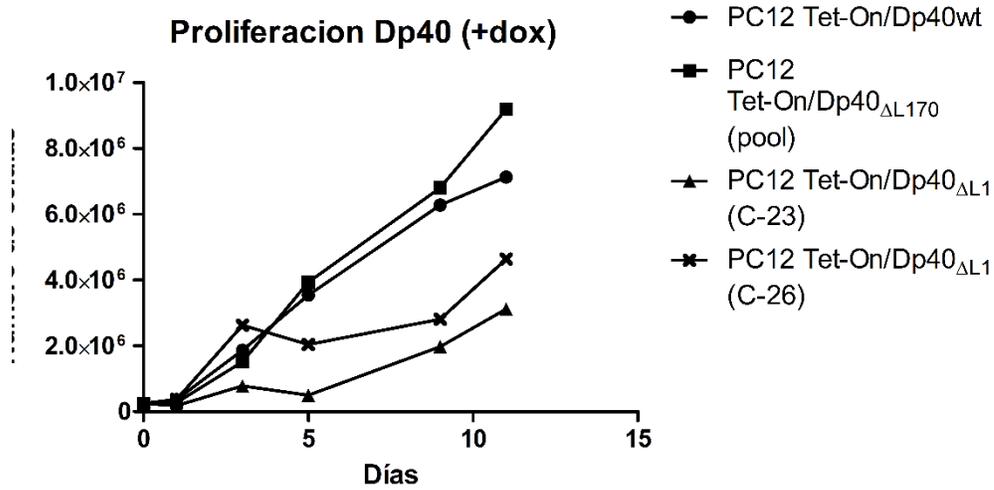


Figura 7 Gráfica de proliferación celular. Cuantificaciones a 0, 3, 5, 9 y 11 días para las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26).

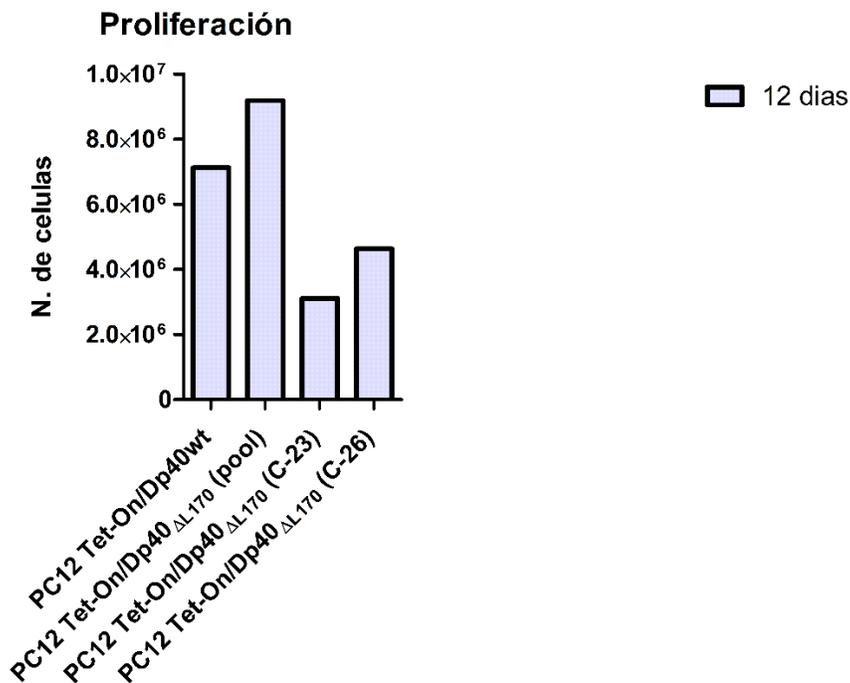


Figura 8 Gráfica del número de células cuantificadas al día 11 de proliferación para las líneas celulares pTRE2pur-Myc-Dp40 (wt), pTRE2pur-Myc-Dp40 $\Delta$ L170 (pool), pTRE2pur-Myc-Dp40 $\Delta$ L170 (C-23), pTRE2pur-Myc-Dp40 $\Delta$ L170 (C-26). Se observa que las líneas celulares pTRE2pur-Myc-Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y pTRE2pur-Myc-Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) se ven afectadas en cuanto al crecimiento, teniendo una proliferación menor.

### iii. Análisis morfométrico de las neuritas de células PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26)

Las micrografías capturadas a los 0 días de diferenciación (figura 9) muestran algunas diferencias en la morfología de las células analizadas, inicialmente se puede observar que las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv) y PC12 Tet-On/Dp40wt crecen de manera similar, separadas, redondeadas y uniformes sin mayores protuberancias en el caso de las células PC12 Tet-On/Myc (vv). Las células PC12 Tet-On/Dp40wt muestran pequeñas neuritas desde el día 0 de diferenciación. Al comparar las células anteriores con las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) se observa en éstas últimas una morfología distinta, crecen en cúmulos de células y con una superficie irregular. Cabe destacar que la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23)

muestra pequeñas protuberancias sin llegar a observarse como neuritas, esta morfología es más pronunciada que en la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26).

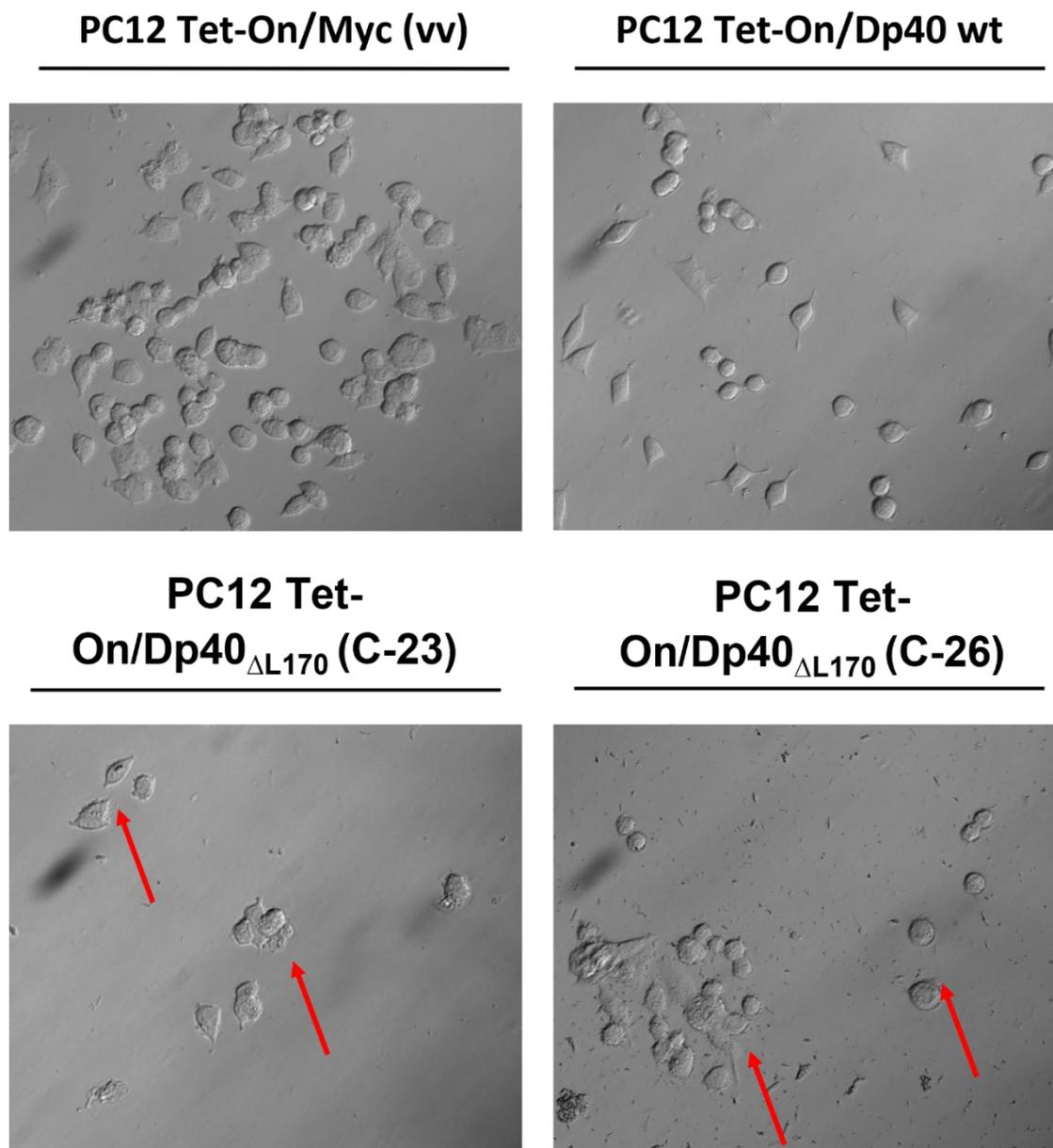
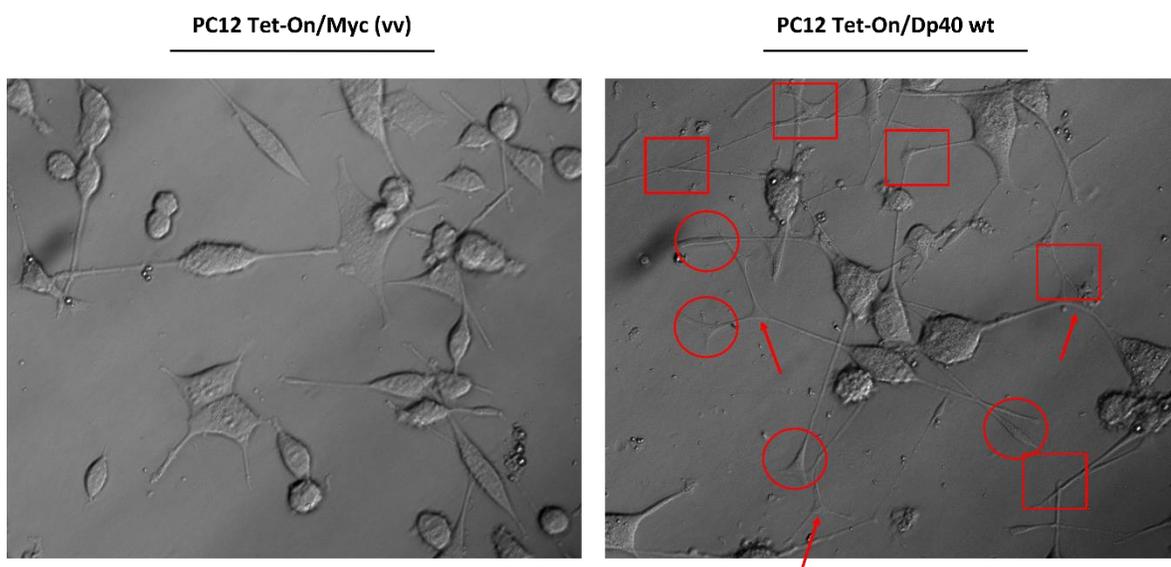


Figura 9 Micrografías representativas de células PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) sin diferenciar. Las células fueron crecidas como se indica en Materiales y Métodos. En la parte superior de la figura se muestran las células PC12 Tet-On/Myc (vv) y PC12 Tet-On/Dp40wt y en la parte inferior se muestran las células PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26). Las micrografías fueron capturadas en un microscopio AX10 Zeiss con el objetivo 40X. Las flechas rojas indican las células que crecen en cúmulos y con una periferia irregular. Se capturaron micrografías de aproximadamente 20 campos de cada línea celular, los resultados corresponden a un experimento.

A continuación, se procedió con el análisis de las células diferenciadas a 3, 6, 9 y 12 días en presencia de NGF. Al compararse las micrografías obtenidas durante el proceso de diferenciación, se observan varias características importantes. Inicialmente se observa que las células PC12 Tet-On/Myc (vv) (figura 10) presentan neuritas alargadas desde el día 3 (figura 13), las neuritas son delgadas, rectas y no presentan varicosidades ni conos de crecimiento pronunciados, las neuritas crecen sin dirección aparente y entre las células diferenciadas prevalecen células bipolares. Al comparar esta línea celular con las células PC12 Tet-On/Dp40wt se puede observar que esta última presenta neuritas alargadas desde el día 3, comparado con las PC12 Tet-On/Myc (vv) las neuritas son más largas, gruesas, forman estructuras complejas y presentan múltiples varicosidades y conos de crecimiento pronunciados, las neuritas crecen en dirección a otras células y generan múltiples nodos de contacto y entre las células diferenciadas prevalecen células multipolares.



*Figura 10 Micrografías representativas de la comparación entre la línea celular PC12 Tet-On/Myc (vv) y PC12 Tet-On/Dp40wt tras 12 días de diferenciación con NGF, las flechas rojas indican estructuras complejas de las neuritas, los círculos señalan los conos de crecimiento, los cuadrados señalan los puntos de contacto de las neuritas. Las micrografías fueron capturadas en un microscopio AX10 Zeiss con el objetivo 40X. Se capturaron micrografías de aproximadamente 20 campos de cada línea celular, los resultados corresponden a un experimento individual.*

Al analizar la morfología de la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) (figura 11), en comparación con las células PC12 Tet-On/Dp40wt, se puede observar que el número de células con neuritas es menor y las neuritas son más delgadas, forman estructuras simples y no presentan conos de crecimiento pronunciados, las neuritas crecen sin aparente dirección y entre las células diferenciadas prevalecen células aplanadas y amorfas, adicionalmente, hay células que crecen en cúmulos.

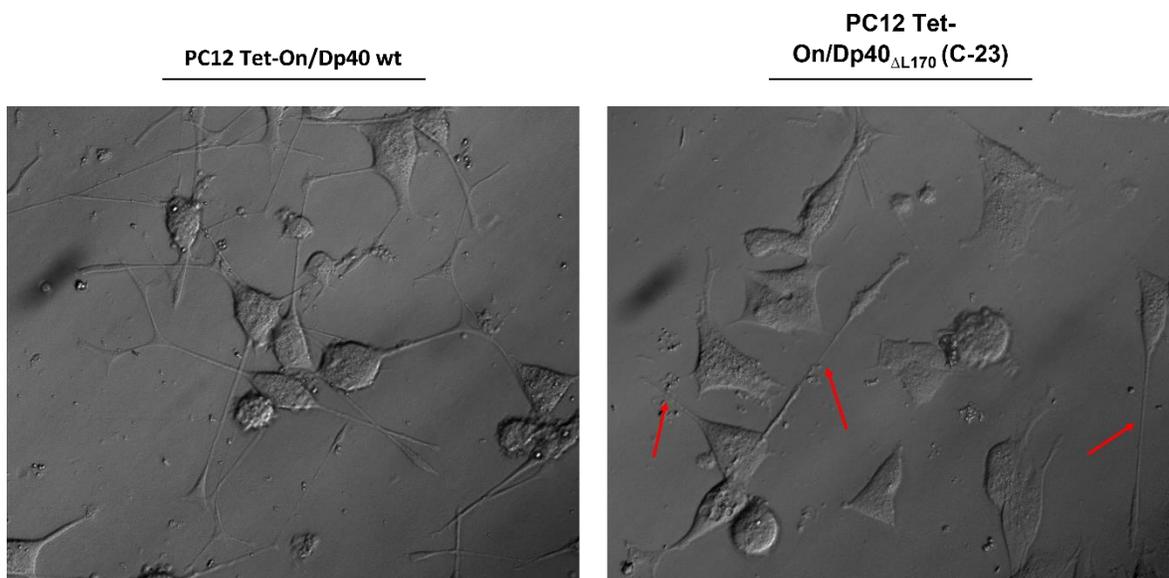


Figura 11 Micrografía representativa de la comparación de las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40wt y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) tras 12 días de diferenciación, las flechas señalan las estructuras de las neuritas. Las micrografías fueron capturadas en un microscopio AX10 Zeiss con el objetivo 40X. Se capturaron micrografías de aproximadamente 20 campos de cada línea celular, los resultados corresponden a un experimento individual.

Finalmente, la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) (figura 12), presenta neuritas alargadas a partir del día 6 (figura 13), comparado con la línea celular PC12 Tet-On/Dp40wt, las neuritas son más delgadas, forman estructuras simples y no presentan conos de crecimiento pronunciados, adicionalmente, se observa que las neuritas crecen sin aparente dirección.

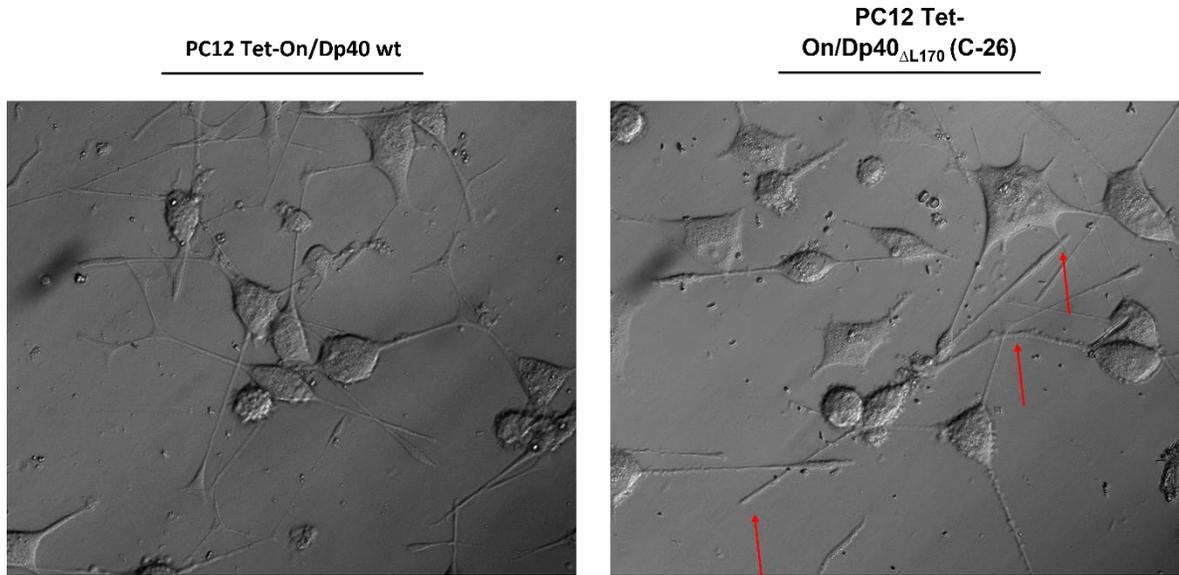


Figura 12 Micrografía representativa de la comparación de las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40wt y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) después de 12 días de diferenciación, las flechas rojas señalan la estructura de las neuritas. Las micrografías fueron capturadas en un microscopio AX10 Zeiss con el objetivo 40X. Se capturaron micrografías de aproximadamente 20 campos de cada línea celular, los resultados corresponden a un experimento individual.

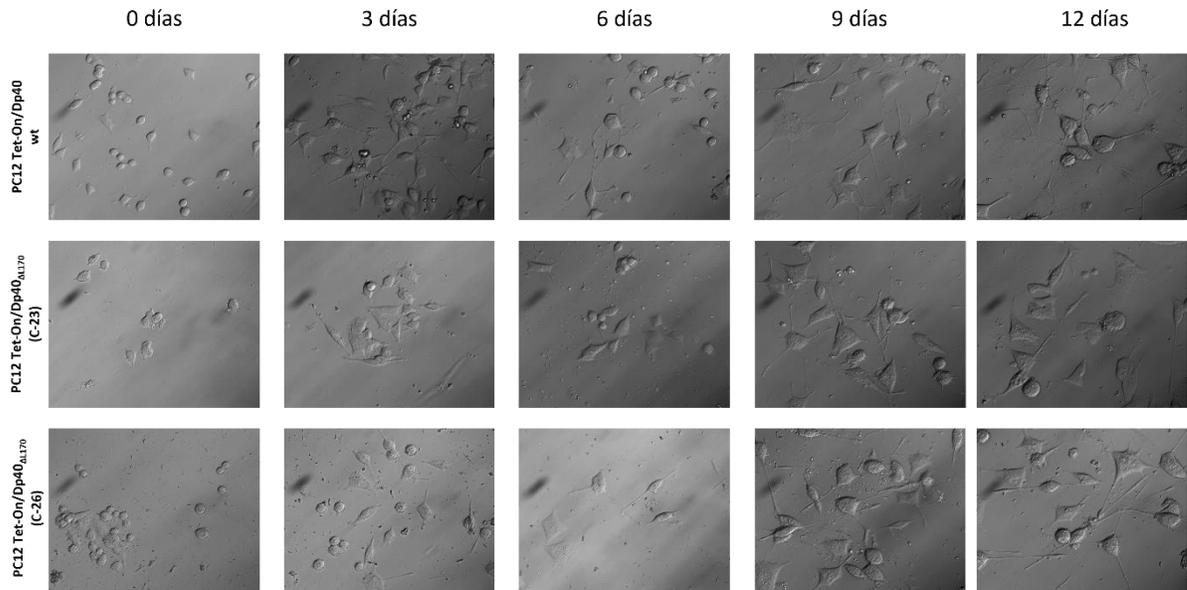


Figura 13 Micrografías representativas de las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40wt, Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170(C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170(C-26) a 0, 3, 6, 9 y 12 días de diferenciación con NGF. Las micrografías fueron capturadas en un microscopio AX10 Zeiss con el objetivo 40X. Se capturaron micrografías de aproximadamente 20 campos de cada línea celular, los resultados corresponden a un experimento.

Con respecto a los datos obtenidos del conteo celular realizado para las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-

23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) a los 12 días de diferenciación, se obtuvieron varias observaciones. Inicialmente podemos observar diferencias en la morfología general de las células (Figura 14). Se consideraron células sin cambio a aquellas que, sin importar los días de diferenciación transcurridos, conservaron la morfología del día 0, permaneciendo redondas, por otro lado, en el grupo de células aplanadas se consideró a todas las células que tuvieron cualquier cambio, sin importar el tamaño de sus neuritas o su tasa de aplanamiento. El análisis de los resultados indican que para la línea celular PC12 Tet-On/Myc (vv) el 42.8% de las células permanecen sin cambio y el 57.2% presentó cambios en su morfología, para PC12 Tet-On/Dp40 wt el 26.5% de las células permanecen sin cambio y el 73.5% presento cambios en su morfología, para PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) el 33.5% de las células permanecen sin cambio y el 66.5% presentó cambios en su morfología y finalmente para la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) el 31.2% de las células permanecen sin cambio y el 68.8% presentó cambios en su morfología.

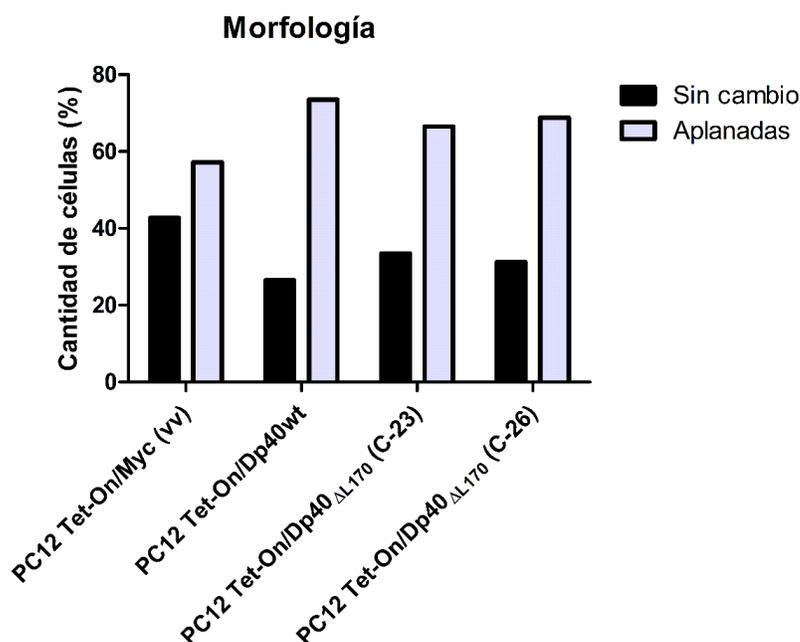


Figura 14 Cambio en la morfología a 12 días de diferenciación para las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26). En negro se observa el porcentaje de células que permanecieron sin cambio a 12 días de diferenciación, en gris se observa el porcentaje de células que cambiaron su morfología a 12 días de diferenciación. El conteo corresponde al menos a 100 células de cada línea celular en un solo experimento.

De igual manera se realizó el conteo de las células que se diferenciaron a los 12 días de inducción con NGF (Figura 15), para esto se consideraron los parámetros especificados en la sección de Materiales y Métodos, en donde se consideran células diferenciadas a aquellas que tienen neuritas que exceden dos veces el tamaño del cuerpo celular y el resto son consideradas células no diferenciadas. Con este análisis, los resultados indican que para la línea celular PC12 Tet-On/Myc (vv) el 30.4% de las células se diferenciaron y el 69.6% no, para la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 wt el 59.5% de las células se diferenciaron y el 40.5% no, para PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) se diferenciaron el 28.1% y el 71.9% no y finalmente para las células PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) el 50.4% se diferenció y el 49.6 no.

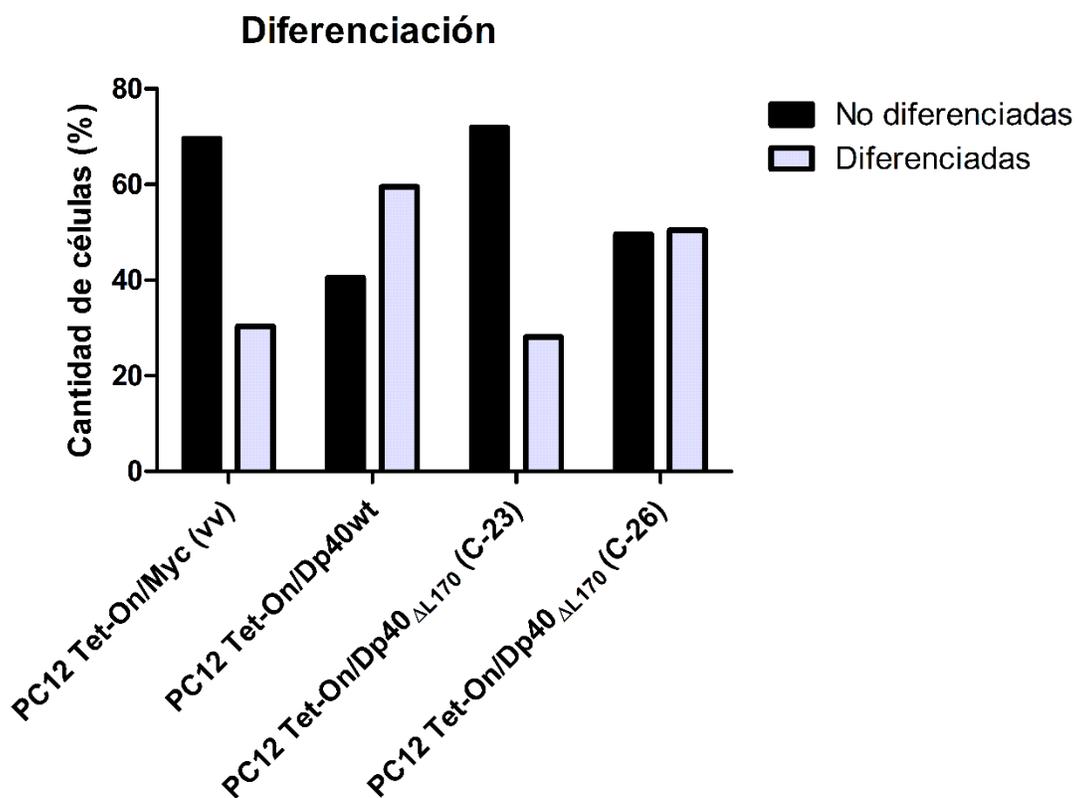


Figura 15 Diferenciación de las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) a los 12 días de diferenciación. En negro se observa el porcentaje de células cuyas neuritas tienen un tamaño menor a 2 cuerpos celulares, en gris se observa el porcentaje de células cuyas neuritas tienen un tamaño de al menos 2 cuerpos celulares a los 12 días de diferenciación. El conteo corresponde al menos a 100 células en un solo experimento.

Adicionalmente, se determinó la complejidad de las neuritas observadas en las diferentes líneas celulares (Figura 16), se consideraron neuritas simples a las neuritas que crecían en una sola dirección independientemente de su tamaño, y neuritas complejas a aquellas que crecían cambiando de dirección o con ramificaciones. Los resultados mostraron que para las células PC12 Tet-On/Myc (vv) el 100% de las neuritas son simples, para la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 wt el 55.6% de las neuritas son simples y el 44.4% son neuritas complejas, para PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) el 90.8% de las neuritas son simples y el 9.2% son complejas y finalmente, para las células PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) el 90.9% de las neuritas son simples y el 9.1% son neuritas complejas.

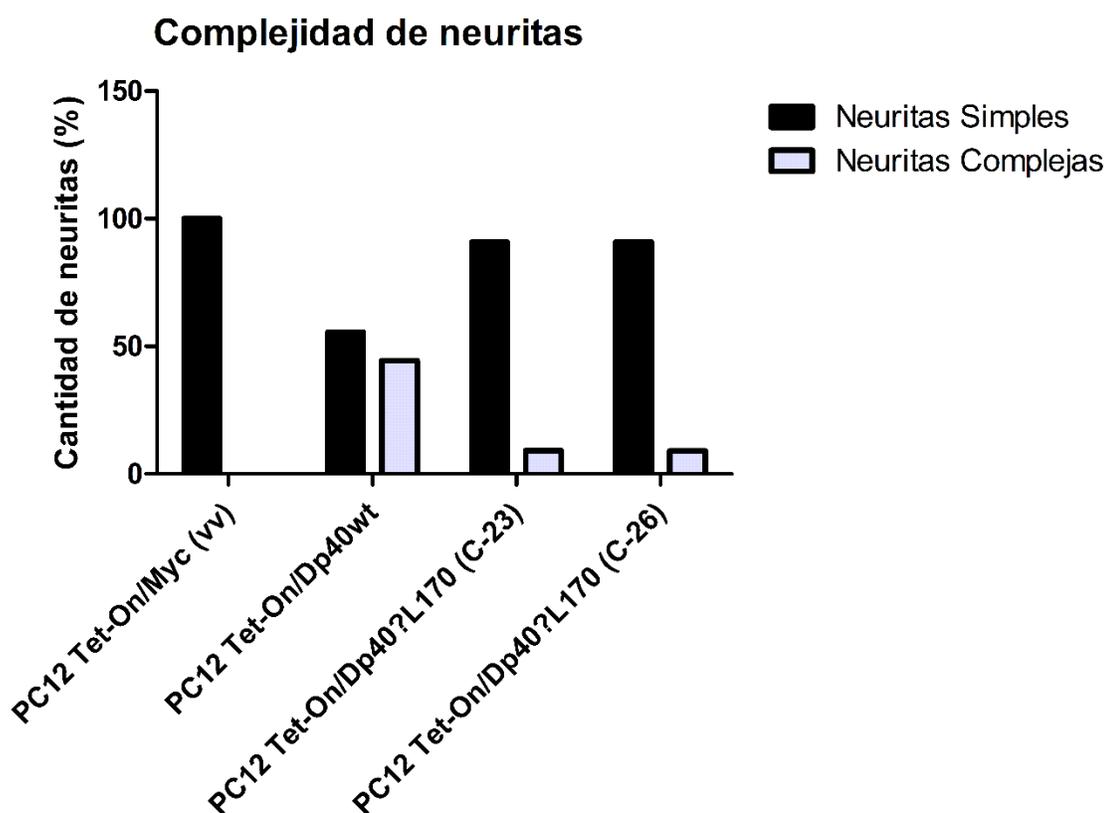


Figura 16 Complejidad de las neuritas observada en las células PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) a los 12 días de diferenciación. En negro se muestra el porcentaje de neuritas simples, en gris se representa el porcentaje de neuritas que forman estructuras más complejas a los 12 días de diferenciación. El conteo corresponde al menos a 100 células de un solo experimento.

**iv. Expresión de marcadores de diferenciación y proliferación en las células PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26)**

Se realizó un ensayo de western blot para determinar la expresión relativa de las proteínas FAK, NSE, NF-L, B-actina, Dp40 y PCNA (Figura 17), normalizándolos con la expresión de actina en cada línea celular. Estos marcadores permiten evaluar los procesos de adhesión, diferenciación y proliferación. Se analizaron las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) utilizando los anticuerpos correspondientes contra cada uno de los marcadores mencionados, comparando 0 y 12 días de diferenciación con NGF en presencia de doxiciclina.

A los 12 días de diferenciación las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv) y PC12 Tet-On/Dp40 wt no muestran cambios importantes en la presencia relativa de la proteína FAK (Figura 18), sin embargo, la línea celular denominada pool mostró un incremento de 0.6 veces, mientras que PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) muestra un incremento de 11.2 veces y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) un incremento de 4.5 veces en la expresión de este marcador.

En el caso de la expresión de la proteína NSE (Figura 19), a los 12 días de diferenciación se observa un incremento importante en el PC12 Tet-On/Myc (vv), en la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 wt el incremento corresponde a 2.5 veces, en el pool el aumento corresponde a 2.3 veces, en la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) no existe un cambio apreciable, mientras que en PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) el aumento corresponde a 3.6 veces.

El marcador NF-L (Figura 20) presenta un cambio en su expresión relativa de 0.3 veces a los 12 días de diferenciación para la línea celular PC12 Tet-On/Myc (vv), en la línea PC12 Tet-On/Dp40 wt se observa una reducción de 8.2 veces, mientras que en el pool la reducción corresponde a 2.6 veces, para las líneas PC12 Tet-

On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) existe un aumento de 4.8 y 0.2 veces respectivamente.

La expresión de la distrofina Dp40 (Figura 21) no se observa en la línea PC12 Tet-On/Myc (vv) debido a la naturaleza de esta, sin embargo, en la PC12 Tet-On/Dp40 wt se observa un decremento en su presencia de 0.7 veces tras 12 días de diferenciación, el pool muestra un aumento 0.8 veces, mientras que el aumento correspondiente a la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) es de 6.1 veces, finalmente la línea PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) muestra una disminución de 0.4 veces.

PCNA (Figura 22) por su parte está disminuida 3.6 veces en el PC12 Tet-On/Myc (vv) y desaparece por completo en la línea PC12 Tet-On/Dp40wt, en el pool su presencia disminuye alrededor de 3.6 veces, mientras que en la línea PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) la disminución es apenas observable y corresponde a 0.2 veces, finalmente en la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) la disminución es de 4.4 veces.

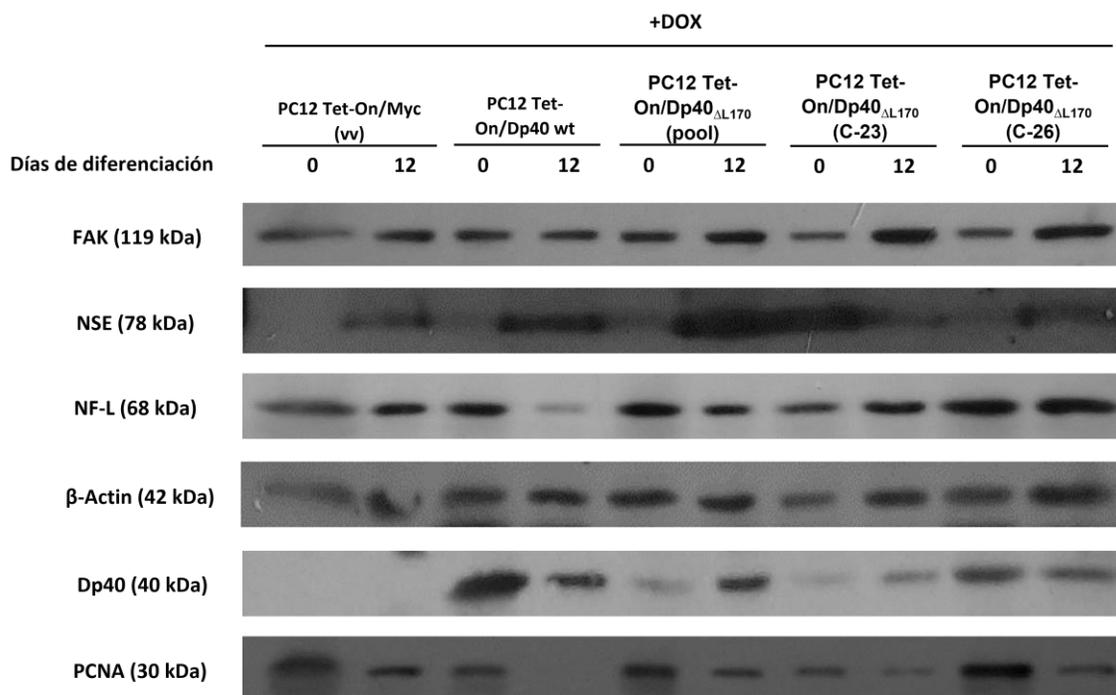


Figura 17 Expresión de las proteínas FAK, NSE, NF-L, Dp40 y PCNA en las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26). Las células fueron cultivadas como se indica en Materiales y Métodos. Se procedió a la extracción de

proteínas a 0 y 12 días de diferenciación, todas las condiciones fueron inducidas con doxiciclina. Se realizó el experimento de **Western blot** utilizando los anticuerpos indicados en materiales y métodos. a actina fue utilizado para normalizar la expresión de los marcadores. Los resultados corresponden a un experimento.

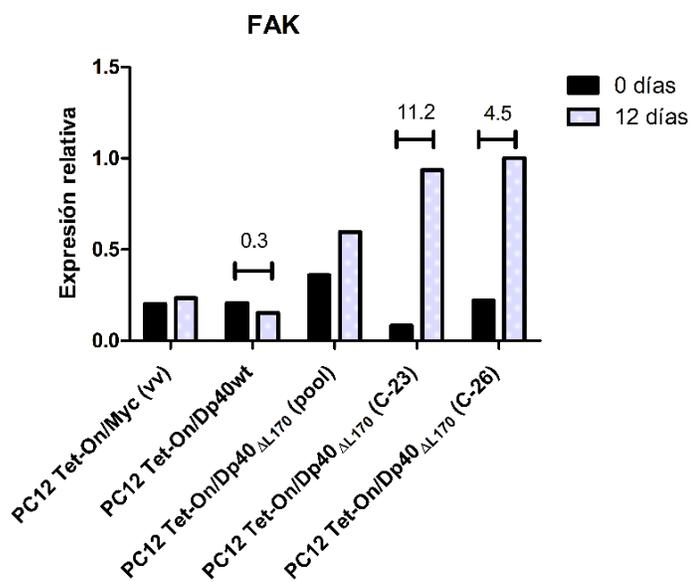


Figura 18 Expresión de la proteína FAK en las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26). Gráfica de los resultados de western blot para el marcador FAK para las líneas celulares a los PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) tras 0 y 12 días de diferenciación con NGF en presencia de doxiciclina. Los números sobre las barras denotan la diferencia entre ambas barras. La expresión relativa fue normalizada con respecto a actina. El resultado corresponde a un experimento.

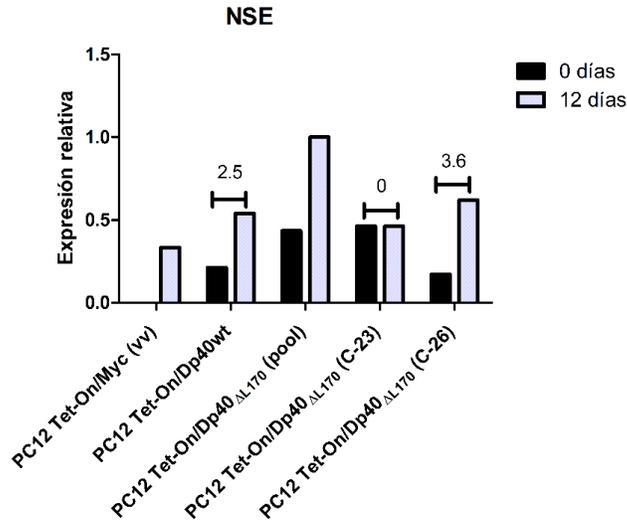


Figura 19 Expresión de la proteína NSE en las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26). Gráfica de los resultados de western blot para el marcador FAK para las líneas celulares a los PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) tras 0 y 12 días de diferenciación con NGF en presencia de doxiciplina. Los números sobre las barras denotan la diferencia entre ambas barras. La expresión relativa fue normalizada con respecto a actina. El resultado corresponde a un experimento.

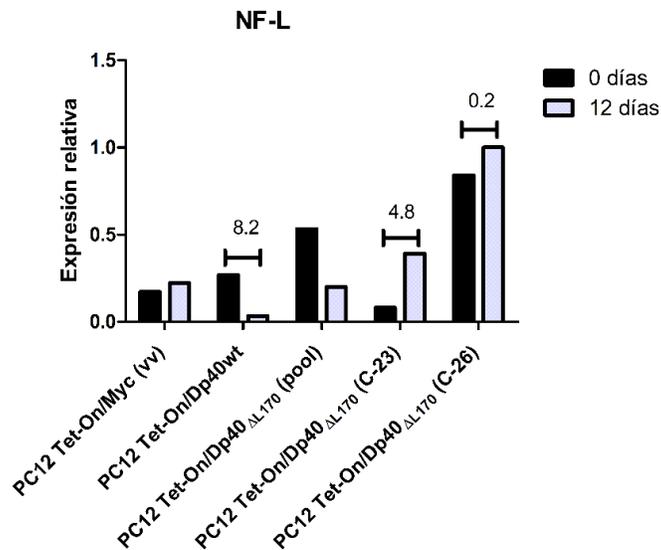


Figura 20 Expresión de la proteína NF-L en las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26). Gráfica de los resultados de western blot para el marcador FAK para las líneas celulares a los PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) tras 0 y 12 días de diferenciación con NGF en presencia de doxiciplina. Los números sobre las barras denotan la diferencia entre ambas barras. La expresión relativa fue normalizada con respecto a actina. El resultado corresponde a un experimento.

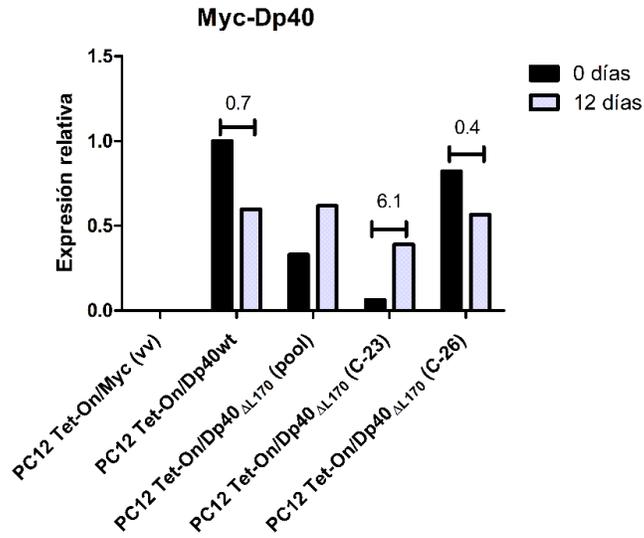


Figura 21 Expresión de la proteína Dp40 en las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26). Gráfica de los resultados de western blot para el marcador FAK para las líneas celulares a los PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) tras 0 y 12 días de diferenciación con NGF en presencia de doxiciclina. Los números sobre las barras denotan la diferencia entre ambas barras. La expresión relativa fue normalizada con respecto a actina. El resultado corresponde a un experimento.

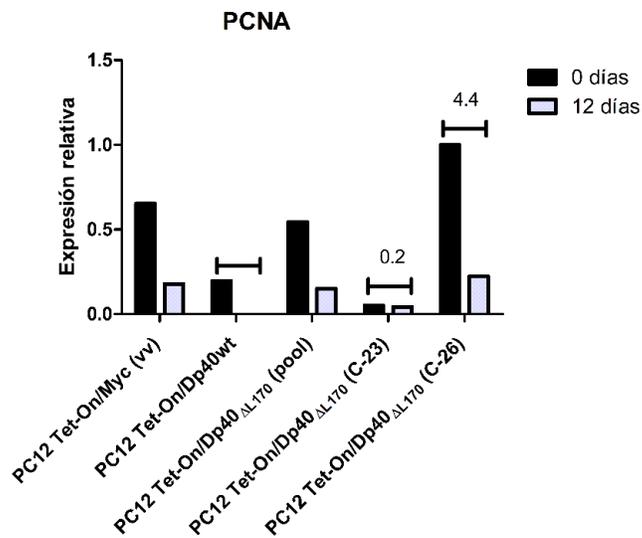


Figura 22 Expresión de la proteína PCNA en las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26). Gráfica de los resultados de western blot para el marcador FAK para las líneas celulares a los PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) tras 0 y 12 días de diferenciación con NGF en presencia de doxiciclina. Los números sobre las barras denotan la diferencia entre ambas barras. La expresión relativa fue normalizada con respecto a actina. El resultado corresponde a un experimento.

## v. Localización de las proteínas Dp40wt, y Dp40 $\Delta$ L170 en las células PC12 Tet-On

Con el objetivo de conocer la localización celular de las proteínas Dp40wt y Dp40 $\Delta$ L170, en las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp40wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia indirecta utilizando los anticuerpos anti-Myc y anti-lámina A/C (figura 23). Los resultados obtenidos para las células PC12 Tet-On/Myc (vv) muestran que a 6 días de diferenciación se observa el péptido Myc en toda la célula de manera punteada, a 12 días se observa mayor presencia en el núcleo, pero también se observa en las neuritas y extensiones celulares, por su parte la lámina A/C se observa delimitando el núcleo y sin presencia dentro del mismo a 6 y 12 días de diferenciación.

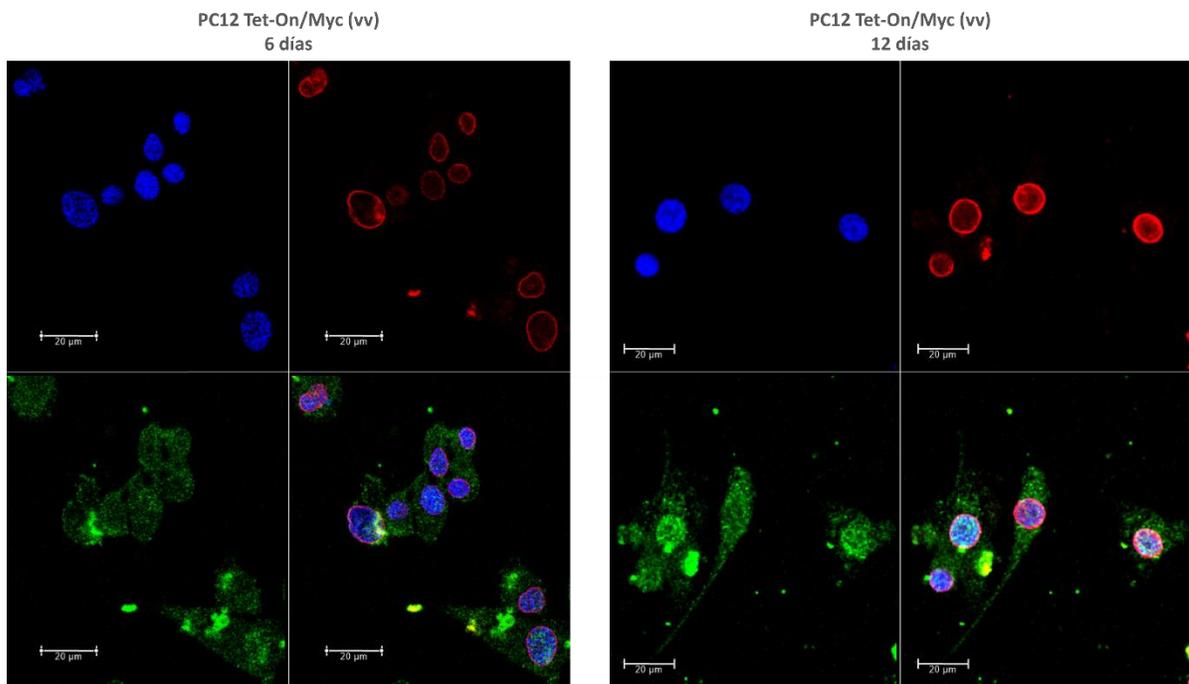


Figura 23 Distribución del péptido myc y lamina A/C en células PC12 Tet-On/Myc (vv). Se llevó a cabo un experimento de inmunofluorescencia indirecta en las células PC12 Tet-On/Myc (vv) a 6 y 12 días de diferenciación. En verde se muestra la señal del anticuerpo anti Myc, en rojo la señal para el anticuerpo anti-lámina A/C, en azul se representa la señal de DAPI. Las imágenes corresponden a cortes en el eje z. obtenidos en el microscopio confocal Leica TCS SPE8. Los resultados corresponden a un solo experimento. Se indica la barra de tamaño de 20  $\mu$ m.

En la línea celular PC12 Tet-On/Dp40wt (figura 24) se observa la distrofina Dp40, a los 6 días de diferenciación, en toda la célula de forma homogénea, de igual manera, a 12 días de diferenciación se observa en toda la célula y con menor presencia en el núcleo. En lo que respecta a la lámina A/C, en los cortes que permiten observar el núcleo, se encuentra de igual forma a 6 y 12 días de diferenciación mayormente en la periferia del núcleo y sin presencia en la parte interna del mismo.

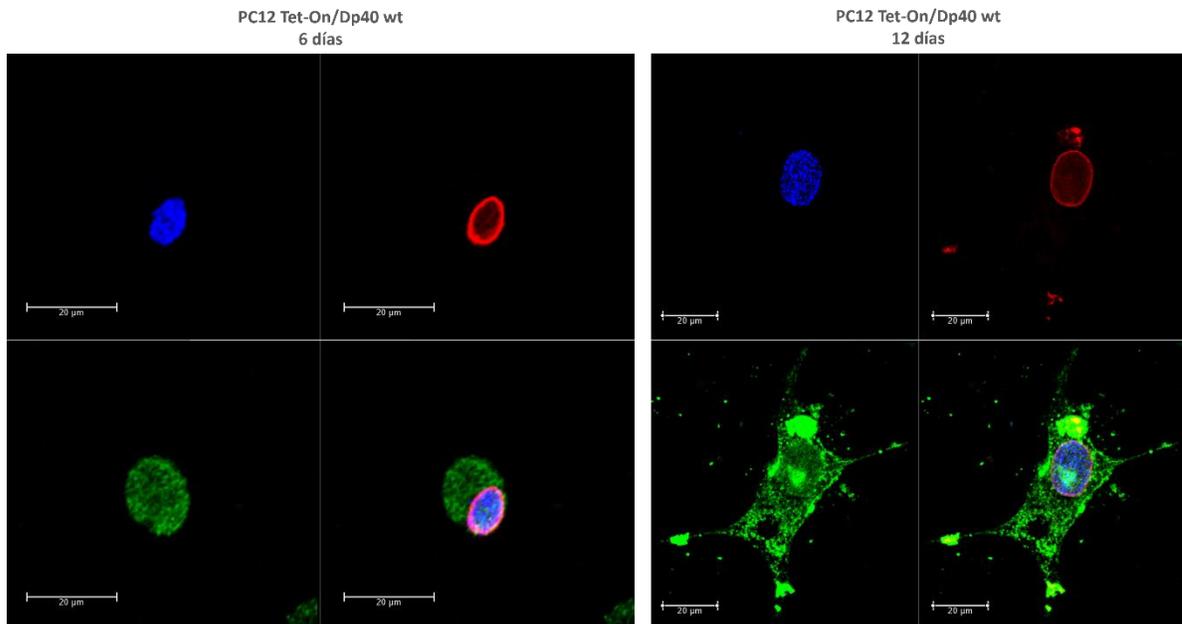


Figura 24 Distribución del péptido myc y lamina A/C en células PC12 Tet-On/Dp40wt. Se llevó a cabo un experimento de inmunofluorescencia indirecta en las células PC12 Tet-On/Dp40wt a 6 y 12 días de diferenciación. En verde se muestra la señal del anticuerpo anti Myc, en rojo la señal para el anticuerpo anti-lamina A/C, en azul se representa la señal de DAPI. Las imágenes corresponden a cortes en del eje z obtenidos en el microscopio confocal Leica TCS SPE8. Los resultados corresponden a un solo experimento. Se indica la barra de tamaño de 20 µm.

Al observar a la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) (figura 25), la Dp40 $\Delta$ L170 a los 6 días de diferenciación se encuentra mayormente en el núcleo de la célula, sin embargo, al transcurrir los 12 días de diferenciación, la distrofina mutante se encuentra en toda la célula y los procesos neuríticos y la presencia en el núcleo comienza a disminuir igualando su intensidad con el citoplasma. En lo que respecta a lámina A/C se observa que a los 6 días de diferenciación se encuentra localizada en toda el área nuclear, sin embargo, después de 12 días la lámina A/C se dispone nuevamente en la periferia nuclear y ya no está presente en el interior del núcleo.

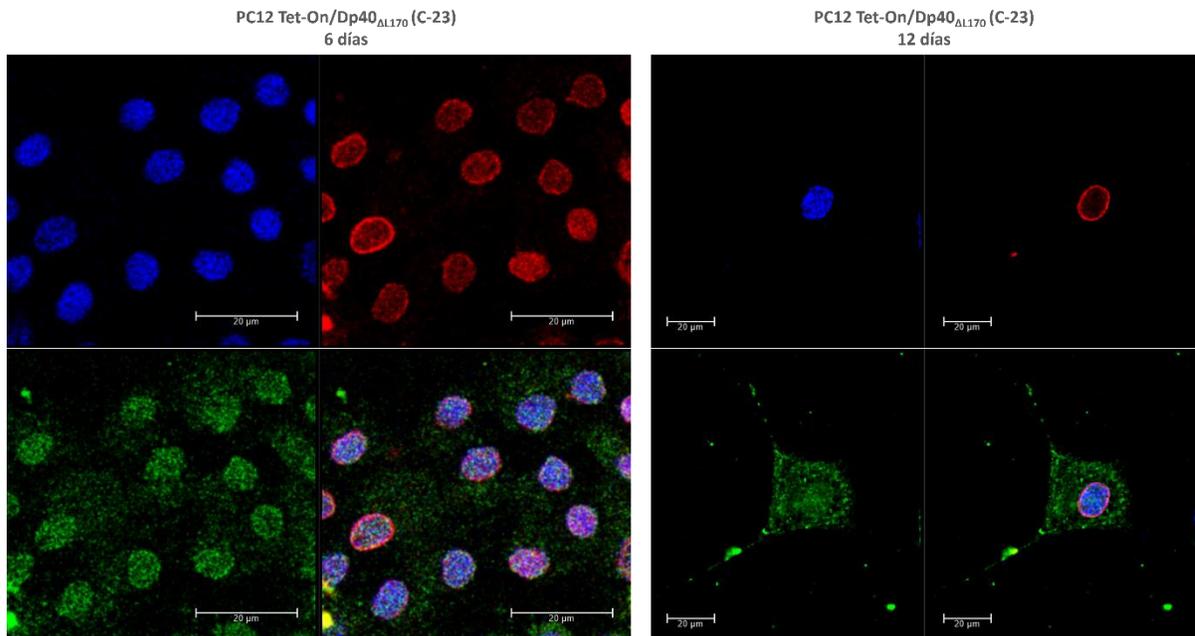


Figura 25 Distribución del péptido myc y lamina A/C en células PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23). Se llevó a cabo un experimento de inmunofluorescencia indirecta en las células PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) a 6 y 12 días de diferenciación. En verde se muestra la señal del anticuerpo anti Myc, en rojo la señal para el anticuerpo anti lámina A/C, en azul se representa la señal de DAPI. Las imágenes corresponden a cortes en del eje z. obtenidos en el microscopio confocal Leica TCS SPE8. Los resultados corresponden a un solo experimento. Se indica la barra de tamaño de 20  $\mu$ m.

En la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) (figura 26) se puede observar la presencia de Dp40 $\Delta$ L170 principalmente en el núcleo celular a los 6 días de diferenciación, a los 12 días, su localización subcelular cambia para relocalizarse en toda el área celular y los procesos neuríticos, mostrando una presencia menor en el núcleo celular. Con respecto a la localización subcelular de lámina A/C, tras 6 días, comienza a localizarse en la periferia nuclear, sin embargo, aún puede encontrarse en toda el área que corresponde al núcleo celular, al haber transcurrido los 12 días, la lámina A/C se observa dispuesta en la periferia del núcleo y sin presencia en la parte interna del mismo.

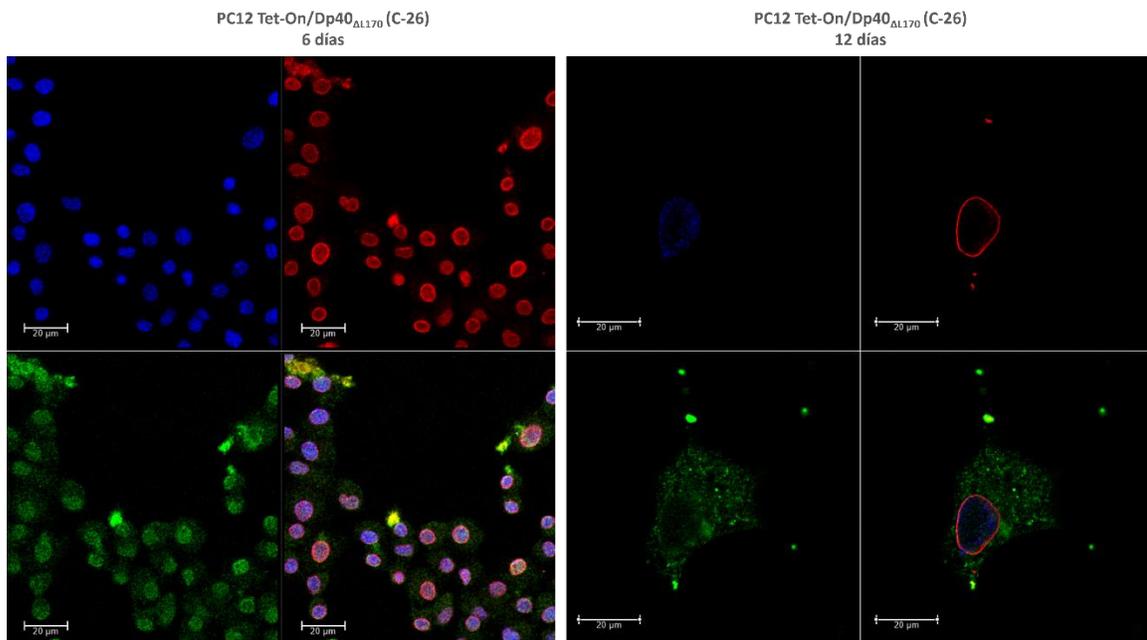


Figura 26 Distribución del péptido myc y lamina A/C en células PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26). Se llevó a cabo un experimento de inmunofluorescencia indirecta en las células PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) a 6 y 12 días de diferenciación. En verde se muestra la señal del anticuerpo anti Myc, en rojo la señal para el anticuerpo anti-lámina A/C, en azul se representa la señal de DAPI. Las imágenes corresponden a cortes en del eje z. Obtenidos en el microscopio confocal Leica TCS SPE8. Los resultados corresponden a un solo experimento. Se indica la barra de tamaño de 20  $\mu$ m.

**b. Caracterización del efecto de la proteína mutante Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 en la diferenciación de células PC12**

**i. Expresión de la proteína mutante Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170**

Con la finalidad de corroborar la expresión de la proteína mutante Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 se realizó un western blot con el anticuerpo primario anti-C-Myc (imagen 27), el cual indico la ausencia de expresión de la distrofina Dp71 en las condiciones de 0 y 12 días +/- doxiciclina para las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 (wt), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-1), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-2) y PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-3).

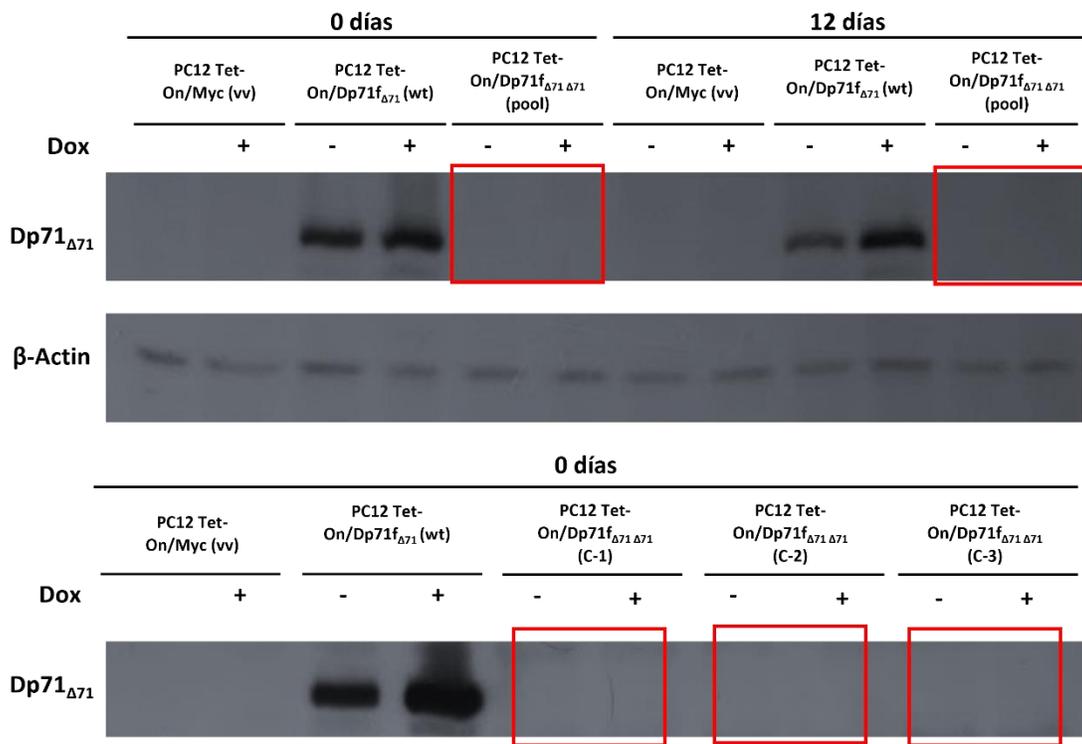


Figura 27 Expresión de la proteína Myc-Dp71f $\Delta$ 71 en las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 (wt), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (pool), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-1), PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-2) y PC12 Tet-On/Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170 (C-3). Western blot realizado con el anticuerpo antiC-Myc, los cuadros rojos indican los sitios donde se debería encontrar a la distrofina Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170.



## 10. DISCUSIÓN

Una característica importante de la distrofia muscular de Duchenne es el déficit cognitivo, el cual correlaciona con mutaciones en la parte distal del gen DMD, donde se encuentra la región que codifica para las distrofinas cortas Dp40 y Dp71. Se ha reportado anteriormente la importancia del sitio L170 en dichas proteínas y se ha correlacionado con el déficit cognitivo en ausencia de distrofia muscular. La caracterización de esta mutación en un modelo celular durante la diferenciación neural permitirá establecer las bases del efecto de esta mutación en la distrofia muscular de Duchenne.

Inicialmente se realizó la curva de proliferación de las líneas celulares utilizadas en este estudio, para analizar el crecimiento de las células, de inicio se encontró un comportamiento interesante, observando que las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) crecen aproximadamente a la mitad de la velocidad de las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40 wt. Se puede observar que la línea celular más afectada es la PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23), dado que en comparación a la PC12 Tet-On/Dp40 wt crece 2.3 veces menos tras 11 días, es decir, la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 wt crece más del doble. La línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) crece 0.4 veces menos que la PC12 Tet-On/Dp40 wt, lo que representa una alteración menor que la línea PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23).

Al analizar la morfología se observaron resultados similares a los obtenidos por (García-Cruz et al., 2022), donde se reporta la afectación en el número de células con neuritas, así como el tamaño de las neuritas al modificar el amino ácido L170 a P170 (L170P). En células sin diferenciar se pueden observar pocas diferencias, una de ellas es que las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) crecen agrupadas o en cúmulos, y no son completamente redondas, ya que su periferia es irregular y poco homogénea a diferencia de PC12 Tet-On/Myc (vv) y PC12 Tet-On/Dp40 wt. La línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) muestra estas características en mayor medida que la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26), pareciendo estar esta última menos afectada. Al analizar

la condición de 12 días de diferenciación con NGF podemos encontrar varias características importantes, es de resaltar que el crecimiento de neuritas se ve claramente estimulado en la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 wt con respecto a Tet-On/Myc (vv), esto es evidenciado por la cantidad de células que generan neuritas así como por el tamaño de las neuritas, adicionalmente hay menos células no diferenciadas, las neuritas tienen conos de crecimiento altamente pronunciados y sus neuritas forman contactos y estructuras complejas. La línea celular PC12 Tet-On/Myc (vv) muestra una diferenciación moderada en cuanto a dichas características. Al comparar la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 wt con PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) basados en los mismos parámetros se encontró una clara reducción en la diferenciación y formación de neuritas. Lo remarcable de la observación anterior es que mientras la línea PC12 Tet-On/Dp40 wt comienza a diferenciarse y generar neuritas desde el día 1 y completa la diferenciación alrededor de los 9 días, la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) inicia la diferenciación alrededor de 6 días y la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) alrededor de 3 días. Con el análisis de la morfología se observa que la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) tiene las mismas etapas que PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26), pero comienza el proceso de diferenciación después. Adicionalmente se realizó el análisis morfométrico, el cual indica inicialmente una ligera diferencia entre la línea celular PC12 Tet-On/Myc (vv) que muestra un 57.3% de células aplanadas o diferenciadas y las líneas PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) que muestran un 73.6%, 66.5% y 68.8% respectivamente de células aplanadas o diferenciadas, indicando que las células a las que se les induce la sobreexpresión de la distrofina Dp40 comienzan el proceso de diferenciación con una mayor eficiencia, incluso cuando se expresa la Dp40 $\Delta$ L170, donde el porcentaje es ligeramente menor en comparación con la distrofina Dp40wt. Así mismo, cuando se cuantifica la diferenciación en función de la longitud de las neuritas, se observa que en las células PC12 Tet-On/Myc (vv) existe un 30.4% de células diferenciadas mientras en las líneas PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) existe un 59.5%, 28.1% y 50.4% de células diferenciadas.

En este caso la diferencia es bastante clara entre las células PC12 Tet-On/Myc (vv) y PC12 Tet-On/Dp40 wt en donde se observa un cambio en la diferenciación del 30.4% al 59.5%. Cuando la distrofina Dp40 contiene la mutación  $\Delta$ L170 se observa una disminución de dicha diferenciación hasta el 28.1% en las células PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y hasta 50.4% en las células PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26), indicando que esta última línea celular se encuentra menos afectada en cuanto a su la formación de neuritas. Finalmente se cuantifico la complejidad de las neuritas, en este caso es cuando se observó la mayor diferencia, puesto que, mientras el 0% de las neuritas de las células PC12 Tet-On/Myc (vv) fueron neuritas complejas, para las células PC12 Tet-On/Dp40 wt, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26), el porcentaje de neuritas complejas fue de 44.4%, 9.2% y 9.1% respectivamente. Esto último indica que la sobreexpresión de la distrofina Dp40wt promueve la formación de neuritas complejas de una manera significativa, mientras que la mutación  $\Delta$ L170 disminuye claramente la formación de las mismas.

Los resultados del análisis de la expresión de los marcadores de diferenciación y proliferación celular proveen valiosa información. FAK, es una enzima indispensable durante la etapa de iniciación de la formación de las neuritas. A los 12 días del tratamiento con NGF, la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 wt no muestra cambios en la presencia relativa de FAK, sin embargo, PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 C-26 y C-23 muestran un aumento, siendo mucho mayor en este último, lo cual es congruente con las observaciones en morfología. Desde este punto de vista se puede interpretar que al ser necesaria esta proteína durante el inicio del proceso de diferenciación, es congruente que exista una mayor expresión en la clona PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23), que comenzó este proceso más tarde que PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26), de igual forma es congruente que el aumento sea menor en PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) y aun menor en PC12 Tet-On/Dp40wt. Con respecto al marcador de diferenciación NSE, el cual es una enzima presente únicamente en eventos tardíos de diferenciación, resulta bastante coherente que a los 12 días de diferenciación PC12 Tet-On/Dp40 wt y C-26 muestran una maduración neural estable evidenciada por el incremento en la presencia de NSE; no así PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) que tras 12 días aun no muestra incremento en los niveles de NSE. El marcador

NF-L es un marcador de daño en los axones, el incremento en su expresión en la clona PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) tras 12 días, pudiera relacionarse con la dificultad de dicha clona para formar neuritas estables en este tiempo de diferenciación, a diferencia de la clona PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26); la cual presenta mayores niveles de diferenciación. Al observar la expresión de Dp40, encontramos un comportamiento inesperado, a diferencia de las líneas PC12 Tet-On/Dp40 wt y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26), la clona PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) continua con una expresión pronunciada de distrofina Dp40 $\Delta$ L170 a los 12 días de diferenciación. Debido a que no se pudieron realizar repeticiones de estos experimentos, la información es limitada para dilucidar el papel de la distrofina, sin embargo, dicho efecto pudiera ser atribuido como una consecuencia de un evento de regulación de dicha proteína, que a su vez desencadena la serie de efectos observados en los otros marcadores. Finalmente encontramos el marcador de proliferación celular PCNA, en el cual las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40 wt y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) disminuyen su proliferación a los 12 días de diferenciación como es esperado, debido a que el fenómeno de diferenciación detiene el proceso de proliferación celular. Sin embargo, la clona PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) no presenta cambios en su proliferación a los 12 días, indicando indirectamente que en dicho lapso no se lleva a cabo una diferenciación eficiente aun, en congruencia con lo observado en los marcadores de diferenciación NSE, NF-I y lo observado en la morfología.

Finalmente, al observar los resultados de la inmunofluorescencia indirecta, podemos encontrar que la distrofina Dp40 se dispone homogéneamente tanto en el citoplasma como en el núcleo, cuando la diferenciación es más evidente, llegando, en algunos casos, a abandonar el núcleo y trasladarse casi de forma total al citoplasma y los procesos neuríticos. Con esta metodología se observa que las clonas PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) muestran una mayor presencia de Dp40 en el núcleo a días en los cuales las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40 wt y Tet-On/Myc (vv) ya han sido diferenciadas y ya se encuentran tanto en el citoplasma como en el núcleo. Este efecto es más visible en

la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23), corroborando nuevamente que dicha línea presenta un retraso mayor en el proceso de diferenciación.

En cuanto a lo observado en la distribución de la proteína lámina A/C, esta es una proteína que suele encontrarse dispuesta en la periferia del núcleo, como se puede observar a lo largo de la diferenciación de las líneas celulares PC12 Tet-On/Myc (vv) y PC12 Tet-On/Dp40 wt. Sin embargo, en las clonas PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26) se observa que a tiempos intermedios del proceso de diferenciación, a 6 días, la lámina A/C se encuentra en una disposición anormal, distribuida por todo el núcleo celular y redistribuyéndose a la periferia celular hasta los últimos días del estudio, siendo este efecto más claro en la línea celular PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23).

En conclusión, los diferentes ensayos muestran que la sobreexpresión de la proteína mutante en las células PC12, está causando un retraso en la diferenciación, afectando en gran medida la neuritogénesis y provocando morfologías aberrantes o anormales en las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26).

## 11. CONCLUSIONES

- La sobreexpresión de Dp40 estimula la formación de las neuritas en las células PC12.
- La proteína mutante Dp40 $\Delta$ L170, afecta el crecimiento y morfología de las neuritas promovido por Dp40wt, durante la diferenciación de las células PC12-Tet-On.
- La proteína mutante Dp40 $\Delta$ L170, en comparación con la proteína Dp40wt, provoca un retraso en la generación de neuritas, durante la diferenciación de las células PC12-Tet-On.
- La proteína mutante Dp40 $\Delta$ L170, permanece en el núcleo tras la diferenciación.

- La proteína mutante Dp40 $\Delta$ L170, provoca un aparente cambio en la disposición de la lámina A/C al inicio de la neuritogenesis durante la diferenciación de las células PC12-Tet-On.
- La delección en el vector pTRE2pur-Myc-Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170, impide la expresión de la proteína Dp71f $\Delta$ 71 $\Delta$ L170, en las células PC12-Tet-On.

## 12. PERSPECTIVAS

- Determinar el cambio en los niveles de los marcadores de proliferación y diferenciación (FAK, NSE, PCNA, NF-L) a 3, 6 y 9 días en las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 en comparación con la línea celular PC12 Tet-On/Dp40wt.
- Caracterizar el retraso en la diferenciación inducida por NGF en las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-23) y PC12 Tet-On/Dp40 $\Delta$ L170 (C-26).
- Determinar las proteínas con las que interactúa Dp40 en el núcleo y el efecto de la Dp40 $\Delta$ L170 en la estructura nuclear
- Realizar el seguimiento en la distribución subcelular de Dp40 $\Delta$ L170 durante los 12 días de diferenciación en comparación con Dp40.
- Determinar el papel de la lámina A/C en correlación a la Dp40, así como su comportamiento durante el proceso de diferenciación inducido por NGF.
- Determinar la variación en la distribución subcelular de Dp40 en la línea celular PC12 Tet-On/Dp40wt en comparación con las clonas C-23 y C-26.
- Secuenciar el sitio de inserción de los plásmidos que expresan a la distrofina Dp40 en las líneas celulares utilizadas.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, R., Montañez, C., Fuentes-Mera, L., Gonzalez, E., Gómez, P., Quintero-Mora, L., Mornet, D., Álvarez-Salas, L. M., & Cisneros, B. (2004). Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Experimental Cell Research*, *296*(2), 265–275.  
<https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2004.01.015>
- Aleman, V., Osorio, B., Chavez, O., Rendon, A., Mornet, D., & Martinez, D. (2001). Subcellular localization of Dp71 dystrophin isoforms in cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes. *Histochemistry and Cell Biology*, *115*(3), 243–254.  
<https://doi.org/10.1007/S004180000221>
- Aragón, J., González-Reyes, M., Romo-Yáñez, J., Vacca, O., Aguilar-González, G., Rendón, A., Vaillend, C., & Montañez, C. (2018). Dystrophin Dp71 Isoforms Are Differentially Expressed in the Mouse Brain and Retina: Report of New Alternative Splicing and a Novel Nomenclature for Dp71 Isoforms. *Molecular Neurobiology*, *55*(2), 1376–1386.  
<https://doi.org/10.1007/S12035-017-0405-X>
- Aragón, J., Martínez-Herrera, A., Bermúdez-Cruz, R. M., Bazán, M. L., Soid-Raggi, G., Ceja, V., Coy-Arechavaleta, A. S., Alemán, V., Depardón, F., & Montañez, C. (2015). EF-hand domains are involved in the differential cellular distribution of dystrophin Dp40. *Neuroscience Letters*, *600*, 115–120. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2015.05.038>
- Aragón, J., Romo-Yáñez, J., Martínez-Herrera, A., Ceja, V., Rendon, A., & Montañez, C. (2011). Characterization of Dp71 $\Delta$ (78-79), a novel dystrophin mutant that stimulates PC12 cell differentiation. *Journal of Neurochemistry*, *119*(4), 697–707. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2011.07347.X>
- Battini, R., Chieffo, D., Bulgheroni, S., Piccini, G., Pecini, C., Lucibello, S., Lenzi, S., Moriconi, F., Pane, M., Astrea, G., Baranello, G., Alfieri, P., Vicari, S., Riva, D., Cioni, G., & Mercuri, E. (2018). Cognitive profile in Duchenne muscular dystrophy boys without intellectual disability: The role of executive functions. *Neuromuscular Disorders : NMD*, *28*(2), 122–128.  
<https://doi.org/10.1016/J.NMD.2017.11.018>
- Bladen, C. L., Salgado, D., Monges, S., Foncuberta, M. E., Kekou, K., Kosma, K., Dawkins, H.,

- Lamont, L., Roy, A. J., Chamova, T., Guergueltcheva, V., Chan, S., Korngut, L., Campbell, C., Dai, Y., Wang, J., Barišić, N., Brabec, P., Lahdetie, J., ... Lochmüller, H. (2015). The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of More than 7,000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. *Human Mutation*, 36(4), 395. <https://doi.org/10.1002/HUMU.22758>
- Blake, D. J., Hawkes, R., Benson, M. A., & Beesley, P. W. (1999). Different Dystrophin-like Complexes Are Expressed in Neurons and Glia. *The Journal of Cell Biology*, 147(3), 645. <https://doi.org/10.1083/JCB.147.3.645>
- Bucher, K., Ionasescu, V., & Hanson, J. (1980). Frequency of new mutants among boys with duchenne muscular dystrophy. *American Journal of Medical Genetics*, 7(1), 27–34. <https://doi.org/10.1002/AJMG.1320070107>
- Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D. J., Case, L. E., Clemens, P. R., Cripe, L., Kaul, A., Kinnett, K., McDonald, C., Pandya, S., Poysky, J., Shapiro, F., Tomezsko, J., & Constantin, C. (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *The Lancet. Neurology*, 9(1), 77–93. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70271-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70271-6)
- Bushby, K. M. D., Appleton, R., Anderson, L. V. B., Welch, J. L., Kelly, P., & Gardner-Medwin, D. (1995). Deletion status and intellectual impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 37(3), 260–269. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8749.1995.TB12000.X>
- Byers, T. J., Lidov, H. G. W., & Kunkel, L. M. (1993). An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nature Genetics*, 4(1), 77–81. <https://doi.org/10.1038/NG0593-77>
- Calderilla-Barbosa, L., Ortega, A., & Cisneros, B. (2006). Phosphorylation of dystrophin Dp71d by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II modulates the Dp71d nuclear localization in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 98(3), 713–722. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2006.03904.X>
- Carter, J. C., Sheehan, D. W., Prochoroff, A., & Birnkrant, D. J. (2018). Muscular Dystrophies. *Clinics in Chest Medicine*, 39(2), 377–389. <https://doi.org/10.1016/J.CCM.2018.01.004>
- Ceccarini, M., Rizzo, G., Rosa, G., Chelucci, C., Macioce, P., & Petrucci, T. C. (1997). A splice variant of Dp71 lacking the syntrophin binding site is expressed in early stages of human neural

development. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 103(1), 77–82.

[https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(97\)00122-3](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(97)00122-3)

- Cerna, J., Cerecedo, D., Ortega, A., García-Sierra, F., Centeno, F., Garrido, E., Mornet, D., & Cisneros, B. (2006). *Dystrophin Dp71f Associates with the  $\beta$ 1-Integrin Adhesion Complex to Modulate PC12 Cell Adhesion*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.075>
- Chamova, T., Guergueltcheva, V., Raycheva, M., Todorov, T., Genova, J., Bichev, S., Bojinova, V., Mitev, V., Tournev, I., & Todorova, A. (2013). Association between loss of dp140 and cognitive impairment in duchenne and becker dystrophies. *Balkan Journal of Medical Genetics : BJMG*, 16(1), 21–30. <https://doi.org/10.2478/BJMG-2013-0014>
- Chung, W., & Campanelli, J. T. (1999). WW and EF hand domains of dystrophin-family proteins mediate dystroglycan binding. *Molecular Cell Biology Research Communications : MCBRC*, 2(3), 162–171. <https://doi.org/10.1006/MCBR.1999.0168>
- 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), 107–110. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12863-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12863-9)
- Cox, G. A., Sunada, Y., Campbell, K. P., & Chamberlain, J. S. (1994). Dp71 can restore the dystrophin-associated glycoprotein complex in muscle but fails to prevent dystrophy. *Nature Genetics*, 8(4), 333–339. <https://doi.org/10.1038/NG1294-333>
- Culver, S. (2019). *MEDICAL GENETICS : role of genetics in diseases and disorders*. HAYLE MEDICAL. [https://books.google.com/books/about/Medical\\_Genetics\\_Role\\_of\\_Genetics\\_in\\_Dis.html?id=ebxTxQEACAAJ](https://books.google.com/books/about/Medical_Genetics_Role_of_Genetics_in_Dis.html?id=ebxTxQEACAAJ)
- Daoud, F., Angeard, N., Demerre, B., Martie, I., Benyaou, R., Leturcq, F., Cossée, M., Deburgrave, N., Saillour, Y., Tuffery, S., Urtizbera, A., Toutain, A., Echenne, B., Frischman, M., Mayer, M., Desguerre, I., Estournet, B., Réveillère, C., Penisson-Besnier, ... Chelly, J. (2009). Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Human Molecular Genetics*, 18(20), 3779–3794. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDP320>
- Darras, B. T., Urion, D. K., & Ghosh, P. S. (2000). *Dystrophinopathies*. 1993–2022.
- De Brouwer, A. P., Nabuurs, S. B., Verhaart, I. E., Oudakker, A. R., Hordijk, R., Yntema, H. G.,

- Hordijk-Hos, J. M., Voesenek, K., De Vries, B. B., Van Essen, T., Chen, W., Hu, H., Chelly, J., Den Dunnen, J. T., Kalscheuer, V. M., Aartsma-Rus, A. M., Hamel, B. C., Van Bokhoven, H., & Kleefstra, T. (2014). A 3-base pair deletion, c.9711\_9713del, in DMD results in intellectual disability without muscular dystrophy. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, *22*(4), 480–485. <https://doi.org/10.1038/EJHG.2013.169>
- den Dunnen, J. T. (2006, March 5). *Dystrophin isoforms* . <https://www.dmd.nl/isoforms.html>
- Djinovic-Carugo, K., Gautel, M., Ylänne, J., & Young, P. (2002). The spectrin repeat: a structural platform for cytoskeletal protein assemblies. *FEBS Letters*, *513*(1), 119–123. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03304-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03304-X)
- Donato, R. (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *33*(7), 637–668. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00046-2)
- Doorenweerd, N. (2020). Combining genetics, neuropsychology and neuroimaging to improve understanding of brain involvement in Duchenne muscular dystrophy - a narrative review. *Neuromuscular Disorders*, *30*(6), 437–442. <https://doi.org/10.1016/J.NMD.2020.05.001>
- Doorenweerd, N., Straathof, C. S., Dumas, E. M., Spitali, P., Ginjaar, I. B., Wokke, B. H., Schrans, D. G., Van Den Bergen, J. C., Van Zwet, E. W., Webb, A., Van Buchem, M. A., Verschuuren, J. J., Hendriksen, J. G., Niks, E. H., & Kan, H. E. (2014). Reduced cerebral gray matter and altered white matter in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Annals of Neurology*, *76*(3), 403–411. <https://doi.org/10.1002/ANA.24222>
- Dowling, P., Gargan, S., Murphy, S., Zweyer, M., Sabir, H., Swandulla, D., & Ohlendieck, K. (2021). The Dystrophin Node as Integrator of Cytoskeletal Organization, Lateral Force Transmission, Fiber Stability and Cellular Signaling in Skeletal Muscle. *Proteomes*, *9*(1), 1–20. <https://doi.org/10.3390/PROTEOMES9010009>
- Duan, D. (2018). Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *26*(10), 2337–2356. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2018.07.011>
- Durbeej, M., Jung, D., Hjalt, T., Campbell, K. P., & Ekblom, P. (1997). Transient expression of Dp140, a product of the Duchenne muscular dystrophy locus, during kidney tubulogenesis.

*Developmental Biology*, 181(2), 156–167. <https://doi.org/10.1006/DBIO.1996.8430>

Elsevier Connect. (n.d.). *Organización del músculo esquelético: las fibras*. Retrieved May 11, 2022, from <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/edu-organizacion-del-musculo-esqueletico-las-fibras>

Emery, A. E. H. (1989). Emery-Dreifuss syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 26(10), 637–641. <https://doi.org/10.1136/JMG.26.10.637>

Emery, A. E. H. (2002). The muscular dystrophies. *The Lancet*, 359(9307), 687–695. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07815-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07815-7)

Enríquez-Aragón, J. A., Cerna-Cortés, J., Bermúdez De León, M., García-Sierra, F., González, E., Mornet, D., & Cisneros, B. (2005). Dystrophin Dp71 in PC12 cell adhesion. *Neuroreport*, 16(3), 235–238. <https://doi.org/10.1097/00001756-200502280-00006>

Farea, M., Rani, A. Q. M., Maeta, K., Nishio, H., & Matsuo, M. (2020). Dystrophin Dp71ab is monoclally expressed in human satellite cells and enhances proliferation of myoblast cells. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-74157-Y>

Fuentes-Mera, L., Rodríguez-Muñoz, R., González-Ramírez, R., García-Sierra, F., González, E., Mornet, D., & Cisneros, B. (2006). Characterization of a novel Dp71 dystrophin-associated protein complex (DAPC) present in the nucleus of HeLa cells: members of the nuclear DAPC associate with the nuclear matrix. *Experimental Cell Research*, 312(16), 3023–3035. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2006.06.002>

Fujimoto, T., Itoh, K., Yaoi, T., & Fushiki, S. (2014). Somatodendritic and excitatory postsynaptic distribution of neuron-type dystrophin isoform, Dp40, in hippocampal neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 452(1), 79–84. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2014.08.064>

García-Cruz, C., Merino-Jiménez, C., Aragón, J., Ceja, V., González-Assad, B., Reyes-Grajeda, J. P., & Montanez, C. (2022). Overexpression of the dystrophins Dp40 and Dp40L170P modifies neurite outgrowth and the protein expression profile of PC12 cells. *Scientific Reports*, 12(1), 1410. <https://doi.org/10.1038/S41598-022-05271-2>

García-Cruz, C., Merino-Jiménez, C., Ceja, V., Aragón, J., Siqueiros-Márquez, L., Reyes-Grajeda, J. P., & Montañez, C. (2019). The dystrophin isoform Dp71e  $\Delta$ 71 is involved in neurite outgrowth

and neuronal differentiation of PC12 cells. *Journal of Proteomics*, 191, 80–87.

<https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2018.03.027>

Garcia-Tovar, C. G., Perez, A., Luna, J., Mena, R., Osorio, B., Aleman, V., Mondragon, R., Mornet, D., Rendon, A., & Hernandez, J. M. (2001). Biochemical and histochemical analysis of 71 kDa dystrophin isoform (Dp71f) in rat brain. *Acta Histochemica*, 103(2), 209–224.

<https://doi.org/10.1078/0065-1281-00591>

Genetic Alliance, & District of Columbia Department of Health. (2010). Understanding Genetics. In *Understanding Genetics: A District of Columbia Guide for Patients and Health Professionals*.

Genetic Alliance. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK132149/>

Glyakina, A. V., Likhachev, I. V., Balabaev, N. K., & Galzitskaya, O. V. (2018). Comparative mechanical unfolding studies of spectrin domains R15, R16 and R17. *Journal of Structural Biology*, 201(2), 162–170. <https://doi.org/10.1016/J.JSB.2017.12.003>

González, E., Montañez, C., Ray, P. N., Howard, P. L., García-Sierra, F., Mornet, D., & Cisneros, B. (2000). Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS Letters*, 482(3), 209–214. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02044-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02044-5)

Greenberg, D. S., Schatz, Y., Levy, Z., Pizzo, P., Yaffe, D., & Nudel, U. (1996). Reduced Levels of Dystrophin Associated Proteins in the Brains of Mice Deficient for Dp71. *Human Molecular Genetics*, 5(9), 1299–1303. <https://doi.org/10.1093/HMG/5.9.1299>

Greenberg, D. S., Sunada, Y., Campbell, K. P., Yaffe, D., & Nudel, U. (1994). Exogenous Dp71 restores the levels of dystrophin associated proteins but does not alleviate muscle damage in mdx mice. *Nature Genetics*, 8(4), 340–344. <https://doi.org/10.1038/NG1294-340>

Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7), 2424–2428.

<https://doi.org/10.1073/PNAS.73.7.2424>

Gribenko, A. V., Hopper, J. E., & Makhatadze, G. I. (2001). Molecular characterization and tissue distribution of a novel member of the S100 family of EF-hand proteins. *Biochemistry*, 40(51), 15538–15548. <https://doi.org/10.1021/BI0114731>

Hazai, D., Halasy, K., Mornet, D., Hajós, F., & Jancsik, V. (2006). Dystrophin Splice Variants Are

- Distinctly Localized in the Hippocampus. *Acta Biologica Hungarica* 2006 57:2, 57(2), 141–146.  
<https://doi.org/10.1556/ABIOL.57.2006.2.1>
- Helleringer, R., Le Verger, D., Li, X., Izabelle, C., Chaussonot, R., Belmaati-Cherkaoui, M., Dammak, R., Decottignies, P., Daniel, H., Galante, M., & Vaillend, C. (2018). Cerebellar synapse properties and cerebellum-dependent motor and non-motor performance in Dp71-null mice. *Disease Models & Mechanisms*, 11(7). <https://doi.org/10.1242/DMM.033258>
- 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[INCREMENT]<sub>78-79</sub> stimulates cell proliferation. *Neuroreport*, 27(1), 6–11.  
<https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000475>
- Howard, P. L., Dally, G. Y., Ditta, S. D., Austin, R. C., Worton, R. G., Klamut, H. J., & Ray, P. N. (1999). Dystrophin isoforms Dp71 and Dp427 have distinct roles in myogenic cells. *Muscle and Nerve*, 22(1), 16–27. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4598\(199901\)22:1<16::AID-MUS5>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4598(199901)22:1<16::AID-MUS5>3.0.CO;2-R)
- Illaraza-Lomeli, R., Cisneros-Vega, B., Cervantes-Gomez, M. D. L., Mornet, D., & Montañez, C. (2007). Dp71, utrophin and beta-dystroglycan expression and distribution in PC12/L6 cell cocultures. *Neuroreport*, 18(16), 1657–1661.  
<https://doi.org/10.1097/WNR.0B013E3282F0E42D>
- Ilisley, J. L., Sudol, M., & Winder, S. J. (2001). The interaction of dystrophin with beta-dystroglycan is regulated by tyrosine phosphorylation. *Cellular Signalling*, 13(9), 625–632.  
[https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(01\)00188-7](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(01)00188-7)
- Imamura, M., Araishi, K., Noguchi, S., & Ozawa, E. (2000). A sarcoglycan-dystroglycan complex anchors Dp116 and utrophin in the peripheral nervous system. *Human Molecular Genetics*, 9(20), 3091–3100. <https://doi.org/10.1093/HMG/9.20.3091>
- Imamura, M., & Ozawa, E. (1998). Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyryl-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6139–6144. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.11.6139>
- Ishikawa-Sakurai, M., Yoshida, M., Imamura, M., Davies, K. E., & Ozawa, E. (2004). ZZ domain is

essentially required for the physiological binding of dystrophin and utrophin to beta-dystroglycan. *Human Molecular Genetics*, 13(7), 693–702.

<https://doi.org/10.1093/HMG/DDH087>

Jackson, M., Marks, L., May, G. H. W., & Wilson, J. B. (2018). The genetic basis of disease. *Essays in Biochemistry*, 62(5), 643. <https://doi.org/10.1042/EBC20170053>

Jones, L., Naidoo, M., Machado, L. R., & Anthony, K. (2021). The Duchenne muscular dystrophy gene and cancer. *Cellular Oncology*, 44(1), 19–32. <https://doi.org/10.1007/S13402-020-00572-Y/FIGURES/3>

Judge, L. M., Arnett, A. L. H., Banks, G. B., & Chamberlain, J. S. (2011). Expression of the dystrophin isoform Dp116 preserves functional muscle mass and extends lifespan without preventing dystrophy in severely dystrophic mice. *Human Molecular Genetics*, 20(24), 4978–4990.

<https://doi.org/10.1093/HMG/DDR433>

Julian, J. N. schofield. D., Simmons, C., E.morris, G., M.tinsley, J., Davies, K. E., & Edwards, Y. H. (1994). Apo-dystrophin-1 and apo-dystrophin-2, products of the Duchenne muscular dystrophy locus: expression during mouse embryogenesis and in cultured cell lines. *Human Molecular Genetics*, 3(8), 1309–1316. <https://doi.org/10.1093/HMG/3.8.1309>

Jung, D., Yang, B., Meyer, J., Chamberlain, J. S., & Campbell, K. P. (1995). Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 27305–27310. <https://doi.org/10.1074/JBC.270.45.27305>

Jung, Daniel, Filliol, D., Metz-Boutigue, M. H., & Rendon, A. (1993). Characterization and subcellular localization of the dystrophin-protein 71 (Dp71) from brain. *Neuromuscular Disorders*, 3(5–6), 515–518. [https://doi.org/10.1016/0960-8966\(93\)90107-U](https://doi.org/10.1016/0960-8966(93)90107-U)

Kameya, S., Araki, E., Katsuki, M., Mizota, A., Adachi, E., Nakahara, K., Nonaka, I., Sakuragi, S., Takeda, S., & Nabeshima, Y. I. (1997). Dp260 disrupted mice revealed prolonged implicit time of the b-wave in ERG and loss of accumulation of beta-dystroglycan in the outer plexiform layer of the retina. *Human Molecular Genetics*, 6(13), 2195–2203.

<https://doi.org/10.1093/HMG/6.13.2195>

Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., & Haussler, and D. (2002). The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Research*, 12(6), 996.

<https://doi.org/10.1101/GR.229102>

- Koenig, M., & Kunkel, L. M. (1990). Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *Journal of Biological Chemistry*, 265(8), 4560–4566. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)39599-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)39599-7)
- Koenig, M., Monaco, A. P., & Kunkel, L. M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, 53(2), 219–228. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90383-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90383-2)
- Kumagai, T., Miura, K., Ohki, T., Matsumoto, A., Miyazaki, S., Nakamura, M., Ochi, N., & Takahashi, O. (2001). [Central nervous system involvements in Duchenne/Becker muscular dystrophy]. *No to Hattatsu = Brain and Development*, 33(6), 480–486. <https://europepmc.org/article/med/11725514>
- Laforêt, P., De Toma, C., Eymard, B., Becane, H. M., Jeanpierre, M., Fardeau, M., & Duboc, D. (1998). Cardiac involvement in genetically confirmed facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology*, 51(5), 1454–1456. <https://doi.org/10.1212/WNL.51.5.1454>
- Lapidos, K. A., Kakkar, R., & McNally, E. M. (2004). The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circulation Research*, 94(8), 1023–1031. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000126574.61061.25>
- Le, S., Yu, M., Hovan, L., Zhao, Z., Ervasti, J., & Yan, J. (2018). Dystrophin As A Molecular Shock Absorber. *ACS Nano*, 12(12), 12140. <https://doi.org/10.1021/ACS.NANO.8B05721>
- 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. <https://doi.org/10.1073/PNAS.89.12.5346>
- Lederfein, Doron, Yaffe, D., & Nudel, U. (1993). A housekeeping type promoter, located in the 3' region of the Duchenne muscular dystrophy gene, controls the expression of Dp71, a major product of the gene. *Human Molecular Genetics*, 2(11), 1883–1888. <https://doi.org/10.1093/HMG/2.11.1883>
- Leibovitz, S., Meshorer, A., Fridman, Y., Wieneke, S., Jockusch, H., Yaffe, D., & Nudel, U. (2002). Exogenous Dp71 is a dominant negative competitor of dystrophin in skeletal muscle.

*Neuromuscular Disorders : NMD*, 12(9), 836–844. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(02\)00141-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(02)00141-4)

Liang, Y., Chen, S., Zhu, J., Zhou, X., Yang, C., Yao, L., & Zhang, C. (2015). Dystrophin hydrophobic regions in the pathogenesis of Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(2), 42–49. <https://doi.org/10.17305/BJBMS.2015.300>

Lidov, H. G. W., & Kunkel, L. M. (1998). Dystrophin and Dp140 in the adult rodent kidney. *Laboratory Investigation*, 78(12).

Lidov, Hart G.W., & Kunkel, L. M. (1997). Dp140: alternatively spliced isoforms in brain and kidney. *Genomics*, 45(1), 132–139. <https://doi.org/10.1006/GENO.1997.4905>

Lidov, Hart G.W., Selig, S., & Kunkel, L. M. (1995). Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Human Molecular Genetics*, 4(3), 329–335. <https://doi.org/10.1093/HMG/4.3.329>

Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C. J., & Marchler-Bauer, A. (2020). CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D265–D268. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ991>

Lumeng, C. N., Hauser, M., Brown, V., & Chamberlain, J. S. (1999). Expression of the 71 kDa dystrophin isoform (Dp71) evaluated by gene targeting. *Brain Research*, 830(1), 174–178. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01201-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01201-9)

Lvovs, D., Favorova, O. O., & Favorov, A. V. (2012). A Polygenic Approach to the Study of Polygenic Diseases. *Acta Naturae*, 4(3), 59. <https://doi.org/10.32607/20758251-2012-4-3-59-71>

Mah, J. K., Korngut, L., Fiest, K. M., Dykeman, J., Day, L. J., Pringsheim, T., & Jette, N. (2016). A Systematic Review and Meta-analysis on the Epidemiology of the Muscular Dystrophies. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 43(1), 163–177. <https://doi.org/10.1017/CJN.2015.311>

Mahdieh, N., & Rabbani, B. (2013). An Overview of Mutation Detection Methods in Genetic Disorders. *Iranian Journal of Pediatrics*, 23(4), 375. [/pmc/articles/PMC3883366/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3883366/)

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), 957–966. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00063-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00063-0)
- Martínez Herrera, A. (2015). *Caracterización molecular de los productos del gen DMD; Dp71a, Dp71c y Dp40 en células PC12* [CINVESTAV]. <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/2398>
- Masaki, T., Matsumura, K., Hirata, A., Yamada, H., Hase, A., Shimizu, T., Yorifuji, H., Motoyoshi, K., & Kamakura, K. (2001). Expression of dystroglycan complex in satellite cells of dorsal root ganglia. *Acta Neuropathologica*, *101*(2), 174–178. <https://doi.org/10.1007/S004010000276>
- Matsumura, K., & Campbell, K. P. (1994). Dystrophin-glycoprotein complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Muscle & Nerve*, *17*(1), 2–15. <https://doi.org/10.1002/MUS.880170103>
- Matsuo, M., Awano, H., Matsumoto, M., Nagai, M., Kawaguchi, T., Zhang, Z., & Nishio, H. (2017). Dystrophin Dp116: A yet to Be Investigated Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene. *Genes*, *8*(10). <https://doi.org/10.3390/GENES8100251>
- Mercuri, E., Bönnemann, C. G., & Muntoni, F. (2019). Muscular dystrophies. *The Lancet*, *394*(10213), 2025–2038. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32910-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32910-1)
- Merino-Jiménez, C., Aragón, J., Ceja, V., Rodríguez-Martínez, G., Cázares-Raga, F. E., Chardonnet, S., Pionneau, C., Rendon, A., & Montañez, C. (2016). Dp71 $\Delta$ 78-79 dystrophin mutant stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via upregulation and phosphorylation of HspB1. *Proteomics*, *16*(9), 1331–1340. <https://doi.org/10.1002/PMIC.201500211>
- Milic Rasic, V., Vojinovic, D., Pesovic, J., Mijalkovic, G., Lukic, V., Mladenovic, J., Kosac, A., Novakovic, I., Maksimovic, N., Romac, S., Todorovic, S., & Savic Pavicevic, D. (2015). Intellectual ability in the duchenne muscular dystrophy and dystrophin gene mutation location. *Balkan Journal of Medical Genetics*, *17*(2), 25–36. <https://doi.org/10.2478/BJMG-2014-0071>
- Mirabella, M., Servidei, S., Manfredi, G., Ricci, E., Frustaci, A., Bertini, E., Rana, M., & Tonali, P. (1993). Cardiomyopathy may be the only clinical manifestation in female carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, *43*(11), 2342–2342.

<https://doi.org/10.1212/WNL.43.11.2342>

Mizuno, Y., Yoshida, M., Yamamoto, H., Hirai, S., & Ozawa, E. (1993). Distribution of dystrophin isoforms and dystrophin-associated proteins 43DAG (A3a) and 50DAG (A2) in various monkey tissues. *Journal of Biochemistry*, *114*(6), 936–941.

<https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A124281>

Moizard, M.-P., Billard, C., Toutain, A., Berret, F., Marmin, N., & Moraine, C. (1998). Are Dp71 and Dp140 Brain Dystrophin Isoforms Related to Cognitive Impairment in Duchenne Muscular Dystrophy? *J. Med. Genet*, *80*, 32–41. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19981102\)80:1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19981102)80:1)

Moizard, M. P., Toutain, A., Fournier, D., Berret, F., Raynaud, M., Billard, C., Andres, C., & Moraine, C. (2000). Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical indication for Dp71 isoform point mutation screening. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, *8*(7), 552–556.

<https://doi.org/10.1038/SJ.EJHG.5200488>

Morris, G. E., Simmons, C., & Man, N. T. (1995). Apo-dystrophins (Dp140 and Dp71) and dystrophin splicing isoforms in developing brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *215*(1), 361–367. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1995.2474>

Mueller Emery AEH, C. R. (2004). Emery A.E.H., Muntoni F. (eds): Duchenne muscular dystrophy. *Human Genetics 2004 115:6*, *115*(6), 529–529. <https://doi.org/10.1007/S00439-004-1189-4>

Muntoni, F., Bertini, E., Bönnemann, C., Brockington, M., Brown, S., Bushby, K., Fisman, M., Körner, C., Mercuri, E., Merlini, L., Hewitt, J., Quijano-Roy, S., Romero, N., Squarzone, S., Sewry, C. A., Straub, V., Topaloglu, H., Haliloglu, G., Voit, T., ... Guicheney, P. (2002). 98th ENMC International Workshop on Congenital Muscular Dystrophy (CMD), 7th Workshop of the International Consortium on CMD, 2nd Workshop of the MYO CLUSTER project GENRE: 26–28th October, 2001, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders*, *12*(9), 889–896. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(02\)00068-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(02)00068-8)

Muntoni, Francesco, Torelli, S., & Ferlini, A. (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *The Lancet. Neurology*, *2*(12), 731–740.

[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00585-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00585-4)

Nigro, G., Comi, L. I., Limongelli, F. M., Giugliano, M. A. M., Politano, L., Petretta, V., Passamano, L.,

- & Stefanelli, S. (1983). Prospective study of X-linked progressive muscular dystrophy in Campania. *Muscle & Nerve*, 6(4), 253–262. <https://doi.org/10.1002/MUS.880060403>
- Nonaka, I. (1999). Distal myopathies. *Current Opinion in Neurology*, 12(5), 493–499. [https://journals.lww.com/co-neurology/Fulltext/1999/10000/Distal\\_myopathies.2.aspx](https://journals.lww.com/co-neurology/Fulltext/1999/10000/Distal_myopathies.2.aspx)
- Ogata, H., Ishikawa, Y., Ishikawa, Y., & Minami, R. (2009). Beneficial effects of beta-blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Cardiology*, 53(1), 72–78. <https://doi.org/10.1016/J.JJCC.2008.08.013>
- Orlova, A., Rybakova, I. N., Prochniewicz, E., Thomas, D. D., Ervasti, J. M., & Egelman, E. H. (2001). Binding of dystrophin's tandem calponin homology domain to F-actin is modulated by actin's structure. *Biophysical Journal*, 80(4), 1926. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76162-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76162-0)
- Oshima, J., Magner, D. B., Lee, J. A., Breman, A. M., Schmitt, E. S., White, L. D., Crowe, C. A., Merrill, M., Jayakar, P., Rajadhyaksha, A., Eng, C. M., & del Gaudio, D. (2009). Regional genomic instability predisposes to complex dystrophin gene rearrangements. *Human Genetics*, 126(3), 411–423. <https://doi.org/10.1007/S00439-009-0679-9/FIGURES/7>
- Pane, M., Lombardo, M. E., Alfieri, P., D'Amico, A., Bianco, F., Vasco, G., Piccini, G., Mallardi, M., Romeo, D. M., Ricotti, V., Ferlini, A., Gualandi, F., Vicari, S., Bertini, E., Berardinelli, A., & Mercuri, E. (2012). Attention deficit hyperactivity disorder and cognitive function in Duchenne muscular dystrophy: phenotype-genotype correlation. *The Journal of Pediatrics*, 161(4). <https://doi.org/10.1016/J.JPEDS.2012.03.020>
- Percival, J. M. (2018). Perspective: Spectrin-Like Repeats in Dystrophin Have Unique Binding Preferences for Syntrophin Adaptors That Explain the Mystery of How nNOS $\mu$  Localizes to the Sarcolemma. *Frontiers in Physiology*, 9(OCT). <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2018.01369>
- Rae, M. G., & O'Malley, D. (2016). Cognitive dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: a possible role for neuromodulatory immune molecules. *Journal of Neurophysiology*, 116(3), 1304–1315. <https://doi.org/10.1152/JN.00248.2016>
- Rapaport, D., Fuchs, O., Nudel, U., & Yaffe, D. (1992). Expression of the Duchenne muscular dystrophy gene products in embryonic stem cells and their differentiated derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 267(30), 21289–21292. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)36604-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)36604-9)

- Rapaport, Debora, Greenberg, D. S., Tal, M., Yaffe, D., & Nudel, U. (1993). Dp71, the nonmuscle product of the Duchenne muscular dystrophy gene is associated with the cell membrane. *FEBS Letters*, *328*(1–2), 197–202. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80992-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80992-4)
- Rapaportz, D., Fuchs, O., Nudelg, U., & Yaffell, D. (1992). Expression of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene Products in Embryonic Stem Cells and Their Differentiated Derivatives\*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, *267*(30), 21289–21292. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)36604-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)36604-9)
- Rentschler, S., Linn, H., Deininger, K., Bedford, M. T., Espanel, X., & Sudol, M. (1999). The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biological Chemistry*, *380*(4), 431–442. <https://doi.org/10.1515/BC.1999.057>
- Richard C., A., Howard, P. L., D'souza, V. N., Klamut, H. J., & Ray, P. N. (1995). Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Human Molecular Genetics*, *4*(9), 1475–1483. <https://doi.org/10.1093/HMG/4.9.1475>
- Rodius, F., Claudepierre, T., Rosas-Vargas, H., Cisneros, B., Montanez, C., Dreyfus, H., Mornet, D., & Rendon, A. (1997). Dystrophins in developing retina: Dp260 expression correlates with synaptic maturation. *Neuroreport*, *8*(9–10), 2383–2387. <https://doi.org/10.1097/00001756-199707070-00056>
- Rodríguez-Muñoz, R., Villarreal-Silva, M., González-Ramírez, R., García-Sierra, F., Mondragón, M., Mondragón, R., Cerna, J., & Cisneros, B. (2008). Neuronal differentiation modulates the dystrophin Dp71d binding to the nuclear matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *375*(3), 303–307. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2008.07.135>
- Romero Flores, I. S. (2021). *Identificación de las isoformas de la distrofina Dp40 que se expresan durante la diferenciación de las células PC12* [CINVESTAV]. <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/3842>
- Romo-Yáñez, J., Ceja, V., Ilarraza-Lomelí, R., Coral-Vázquez, R., Velázquez, F., Mornet, D., Rendón, A., & Montañez, C. (2007). Dp71ab/DAPs complex composition changes during the differentiation process in PC12 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *102*(1), 82–97. <https://doi.org/10.1002/JCB.21281>
- Ropers, H. H. (2007). New Perspectives for the Elucidation of Genetic Disorders. *American Journal*

*of Human Genetics*, 81(2), 199. <https://doi.org/10.1086/520679>

- Ruggieri, S., Viggiano, L., Annese, T., Rubolino, C., Gerbino, A., De Zio, R., Corsi, P., Tamma, R., Ribatti, D., Errede, M., Operto, F., Margari, L., Resta, N., Di Tommaso, S., Rosati, J., Trojano, M., & Nico, B. (2019). DP71 and SERCA2 alteration in human neurons of a Duchenne muscular dystrophy patient. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S13287-018-1125-5/FIGURES/4>
- Saint Martín, A., Aragón, J., Depardon-Benítez, F., Sánchez-Trujillo, A., Mendoza-Hernández, G., Ceja, V., & Montañez, C. (2012). Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy-terminal end. *The FEBS Journal*, 279(1), 66–77. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2011.08399.X>
- Sánchez Juárez, P. A. (2016). *Identificación de los mecanismos de transporte nuclear involucrados en la localización de las isoformas de Dp71 y Dp40 en células PC12* [CINVESTAV]. <https://repositorio.cinvestav.mx/handle/cinvestav/2445>
- Santamaria-Kisiel, L., Rintala-Dempsey, A. C., & Shaw, G. S. (2006). Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochemical Journal*, 396(2), 201–214. <https://doi.org/10.1042/BJ20060195>
- 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. <https://doi.org/10.1093/HMG/8.1.1>
- Sarkis, J., Vía, V., Winder, S. J., Renault, A., Le Rumeur, E., & Hubert, J. F. (2013). Resisting sarcolemmal rupture: dystrophin repeats increase membrane-actin stiffness. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(1), 359–367. <https://doi.org/10.1096/FJ.12-208967>
- Sarrazin, E., Hagen, M. Von Der, Schara, U., Von Au, K., & Kaindl, A. M. (2014). Growth and psychomotor development of patients with Duchenne muscular dystrophy. *European Journal of Paediatric Neurology : EJPN : Official Journal of the European Paediatric Neurology Society*, 18(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/J.EJPN.2013.08.008>
- Singh, S. M., Bandi, S., & Mallela, K. M. G. (2015). The N- and C-Terminal Domains Differentially

Contribute to the Structure and Function of Dystrophin and Utrophin Tandem Calponin-Homology Domains. *Biochemistry*, 54(46), 6942–6950.  
<https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.5B00969>

Stone, M. R., O'Neill, A., Catino, D., & Bloch, R. J. (2005). Specific Interaction of the Actin-binding Domain of Dystrophin with Intermediate Filaments Containing Keratin 19. *Molecular Biology of the Cell*, 16(9), 4280. <https://doi.org/10.1091/MBC.E05-02-0112>

Suárez-Sánchez, R., Aguilar, A., Wagstaff, K. M., Velez, G., Azuara-Medina, P. M., Gomez, P., Vásquez-Limeta, A., Hernández-Hernández, O., Lieu, K. G., Jans, D. A., & Cisneros, B. (2014). Nucleocytoplasmic shuttling of the Duchenne muscular dystrophy gene product dystrophin Dp71d is dependent on the importin  $\alpha/\beta$  and CRM1 nuclear transporters and microtubule motor dynein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(5), 985–1001.  
<https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2014.01.027>

Theadom, A., Rodrigues, M., Roxburgh, R., Balalla, S., Higgins, C., Bhattacharjee, R., Jones, K., Krishnamurthi, R., & Feigin, V. (2014). Prevalence of Muscular Dystrophies: A Systematic Literature Review. *Neuroepidemiology*, 43(3–4), 259–268.  
<https://doi.org/10.1159/000369343>

Tinsley, J. M., Blake, D. J., & Davies, K. E. (1993). Apo-dystrophin-3: a 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Human Molecular Genetics*, 2(5), 521–524. <https://doi.org/10.1093/HMG/2.5.521>

Tokarz, S. A., Duncan, N. M., Rash, S. M., Sadeghi, A., Dewan, A. K., & Pillers, D. A. M. (1998). Redefinition of dystrophin isoform distribution in mouse tissue by RT-PCR implies role in nonmuscle manifestations of duchenne muscular dystrophy. *Molecular Genetics and Metabolism*, 65(4), 272–281. <https://doi.org/10.1006/MGME.1998.2763>

Tozawa, T., Itoh, K., Yaoi, T., Tando, S., Umekage, M., Dai, H., Hosoi, H., & Fushiki, S. (2012). The Shortest Isoform of Dystrophin (Dp40) Interacts with a Group of Presynaptic Proteins to Form a Presumptive Novel Complex in the Mouse Brain. *Molecular Neurobiology*, 45(2), 287–297.  
<https://doi.org/10.1007/S12035-012-8233-5>

Upadhyay, V., Bandi, S., Panja, S., Saba, L., & Mallela, K. M. G. (2020). Tissue-Specificity of Dystrophin-Actin Interactions: Isoform-Specific Thermodynamic Stability and Actin-Binding

- Function of Tandem Calponin-Homology Domains. *ACS Omega*, 5(5), 2159–2168.  
<https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.9B02911>
- Van Heyningen, V., & Yeyati, P. L. (n.d.). *Mechanisms of non-Mendelian inheritance in genetic disease*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh254>
- Vélez Aguilera, G., & Cisneros Vega, B. (2016). Investigación en Discapacidad. *Investigación En Discapacidad*, 5(1), 27–38. [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)
- Villarreal-Silva, M., Suárez-Sánchez, R., Rodríguez-Muñoz, R., Mornet, D., & Cisneros, B. (2010). Dystrophin Dp71 is critical for stability of the DAPs in the nucleus of PC12 cells. *Neurochemical Research*, 35(3), 366–373. <https://doi.org/10.1007/S11064-009-0064-Z>
- Vulin, A., Wein, N., Strandjord, D. M., Johnson, E. K., Findlay, A. R., Maiti, B., Howard, M. T., Kaminoh, Y. J., Taylor, L. E., Simmons, T. R., Ray, W. C., Montanaro, F., Ervasti, J. M., & Flanigan, K. M. (2014). The ZZ domain of dystrophin in DMD: making sense of missense mutations. *Human Mutation*, 35(2), 257–264. <https://doi.org/10.1002/HUMU.22479>
- Wang, J. Z., Wu, P., Shi, Z. M., Xu, Y. L., & Liu, Z. J. (2017). The AAV-mediated and RNA-guided CRISPR/Cas9 system for gene therapy of DMD and BMD. *Brain & Development*, 39(7), 547–556. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINDEV.2017.03.024>
- Warner, L. E., DelloRusso, C. T., Crawford, R. W., Rybakova, I. N., Patel, J. R., Ervasti, J. M., & Chamberlain, J. S. (2002). Expression of Dp260 in muscle tethers the actin cytoskeleton to the dystrophin-glycoprotein complex and partially prevents dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 11(9), 1095–1105. <https://doi.org/10.1093/HMG/11.9.1095>
- Wensley, B. G., Gärtner, M., Choo, W. X., Batey, S., & Clarke, J. (2009). Different members of a simple three-helix bundle protein family have very different folding rate constants and fold by different mechanisms. *Journal of Molecular Biology*, 390(5), 1074–1085.  
<https://doi.org/10.1016/J.JMB.2009.05.010>
- Westerink, R. H. S., & Ewing, A. G. (2008). The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 192(2), 273–285. <https://doi.org/10.1111/J.1748-1716.2007.01805.X>
- Wood, S., & McGillivray, B. C. (1988). Germinal mosaicism in Duchenne muscular dystrophy. *Human Genetics*, 78(3), 282–284. <https://doi.org/10.1007/BF00291677>

- Xin, H., Poy, F., Zhang, R., Joachimiak, A., Sudol, M., & Eck, M. J. (2000). Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nature Structural Biology*, 7(8), 634–638. <https://doi.org/10.1038/77923>
- Yamamoto, T., Awano, H., Zhang, Z., Sakuma, M., Kitaaki, S., Matsumoto, M., Nagai, M., Sato, I., Imanishi, T., Hayashi, N., Matsuo, M., Iijima, K., & Saegusa, J. (2018). Cardiac Dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy Is Less Frequent in Patients With Mutations in the Dystrophin Dp116 Coding Region Than in Other Regions. *Circulation. Genomic and Precision Medicine*, 11(1), E001782. <https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.117.001782>
- Yan, Y., Winograd, E., Viel, A., Cronin, T., Harrison, S. C., & Branton, D. (1993). Crystal structure of the repetitive segments of spectrin. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5142), 2027–2030. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8266097>
- Zhao, J., Kodippili, K., Yue, Y., Hakim, C. H., Wasala, L., Pan, X., Zhang, K., Yang, N. N., Duan, D., & Lai, Y. (2016). Dystrophin contains multiple independent membrane-binding domains. *Human Molecular Genetics*, 25(17), 3647–3653. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDW210>