



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Estudio comparativo del efecto de las distrofinas Dp71d_{Δ71} y Dp71d_{Δ71-74}
sobre proteínas que participan en la diferenciación de las células PC12 Tet-
On”**

TESIS

Que presenta:

Q.F.B. Nallely Felix Partida

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias

En la especialidad de:

Genética y Biología Molecular

Directora de Tesis

Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda

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 la QFB. Nallely Felix Partida, fue becada 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 Anuies-Sep-Conacyt Ecos Nord 276330/ M16SO1.

INDICE

INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1. Introducción.....	1
1.1 Distrofias musculares.....	1
1.2 Distrofia muscular de Duchenne	2
1.3 DMD y déficit cognitivo	2
1.4 Gen DMD	3
1.5 Distrofina.....	5
2. Antecedentes directos.....	7
2.1 Distrofina Dp71	7
2.2 Función de la Dp71	8
2.3 Expresión y función de Dp71 en las células PC12	9
2.4 Funciones de la Dp71d _{Δ71} y Dp71d _{Δ71-74}	12
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPOTESIS	17
5. OBJETIVOS	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos particulares	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1 Cultivo celular y diferenciación.....	19
6.2 Curva de proliferación.....	19
6.3 Análisis morfológico	19
6.4 Extracción de RNA.....	20
6.5 RT-PCR	20
6.6 PCR	22
6.7 Obtención de extractos proteicos.....	22
6.8 Western blot.....	23

6.9 Inmunofluorescencia indirecta	24
7. RESULTADOS.....	26
7.1 Caracterización de las células PC12 Tet-On/Control, PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74.....	26
7.1.1 Identificación de las proteínas recombinantes Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 mediante RT-PCR.....	26
7.1.2 Proliferación de las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74	28
7.1.3 Análisis morfológico de las clonas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74.....	30
7.1.4 Expresión de las proteínas recombinantes Myc/Dp71d Δ 71 y Myc/Dp71d Δ 71-74.....	32
7.2 Expresión diferencial de las proteínas HspB1, periferina y VGF en células PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71-74	34
7.3 Distribución celular de las proteínas anexina A1, HspB1, periferina, VGF y lámina A/C en células de PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 ..	39
8. DISCUSIÓN	55
9. CONCLUSIONES	66
10. PERSPECTIVAS.....	68
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la estructura de las formas de la distrofina.....	6
Figura 2. Variantes de la Dp71.....	7
Figura 3. Proliferación de células PC12 Tet-On y distribución subcelular de Myc-Dp71d Δ 71 y Myc-Dp71d Δ 71-74.....	13
Figura 4. Diferenciación de las clonas PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74.....	14
Figura 5. Participación de HspB1 en el crecimiento neurítico de células PC12-C11.....	15
Figura 6. Identificación de los fragmentos de DNA que codifican para las proteínas recombinantes Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 por RT-PCR.....	26
Figura 7. Inducción de la expresión de las proteínas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 con doxiciclina.....	28
Figura 8. Curva de proliferación celular.....	29
Figura 9. Análisis morfológico de las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74.....	30
Figura 10. Expresión de las proteínas recombinantes Myc-Dp71d Δ 71 y Myc-Dp71d Δ 71-74.....	33
Figura 11. Expresión diferencial de la proteína HspB1 en células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74.....	35
Figura 12. Expresión diferencial de la proteína periférica en células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74.....	37
Figura 13. Expresión diferencial de la proteína VGF en células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74.....	38
Figura 14. Distribución de las proteínas recombinantes Myc-Dp71d Δ 71, Myc-Dp71d Δ 71-74 y anexina A1 en células PC12 Tet-On no diferenciadas.....	40
Figura 15. Distribución de las proteínas recombinantes Myc-Dp71d Δ 71, Myc-Dp71d Δ 71-74 y anexina A1 en células PC12 Tet-On diferenciadas.....	41
Figura 16. Distribución de las proteínas recombinantes Myc-Dp71d Δ 71, Myc-Dp71d Δ 71-74 y HspB1 en células PC12 Tet-On no diferenciadas.....	43

Figura 17. Distribución de las proteínas recombinantes Myc-Dp71d Δ 71, Myc-Dp71d Δ 71-74 y HspB1 en células PC12 Tet-On diferenciadas.....	44
Figura 18. Distribución de las proteínas recombinantes Myc-Dp71d Δ 71, Myc-Dp71d Δ 71-74 y periferina en células PC12 Tet-On no diferenciadas.	46
Figura 19. Distribución de las proteínas recombinantes Myc-Dp71d Δ 71, Myc-Dp71d Δ 71-74 y periferina en células PC12 Tet-On diferenciadas. Las células fueron tratadas con anticuerpos anti-Myc y anti-Pph.	47
Figura 20. Distribución de las proteínas recombinantes Myc-Dp71d Δ 71, Myc-Dp71d Δ 71-74 y VGF en células PC12 Tet-On no diferenciadas.....	49
Figura 21. Distribución de las proteínas recombinantes Myc-Dp71d Δ 71, Myc-Dp71d Δ 71-74 y VGF en células PC12 Tet-On diferenciadas.	50
Figura 22. Distribución de las proteínas recombinantes Myc-Dp71d Δ 71, Myc-Dp71d Δ 71-74 y lámina A/C en células PC12 Tet-On no diferenciadas.....	52
Figura 23. Distribución de las proteínas recombinantes Myc-Dp71d Δ 71, Myc-Dp71d Δ 71-74 y lámina A/C en células PC12 Tet-On diferenciadas.	53
Figura 24. Procesos biológicos relacionados con las proteínas de expresión diferencial en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74.....	61
Figura 25. Interactoma de las proteínas con expresión diferencial en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74.....	62
Figura 26. Interactoma de las proteínas con expresión disminuida en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74.....	63
Figura 27. Interactoma de las proteínas con expresión aumentada en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74.....	65

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas con relevancia biológica y expresión diferencial aumentada en células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74.	16
Tabla 2. Condiciones empleadas para la RT-PCR	21
Tabla 3. Secuencia de los iniciadores utilizados en la metodología de PCR	22
Tabla 4. Especificaciones de los anticuerpos utilizados en las distintas metodologías	24
Tabla 5. Proliferación celular.	29
Tabla 6. Distribución y colocación de anexina A1, HspB1, periferina, VGF y lamina A/C en células PC12 Tet-On/Control, PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74.	54

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA de cadena complementaria
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensajero
BSA	Albúmina de suero bovino
C-terminal	Carboxi-terminal
DAPC	Complejo de Proteínas asociadas a Distrofina
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DMEM	Dubelco's Modified Eagle Medium
DOX	Doxiciclina
HspB1	Proteína de Choque Térmico B1
kDa	Kilo Dalton
mM	Milimolar
NGF	Factor de Crecimiento Neural
N-Terminal	Amino-Terminal
pb	pares de bases
PBS	amortiguador fosfato salino
PCNA	Antígeno nuclear de células en proliferación
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de iones de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a PCR
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema Nervioso Central
TBS-T	Amortiguador salino Tris-0.05% del Tween 20
TeR	Elemento de respuesta a Tet
Tet	Tetraciclina
TetO	Operador de elemento de respuesta a tetraciclina
µg	Microgramo
µl	Microlitro
VV	Vector Vacío
°C	Grados Centígrados

RESUMEN

La distrofia muscular de Duchenne es una enfermedad que se caracteriza por atrofia muscular, en algunos pacientes se ha descrito déficit cognitivo de grado variable. El déficit cognitivo se ha relacionado con mutaciones en distintas partes del gen que pueden afectar a una de las distrofinas cortas, la Dp71. Esta distrofina se ha relacionado con el funcionamiento del sistema nervioso central, aunque aún no se conoce bien su función. Cuando las células PC12 se diferencian con el factor de crecimiento neural adquieren un fenotipo neural, si estas células sobreexpresan a la isoforma Dp71d Δ 71-74, se vuelven multipolares con neuritas largas y delgadas, mientras que las células que sobreexpresan a la proteína Dp71d Δ 71 se diferencian poco y sus neuritas son bipolares. Basados en un análisis previo del proteoma de las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74, en este trabajo se validó la expresión aumentada de proteínas que se relacionan con el desarrollo de neuritas. Mediante ensayos de western blot se encontró que HspB1 aumenta su expresión al doble en células sin diferenciar y al triple en células diferenciadas comparadas con las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71. Periferina aumenta al doble su expresión tanto en células no diferenciadas como diferenciadas. VGF presentó mayor expresión en las células diferenciadas siendo 30 veces más expresada en PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74. Los análisis de inmunofluorescencia mostraron que, en las células sin diferenciar, anexina A1, HspB1, periferina y VGF se localizan en el citoplasma en ambas líneas celulares, mientras que en las células diferenciadas se encuentran también en las neuritas. La proteína Dp71d Δ 71-74 colocaliza con las proteínas anexina A1 y HspB1 principalmente a lo largo de las neuritas de células diferenciadas, mientras que la colocalización con periferina y VGF ocurre en los extremos de las neuritas. Por otra parte, lámina A/C cambia su distribución en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74: en células no diferenciadas está en la periferia y el núcleo, mientras que, en las diferenciadas además de localizarse en la periferia nuclear, se extiende por el núcleo, el citoplasma y las neuritas. Estos resultados validan el aumento en la expresión de las proteínas analizadas por proteómica y además brindan nueva información sobre la distribución de estas proteínas en células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74.

ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy is a disease characterized by muscle atrophy; cognitive deficits of varying degrees have been reported in some patients. Cognitive deficit has been linked to mutations in different parts of the DMD gene that can affect the expression of the short dystrophins, Dp71. This dystrophin has been linked to the functioning of the central nervous system; however, its function is not yet well understood. PC12 cells, when differentiated with nerve growth factor they acquire a neural phenotype, if these cells overexpress the Dp71d Δ 71-74 isoform, they become multipolar with long neurites, whereas cells that overexpress the protein Dp71d Δ 71 their neurites are bipolar and short. Based on a previous proteome analysis of PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 cells, in this work, the increased expression of proteins that are related to the development of neurites was validated. Through western blot assays it was found that HspB1 increases its expression twice in undifferentiated cells and three times in differentiated cells compared to PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 cells. Peripherin doubles its expression in both undifferentiated and differentiated cells. VGF presented greater expression in differentiated cells being 30 more times expressed in PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74. Immunofluorescence analyses showed that, in undifferentiated cells annexin A1, HspB1, peripherin, and VGF are in the cytoplasm in both cell lines. The protein Dp71d Δ 71-74 colocalizes with the proteins annexin A1 and HspB1 mainly along the neurites of differentiated cells, while colocalization with peripherin and VGF occurs at the ends of neurites. On the other hand, Lamin A/C changes its distribution in PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 cells: in undifferentiated cells it is in the periphery and the nucleus, while, in differentiated cells in addition to being in the nuclear periphery, extends through the nucleus, cytoplasm and neurites. These results validate the increase in the expression of proteins analyzed by proteomics and provides new information on the distribution of these proteins in PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 and PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Distrofias musculares

Las distrofias musculares son trastornos miogénicos hereditarios que se caracterizan por atrofia muscular progresiva y debilidad, siendo variables en su distribución y gravedad. Se han reportado más de 40 formas de distrofias musculares según la manifestación clínica y la etiología genética. Estos padecimientos se pueden dividir en varios tipos, incluidas las formas congénitas, de acuerdo con la distribución de la debilidad muscular predominante. Estos tipos son: la distrofia muscular congénita (NN), la distrofia muscular de Duchenne y Becker (DMD/BMD), distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia muscular distal, facioescapulohumeral, de cinturas, entre otras. La DMD es la forma de distrofia más grave, mientras que en la BMD los pacientes presentan manifestaciones clínicas más leves. (Emery, 2002).

Estos trastornos multisistémicos se caracterizan por una alta variabilidad de síntomas musculares y extra-musculares, lo que a menudo provoca un retraso en el diagnóstico. Diversos síntomas se superponen, sin embargo, algunas diferencias permiten su distinción clínica, por ejemplo, el corazón puede verse gravemente afectado en varias distrofias, a veces, en ausencia de signos clínicos (Wenninger et al., 2018).

Mutaciones en diversos genes causan distrofia muscular, incluidos los genes que codifican para proteínas que mantienen la estabilidad de la membrana, participan en la reparación de la membrana o son componentes de la matriz extracelular o la envoltura nuclear (Tidball et al., 2018). Esta heterogeneidad de proteínas defectuosas que podrían estar involucradas en los padecimientos, vuelve muy diversa la patología molecular (Davies & Nowak, 2006). Un ejemplo de esto son las distrofias musculares relacionadas con la pérdida completa o reducción de los componentes del complejo sarcolema distrofina-glicoproteína (DGC) que funciona uniendo la matriz extracelular con el citoesqueleto (Le et al., 2018).

1.2 Distrofia muscular de Duchenne

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es un trastorno neuromuscular hereditario recesivo ligado al cromosoma X que afecta a uno de cada 3300 niños de sexo masculino nacidos vivos (Deconinck & Dan, 2007). La DMD es la distrofia muscular infantil más común que provoca discapacidad grave y que conduce a una muerte prematura al final de la adolescencia, usualmente por fallas respiratorias. Los síntomas aparecen en la niñez, y empiezan como dolor y rigidez muscular, problemas para correr y saltar, problemas de aprendizaje que se derivan del déficit cognitivo. Este déficit cognitivo puede ir desde grados leves hasta graves (Blake et al., 2002; Manzur et al., 2008).

Esta enfermedad es causada por mutaciones en el gen DMD que codifica una proteína estructural asociada a la membrana, llamada distrofina. La distrofina, el producto proteico del gen DMD, se asocia con el citoesqueleto de actina y lo vincula con un complejo oligomérico de glicoproteínas del sarcolema. Este complejo proporciona un enlace con la laminina, un componente de la matriz extracelular, formando un gran complejo de proteínas estructurales intracelulares y extracelulares (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992).

En pacientes con DMD, la ausencia de distrofina conduce a la pérdida de todas las proteínas asociadas a la distrofina, provocando la interrupción del enlace entre el citoesqueleto subsarcolémico y la matriz extracelular (Matsumura & Campbell, 1994) produciendo fibras musculares mecánicamente más débiles. Esta ausencia se ha relacionado también con el aumento en la salida de proteínas citosólicas en el musculo distrófico, como la creatina cinasa muscular (CK), lo que sugiere que la ausencia de la distrofina genera membranas más débiles provocando entradas/salidas no reguladas de moléculas, alterando gravemente la homeostasis celular y provocando la muerte (Petrof et al., 1993).

1.3 DMD y déficit cognitivo

Los pacientes con DMD presentan síntomas neurocognitivos y problemas de aprendizaje, específicamente en la lectura, procesos de atención y habilidades del

lenguaje. Además, la prevalencia de epilepsia es mayor relacionándose con la ausencia de esta proteína y un mayor nivel de excitabilidad del sistema nervioso central (SNC) (Hendriksen et al., 2015). Estudios sobre el comportamiento de niños con DMD han demostrado que presentan un deterioro cognitivo y un coeficiente intelectual (CI) bajo (promedio de 85). Esto se ha relacionado con desordenes en el SNC, especialmente en una reducción de las neuronas que normalmente expresan distrofina y anomalías en las dendritas. A nivel bioquímico hay un aumento en los niveles de compuestos formados por colina, lo cual es indicativo de patología en el SNC. Además, evidencias preliminares revelan que probablemente la función sináptica se afecte negativamente en ausencia de la distrofina. Todo esto pone de manifiesto un papel importante de la distrofina sobre el buen funcionamiento del SNC (Anderson et al., 2002).

El CI de pacientes con DMD y BMD, son diferentes, los hombres con DMD en promedio tienen un CI más bajo que los hombres con BMD, incluso también más bajo que la población en general (Weerkamp et al., 2022). En el caso de los pacientes pediátricos con DMD estos también presentan puntuaciones bajas en evaluaciones del CI, que podría considerarse como discapacidad intelectual, mientras que los pacientes con BMD presentan CI normales (D'alessandro et al., 2021).

Al analizar el gen de la distrofina en busca de mutaciones (deleciones y duplicaciones) se ha encontrado diferencia significativa en el coeficiente intelectual verbal en pacientes con deleciones en los extremos 5' y 3', mientras que ningún paciente con deleciones en el extremo 5' presentó déficit cognitivo, asociando las deleciones distales con este fenotipo (Bushby et al., 1995; Daoud et al., 2008).

1.4 Gen DMD

El gen DMD es el gen más largo descrito en humanos y está ubicado en el brazo corto del cromosoma X en la banda Xp21. Este gen representa el 1.5% del cromosoma X y el 99% de su secuencia está conformada por intrones. La secuencia del gen comprende aproximadamente 2.5 Mb y codifica para 79 exones. La

expresión de este gen está finamente regulada por 7 promotores que expresan una familia de distrofinas. El gen presenta tres promotores independientes los cuales llevan el nombre del sitio de mayor expresión de cada distrofina de longitud completa (B, M y P); cerebro, músculo esquelético y células de Purkinje respectivamente, una proteína de citoesqueleto de 427 kDa formada por 3,685 aminoácidos (Dp427). El mRNA de tamaño completo para la Dp427 es de 14 Kb y se expresa principalmente en el músculo esquelético y cardiaco (Blake et al., 2002; Górecki et al., 1992; Muntoni et al., 2003; Nudel et al., 1989; Tadayoni et al., 2012). Los cuatro promotores internos codifican para las distrofinas cortas Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 y Dp40, estas proteínas son expresadas en distintos tejidos como retina, cerebro y nervios periféricos (Doorenweerd, 2020).

Se han descrito muchas mutaciones en este gen, la mayoría de las cuales afectan la expresión de la forma muscular. Sin embargo, hay varias formas de distrofina específicas de tejido, algunas expresadas exclusiva o predominantemente en el cerebro o la retina (Muntoni et al., 2003).

El 60% de los pacientes con DMD presentan deleciones en el gen, produciendo una proteína trunca e inestable (Koenig et al., 1989). Estas deleciones generalmente de más de un exón ocurren principalmente en el centro del gen (80%) y en menor frecuencia en el extremo 5' (20%) aunque las deleciones de este último sitio suelen ser más grandes. Por el contrario, las duplicaciones parciales del gen se relacionan solo con el 5-10% de los pacientes y estas se encuentran principalmente en el extremo 5' (80%) y solo el 20% en la región central (Prior & Bridgeman, 2005). Las mutaciones pequeñas o de menos de un exón son menos frecuentes pero también se presentan en forma de deleción o duplicaciones en el 25% y 9% de los pacientes respectivamente (Bladen et al., 2015).

Las mutaciones puntuales también se han descrito en pacientes con DMD que no presentan grandes deleciones o duplicaciones, estas suelen presentarse con poca frecuencia dando origen a proteínas truncas en el sitio C-terminal por mutaciones sin sentido o por cambios en el marco de lectura, estas suelen ser exclusivas de pocos pacientes (Prior & Bridgeman, 2005).

1.5 Distrofina

La distrofina de tamaño completo es una proteína de citoesqueleto de 427 kDa perteneciente a la familia de las β -espectrinas/ α -actininas. Esta familia se caracteriza por un dominio NH₂-terminal de unión a actina seguido de un número variable de repetidos conocidos del tipo espectrina. La distrofina cuenta con varios dominios que se clasifican con base a la homología de su secuencia, un dominio de unión a actina en el NH₂ terminal, un dominio central, un dominio rico en cisteína y un dominio COOH-terminal. El dominio central está compuesto por 24 repetidos similares a la hélice de tripletes repetidos de espectrina, esta región le proporciona flexibilidad a la molécula (Koenig & Kunkel, 1990; Rybakova et al., 1996). Seguido de estos 24 repetidos se encuentra el dominio WW que une sustratos ricos en prolina y media la interacción entre β -dístroglicano y la distrofina. El dominio rico en cisteína contiene dos motivos de EF-hand que pueden unir Ca²⁺ intracelular (Koenig et al., 1988). El dominio ZZ también forma parte del dominio rico en cisteína, es similar a los dedos de zinc y actúa como sitio de unión de la calmodulina. Finalmente, el COOH-terminal se organiza con una estructura de α -hélice formado por heptámeros repetidos conservados similares a cierres de leucina, esta región sirve como sitio de unión para distrobrevinas y otras proteínas asociadas a la distrofina (Blake et al., 2002).

Las distrofinas se asocian con la membrana plasmática del tejido cardíaco y el músculo esquelético, siendo su función principal interactuar en el sarcolema con proteínas integrales de membrana como sarcoglicanos, dístroglucanos, sintrofina y distrobrevinas. Estos complejos forman un enlace con el sarcolema y conectan la lámina basal de la matriz extracelular con el citoesqueleto para proteger a las fibras musculares de largas contracciones producidas por daño (Muntoni et al., 2003).

Las otras formas C-terminal de la distrofina son codificadas a partir de los cuatro promotores internos del gen DMD. Estas formas carecen del sitio terminal de unión a actina, pero mantienen el dominio rico en cisteína y el dominio COOH-terminal que sirven para unir proteínas como dístroglucanos, distrobrevinas y sintrofinas. Cada uno de estos promotores expresa proteínas que tienen un exón

único en el extremo NH₂ terminal, excepto la Dp140, y generan productos a partir de los exones 30, 45, 56 y 63 para formar proteínas de 260 kDa, 140 kDa, 116 kDa, 71 kDa y 40 kDa que reciben su nombre de acuerdo con su peso molecular Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 y Dp40 respectivamente. Cada una de estas se expresa de manera diferencial en los tejidos: la Dp260 se expresa principalmente en retina, la Dp140 se expresa en cerebro, retina y riñones, la Dp116 únicamente se expresa en los nervios periféricos adultos mientras que la Dp71 y la Dp40, que tienen una expresión ubicua, se encuentran principalmente en tejidos no musculares como el cerebro, retina, riñones, hígado y pulmones, y en niveles muy bajos en músculo esquelético (Bar et al., 1990; Muntoni et al., 2003).

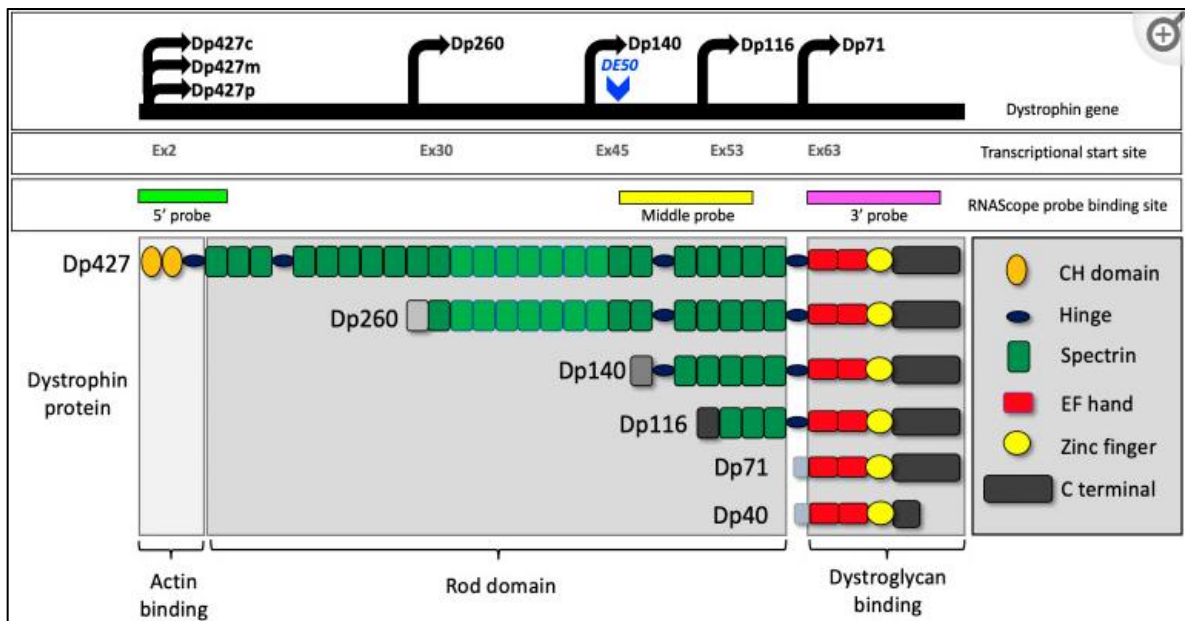


Figura 1. Representación de la estructura de las formas de la distrofina. En la parte superior se indican los promotores que corresponden a cada forma, así como el exón de inicio de la transcripción. Se muestran también los principales dominios y las proteínas con las que interaccionan (Crawford et al., 2022).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

2.1 Distrofina Dp71

La distrofina Dp71 es uno de los productos más pequeños generados por el gen DMD y se caracteriza por ser la forma que se expresa en niveles más altos en el SNC, su expresión depende de los estadios del desarrollo. Esta distrofina se expresa en diversas líneas celulares, y presenta una ubicación celular diferencial (Hugnot et al., 1992).

El promotor que da origen a la Dp71 de longitud completa se encuentra en el intrón 62 y codifica para el exón 1 de la Dp71 que se fusiona con los exones 63 al 79 resultando en un transcrito de 4.6 kb que se traduce en una proteína de 617 aminoácidos.

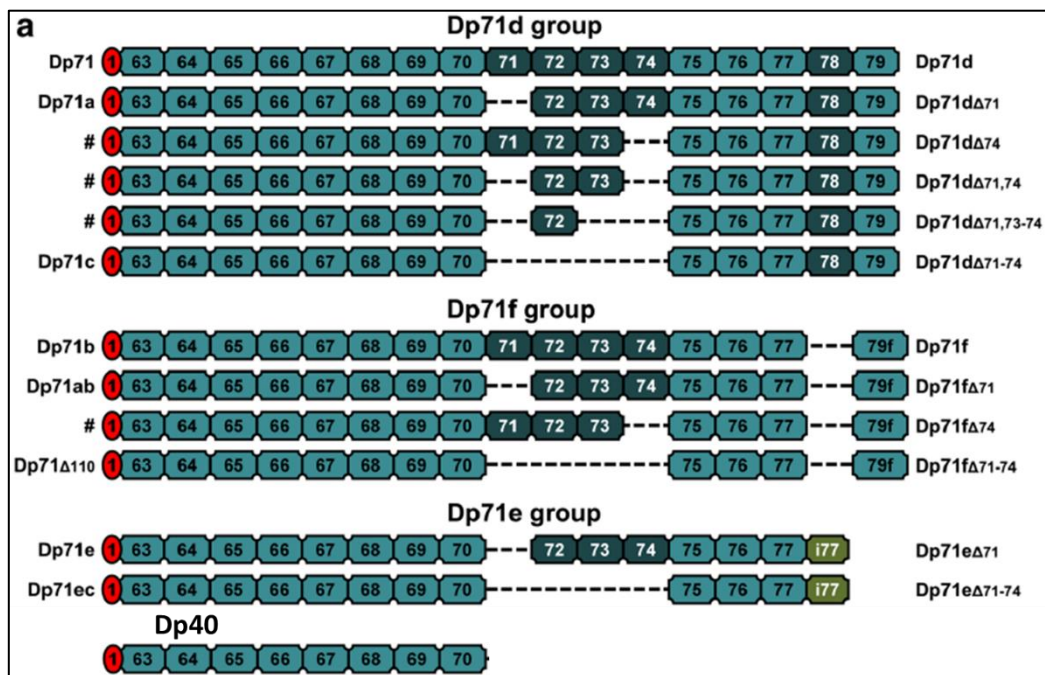


Figura 2. Variantes de la Dp71. Clasificación actual de las formas de Dp71 derivadas del procesamiento del exón 78, así como las variantes resultantes en cada grupo por el procesamiento de los exones del 71 al 74 (Aragón 2018).

La expresión de la Dp71 se regula postranscripcionalmente, el mRNA está sujeto a procesamientos alternativos y genera distintas variantes, en los que participan los exones 71, 71-74, 78, 79 y el intrón 77. El procesamiento del exón 78 o el intrón 77 generan un cambio en el marco de lectura produciendo 3 grupos de Dp71 (Dp71d, Dp71f y Dp71e), cada uno con un COOH-terminal distinto. Las variantes del grupo Dp71d tienen el exón 78, mientras que la Dp71f no contiene el exón 78 y presentan un exón 79 largo y el grupo de las Dp71e que contienen los últimos 34 pb del intrón 77.

Cada grupo está formado por diversas distrofinas; el grupo de las Dp71d contiene las isoformas Dp71d de longitud completa, la Dp71d $_{\Delta 71}$ carece el exón 71, la Dp71d $_{\Delta 74}$ no contiene el exón 74, la Dp71d $_{\Delta 71,74}$ sin el exón 71 y el exón 74, la Dp71d $_{\Delta 71,73-74}$ carece del exón 71 y los exones 73 y 74 y la Dp71d $_{\Delta 71-74}$ no presenta los exones del 71 al 74. Dentro del grupo de las Dp71f está la Dp71f sin el exón 78, la Dp71f $_{\Delta 71}$ carece del exón 71 y 78, la Dp71f $_{\Delta 74}$ no contiene los exones 74 y 78 y la Dp71f $_{\Delta 71-74}$ sin los exones del 71 al 74 además del 78. Finalmente, el grupo de las Dp71e está integrado por la Dp71e $_{\Delta 71}$ sin el exón 71 y la Dp71e $_{\Delta 71-74}$ que carece de los exones del 71 al 74 (Aragón et al., 2018).

2.2 Función de la Dp71

La deficiencia de la Dp71 conduce a dos fenotipos no musculares: déficit cognitivo y disfunción de la retina (Tadayoni et al., 2012). El estudio de esta proteína ha permitido identificar su participación en la formación de sinapsis y plasticidad cerebral, así como su relación con la gravedad del déficit cognitivo que presentan los pacientes (Daoud et al., 2009). Específicamente la pérdida de la función de todos los productos de distrofina se asocia con el déficit cognitivo, pero, el déficit de Dp71 contribuye directamente con la gravedad de estos síntomas, haciendo clara su participación en los mecanismos moleculares relacionados con el deterioro cognitivo (Daoud et al., 2009).

Utilizando como modelo las células gliales de Müller que participan en el mantenimiento de la integridad de la retina se ha revelado el papel de la Dp71 en la

regulación de los canales de agua acuaporina-4 y los canales de potasio Kir4.1, siendo crucial para la homeostasis y el mantenimiento de la barrera hemato-retiniana (Bringmann & Reichenbach, 2001; Fort et al., 2008; Kofuji et al., 2000). En neuronas del hipocampo Dp71 es importante para el agrupamiento y la maduración de los receptores glutamatérgicos (Daoud et al., 2009).

Se ha descrito también que la Dp71 es necesaria para la organización y estabilización de los componentes del complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC), la deficiencia de esta proteína se relaciona con alteraciones en la expresión del DAPC y su distribución en el cerebro, riñones y retina (Fuentes-Mera et al., 2006). También se comprobó que la Dp71 es un componente del huso mitótico y la citocinesis ya que modula la función de la lámina B1 y β -dístroglicano al interactuar con ellos (Villarreal-Silva et al., 2011).

La pérdida de la Dp71 se ha relacionado con la alteración de la organización presináptica de la sinapsis glutamatérgicas centrales que se relacionan con la función sináptica y la plasticidad lo que podría contribuir con el déficit cognitivo de la DMD (Miranda et al., 2011).

Varias de las isoformas de Dp71 se expresan en el SNC, (Aragón et al., 2018; Austin et al., 1995) lo que sugiere que tienen distintas funciones. Se ha descrito que las Dp71 se relacionan con el ciclo celular, la diferenciación de células neurales, la diferenciación de tejido adiposo, la arquitectura del núcleo y la membrana, funciones sinápticas, la homeostasis de cerebro y retina (Tadayoni et al., 2012). La isoforma Dp71 $f_{\Delta 71}$ se ha asociado a la transducción de señales o a la señalización durante la diferenciación neuronal, ya que en células PC12 diferenciadas cambia la composición del complejo al que se une la Dp71 (Romo-Yáñez et al., 2007).

2.3 Expresión y función de Dp71 en las células PC12

La línea celular PC12 deriva de un feocromocitoma de médula adrenal de rata, después de ser tratadas con NGF desarrollan una morfología similar a la de las neuronas; extensión de neuritas, formación de vesículas y la acumulación de

neurotransmisores como dopamina y norepinefrina (Greene & Tischler, 1976). Estas células responden reversiblemente al NGF adquiriendo un fenotipo neuronal, características que hacen de esta línea un modelo útil para el estudio de procesos neurobiológicos, en particular para el estudio de las vías de señalización que conduce a la diferenciación neuronal (Greene & Tischler, 1976).

El NGF presenta gran afinidad por el receptor tropomiosina cinasa A (TrkA) de la familia de receptores tirosina cinasa, desencadenando la activación de la vía MEK/MAPK a través de Ras, en la cual también se ven involucradas las proteínas Raf-1 y MEK. Cuando el NGF se une a TrkA éste se dimeriza, propagando la señal por medio de moléculas adaptadoras que activan a Ras, ésta recluta y lleva a la membrana a Raf-1 activándola, que a su vez fosforila a MEK, la cual fosforila a la cinasa regulada por señal extracelular (ERK), promoviendo su translocación al núcleo y también por fosforilación, activa a la proteína de unión a CRE (CREB) que es el factor transcripcional principal responsable de la inducción y el mantenimiento de la diferenciación neuronal mediada por NGF (Leon et al., 2014; Vaudry et al., 2002).

Cisneros y colaboradores analizaron la expresión de la Dp71 durante la diferenciación de las células PC12 encontrando que los niveles del mRNA de Dp71 aumentaban en paralelo al tratamiento con NGF, demostrando que las células PC12 son un buen modelo para el estudio de la expresión y función de la Dp71 en células neuronales (Cisneros et al., 1996).

Para determinar la función de la Dp71 en células neurales se generaron células PC12 que expresaran de manera transitoria o estable a las proteínas Dp71. Se observó que la Dp71 es esencial para el desarrollo de neuritas y la deficiencia de Dp71 se correlaciona con una expresión alterada del DAPC, teniendo evidencia directa de que la Dp71 tiene funciones neuronales (Acosta et al., 2004; Aragón et al., 2011).

En la diferenciación de las células PC12 por NGF además de que ocurre la regulación diferencial de la expresión de las isoformas de Dp71, también se presentan cambios en la distribución subcelular de las isoformas. La isoforma

Dp71d se localiza en membrana y citoplasma, durante la diferenciación inducida por NGF se concentra en el núcleo colocalizando con β -dístroglicano y muy poco en el citoplasma y las neuritas, además se acumula en contactos célula-célula. La Dp71f se relocaliza desde el citoplasma hacia las neuritas, colocaliza con β -dístroglicano y no se acumula en contactos célula-célula (Marquez et al., 2003). Estos reportes permitieron proponer que la Dp71d y Dp71f podrían tener distintas funciones en las células PC12.

Se han utilizado también las células PC12 en un sistema Tet-On para determinar la expresión de las isoformas de Dp71, así como su distribución subcelular encontrando que en células no diferenciadas y diferenciadas con NGF las proteínas Dp71d Δ 71, Dp71f Δ 71 y Dp71e Δ 71 fueron localizadas en la periferia y el citoplasma y colocalizadas con β -dístroglicanos y α 1-sintrofina, mientras que, Dp71d Δ 71-74 y Dp71e Δ 71-74 se localizaron principalmente en la periferia y no mostraron colocalización con β -dístroglicano y α 1-sintrofina (Aragón et al., 2016).

Las células PC12 también han servido para elucidar el papel de distintas isoformas de la distrofina en la formación de neuritas, tal como la Dp40 y la Dp71e Δ 71. En estudios independientes se observó como la sobreexpresión de estas proteínas aumenta el número de células diferenciadas y el tamaño de las neuritas así como también aumenta la expresión diferencial de proteínas relacionadas con la diferenciación neuronal especialmente con la arquitectura del citoesqueleto (García-Cruz et al., 2019).

En otro trabajo se encontró que la Dp71d en células PC12 forma parte del componente dinámico de la matriz nuclear y que posiblemente participe en el modelado de este durante la diferenciación celular (Rodríguez-Muñoz et al., 2008).

Se determinó también la asociación de la Dp71f con algunos componentes del complejo de adhesión β 1-integrina como con talina, α -actinina y vinculina en neuritas de células PC12 estimuladas con NGF, siendo muy importante la participación de Dp71f para el funcionamiento de este complejo (Cerna et al., 2009).

2.4 Funciones de la Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74

Las proteínas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 pertenecen al grupo de Dp71d, este grupo de isoformas se caracteriza por contener el exón 78, y en particular las isoformas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 carecen de los exones 71, y desde el 71 hasta el 74, respectivamente. Ambas proteínas se expresan mayormente en cerebro comparado con retina (Aragón et al., 2016). En etapas postnatales de ratón específicamente los primeros 21 días después del nacimiento, ambas formas son expresadas en hipocampo, cerebelo y corteza, sin embargo, la presencia de Dp71d Δ 71-74 es mayor comparada con Dp71d Δ 71 (Gonzalez-Reyes, en preparación).

De acuerdo con los resultados de León Moreno (2016) en un sistema de células PC12 Tet-On ([figura 3-A](#)) que sobreexpresan la proteína Dp71d Δ 71 o bien la proteína Dp71d Δ 71-74, se observó que la línea celular PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 prolifera más rápido que la PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 ([figura 3-B](#)).

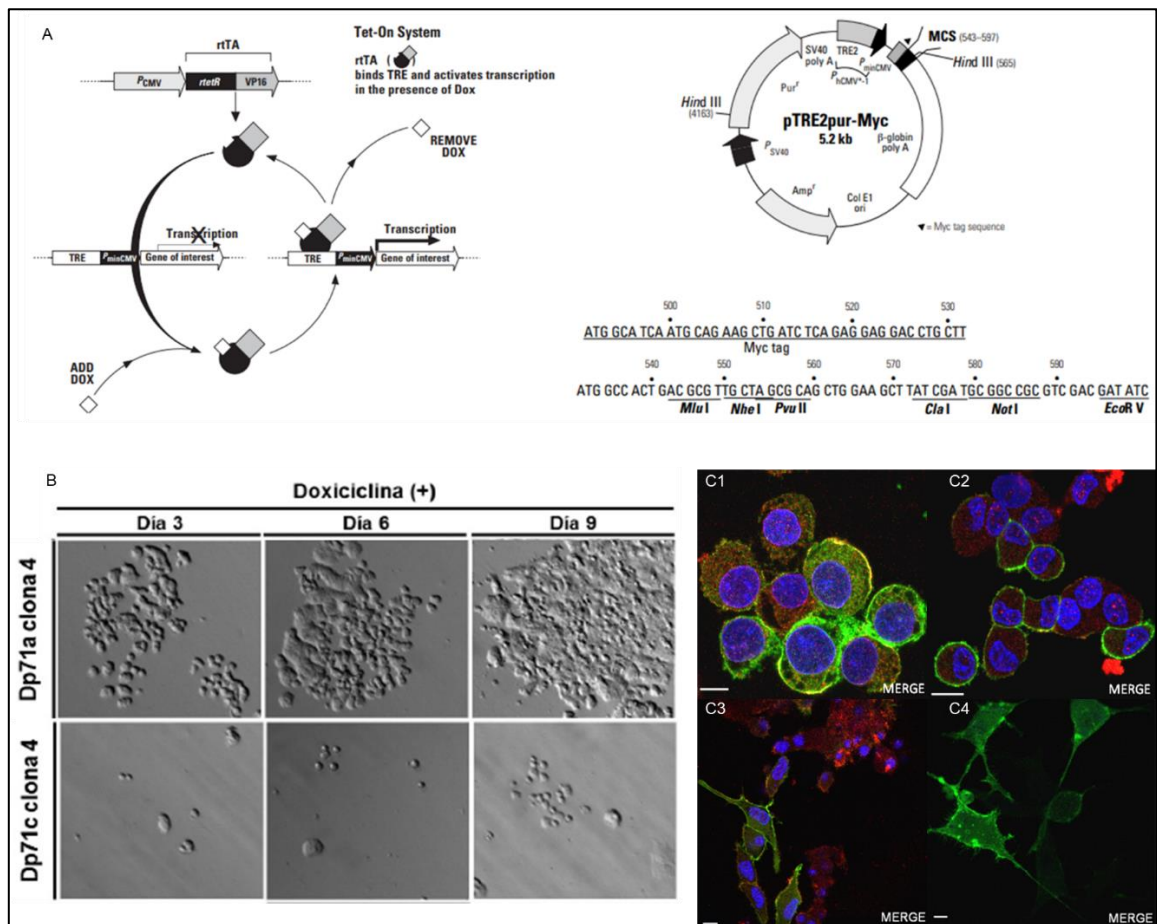


Figura 3. Proliferación de células PC12 Tet-On y distribución subcelular de Myc-Dp71d_{Δ71} y Myc-Dp71d_{Δ71-74}. A) Sistema de las células PC12 Tet-On. Imagen de la izquierda: Sistema de regulación de genes Tet-On. Imagen de la derecha: Representación del vector pTRE2pur-Myc el cual expresa genes de interés unidos a una bandera de Myc. B) Proliferación de las líneas celulares. Parte superior: PC12 Tet-On/Dp71d_{Δ71} (Dp71a=). Parte inferior: PC12 Tet-On/Dp71d_{Δ71-74} (Dp71c). C) Distribución de las proteínas Myc-Dp71d_{Δ71} y Myc-Dp71d_{Δ71-74}. C1-C2) células PC12 Tet-On/Dp71d_{Δ71} y PC12 Tet-On/Dp71d_{Δ71-74} sin diferenciar respectivamente. C3-C4) células PC12 Tet-On/Dp71d_{Δ71} y PC12 Tet-On/Dp71d_{Δ71-74} diferenciadas durante 9 días con NGF, respectivamente. Se muestra la sobreposición de señales (MERGE), las proteínas recombinantes en color verde, DAPI (azul) y β-distroglicano (rojo), (León Moreno 2016).

Al realizar un análisis de inmunofluorescencia indirecta, en células sin diferenciar, se observa que Myc-Dp71d_{Δ71} se localiza en la membrana celular y el citoplasma ([figura 3-C1](#)), mientras que Myc-Dp71d_{Δ71-74} se encuentra principalmente en la membrana celular y muy poca cantidad en el citoplasma ([figura 3-C2](#)). En células diferenciadas durante 9 días con NGF tanto Myc-Dp71d_{Δ71} como Myc-Dp71d_{Δ71-74} se encuentran en la membrana celular, el citoplasma y a lo largo de las neuritas ([figura 3-C3 y 4](#)).

En otro estudio Merino-Jiménez (2020) evaluó la participación de Myc-Dp71d_{Δ71} y Myc-Dp71d_{Δ71-74} en el proceso de diferenciación neuronal en células PC12 Tet-On diferenciadas durante 9 días con NGF ([figura 4](#)). Observó que las células PC12 Tet-On/Dp71d_{Δ71} permanecen en cúmulos, pocas células logran desarrollar neuritas siendo estas cortas y en su mayoría bipolares, en cambio las PC12 Tet-On/Dp71d_{Δ71-74} se mostraron multipolares, con neuritas largas y delgadas que logran establecer contacto con otras neuritas de diferentes células, además, el número de células diferenciadas es mayor cuando esta isoforma se sobreexpresa por lo que concluyó que la Dp71d_{Δ71-74} estimula la diferenciación celular, mientras que la Dp71d_{Δ71} se relaciona mayormente con procesos de proliferación.

Se ha descrito también el complejo proteico al cual se encuentra asociada Dp71d_{Δ71} en células PC12, el cual incluye proteínas como β-tubulina, sintasa de S-adenosilmetionina, ciclina L2, miosina 10 entre otras, estas tienen funciones

relacionadas con el ciclo celular y podrían explicar la proliferación abundante de las células PC12 Tet-On que sobreexpresan a Dp71d Δ 71 (Azotla-Vilchis, 2020).

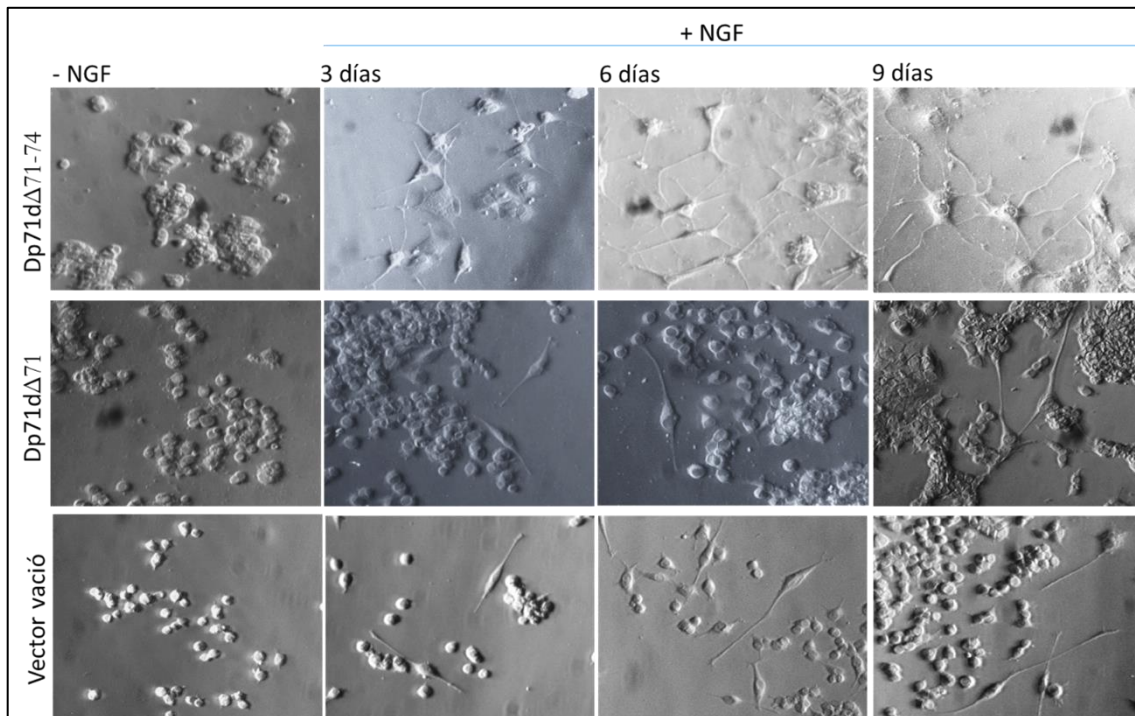


Figura 4. Diferenciación de las clonas PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74. En células tratadas con NGF durante 9 días se puede ver como las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 crecen en cúmulos, pocas células se diferencian y son bipolares, mientras que las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 la mayoría se diferencia de forma multipolar, con neuritas largas y delgadas (Merino-Jiménez, en preparación).

Merino-Jiménez en el 2016 utilizando un modelo de células PC12 que sobreexpresan la Dp71 Δ 78-79 y que se caracterizan por desarrollar neuritas muy largas y delgadas, describió un análisis proteómico en el cual la proteína de choque térmico (HspB1) fue la proteína más sobreexpresada. HspB1 aumenta de forma gradual durante la diferenciación de las células y además su localización subcelular es a lo largo de las neuritas. El bloqueo de esta proteína con un anticuerpo provoca que las células dejen de desarrollar neuritas, incluso los niveles de HspB1 fosforilada también disminuyen por lo que propuso que esta forma de la proteína

interactúa con los filamentos de actina, importantes en el re-arreglo del citoesqueleto y el desarrollo de neuritas (figura 5).

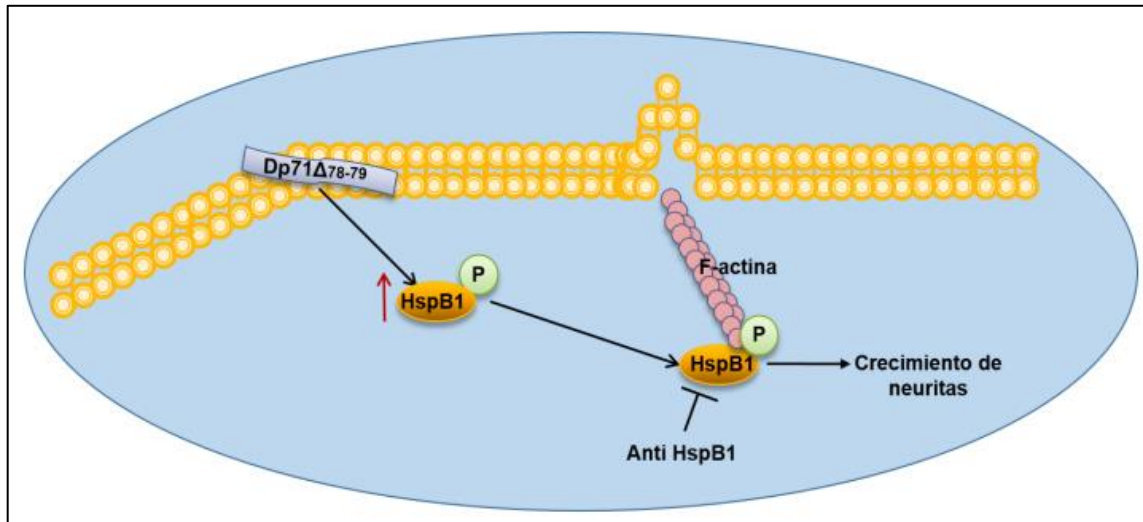


Figura 5. Participación de HspB1 en el crecimiento neurítico de células PC12-C11. La sobreexpresión de Dp71 Δ 78-79 aumenta los niveles de HspB1 fosforilada que interactúa con F-actina durante el re-arreglo del citoesqueleto lo que lleva al desarrollo de neuritas (Merino-Jiménez 2016).

Para entender un poco más la participación de Dp71d Δ 71-74 en la formación de neuritas, también evaluó el efecto de su sobreexpresión mediante un análisis proteómico de las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 diferenciadas en comparación con PC12 Tet-On/Control transfectadas con el vector vacío. Demostró que algunas proteínas se expresan de manera diferencial cuando se sobreexpresa la isoforma Dp71d Δ 71-74. Identificó un total de 533 proteínas, de las cuales 106 mostraron regulación positiva y 77 regulación negativa mientras que, 340 no presentaron cambios. Entre las proteínas con regulación positiva más relevantes por su implicación biológica están HspB1 que se asocia con la neuritogénesis, la proteína neurosecretora VGF que se asocia con el tráfico vesicular, anexina A1 que se asocia con el re-arreglo del citoesqueleto y periferina que es una proteína de filamento intermedio, todas estas proteínas tienen implicaciones en la diferenciación neuronal, especialmente con el desarrollo de neuritas (Merino-Jiménez, en preparación).

Tabla 1. Proteínas con relevancia biológica y expresión diferencial aumentada en células PC12 Tet-On/Dp71d Δ_{71-74} . Se resaltan en color negro las proteínas de interés para este trabajo.

No. Acceso	Anova (p)	Proteína	Descripción	Fold
P61023	1.83E-11	Calcineurin B homologous protein 1	Proteína de unión a calcio involucrada en tráfico vesicular. Requerida para la fusión de vesículas.	10.7
P07150	5.07E-07	Annexin A1	Desempeña un importante papel en la respuesta inmune innata. Promueve re-arreglo del citoesqueleto de actina, polarización y migración celular.	6.53
F1LP80	5.14E-09	Neurosecretory protein VGF	Desempeña muchos roles en a neurogénesis y la neuroplasticidad asociadas con el aprendizaje, la memoria, la depresión y el dolor crónico.	5.19
P42930	1.30E-06	Heat shock 27kDa protein I	Actividad de chaperona, actividad protectora en contra de varios tipos de estrés, controla la arquitectura del citoesqueleto, regula diferentes procesos biológicos incluyendo la fosforilación y el transporte axonal de neurofilamentos.	4.41
P55260	4.68E-02	Annexin A4	Proteína de unión a calcio/fosfolípidos que promueve la fusión de la membrana y esta implicada en la exocitosis.	3.03
A0A0G2JZR4	3.58E-04	Ras-related protein Rab-11B	Reguladoras del tráfico de membrana intracelular.	2.97
P07943	4.38E-09	Aldose reductase	Cataliza la reducción dependiente de NADPH de una gran variedad de aldehídos y carbonilos.	2.64
P21807	6.87E-06	Peripherin	Proteína de filamento intermedio neuronal clase III	2.27
P14668	3.05E-05	Annexin A5	Sitio de unión a Calcio y fosfolípidos, participación en la regulación de los niveles de calcio en el interior celular.	2.22
P62494	1.67E-06	Rab GTPase-binding effector protein 1	Las pequeñas GTPasa Rab son reguladores clave del tráfico de membrana intracelular.	2.22
Q5M7W5	1.95E-02	Microtubule-associated protein	Proteína asociada a microtúbulos no neuronales. Promueve el ensamble de microtúbulos.	2.18
Q9JHZ4	4.90E-02	GRIP1-associated protein 1	Involucrada en la localización del reciclaje de endosomas en espinas dendríticas desempeñando un papel en el mantenimiento de la morfología de la columna dendrítica.	2.15
Q9QXQ0	2.47E-07	Alpha-actinin-4	Proteína de reticulación de actina F que se cree que ancla la actina a una variedad de estructuras intracelulares. Esta es una proteína agrupadora. Probablemente involucrado en el tráfico vesicular a través de su asociación con el complejo CART.	2.07
P85108	3.47E-06	Tubulin beta-2A chain	Principal constituyente de microtúbulos	1.65

3. JUSTIFICACIÓN

La alteración de la Dp71 se ha asociado con el déficit cognitivo que presentan los pacientes con distrofia muscular de Duchenne, sin embargo, aún no se conoce la participación de este grupo de proteínas en el correcto funcionamiento del sistema nervioso central. Estudios previos muestran que la Dp71 tiene una variedad de isoformas que se expresan en diferentes niveles y se localizan de manera diferencial en las células, algunas de ellas están involucradas en la diferenciación neuronal, aunque los procesos moleculares involucrados se desconocen. El conjunto de resultados obtenidos sugiere que cada una de las isoformas podría tener una función particular.

Se sabe que Dp71d Δ 71-74 estimula sustancialmente el proceso de formación de neuritas en las células PC12 en presencia de NGF y que la Dp71d Δ 71 participa en procesos de proliferación. Por lo anterior, identificar proteínas cuya expresión se modifica por la sobreexpresión de estas isoformas, durante el proceso de diferenciación neuronal, contribuirá a elucidar su participación en el crecimiento de las neuritas.

4. HIPOTESIS

La sobreexpresión de la proteína Dp71d Δ 71-74 y no la sobreexpresión de Dp71d Δ 71 en células PC12 Tet-On, aumenta el nivel de expresión y modifica la distribución de las proteínas anexina A1, HspB1, periferina y VGF.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Comparar el efecto de la sobreexpresión de las distrofinas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 sobre la distribución y niveles de expresión de proteínas que participan en la diferenciación de las células PC12 Tet-On.

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar la expresión y distribución de Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 en las células PC12 Tet-On mediante ensayos de RT-PCR, western blot e inmunofluorescencia.
2. Evaluar el cambio en el nivel de expresión de las proteínas HspB1, perifarina y VGF mediante western blot en células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 no diferenciadas y diferenciadas con NGF.
3. Analizar la colocalización de Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 con las proteínas anexina A1, HspB1, perifarina y VGF, en células no diferenciadas y diferenciadas con NGF.
4. Determinar la distribución subcelular de lámina A/C en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 no diferenciadas y diferenciadas por NGF.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo celular y diferenciación

Las clonas PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-4 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74-4 fueron transfectadas de manera estable con el plásmido pTRE2pur-Myc/Dp71d Δ 71 o pTRE2pur-Myc/Dp71d Δ 71-74. Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero de caballo al 10%, suero fetal bovino libre de tetraciclina al 5%, penicilina 100 u/ml, 1 mg/ml de estreptomycin, 0.25 u/ml de micostatina, 100 μ g/ml de geneticina y puromicina a 37°C en 5% de CO₂. La expresión de las proteínas recombinantes Myc-Dp71d Δ 71 y Myc-Dp71d Δ 71-74 fueron inducidas utilizando doxiciclina 500 ng/ml por 24 horas previas a iniciar cualquier experimento. Para la diferenciación, las células se sembraron en placas de cultivo recubiertas de colágena o cubreobjetos recubiertos previamente con poli-L-lisina y se adicionaron 50 ng/ml de NGF (Invitrogen) al medio de cultivo durante un periodo de 9 días con cambio de medio cada 3 días. Como control se utilizaron células PC12 Tet-On transfectadas con el vector vacío pTRE2pur-Myc (PC12 Tet-On/Control).

6.2 Curva de proliferación

Para este análisis se sembraron 150,000 células de cada clona PC12 Tet-On/Control, PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-4 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74-4 en placas p60. Se realizó el conteo de células a los 3, 6 y 9 días de proliferación. Se desprendieron las células vigorosamente con la micropipeta para tomar 10 μ l del medio y homogenizarlo 1:2 con azul de tripano. Se hizo el conteo celular por duplicado utilizando los cuadrantes externos de la cámara de Neubauer. Se graficó el promedio de tres experimentos independientes \pm SEM.

6.3 Análisis morfológico

Se sembraron 4000 células de PC12 Tet-On/Control, 3000 células de PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-4 y 5000 células de PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74-4, en cajas de 4 pozos. Se dejaron adherir las células durante 5 horas y se agregó doxiciclina 500 ng/ml, después de 24 horas, se tomaron 10 fotografías (células no diferenciadas)

de distintos campos con un microscopio óptico invertido (ZEISS Axio Vert.A1) para después adicionar al medio NGF. Se realizó cambio de medio a los 3 y 6 días de las cajas correspondientes y la toma de fotografías se llevaron a cabo a los 3, 6 y 9 días de diferenciación con NGF.

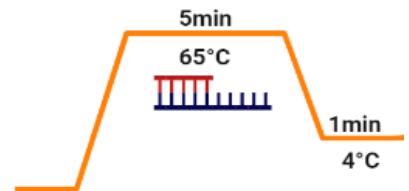
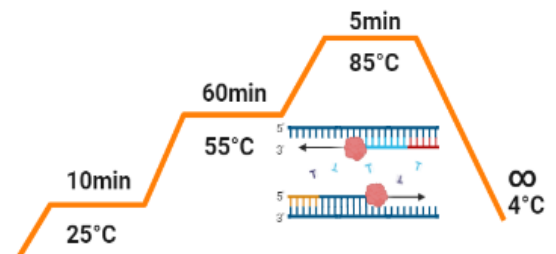
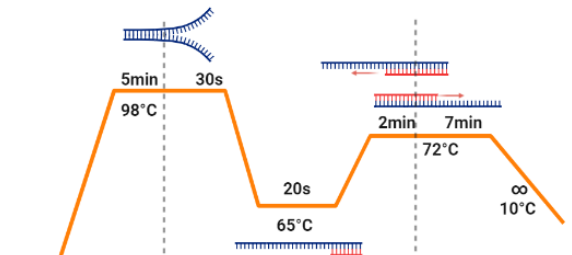
6.4 Extracción de RNA

Se extrajo RNA total de las clonas PC12 Tet-On/Control, PC12 Tet-On/Dp71d_{Δ71-4} y PC12 Tet-On/Dp71d_{Δ71-74-4} utilizando el método de TRIzol. Se sembraron las células en cajas p60 con una confluencia de 80-90%, después de dejarlas adherirse por 5 horas se agregó doxiciclina 500 ng/ml y se incubaron 24 horas. Se retiró el medio y se agregaron 4 ml de PBS 1X. Se raspó la caja para desprender las células y se recolectaron en tubo falcon de 50 ml. Se centrifugó 6 min a 6000 rpm, se decantó para resuspender las células en 1 ml de PBS 1X y se pasó el contenido a un tubo de 1.5 ml, se centrifugó 6 min a 6000 rpm para después decantar y secar. Se resuspendió la pastilla en un 1 ml de TRIzol y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente para separar las fases y se dejó incubando a temperatura ambiente 5 min. Se centrifugó 15 min a 13000 rpm a 4°C. Cuidando de no mezclar las fases se recuperó el sobrenadante en otro tubo de 1.5 ml, se agregaron 500 µl de isopropanol, se invirtió el tubo 10 veces y se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 15 min a 13000 rpm a 4°C, se decantó, se secó y se añadió 1 ml de etanol 75%. Se centrifugó 15 min a 13000 rpm a 4°C, se decantó y se dejó secar la pastilla 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, el RNA se resuspendió en 30 µl de agua libre de RNAsas, se analizó en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.

6.5 RT-PCR

A continuación, se esquematizan las condiciones y reactivos utilizados para cada paso de la RT-PCR:

Tabla 2. Condiciones empleadas para la RT-PCR

	Componentes de la reacción	Condiciones de PCR
Paso 1	3 µg de RNA 1 µl de random primers 1 µl de dNTP's H ₂ O hasta completar 10 µl	
Paso 2	2 µl de RT buffer 2 µl DTT 1 µl Rnasa Out 1 µl RT	
Paso 3	25 µl Master mix 4 µl cDNA 1 µl oligonucleótido Forward 1 µl oligonucleótido Reverse H ₂ O hasta completar 50 µl	

Se utilizó el RNA obtenido a partir de las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-4 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74-4 transfectadas de manera estable. Se usaron 3 µg de RNA para la síntesis de cDNA como lo indica el fabricante de Superscript III RT de Invitrogen: agregando 1µl de “random primers”, 1µl de dNTPs y H₂O necesaria hasta alcanzar un volumen de 10 µl. Lo anterior se colocó en un tubo para PCR y se incubo 5 min a 65°C en el termociclador, después la muestra se colocó en hielo durante 1 min. Se preparó una mezcla que contenía para cada muestra: 2 µl de buffer 10x RT, 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de DTT 0.1 M, 1 µl de RNasa out (40u/ml) y 1 µl Superscript III RT (Invitrogen). Se agregaron 10 µl de la mezcla a cada muestra y se centrifugó levemente para eliminar burbujas. La síntesis del cDNA se llevó a cabo incubando la reacción a 55°C por 60 min, seguido de una incubación a 85°C por 5 min y terminando la reacción a 4°C. Las muestras se

almacenaron a -4°C y después se realizó una PCR. Como control se utilizó células PC12 transfectadas con el vector vacío pTRE2pur-Myc.

6.6 PCR

A partir del cDNA de las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-4 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74-4 transfectadas de manera estable, se llevó a cabo una reacción de PCR como se describe a continuación: 25 μl de PCR master mix with HF buffer (Phusion high-fidelity BioLabs), 1 μl del iniciador pTRE2 5', 1 μl del iniciador pTRE2 3', 4 μl de cDNA y H₂O hasta alcanzar un volumen final de 50 μl . La reacción se llevó a un termociclador Veriti de Applied BioSystems.

Para amplificar los productos se inició con 98°C por 5 min, para seguir con 38 ciclos de 98°C por 30 s, 65°C por 20 s, 72°C por 2 min y 72°C por 7 min por 35 min. La detección de los productos esperados se llevó a cabo en geles de agarosa al 1.2 % teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 3. Secuencia de los iniciadores utilizados en la metodología de PCR

Iniciador	Secuencia
pTRE2-F	5'-ATGGCCATGGCTAGTAGAATTCACATGGCATCAATGCAGAAGCTG-3'
pTRE2-R	5'-ACAATCAAGGGTCCCCAAACT-3'

6.7 Obtención de extractos proteicos

Se utilizaron las líneas celulares PC12 Tet-On/Control, PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-4 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74-4 no diferenciadas y diferenciadas durante 9 días con NGF con cambio de medio a los 3 y 6 días, para obtener el extracto total de proteínas. Se sembraron células en cajas p60 con confluencia del 80-100% para el experimento de células no diferenciadas, 300,000 para la PC12 Tet-On/Control, 150,000 para la PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-4 y 500,000 para la PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74-4 para el experimento de células diferenciadas. Después de permitir por 5 horas la adherencia de las células, se agregó doxiciclina 500 ng/ml por 24 horas. La cosecha se hizo retirando el medio de la caja y agregando 1.5 ml de PBS 1X, se despegaron las células raspando la caja de cultivo y se pasaron a

un tubo de 1.5 ml. Se centrifugó a 6000 rpm por 6 min, se retiró con micropipeta todo el sobrenadante posible. Se agregó a cada muestra BE2 (Tris HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM y 1% de Tritón X-100) considerando el tamaño de la pastilla (entre 100-300 μ l). Se dejó incubar 20 min a temperatura ambiente, después se apartaron 5 μ l de cada muestra para su posterior cuantificación utilizando el método de Bradford. Por último, se agregó a cada muestra buffer de carga 5X (Tris-HCl 75 mM pH 6.8, dodecilsulfato de sodio 15%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 20%, azul de bromofenol al 0,001%) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.8 Western blot

El extracto de proteína total fue separado electroforéticamente en PAGE-SDS al 10% (Para el gel separador: 7.2 ml de H₂O, 6 ml de acrilamida al 30%, 4.6 ml de Tris-Base 1.5M pH 8.8, 200 μ l SDS 10%, 200 μ l APS 10% y 9.6 μ l TEMED. Para el concentrador: 4.26 ml de H₂O, 1.25 ml de acrilamida al 30%, 1.87 ml de Tris-HCl 0.5M pH 6.8, 75 μ l SDS 10%, 75 μ l APS 10% y 7.5 μ l TEMED) aplicando 100 volts para su migración. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en una cámara de transferencia durante 18 horas a 4°C utilizando 23 volts, finalizada la transferencia las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en TBST-1X (10 mM de tris-HCl pH 7.8, 0.15 M de NaCl, 0.05% de Tween 20). Posteriormente las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes, diluidos en TBST-1x. Después de la incubación se lavó 3 veces con TBST-1X, posteriormente la membrana se incubo con los anticuerpos secundarios con leche descremada al 5% en TBST-1X durante 1.3 h. Transcurrida la incubación se hicieron 3 lavados con TBST-1X. Las bandas fueron detectadas mediante el kit de quimioluminiscencia Lightening plus ECL (Perkinelmer, inc.). Para determinar la expresión relativa de cada proteína se hizo un análisis densitométrico con el software ImageJ (NIH, USA). Se utilizó β -actina como control de carga.

A continuación, se muestran los anticuerpos utilizados en las diferentes metodologías:

Tabla 4. Especificaciones de los anticuerpos utilizados en las distintas metodologías

Anticuerpos Primarios					
Anticuerpo Anti	Peso molecular del blanco	Marca	No. de catálogo	Especie	Dilución
Anexina A1	40 kDa	Abcam	AB196830	Conejo	WB 1:100 IF 1:100
HspB1	27 kDa	Santa Cruz	SC13132	Ratón	WB 1:200
	27 kDa	Abcam	AB5579	Conejo	IF 1:100
c-Myc	-	Santa Cruz	9 E10	Ratón	WB 1:300 IF: 1:100
Periferina	60 kDa	Santa Cruz	SC377093	Ratón	WB 1:5,000
	60 kDa	ABClonal	A4048	Conejo	WB 1:500 IF 1:100
VGF	90 kDa	Santa Cruz	SC365397	Ratón	WB 1:100
	90 kDa	Abcam	AB69989	Conejo	IF 1:100

Anticuerpos Secundarios		
Anticuerpo	Marca	Dilución
Mouse	Invitrogen	WB 1:10,000
Rabbit	Invitrogen	WB 1:10,000
Alexa Fluor 594	Invitrogen	IF 1:200
Alexa Fluor 488	Invitrogen	IF 1:300

WB: western blot, IF: inmunofluorescencia

6.9 Inmunofluorescencia indirecta

Para el experimento con células diferenciadas se sembraron 40,000 células de PC12 Tet-On/Control, 30,000 células de PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-4 y 50,000 células de PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74-4, para el experimento de células sin diferenciar se sembraron con confluencia del 80% ambos experimentos en cubreobjetos recubiertos previamente con poli-L-lisina, se dejaron adherir 5 horas y se agregó doxiciclina 500 ng/ml 24 horas antes de iniciar con el experimento. Para las células diferenciadas, se incubaron 24 horas con doxiciclina y posteriormente se adicionó al medio 50 ng/ml de NGF, haciéndose cambio de medio a los 3 y 6 días. Usando

una canastilla se lavaron las células durante 5 min en buffer de citoesqueleto (10 mM de ácido 2-(n-morfolino) etanosulfónico (MES), 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 5 mM de MgCl₂ y 5 mM de glucosa). Se colocaron los cubreobjetos en una cámara húmeda para permeabilizar las células con 200 µl de PFA al 4% + Tritón 100X al 0.4% durante 5 min. Se realizó un lavado de 15 min con buffer de citoesqueleto y después se fijaron las células con PFA al 4% durante 20 min. Posteriormente se hizo un lavado con PBS 1X por 5 min y un segundo lavado durante 10 min, el bloqueo se hizo con 200 µl de gelatina al 0.5% por 1 hora. Se repitieron los lavados con PBS 1X durante 5 y 10 min. Se incubó toda la noche con los anticuerpos primarios en PBS 1X a 4°C. Una vez finalizada la incubación se retiró el anticuerpo primario y se lavó con PBS 1X por 5 min. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: Alexa 488 1:300 y Alexa 594 1:200 en cámara húmeda a temperatura ambiente por 1 hora, pasado ese tiempo se agregó el reactivo DAPI 1:1000, se incubó a temperatura ambiente en cámara húmeda por 5 min para después lavar con PBS 1X durante 10 min. Finalmente se lavan con agua filtrada y estéril durante 15 min. El montaje de las preparaciones se realizó en portaobjetos con 5 µl de medio de montaje vectashield (Vector laboratories, inc.), se sellaron alrededor de los cubreobjetos con barniz, una vez secos se almacenaron en oscuridad a 4-10°C. La inmunofluorescencia se visualizó mediante microscopía confocal (Leica TCS Sp8) con un objetivo de inmersión en aceite de 40X, se tomaron 20-30 secciones ópticas en el eje Z de 0.3 a 0.5 µm de espesor. Para cuantificar la señal fluorescente obtenida para cada proteína analizada se tomaron 10 campos de cada uno de los experimentos.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de las células PC12 Tet-On/Control, PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74

7.1.1 Identificación de las proteínas recombinantes Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 mediante RT-PCR

Para iniciar con la caracterización de las líneas celulares que se utilizaron en este proyecto, se realizó un análisis de RT-PCR para identificar las secuencias correspondientes a cada una de las isoformas de Dp71. Se inició con la extracción del RNA, luego se obtuvo cDNA para finalmente amplificar los fragmentos correspondientes a las secuencias de las proteínas recombinantes utilizando iniciadores que las flanquean. Estos procesos se detallan en el apartado de metodología, así como los iniciadores utilizados.

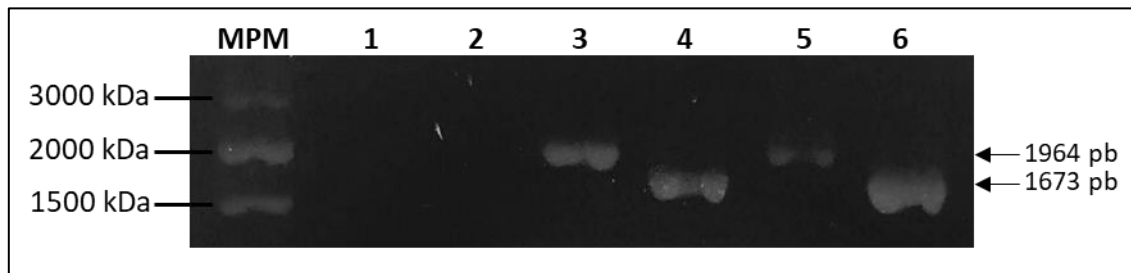


Figura 6. Identificación de los fragmentos de DNA que codifican para las proteínas recombinantes Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 por RT-PCR. Se muestran los productos de RT-PCR obtenidos a partir del cDNA. El carril 1 es el control negativo, en la reacción no se agregó cDNA. El carril 2 muestra el producto de la línea celular PC12 Tet-On/Control. Carril 3 y 4 muestran el cDNA obtenido a partir de las líneas celulares PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 (1,964 pb) y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 (1673 pb) respectivamente. Los carriles 5 y 6 muestran los productos de PCR de los plásmidos pTRE2pur-Myc/Dp71d Δ 71 y pTRE2pur-Myc/Dp71d Δ 71-74 respectivamente, utilizados para transfectar las líneas celulares PC12 Tet-On. Carril MPM corresponde al marcador de peso molecular 100 pb (Axygen).

En el gel de agarosa que se realizó para observar estos productos de PCR ([figura 6](#)) se observó lo siguiente; del lado izquierdo se cargó el marcador de peso molecular (MPM), seguido de un control negativo el cual no tenía DNAc, por lo que no se observa ninguna banda. En el segundo carril se cargó el producto de la línea

celular PC12 Tet-On/Control, en el cual tampoco aparece una banda. La banda del tercer carril corresponde al producto de la línea celular PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 que coincide en peso con la banda que aparece en el quinto carril, así como el producto del cuarto carril correspondiente a la línea PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 y que coincide con el peso de la banda del sexto carril. Los carriles 5 y 6 son productos de PCR de los plásmidos pTRE2pur-Myc/Dp71d Δ 71 y pTRE2pur-Myc/Dp71d Δ 71-74 respectivamente, que se utilizaron para transfectar de manera estable a las líneas celulares PC12 Tet-On. Los resultados indican que las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 expresan el RNA mensajero que codifica para las proteínas recombinantes Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74.

Para corroborar el funcionamiento del sistema Tet-On, se evaluó la expresión de las proteínas recombinantes con doxiciclina. Se sembraron las células confluentes con y sin la adición de doxiciclina durante 24 horas y se obtuvo el extracto proteico. Como se esperaba, en las células PC12 Tet-On/Control no hay presencia de la proteína recombinante mientras que, en la clona PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 se vio un aumento de casi el doble en la expresión de la proteína Myc/Dp71d Δ 71 al agregar doxiciclina y en la clona PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 la expresión de la proteína Myc/Dp71d Δ 71-74 fue 3 veces mayor al inducir las células con doxiciclina ([figura 7](#)). Por lo que todos los experimentos posteriores se realizaron induciendo previamente las células durante 24 horas con doxiciclina.

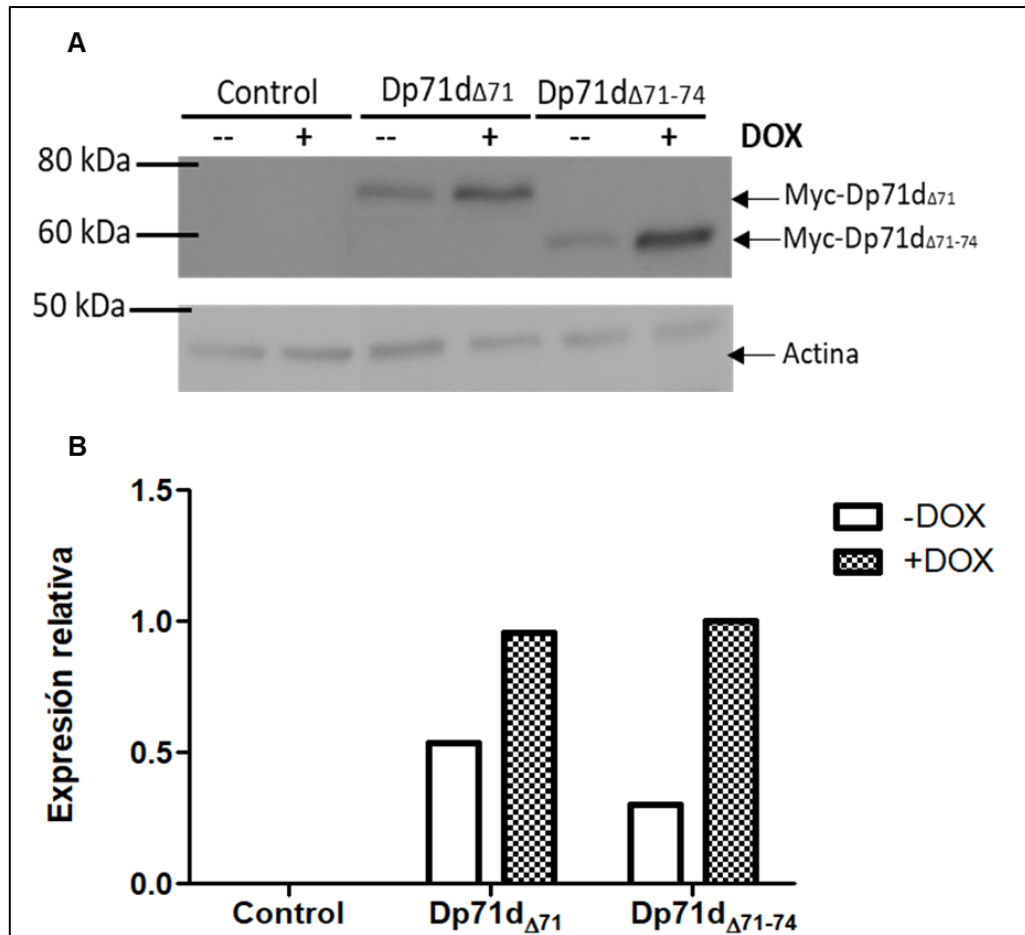


Figura 7. Inducción de la expresión de las proteínas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 con doxiciclina. A) Los extractos proteicos de las líneas celulares PC12 Tet-On/Control, PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 a las cuales se les administró doxiciclina 500 ng/ml durante 24 horas, se analizaron mediante WB como se indica en Materiales y Métodos. Se utilizó el anticuerpo Anti-Myc que reconoce la bandera Myc de las proteínas recombinantes. Se empleó β -actina como control de carga. Del lado izquierdo se indican los tamaños del marcador de peso molecular Dual Color (Bio-Rad). B) La gráfica representa un solo ensayo.

7.1.2 Proliferación de las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-

74

Una vez que se corroboró la expresión del RNA mensajero y las proteínas Myc/Dp71d Δ 71 y Myc/Dp71d Δ 71-74 se continuo esta investigación analizando la tasa de proliferación de cada línea celular con la que se trabajaría. Para esto se sembró 150,000 células de cada línea celular en cajas p60.

En la tabla 5, se muestra el número de células de las diferentes líneas celulares a los 3, 6 y 9 días.

Tabla 5. Proliferación celular. Se contó el número de células en cada línea celular en tiempos indicados. Se realizaron tres experimentos independientes, en la tabla se muestra el conteo individual.

Día	No. de células								
	Control			Dp71d Δ 71			Dp71d Δ 71-74		
3	205000	175000	15000	250000	255000	270000	115000	125000	155000
6	495000	405000	360000	630000	915000	765000	285000	270000	295000
9	1E+06	2E+06	2E+06	4E+06	5E+06	8E+06	615000	715000	725000

A partir del tercer día de proliferación se observa el comportamiento característico de las 3 líneas celulares; la PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 es la línea celular que prolifera más lento, seguida las células PC12 Tet-On/Control que para el día 9 de cultivo había 4 veces más células comparada con las PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74. Como era de esperarse la proliferación de la línea celular PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 es la mayor superando los 7 millones de células a los 9 días mientras que para las PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 había 750 mil y para en las células PC12 Tet-On/Control 1.5 millones. En la [figura 8](#), podemos ver representados esquemáticamente los valores de la tabla anterior.

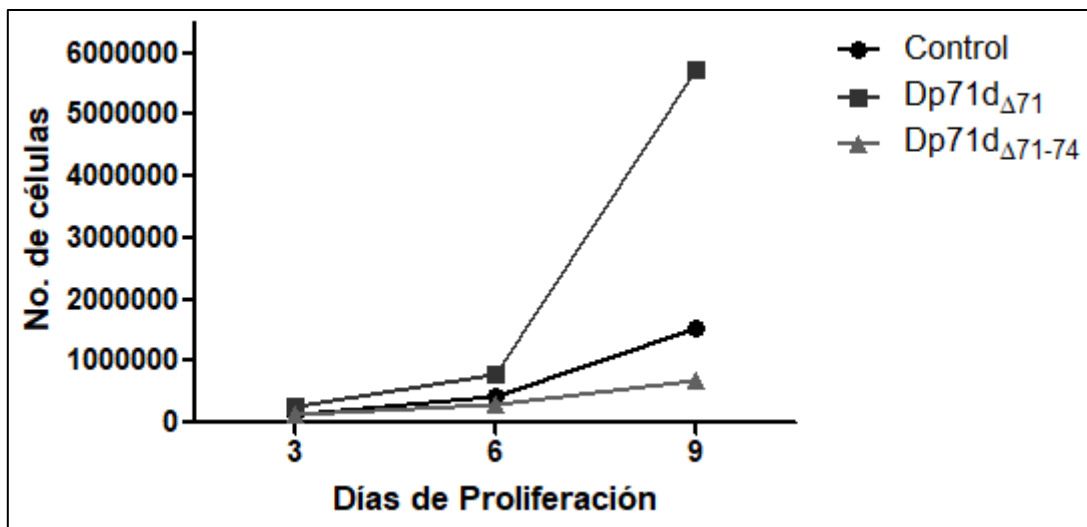


Figura 8. Curva de proliferación celular. Representación esquemática del conteo celular a los días 3, 6 y 9 de las líneas celulares: PC12 Tet-on/Control, PC12 Tet-

on/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/ Dp71d Δ 71-74. Se graficó el promedio de tres ensayos independientes \pm SEM.

7.1.3 Análisis morfológico de las clonas Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74

Otro aspecto importante para la caracterización de las clonas que se usarían en este trabajo, fue el análisis morfológico de las diferentes líneas celulares. Se sembraron las células como se indica en Materiales y Métodos, se agregó NGF para promover la diferenciación y se tomaron fotografías a los 3, 6 y 9 días (figura 9).

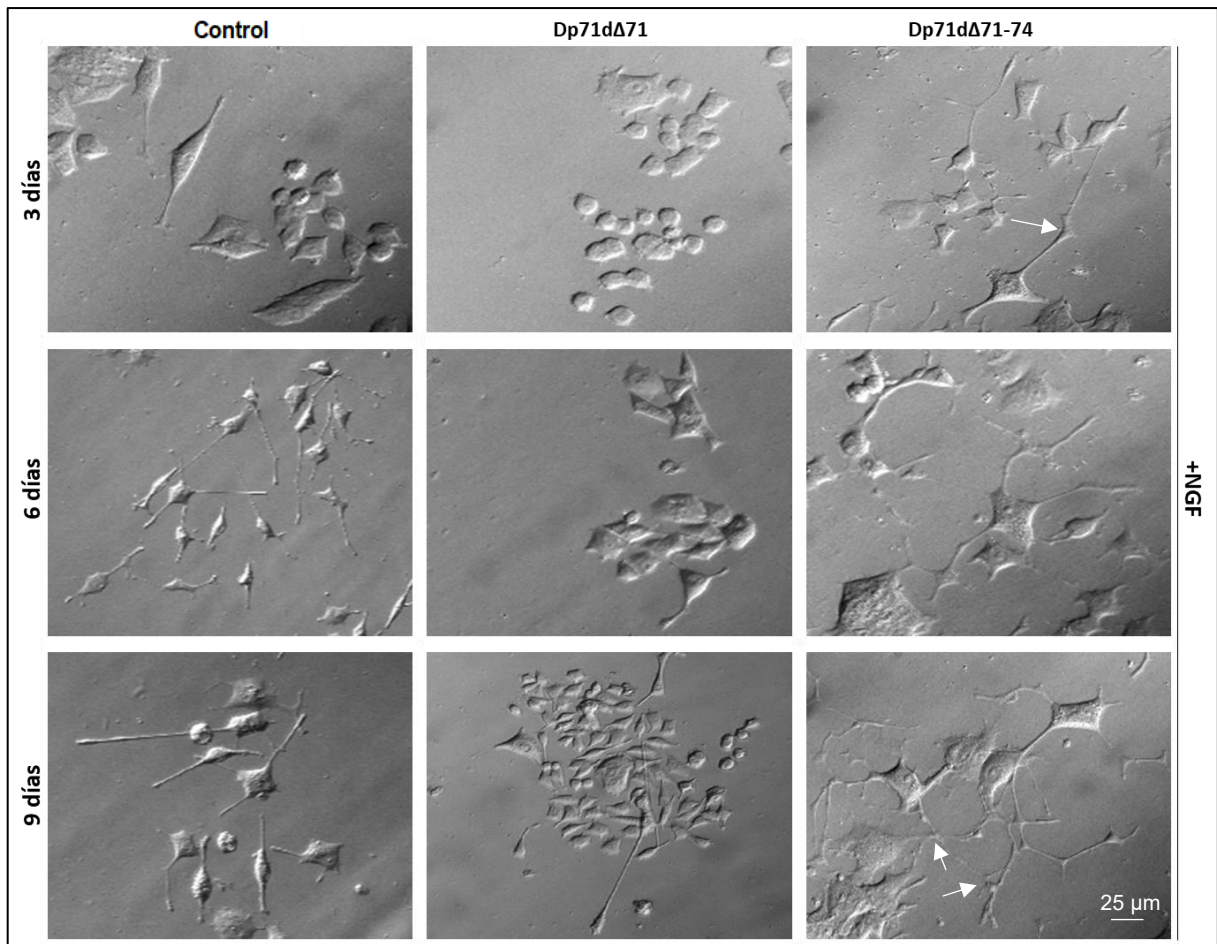


Figura 9. Análisis morfológico de las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74. Se muestran fotografías de las líneas celulares PC12 Tet-On/Control, PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 con un microscopio óptico invertido a los 3, 6 y 9 días de diferenciación con NGF y doxiciclina. Las flechas en blanco indican los sitios de contacto.

Al tercer día en las células PC12 Tet-On/Control se encontraron células aplanadas, con protuberancias un poco más definidas y además células con proyecciones neuríticas menores a un cuerpo celular y en su mayoría bipolares, con pocas células aun redondeadas. Mientras tanto, las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 presentaron una morfología aplanada, la mayoría con neuritas de al menos un cuerpo celular de largo y algunas de estas con conos de crecimiento y nodos de contacto con otras células, la línea celular PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 fue la que menor diferenciación presentó, las células mostraban aplanamiento y pequeñas protuberancias, aunque aún había gran cantidad de células redondeadas y distribuidas en cúmulos.

Al sexto día la proporción de células diferenciadas entre líneas celulares se mantuvo, aunque con cambios notorios. Las células PC12 Tet-On/Control en su mayoría eran bipolares, con neuritas delgadas y de extensión entre 1 a 2 cuerpos celulares, escasamente presentaban varicosidades, y sin nodos de contacto con otras células. Por otra parte, las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 se notaban aplanadas, con morfología estrellada, la gran mayoría de las células con neuritas multipolares, largas y delgadas, con notorias varicosidades y nodos de contacto con otras células cercanas. Por el contrario, la mayoría de las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 ya estaban aplanadas y con protuberancias, algunas otras con neuritas bipolares con extensión menor a un cuerpo celular.

Finalmente, después de 9 días de diferenciación las células PC12 Tet-On/Control no presentaron mucha diferencia morfológica comparado con el sexto día, siguieron observándose células, bipolares con neuritas de dos a tres cuerpos celulares en su mayoría, gruesas y con aparentes conos de crecimiento. Como era de esperarse las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 continuaron con neuritas multipolares, muy largas, mostrando aún más varicosidades que crecieron en dirección a otras células, así como nodos de contacto. Las neuritas eran muy delgadas con tamaño de 3 o más cuerpos celulares. Las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 siguieron con morfología aplanada, ligeramente estrellada, continuaron con protuberancias sin llegar a formar proyecciones neuríticas

alargadas, se encontraron pocas células con neuritas desarrolladas no mayores a dos cuerpos celulares y gruesas, formaron escasos conos de crecimiento y no se apreciaron nodos de contacto.

7.1.4 Expresión de las proteínas recombinantes Myc/Dp71d Δ 71 y Myc/Dp71d Δ 71-74

Para corroborar la expresión de las proteínas recombinantes Myc/Dp71d Δ 71 y Myc/Dp71d Δ 71-74, se sembraron células PC12 Tet-On/Control, PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 en confluencia al 80%-90% para obtener proteína al tiempo 0 (no diferenciadas), las cuales fueron inducidas con doxiciclina 500 ng/ml durante 24 horas. Las células diferenciadas durante 9 días fueron tratadas con doxiciclina y NGF como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

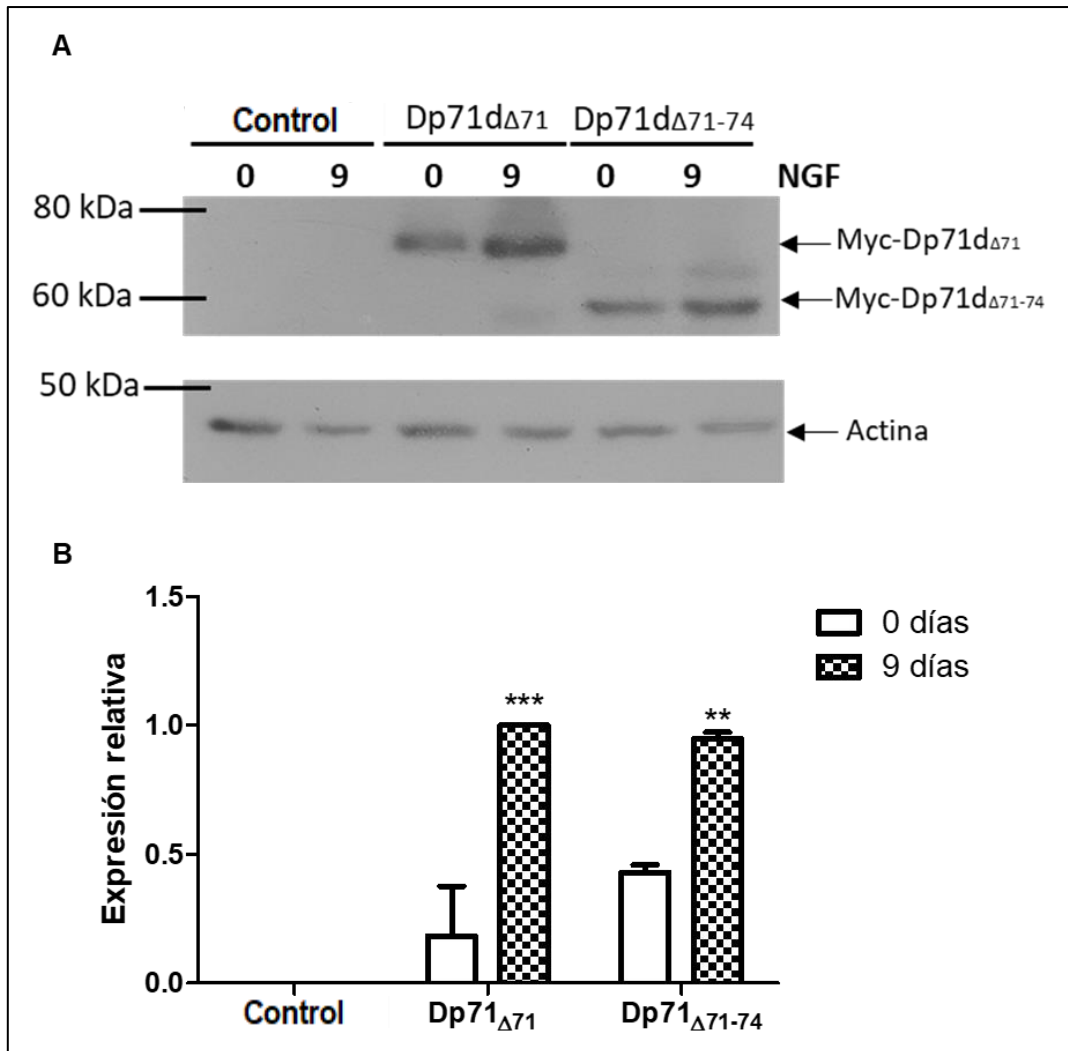


Figura 10. Expresión de las proteínas recombinantes Myc-Dp71 Δ 71 y Myc-Dp71 Δ 71-74. A) Los extractos proteicos de las líneas celulares PC12 Tet-On/Control, PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71-74 sin diferenciar y diferenciadas durante 9 días con NGF y doxícilina, se analizaron mediante WB. Se utilizó el anticuerpo Anti-Myc que reconoce la bandera Myc de las proteínas recombinantes. Se empleó β -actina como control de carga. Del lado izquierdo se indica el tamaño correspondiente al marcador de peso molecular Dual Color (Bio-Rad). B) La gráfica representa el promedio \pm la desviación estándar de dos ensayos independientes. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$.

La [figura 10-A](#) muestra que efectivamente las células PC12 Tet-On/Control no expresan ninguna proteína recombinante al tiempo cero ni a los 9 días de diferenciación, mientras que en el extracto de la línea celular PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71 aparece una banda de 71 kDa que corresponde a la proteína recombinante

Myc/Dp71d Δ 71 siendo 5 veces mayor su expresión a los nueve días de diferenciación ([figura 10-B](#)). En el caso de la clona PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 la banda que aparece corresponde a la proteína Myc/Dp71d Δ 71-74 con un peso de 58 kDa, que duplica su nivel a los 9 días de diferenciación. Este aumento se justifica ya que el sistema Tet-On que se utiliza para transfectar a las células tiene un elemento de respuesta a la tetraciclina, en este caso su análogo doxiciclina, estaría promoviendo la expresión del gen de la proteína recombinante.

7.2 Expresión diferencial de las proteínas HspB1, periferina y VGF en células PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71-74

Previo a este trabajo, se realizó un análisis proteómico de las células PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71-74 y PC12 Tet-On/Control, en el cual se identificaron las proteínas anexina A1, HspB1, periferina, VGF entre otras, cuya expresión aumenta en las células diferenciadas (Merino-Jiménez, datos no publicados). Estas proteínas participan en procesos de diferenciación neuronal específicamente en la neuritogénesis, por lo que en este trabajo se validaron los resultados obtenidos por proteómica analizando la expresión diferencial de estas proteínas mediante ensayos de western blot e inmunofluorescencia que a continuación se describen.

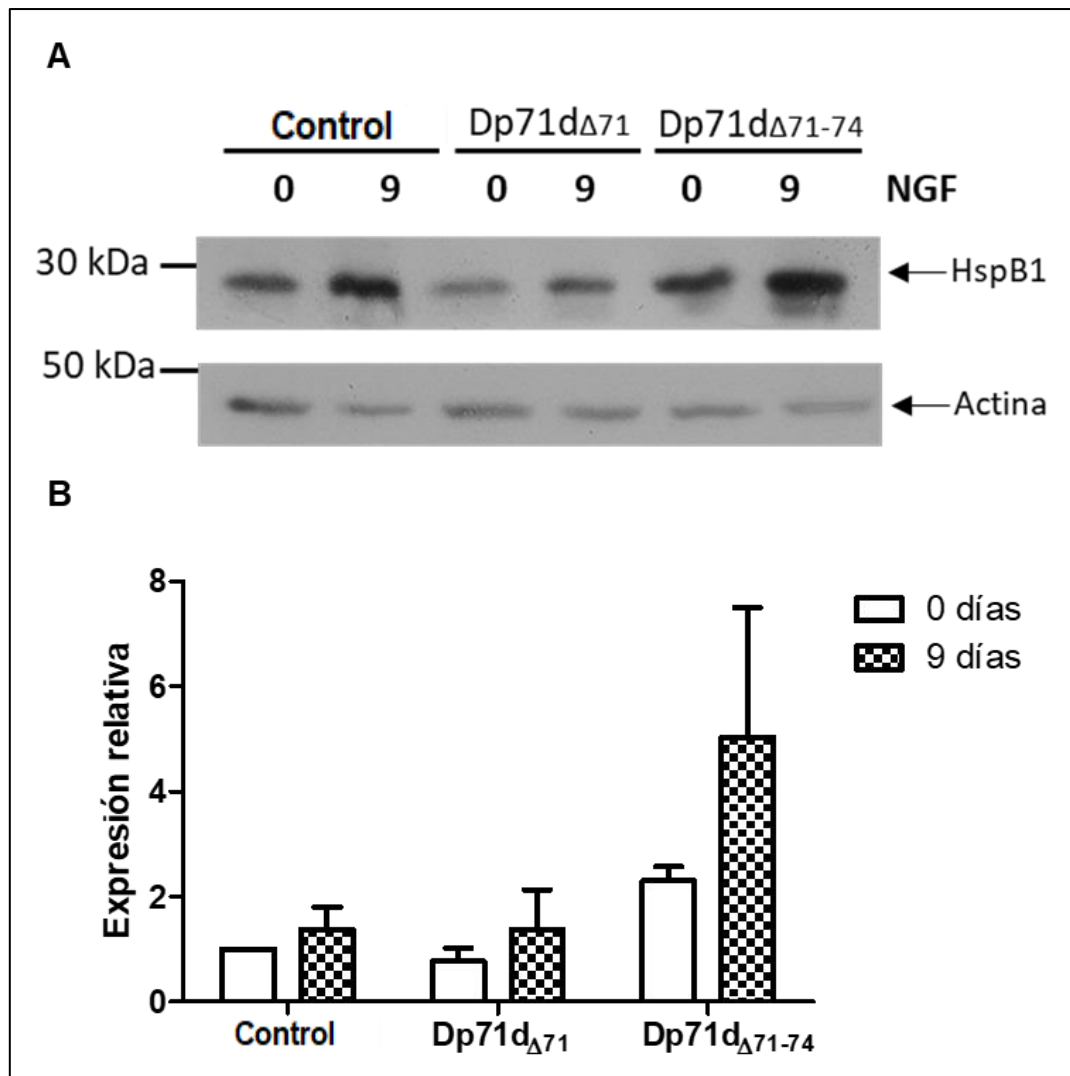


Figura 11. Expresión diferencial de la proteína HspB1 en células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74. A) Los extractos proteicos de las líneas celulares PC12 Tet-On/Control, PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 sin diferenciar y diferenciadas durante 9 días con NGF y doxiciclina, se analizaron mediante WB. Se utilizó el anticuerpo Anti-HspB1 que reconoce a la proteína HspB1. Se empleó β -actina como control de carga. Del lado izquierdo se indica el marcador de peso molecular Dual Color (Bio-Rad). B) La gráfica representa el promedio \pm la desviación estándar de dos ensayos independientes.

Fue analizada la expresión de HspB1 una proteína relacionada con la arquitectura del citoesqueleto y que se ha descrito su expresión y participación en la diferenciación neuronal de las células PC12 (García-Cruz et al., 2019; Merino-Jiménez et al., 2016). Las células PC12 Tet-On/Control muestran un incremento en

la expresión de esta proteína a los 9 días de diferenciación comparado con el día cero ([figura 11](#)). Las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 que se caracterizan principalmente por un incremento en la proliferación comparado con las células control, así como una reducción en la diferenciación, no muestran diferencias importantes en la expresión de HspB1, entre los 0 y los 9 días de diferenciación. Las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 a los 0 y 9 días expresan mayor nivel de HspB1 que en la línea celular PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Control. En específico las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 presentan el doble de expresión de HspB1 en células no diferenciadas y el triple en células diferenciadas comparadas con las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71.

También se analizó la expresión de periferina la cual es una proteína de filamento intermedio que es importante para mantener la forma y arquitectura de las neuronas, en específico para la iniciación, extensión y mantenimiento de las neuritas (Helfand et al., 2003). En general, periferina aumentó su expresión al doble en las células diferenciadas comparado con las células sin diferenciar ([figura 12](#)) sin embargo, a los nueve días de diferenciación su expresión 3 y 1.4 veces mayor en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 comparado con las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Control respectivamente.

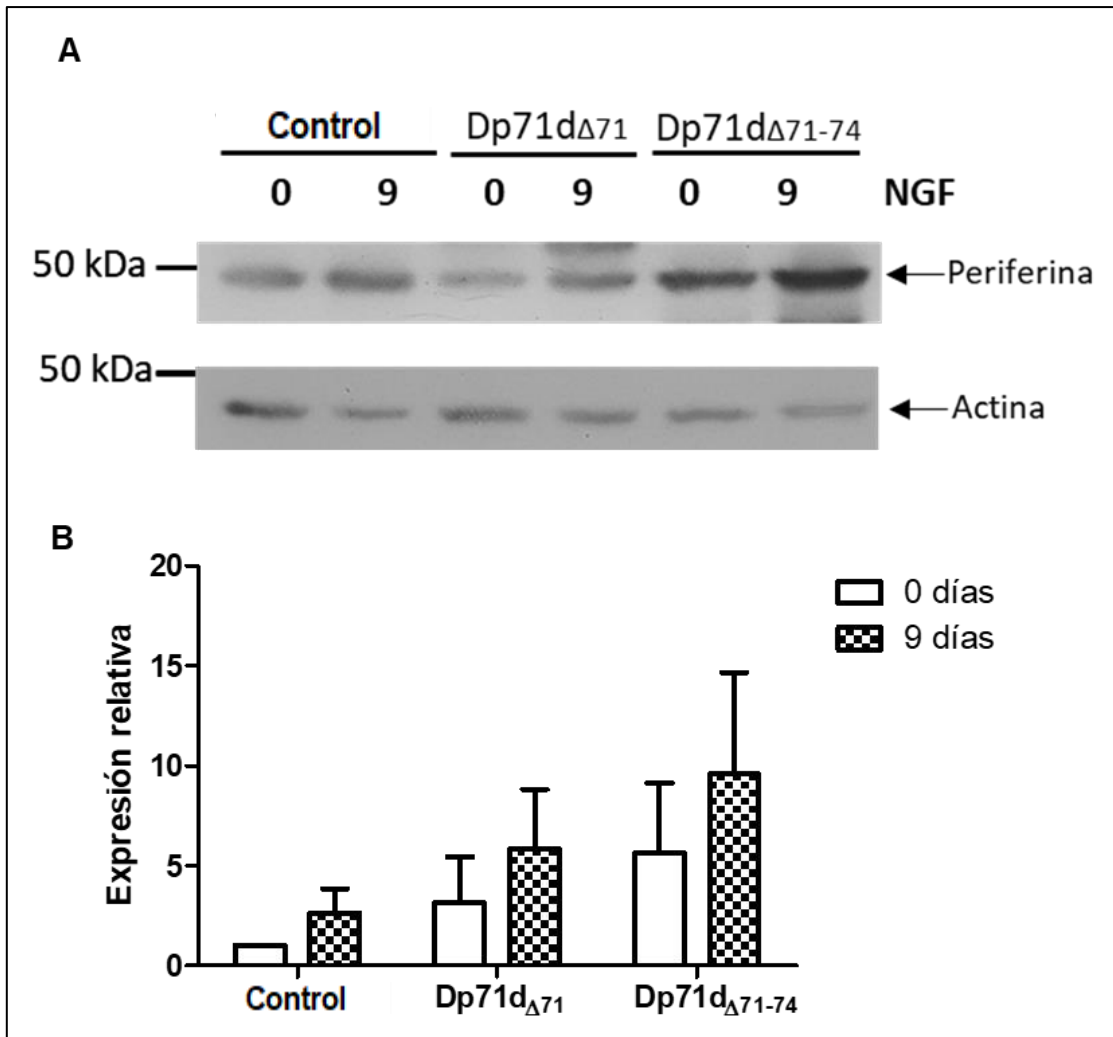


Figura 12. Expresión diferencial de la proteína periferina en células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74. A) Los extractos proteicos de las líneas celulares PC12 Tet-On/Control, PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 sin diferenciar y diferenciadas durante 9 días con NGF y doxiciclina, se analizaron mediante WB. Se utilizó el anticuerpo Anti-Pph que reconoce a la proteína periferina. Se empleó β -actina como control de carga. Del lado izquierdo se indica el marcador de peso molecular Dual Color (Bio-Rad). B) La gráfica representa el promedio \pm la desviación estándar de dos ensayos independientes.

Por otro lado, analizamos la expresión de VGF, otra proteína que se relaciona con la neuritogénesis, se ha descrito como un factor de crecimiento neural presente en células PC12 (Levi et al., 2004). Esta proteína presentó importantes cambios en su expresión en las células diferenciadas; en las células PC12 Tet-On/Control aumento casi 4 veces su expresión, mientras que es relevante hacer notar que las

células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 muestran una expresión muy baja comparada con las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74, tanto sin diferenciar como diferenciadas (figura 13). En cambio, es de destacar que en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 después de 9 días de diferenciación el aumento de la expresión de VGF fue 7 veces mayor comparado con las células sin diferenciar. Mientras que respecto a las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 diferenciadas es 30 veces mayor la expresión de VGF en células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74.

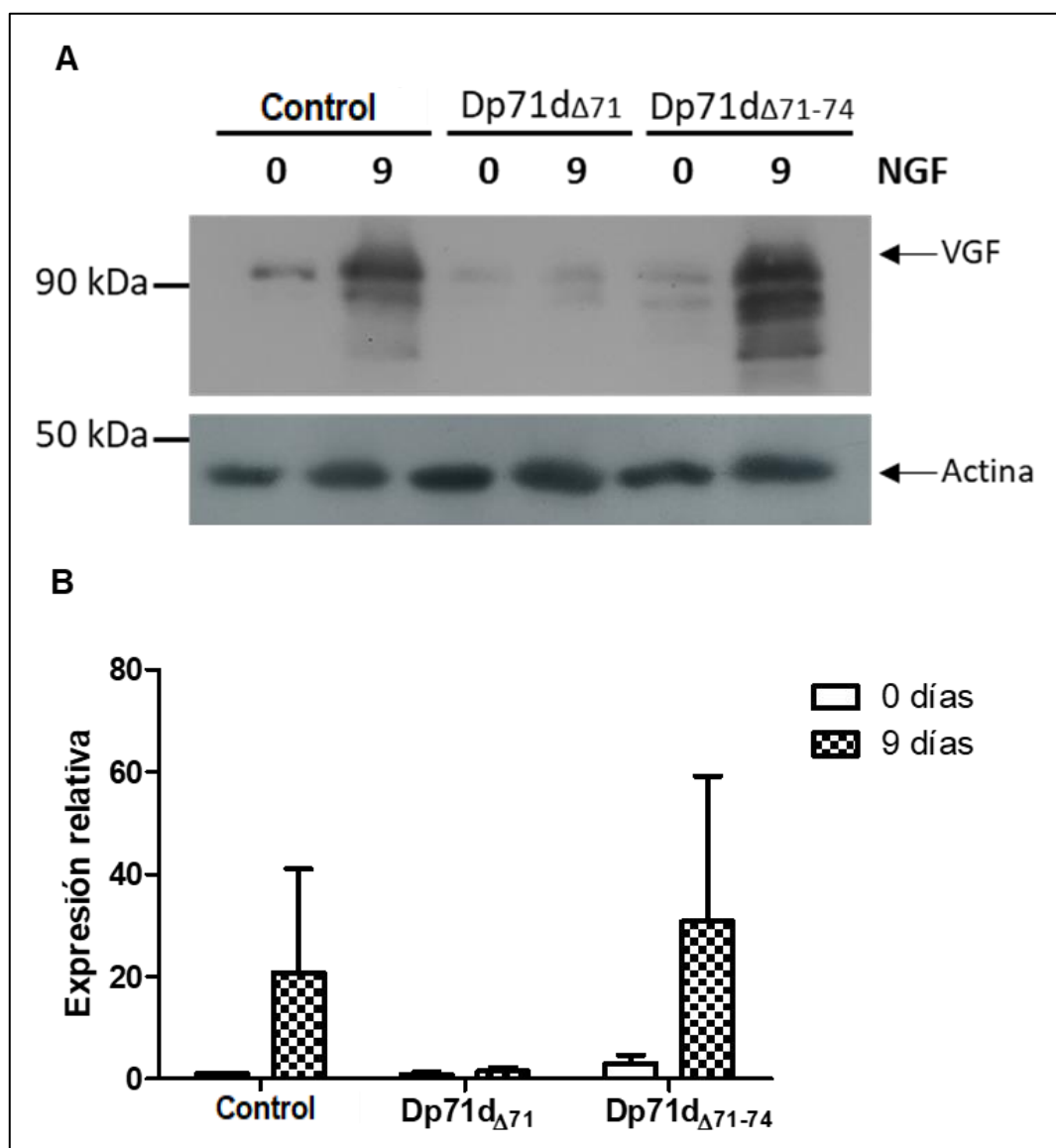


Figura 13. Expresión diferencial de la proteína VGF en células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74. A) Los extractos proteicos de las líneas celulares PC12 Tet-On/Control, PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74

sin diferenciar y diferenciadas durante 9 días con NGF y doxiciclina, se analizaron mediante WB. Se utilizó el anticuerpo Anti-VGF que reconoce a la proteína VGF. Se empleó β -actina como control de carga. Del lado izquierdo se indica el marcador de peso molecular Dual Color (Bio-Rad). B) La gráfica representa el promedio \pm la desviación estándar de dos ensayos independientes.

7.3 Distribución celular de las proteínas anexina A1, HspB1, periferina, VGF y lámina A/C en células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74

Analizar la distribución subcelular de las proteínas de interés ayuda a entender mejor su funcionamiento, así como identificar si colocalizan con otras proteínas que pudieran estar participando en el mismo proceso biológico. Las proteínas mencionadas fueron analizadas mediante inmunofluorescencia indirecta en células sin diferenciar y células diferenciadas durante 9 días con NGF y doxiciclina.

En la [figura 14](#) los paneles A, B y C muestran las células sin diferenciar; PC12 Tet-On/Control, PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 respectivamente en las cuales se puede apreciar en color rojo la ubicación de la proteína anexina A1. Esta proteína se encuentra distribuida en el citoplasma en las tres líneas celulares, mientras que en las células diferenciadas ([figura 15-A, B y C](#)) además de encontrarla en el citoplasma también se observa a lo largo de las neuritas. En azul se aprecia el núcleo y en verde las proteínas Dp71 recombinantes. En las PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 diferenciadas se logra observar colocalización entre la proteína recombinante Myc-Dp71d Δ 71-74 y anexina A1 en las extensiones neuríticas y en el citoplasma, así como con Myc-Dp71d Δ 71.

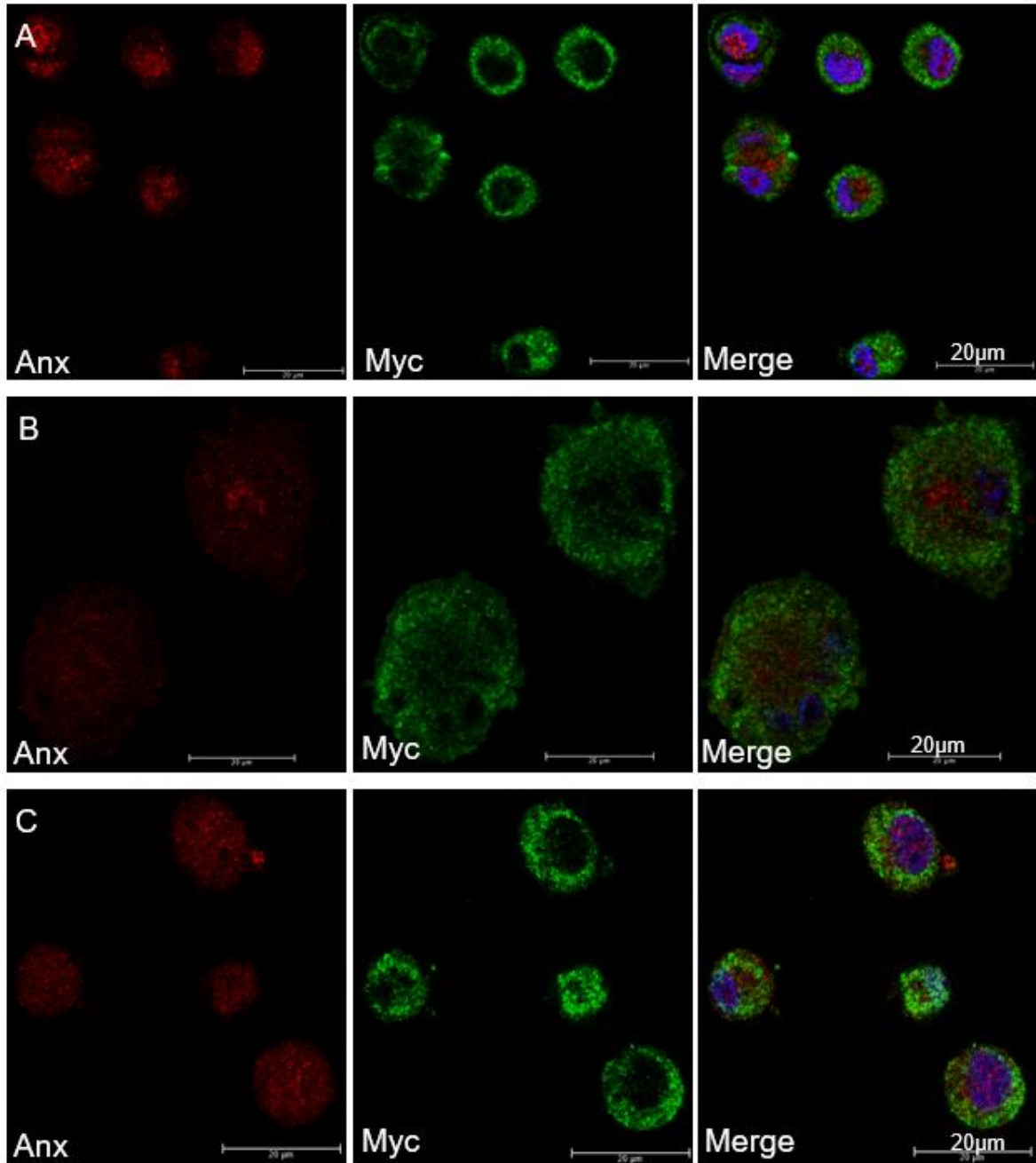


Figura 14. Distribución de las proteínas recombinantes *Myc-Dp71 Δ 71*, *Myc-Dp71 Δ 71-74* y anexina A1 en células PC12 Tet-On no diferenciadas. Las células fueron tratadas con anticuerpos anti-Myc y anti-Anexina A1. Se observan las proteínas recombinantes *Myc-Dp71 Δ 71* y *Myc-Dp71 Δ 71-74* (verde), anexina A1 (rojo), la sobreposición de señales (MERGE) y el núcleo teñido con DAPI (azul). Todas las líneas celulares fueron inducidas con doxiciclina. A) PC12 Tet-On/Control. B) PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71. C) PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71-74. Se muestra la barra de escala en cada sección.

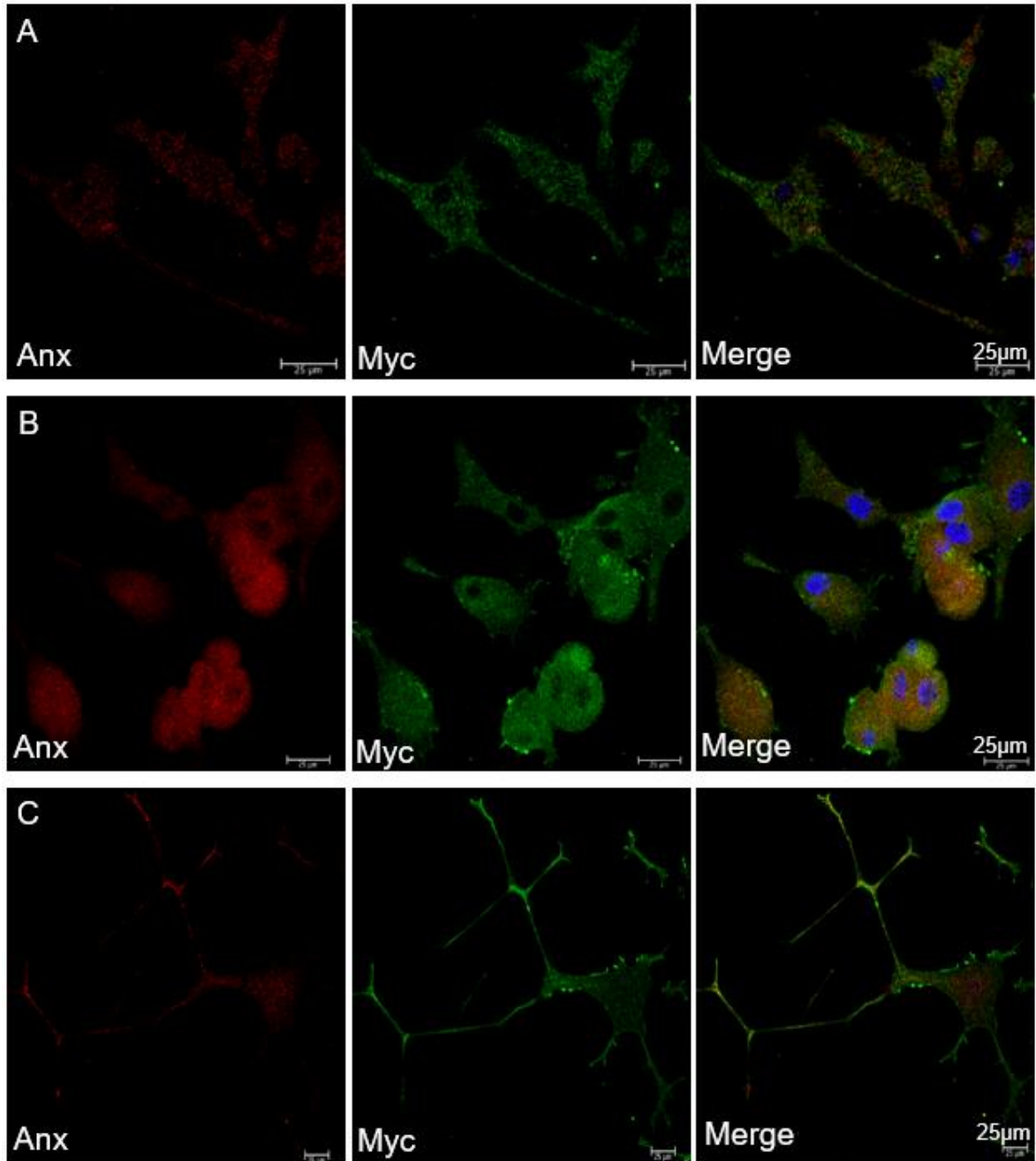


Figura 15. Distribución de las proteínas recombinantes *Myc-Dp71 Δ 71*, *Myc-Dp71 Δ 71-74* y anexina A1 en células PC12 Tet-On diferenciadas. Las células fueron tratadas con anticuerpos anti-Myc y anti-Anexina A1. Se observan las proteínas recombinantes *Myc-Dp71 Δ 71* y *Myc-Dp71 Δ 71-74* (verde), anexina A1 (rojo), la sobreposición de señales (MERGE) y el núcleo teñido con DAPI (azul). Todas las líneas celulares fueron inducidas con doxiciclina y las diferenciadas con NGF, durante 9 días como se indica en Materiales y Métodos. A) PC12 Tet-On/Control. B) PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71. C) PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71-74. Se muestra la barra de escala en cada sección.

A continuación, se analizó la distribución celular de la proteína HspB1, en células sin diferenciar, se encuentra distribuida por el citoplasma ([figura 16-A, B y C](#)) en las tres líneas celulares. Una vez diferenciadas las células, la proteína continua en el citoplasma y a lo largo de las neuritas ([figura 17-A, B y C](#)). Además de esos sitios, en las PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 se puede observar que se acumula en los conos de crecimiento. El núcleo se observa en azul (DAPI) y las proteínas Dp71 recombinantes en verde. La colocación (merge) de Myc-Dp71d Δ 71 y HspB1 es evidente en las células no diferenciadas y diferenciadas principalmente en el citoplasma, mientras que con la proteína Myc-Dp71d Δ 71-74 en células diferenciadas ocurre a lo largo de las neuritas. La señal del anticuerpo Anti-Myc presente en la línea celular PC12 Tet-On/Control, no representa ninguna proteína recombinante ya que se utilizó un vector vacío en cuanto al gen de la Dp71, pero si contiene la secuencia perteneciente a c-Myc.

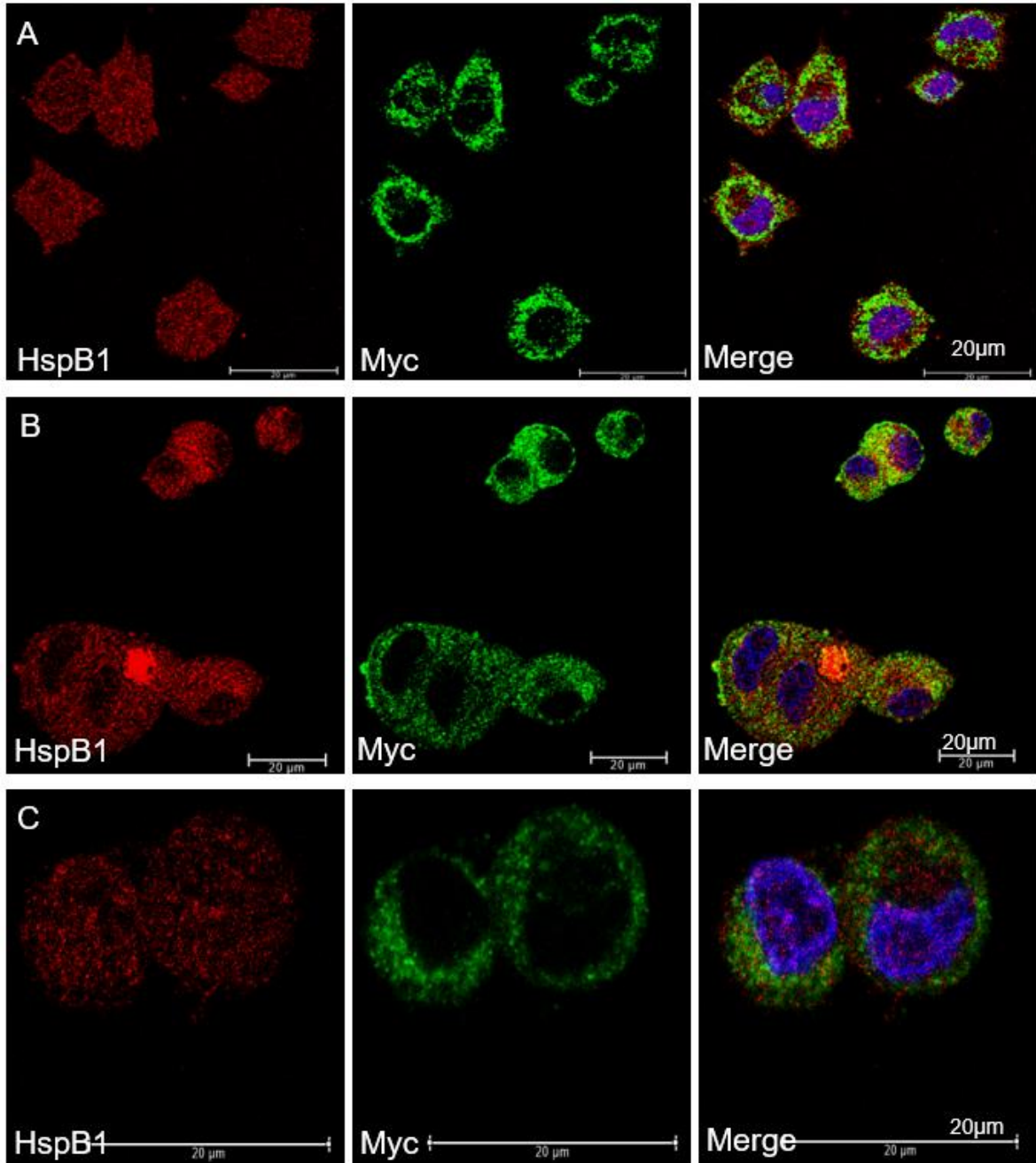


Figura 16. Distribución de las proteínas recombinantes *Myc-Dp71 Δ 71*, *Myc-Dp71 Δ 71-74* y *HspB1* en células PC12 Tet-On no diferenciadas. Las células fueron tratadas con anticuerpos anti-Myc y anti-HspB1. Se observan las proteínas recombinantes *Myc-Dp71 Δ 71* y *Myc-Dp71 Δ 71-74* (verde), *HspB1* (rojo), la sobreposición de señales (MERGE) y el núcleo teñido con DAPI (azul). Todas las líneas celulares fueron inducidas con doxiciclina como se indica en Materiales y Métodos. A) PC12 Tet-On/Control. B) PC12 Tet-On/*Dp71 Δ 71*. C) PC12 Tet-On/*Dp71 Δ 71-74*. Se muestra la barra de escala en cada sección.

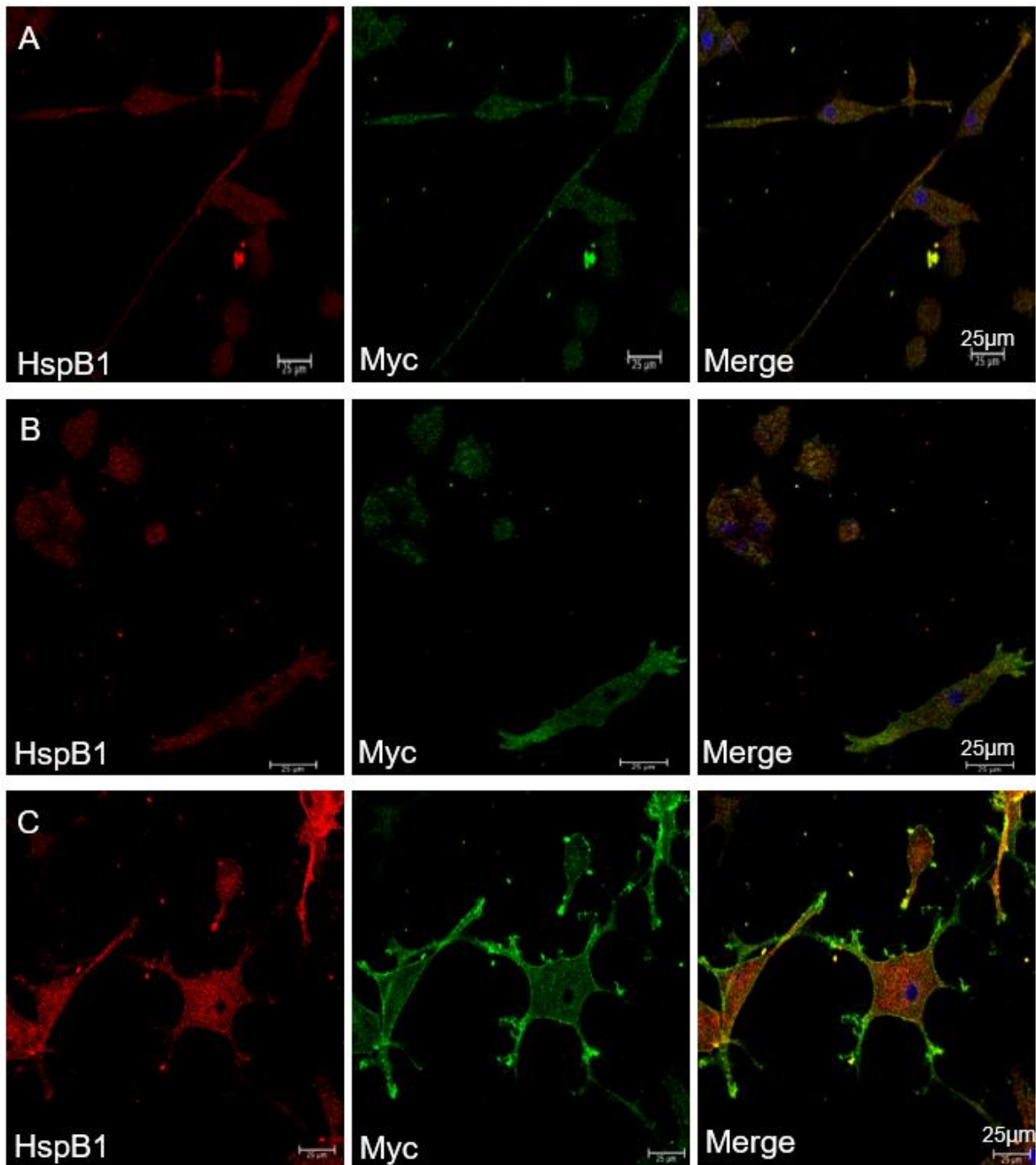


Figura 17. Distribución de las proteínas recombinantes *Myc-Dp71 Δ 71*, *Myc-Dp71 Δ 71-74* y *HspB1* en células PC12 Tet-On diferenciadas. Las células fueron tratadas con anticuerpos anti-Myc y anti-HspB1. Se observan las proteínas recombinantes *Myc-Dp71 Δ 71* y *Myc-Dp71 Δ 71-74* (verde), *HspB1* (rojo), la sobreposición de señales (MERGE) y el núcleo teñido con DAPI (azul). Todas las líneas celulares fueron inducidas con doxiciclina y las diferenciadas con NGF durante 9 días como se indica en Materiales y Métodos. A) PC12 Tet-On/Control. B) PC12 Tet-On/*Dp71 Δ 71*. C) PC12 Tet-On/*Dp71 Δ 71-74*. Se muestra la barra de escala en cada sección.

En la [figura 18-A, B y C](#) se analizó la distribución de periferina en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74. Como se puede observar en color verde están las proteínas Dp71 recombinantes en las células sin diferenciar y en color rojo la ubicación de periferina la cual se distribuye por todo el citoplasma en las tres líneas celulares, acumulándose a un lado del núcleo en la PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74. En los paneles [A, B y C de la figura 19](#) apreciamos las células diferenciadas, en el panel B que corresponde a las PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 se aprecia la distribución en el citoplasma en forma de filamentos cercanos al núcleo. El panel A y C que corresponden a las células control y las PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 asimismo se observa a periferina en el citoplasma en forma de filamentos cercanos al núcleo, concentrada en las neuritas y los conos de crecimiento. El núcleo se encuentra marcado en azul (DAPI) y en verde se aprecian las proteínas recombinantes Dp71. En este caso la colocación (merge) de Myc-Dp71d Δ 71-74 y periferina es muy claro en las regiones de las neuritas de células diferenciadas.

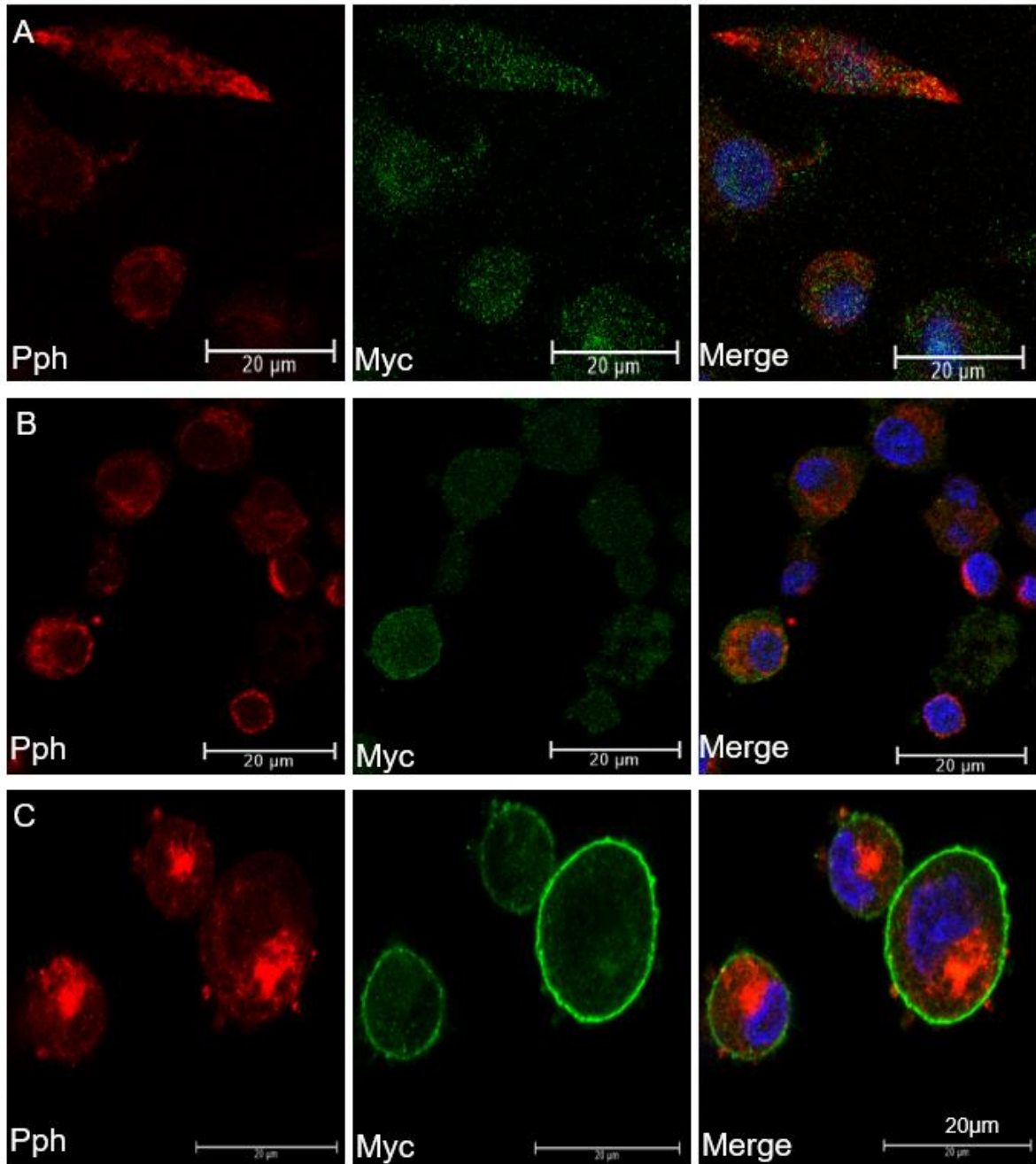


Figura 18. Distribución de las proteínas recombinantes *Myc-Dp71 Δ 71*, *Myc-Dp71 Δ 71-74* y periferina en células PC12 Tet-On no diferenciadas. Las células fueron tratadas con anticuerpos anti-Myc y anti-Pph. Se observan las proteínas recombinantes *Myc-Dp71 Δ 71* y *Myc-Dp71 Δ 71-74* (verde), periferina (rojo), la sobreposición de señales (MERGE) y el núcleo teñido con DAPI (azul). Todas las líneas celulares fueron inducidas con doxiciplina. A) PC12 Tet-On/Control. B) PC12 Tet-On/*Dp71 Δ 71*. C) PC12 Tet-On/*Dp71 Δ 71-74*. Se muestra la barra de escala en cada sección.

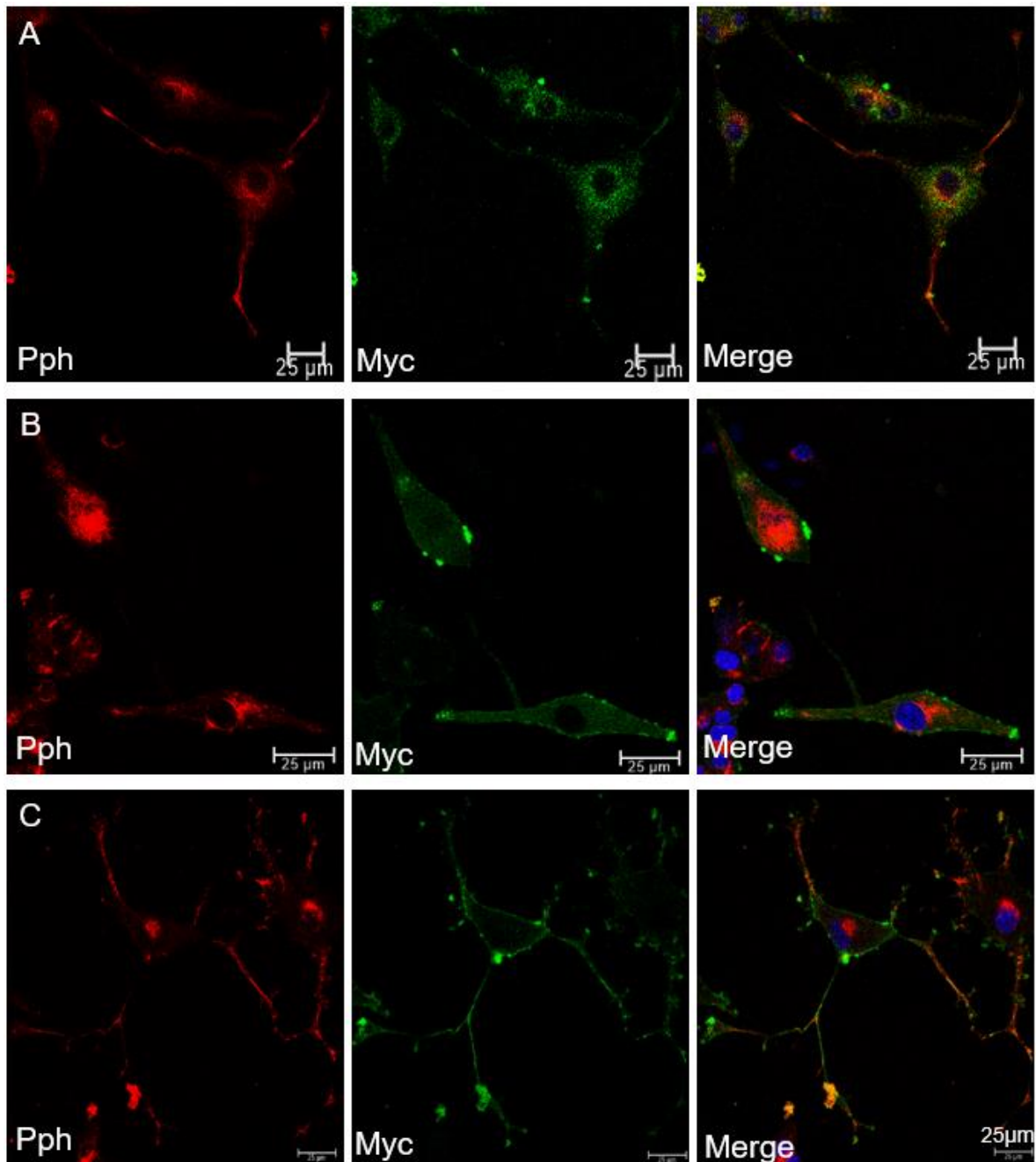


Figura 19. Distribución de las proteínas recombinantes $Myc-Dp71d_{\Delta 71}$, $Myc-Dp71d_{\Delta 71-74}$ y periferina en células PC12 Tet-On diferenciadas. Las células fueron tratadas con anticuerpos anti-Myc y anti-Pph. Se observan las proteínas recombinantes $Myc-Dp71d_{\Delta 71}$ y $Myc-Dp71d_{\Delta 71-74}$ (verde), periferina (rojo), la sobreposición de señales (MERGE) y el núcleo teñido con DAPI (azul). Todas las líneas celulares fueron inducidas con doxiciclina y las diferenciadas con NGF durante 9 días como se indica en Materiales y Métodos. A) PC12 Tet-On/Control. B) PC12 Tet-On/ $Dp71d_{\Delta 71}$. C) PC12 Tet-On/ $Dp71d_{\Delta 71-74}$. Se muestra la barra de escala en cada sección.

En la [figura 20-A, B y C](#) se muestra la distribución celular de VGF en las células PC12 Tet-On/Control, PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 sin diferenciar, se puede apreciar en color rojo a VGF distribuida por todo el citoplasma en todas las líneas celulares estudiadas, acumulándose en la periferia celular en PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74. En el caso de las células diferenciadas ([figura 21-A, B y C](#)) tanto en PC12 Tet-On/Control como PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 VGF disminuye casi por completo su distribución en el citoplasma, se distribuye a lo largo de las neuritas, concentrándose en las extremidades de estas, especialmente en los conos de crecimiento en la PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74. El núcleo se muestra teñido de azul y en verde se muestran las proteínas recombinantes Dp71. En las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 sin diferenciar se observa colocalización (merge) en todo el citoplasma entre Myc-Dp71d Δ 71 y VGF, mientras que en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 no se observa colocalización. En las células diferenciadas de PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 la colocalización es clara en los extremos de las neuritas, sitio en el que se acumula VGF.

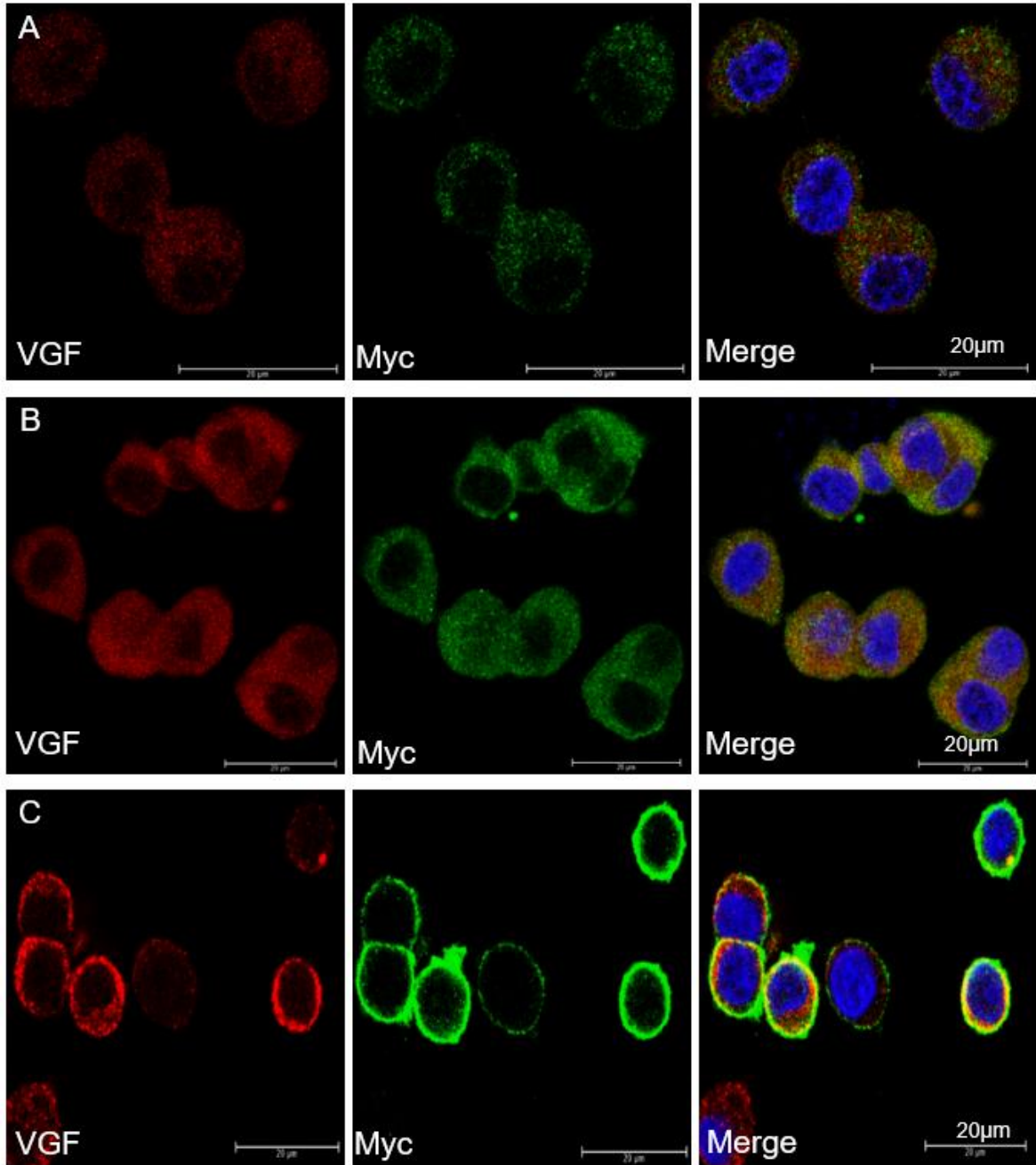


Figura 20. Distribución de las proteínas recombinantes *Myc-Dp71 Δ 71*, *Myc-Dp71 Δ 71-74* y VGF en células PC12 Tet-On no diferenciadas. Las células fueron tratadas con anticuerpos anti-Myc y anti-VGF. Se observan las proteínas recombinantes *Myc-Dp71 Δ 71* y *Myc-Dp71 Δ 71-74* (verde), VGF (rojo), la sobreposición de señales (MERGE) y el núcleo teñido con DAPI (azul). Todas las líneas celulares fueron inducidas con doxiciclina. A) PC12 Tet-On/Control. B) PC12 Tet-On/*Dp71 Δ 71*. C) PC12 Tet-On/*Dp71 Δ 71-74*. Se muestra la barra de escala en cada sección.

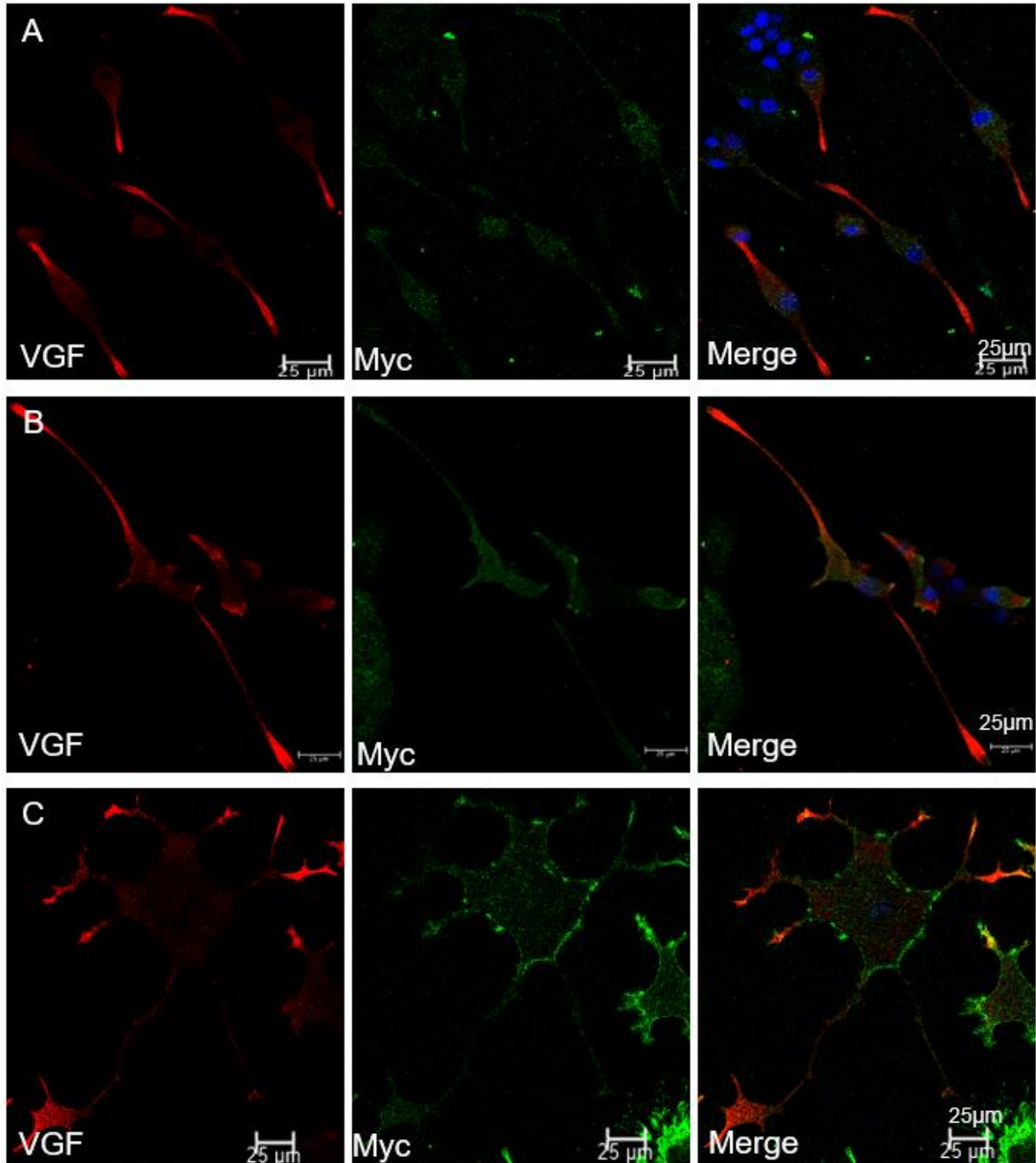


Figura 21. Distribución de las proteínas recombinantes *Myc-Dp71 Δ 71*, *Myc-Dp71 Δ 71-74* y VGF en células PC12 Tet-On diferenciadas. Las células fueron tratadas con anticuerpos anti-Myc y anti-VGF. Se observan las proteínas recombinantes *Myc-Dp71 Δ 71* y *Myc-Dp71 Δ 71-74* (verde), VGF (rojo), la sobreposición de señales (MERGE) y el núcleo teñido con DAPI (azul). Todas las líneas celulares fueron inducidas con doxiciclina y las diferenciadas con NGF durante 9 días como se indica en Materiales y Métodos. A) PC12 Tet-On/Control. B) PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71. C) PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71-74. Se muestra la barra de escala en cada sección.

Hasta el momento lámina A/C no se ha relacionado con la diferenciación neuronal, sin embargo, por su capacidad de interactuar con la polimerasa II podría estar relacionada con el mecanismo que promueve la expresión aumentada de las proteínas de interés para este trabajo. En la [figura 22-A](#) podemos observar la distribución celular de lámina A/C en células sin diferenciar PC12 Tet-On/Control se encuentra por todo el núcleo, mientras que en células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 además de encontrarse en el interior del núcleo, se acumula en la periferia nuclear ([figura 22-B y C](#)). Una vez diferenciadas las células la distribución de lámina A/C cambia ([figura 23-A, B y C](#)), en las tres líneas celulares lámina A/C se distribuye en el citoplasma, dentro y en la periferia del núcleo, aunque para las líneas PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 este cambio es más evidente. El núcleo se tiñó con DAPI (azul) y en verde las proteínas recombinantes Dp71. La colocalización de las proteínas recombinantes con lámina A/C no es clara.

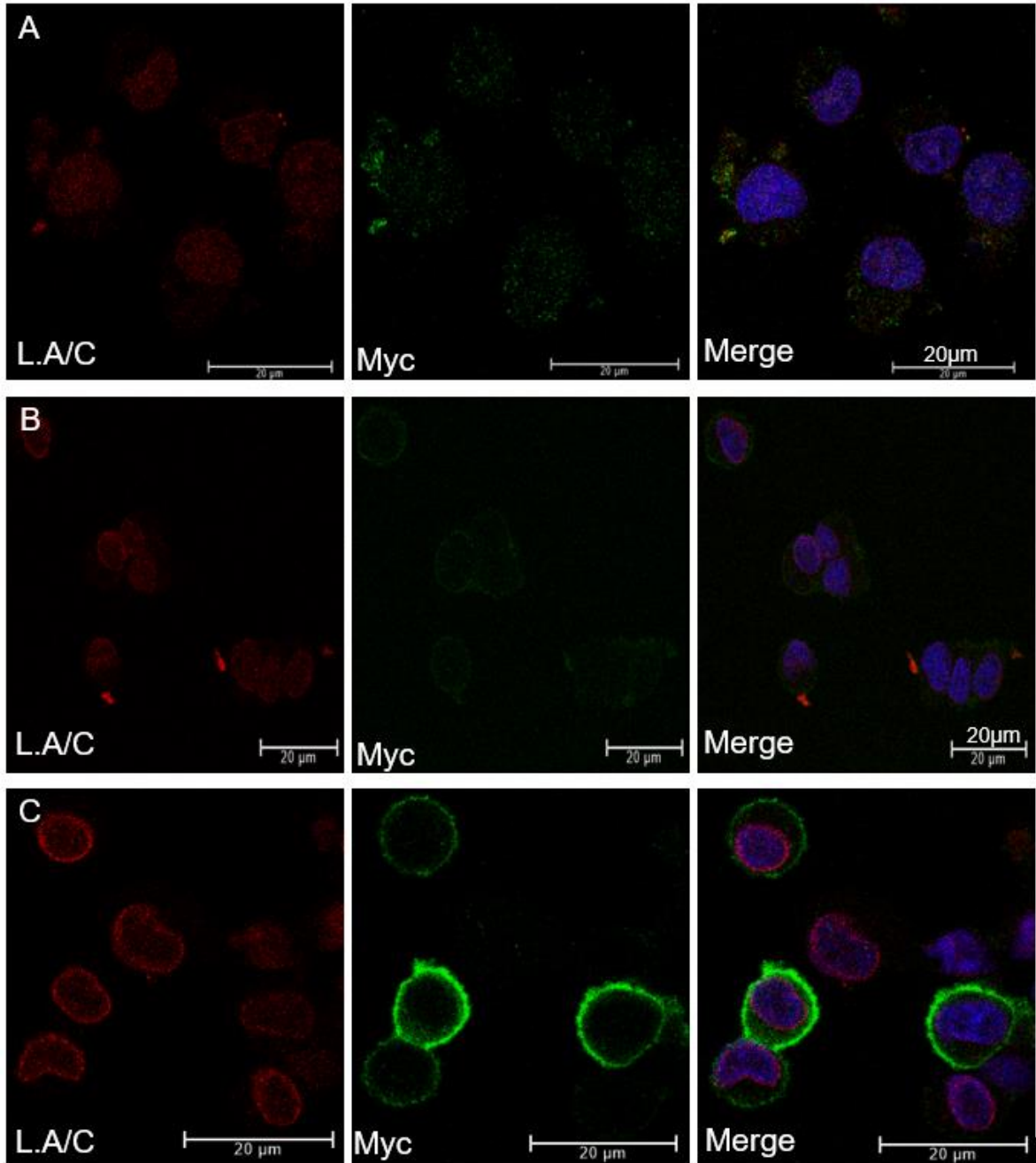


Figura 22. Distribución de las proteínas recombinantes *Myc-Dp71 Δ 71*, *Myc-Dp71 Δ 71-74* y lámina A/C en células PC12 Tet-On no diferenciadas. Las células fueron tratadas con anticuerpos anti-Myc y anti-LMNA. Se observan las proteínas recombinantes *Myc-Dp71 Δ 71* y *Myc-Dp71 Δ 71-74* (verde), lamina A/C (rojo), la sobreposición de señales (MERGE) y el núcleo teñido con DAPI (azul). Todas las líneas celulares fueron inducidas con doxiciclina. A) PC12 Tet-On/Control. B) PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71. C) PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71-74. Se muestra la barra de escala en cada sección.

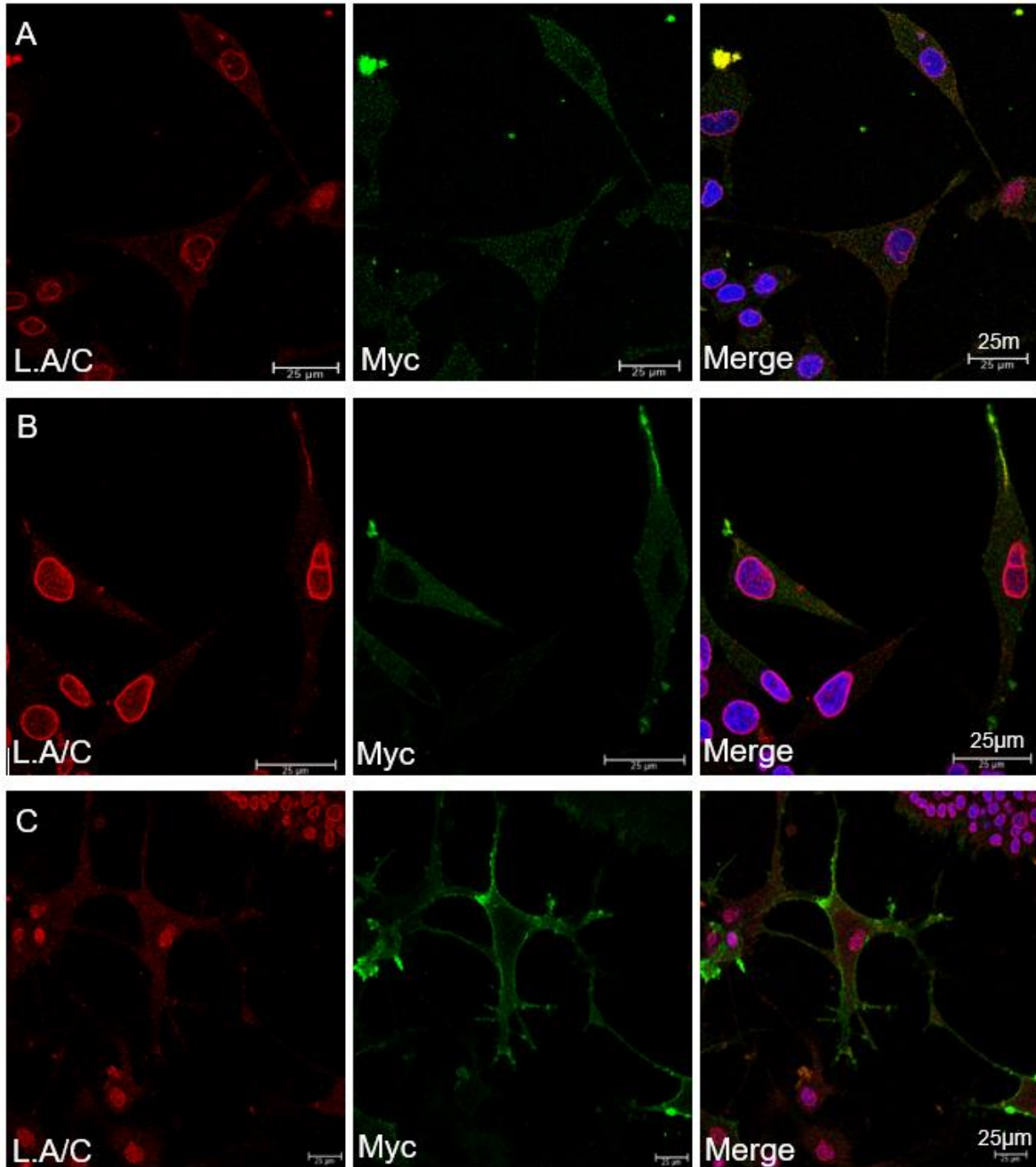


Figura 23. Distribución de las proteínas recombinantes Myc-Dp71 Δ 71, Myc-Dp71 Δ 71-74 y lámina A/C en células PC12 Tet-On diferenciadas. Las células fueron tratadas con anticuerpos anti-Myc y anti-LMNA. Se observan las proteínas recombinantes Myc-Dp71 Δ 71 y Myc-Dp71 Δ 71-74 (verde), lamina A/C (rojo), la sobreposición de señales (MERGE) y el núcleo teñido con DAPI (azul). Todas las líneas celulares fueron inducidas con doxiciclina y las diferenciadas con NGF durante 9 días como se indica en Materiales y Métodos. A) PC12 Tet-On/Control. B) PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71. C) PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71-74. Se muestra la barra de escala en cada sección.

La tabla 6 reúne la información sobre la distribución de las proteínas anexina A1, HspB1, periferina y VGF indicando los sitios en los que estas proteínas se encuentran en cada línea celular, tanto en células no diferenciadas como en células diferenciadas. Además, los sitios marcados en color gris representan los lugares de las células en los que hay colocalización entre la proteína de interés y la proteína recombinante.

Tabla 6. Distribución y colocalización de anexina A1, HspB1, periferina, VGF y lamina A/C en células PC12 Tet-On/Control, PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71-74.

	Células sin diferenciar			Células diferenciadas		
	Control	Dp71 Δ 71	Dp71 Δ 71-74	Control	Dp71 Δ 71	Dp71 Δ 71-74
Anexina A1	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma Neuritas	Citoplasma Neuritas	Citoplasma Neuritas
HspB1	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma Neuritas	Citoplasma Neuritas	Citoplasma Neuritas Conos de crecimiento
Periferina	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma A lado del núcleo	Citoplasma A lado del núcleo	Citoplasma Al lado del núcleo	Citoplasma A lado del núcleo Conos de crecimiento
VGF	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma Neuritas	Citoplasma Neuritas Extremo de las neuritas	Citoplasma Extremo de las neuritas Conos de crecimiento
Lámina A/C	Núcleo	Núcleo Periferia del núcleo	Núcleo Periferia del núcleo	Citoplasma Núcleo Periferia del núcleo	Citoplasma Núcleo Periferia del núcleo	Citoplasma Núcleo Periferia del núcleo

8. DISCUSIÓN

La Dp71 es una proteína multifuncional ya que se ha relacionado con diversos procesos como la formación de complejos con glicoproteínas de membrana (Ervasti & Campbell, 1991; Romo-Yáñez et al., 2020) formando el DAPC, la reestructuración del citoesqueleto de actina (Howard et al., 1999), en adhesión y división celular (Tadayoni et al., 2012) así como en la diferenciación de células PC12 (Naidoo & Anthony, 2020). Dp71 es la distrofina que se expresa en mayor nivel en el SNC y se ha visto que participa en la formación y/o estabilización de los DAPC en cerebro (Greenberg et al., 1996) sin embargo, su función precisa aún no es muy clara. En un estudio con ratones que no expresan la Dp71 por modificación genética, mediante recombinación homóloga, sugiere que la ausencia de esta proteína promueve un déficit cognitivo grave (Daoud et al., 2009). Para profundizar en el conocimiento de la función de Dp71 se ha utilizado como modelo a las células PC12, las cuales expresan isoformas de Dp71 que resultan del corte y empalme del mRNA (Aragón et al., 2016). Específicamente la sobreexpresión de estas isoformas de Dp71 utilizando el sistema PC12 Tet-On ha ayudado a entender un poco más su participación en el desarrollo neuronal.

Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 están presentes en distintas regiones del cerebro en etapas adultas de ratón por lo que sus funciones también se creen son distintas, aunque complementarias (Gonzalez-Reyes, en preparación). En células PC12 Dp71d Δ 71 se encuentra en el citoplasma, mientras que Dp71d Δ 71-74 en la periferia celular, además la sobreexpresión de estas proteínas en células PC12 Tet-On demuestran que Dp71d Δ 71 promueve la proliferación mientras que Dp71d Δ 71-74 el desarrollo de ne (Moreno León, 2016).

Para entender mejor la participación de Dp71d Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 durante la diferenciación de las células PC12 Tet-on, en este trabajo nos enfocamos en validar los resultados del análisis proteómico realizado por Merino-Jiménez (en preparación), específicamente, en analizar las proteínas que mostraron una expresión aumentada en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 después de 9 días de

diferenciación con NGF y compararlas con las células PC12 Tet-On/Control y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71.

En el análisis proteómico realizado utilizando células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74, HspB1 presentó un aumento de 4.41 veces, mientras que mediante western blot se demostró que aumenta aproximadamente 3 veces, si bien, los resultados de estos experimentos no son estadísticamente significativos, coinciden en un incremento claro de esta proteína. Mientras tanto las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 que se caracterizan por presentar un incremento en la proliferación, (Moreno León, 2016) expresa niveles bajos de la proteína HspB1, en menor medida que PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 e incluso menor que las células control PC12.

HspB1 es una proteína de choque térmico con funciones ubicuas que se ha relacionado con el transporte axonal de neurofilamentos (Holmgren et al., 2013), con la unión lateral a pequeños microtúbulos en regiones no centrosomales (Almeida-Souza et al., 2013) y con el crecimiento de neuritas (García-Cruz et al., 2019; Merino-Jiménez et al., 2016). Específicamente la forma fosforilada de HspB1 podría estar interactuando con los filamentos de actina y así promover la reestructuración del citoesqueleto (Merino-Jiménez et al., 2016). Estos hallazgos fueron descritos en células PC12 que sobreexpresan las isoformas Dp71e Δ 71 y Dp71 Δ 78-79. Las funciones ya descritas de HspB1 se correlacionan estrechamente con lo que se consideran los requisitos básicos para la neuritogénesis: una red de actina periférica y matrices de microtúbulos (Flynn, 2013). Por lo que la distribución descrita de HspB1 en este trabajo era esperada, ya que en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 diferenciadas se encuentra distribuida a lo largo de las neuritas con claras acumulaciones en los conos de crecimiento los cuales en células neuronales dan origen a los axones y dendritas (Flynn, 2013). Mientras que en las PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 al tener menor desarrollo de neuritas, HspB1 no se acumula ya que no se forman conos de crecimiento, sin embargo, si se distribuye en las neuritas cortas que forma esta línea celular. La colocalización en ambas líneas celulares es muy clara, ya que Myc-Dp71d Δ 71-74 se localiza principalmente en la membrana celular y las neuritas y Myc-Dp71d Δ 71 se distribuye por el citoplasma, sin embargo, esto

solamente sugiere que podrían estar en sitios cercanos mas no asegura una interacción, por lo que ensayos de co-inmunoprecipitación ayudarían a elucidar si hay interacción o solo cumplen sus funciones en sitios aledaños.

Otra proteína analizada fue periferina la cual mostró un aumento de 2.27 veces en el análisis proteómico, comprobándose en este trabajo por western blot, que efectivamente aumenta al doble la expresión de periferina en células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 comparada con las células PC12 Tet-On/Control y solamente alrededor de 1.70 veces más respecto a las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71. Es importante mencionar que estos resultados consisten en dos experimentos independientes, por lo que realizar un tercer experimento permitiría obtener resultados significativos.

Periferina forma parte de las proteínas de filamento intermedio (Ecurat et al., 1990), es necesaria para el mantenimiento estructural de los conos de crecimiento neurales (Undamatla & Szaro, 2001). En células PC12 se ha descrito la distribución de periferina en el citoplasma y principalmente en las neuritas (Lee et al., 2012), siendo indispensable su participación en la iniciación, extensión y mantenimiento de las mismas (Helfand et al., 2003) Esto puede explicar la colocación entre Myc-Dp71d Δ 71-74 y periferina en las extensiones neuríticas. Además, periferina presenta propiedades móviles, ya que se ha demostrado que se transporta a través del cuerpo celular de las células PC12, las neuritas y los conos de crecimiento (Helfand et al., 2003). La distribución de periferina en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 coincide con lo que se ha descrito en células PC12, estando presente principalmente en las extensiones neuríticas y los conos de crecimiento de las células diferenciadas. Esto es importante de considerar porque la mayor parte de las proteínas son sintetizadas en el cuerpo celular, y las neuronas deben mover todas las proteínas necesarias a las partes más distales de los axones (Brady & Lasek, 1982).

Los resultados de western blot de este trabajo revelan que VGF en células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 aumenta al doble comparado con las células control, mientras que en el análisis proteómico esta proteína aumenta su expresión 5.19

veces. Sin embargo, al comparar las células control y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71, VGF aumenta hasta 30 veces en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74. Por lo anterior, es importante realizar un tercer experimento y poder analizar las diferencias entre líneas celulares. Es importante entender como la sobreexpresión de Myc-Dp71d Δ 71-74 estaría afectando o estimulando la expresión no solamente de VGF si no de las proteínas ya descritas anteriormente que se relacionan con el desarrollo neurítico.

La proteína neurosecretora VGF ayuda a promover la formación de vesículas inmaduras centrales grandes y densas (LDCV) (Fargali et al., 2014). Para la maduración de estas vesículas es necesario su transporte hacia las terminales presinápticas (Merighi, 2018) una vez maduras pueden secretar su contenido mediante exocitosis desde el axón o las dendritas hacia el espacio extracelular (Garcia et al., 2005) y promover nuevamente la síntesis de VGF intracelular (Severini et al., 2008). Estas funciones podrían explicar su distribución en los extremos de las neuritas observada tanto en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 como en las PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74, sitios en los que también se puede ver colocalización entre las proteínas recombinantes y VGF. Hasta el momento no se ha descrito relación de VGF con la diferenciación de células neurales, por lo que los resultados aquí mostrados abren camino a seguir estudiando como esta proteína se ve altamente sobreexpresada por el efecto de las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74.

Otra de las proteínas analizadas fue anexina A1, la cual forma parte de la familia de anexinas que se caracterizan por ser proteínas de unión a fosfolípidos dependientes de calcio, (Swairjo & Seaton, 1994) aunque todas comparten el dominio central que les confiere esa característica, también tienen una región altamente variable, el dominio de interacción N-terminal (Liemann & Lewit-Bentley, 1995). Anexina A1 se relaciona con la organización de la membrana celular (Réty et al., 2000), además mantiene la integridad de la barrera hematoencefálica a través de la colocalización con los filamentos de actina presentes en las uniones célula-célula (McArthur et al., 2016). Dentro de sus funciones está promover la estabilización del citoesqueleto de actina (Sheikh & Solito, 2018) lo que la relaciona

con el desarrollo de neuritas, sin embargo, hasta el momento no hay estudios que la relacionen con dicha función. En las células control, PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 encontramos que se distribuye en el citoplasma, formando acumulaciones en sitios cercanos al núcleo, mientras que en las células diferenciadas colocaliza en las extensiones neuríticas y regiones cercanas a estas en el citoplasma por lo que entender la relación entre las proteínas recombinantes y anexina A1 mediante ensayos de co-inmunoprecipitación podría ayudar a entender mejor su participación en la diferenciación celular.

La proteína lámina A/C es codificada por el gen LMNA, ambas proteínas se encuentran principalmente en la periferia nuclear y una pequeña fracción en el interior del núcleo (Hozak et al., 1995). En células PC12 Tet-On/Dp40 a los 6 y 12 días de diferenciación con NGF, lámina A/C se distribuye en la periferia nuclear, mientras que en la línea celular mutante PC12 Tet-On/Dp40 Δ L170 a los 6 días de diferenciación se distribuye por el interior y la periferia del núcleo. Sin embargo transcurridos 12 días de diferenciación únicamente se encuentra en la periferia nuclear (Sanchez-Perez, 2022). En los resultados obtenidos en este proyecto, se observa que en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 la distribución de lámina A/C es similar a la línea celular PC12 Tet-On/Dp40, sin embargo, en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 sin diferenciar la distribución de la proteína es como en las PC12 Tet-On/Dp40 Δ L170 distribuida en el interior del núcleo considerando que esta línea celular mutante resulta en una baja diferenciación, entonces, lámina A/C en las PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 se distribuye como en las células que sobreexpresan a Dp40 mutante. Cuando las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 son diferenciadas durante 9 días con NGF, la distribución de lámina A/C cambia completamente, ya que esta se acumula en el interior y periferia del núcleo, además de migrar al citoplasma e incluso hasta las proyecciones neuríticas. Este comportamiento de lámina A/C no ha sido descrito antes por lo que podemos relacionarlo directamente con la sobreexpresión de Myc-Dp71d Δ 71-74.

Dentro del núcleo las láminas regulan la actividad génica mediante la RNA polimerasa II (Spann et al., 2002), además pueden interactuar con receptores de

heterocromatina en la periferia nuclear y eucromatina en el interior del núcleo (Montes de Oca et al., 2009). Por lo que podemos suponer que la acumulación de lámina A/C como efecto de la expresión de Myc-Dp71d Δ 71-74 podría regular la expresión aumentada de las proteínas relacionadas a la neuritogénesis. Sería interesante evaluar, con experimentos de western blot si se observa un aumento en la expresión de estas proteínas como resultado del efecto de Myc-Dp71d Δ 71-74.

Finalmente, para entender mejor la interacción entre Myc/Dp71 Δ 71-74 y las proteínas identificadas mediante proteómica en la línea celular PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71-74, se realizó un análisis del interactoma considerando las 106 proteínas con expresión aumentada y 77 con expresión disminuida identificadas en el trabajo de Merino-Jiménez.

En un primer análisis para identificar los procesos biológicos en los cuales pudieran estar relacionadas estas proteínas se obtuvo la gráfica mostrada en la [figura 24](#). De todos los procesos identificados en el décimo lugar se encuentran proteínas que se relacionan con la regulación positiva del ciclo celular, esto es importante ya que la proliferación de las células PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71-74 se ve disminuida conforme avanza el proceso de diferenciación, mientras que en el lugar 26 están proteínas relacionadas con el desarrollo neuronal, entre las cuales se encuentran HspB1, periferina y VGF.

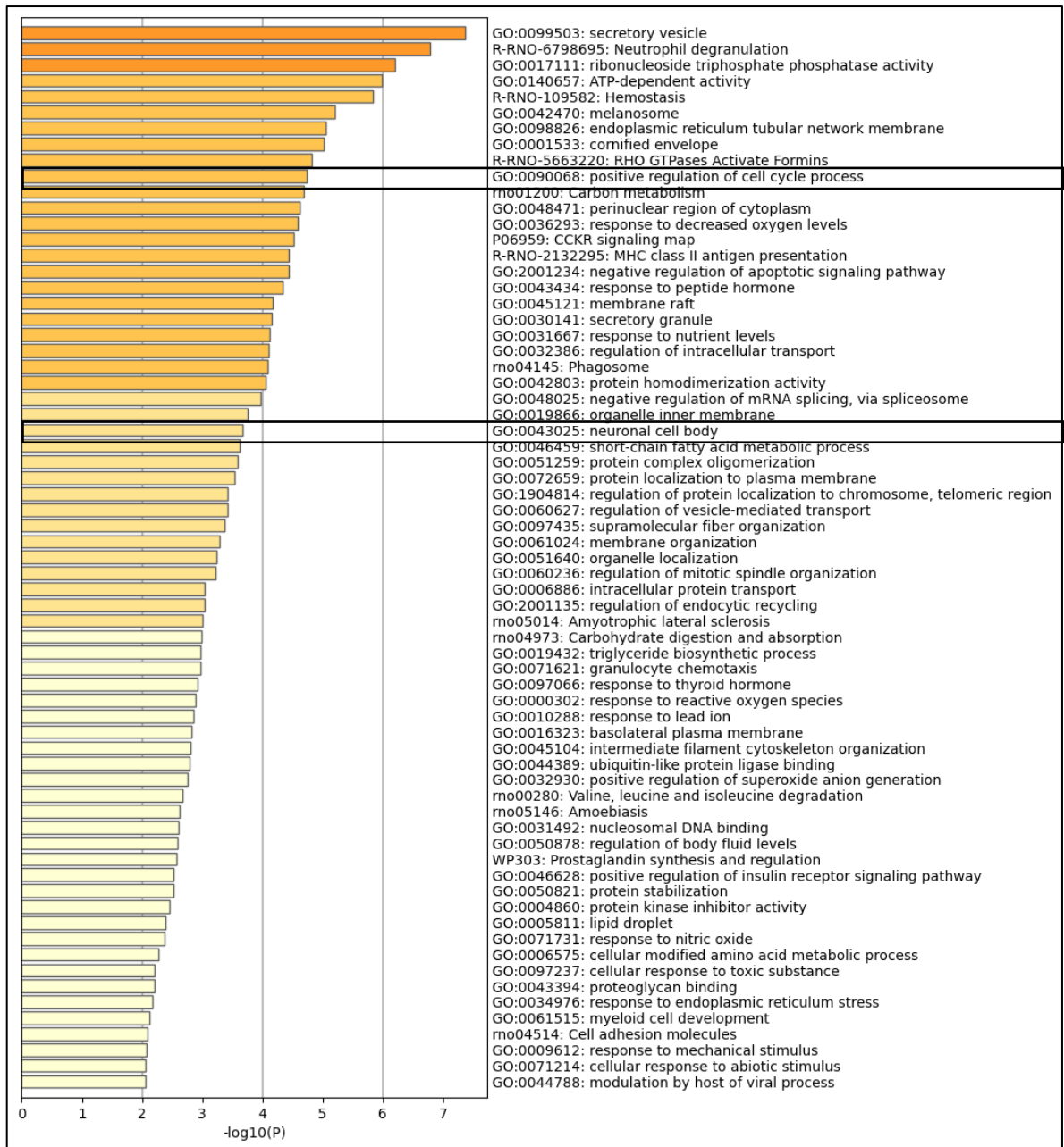


Figura 24. Procesos biológicos relacionados con las proteínas de expresión diferencial en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74. El análisis se realizó mediante Metascape.

En la [figura 25](#) se muestra el interactoma de las 182 proteínas en conjunto, sin embargo, no es muy clara la relación entre los procesos celulares y las proteínas de interés. En rojo se aprecian proteínas relacionadas con el ciclo celular y en amarillo relacionadas con el citoesqueleto. Anexina A1 se encuentra relacionada a

ambos procesos, perifera solo al citoesqueleto, mientras que VGF y HspB1 no los relaciona con alguno de los dos procesos.

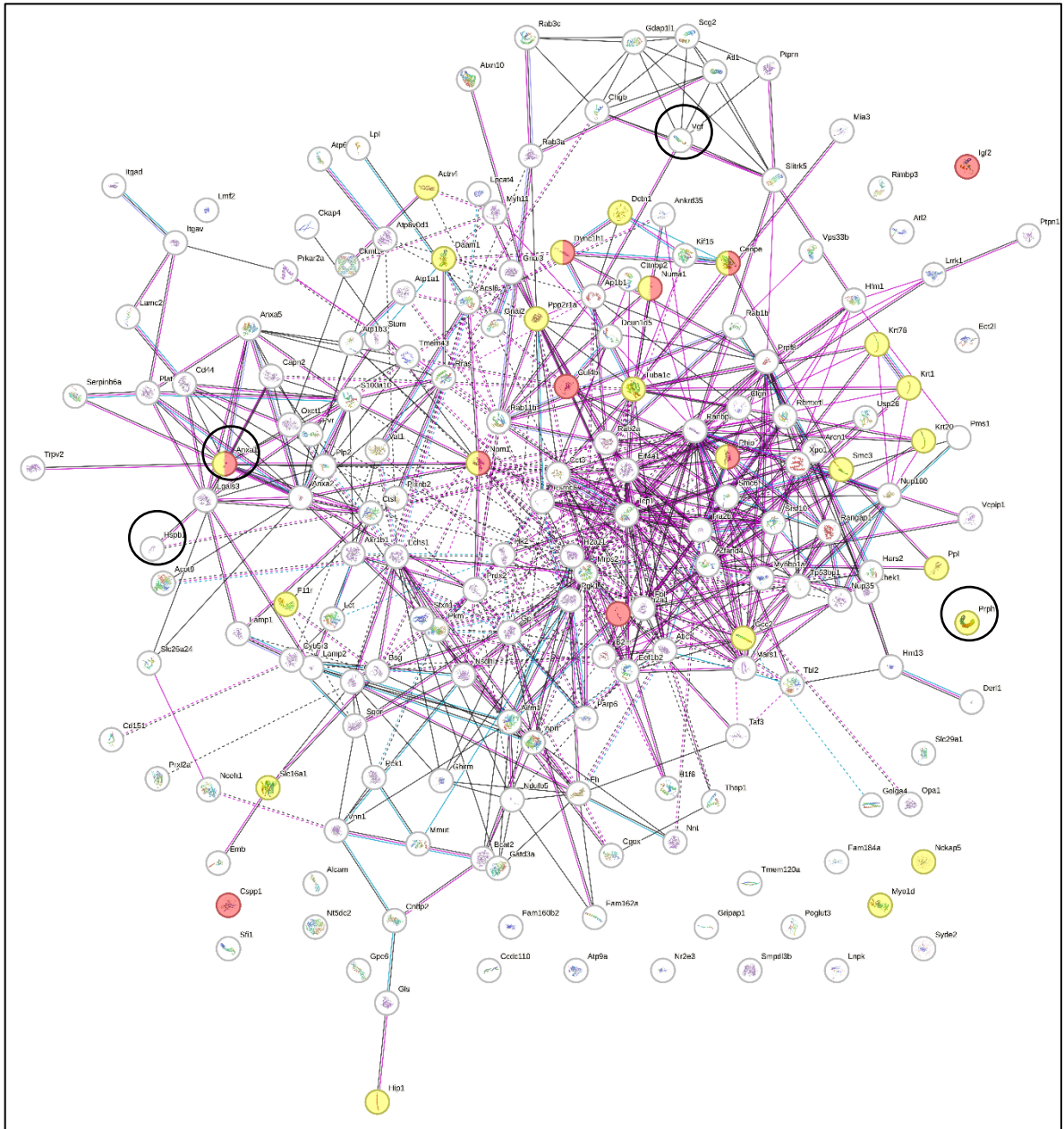


Figura 25. Interactoma de las proteínas con expresión diferencial en las células PC12 Tet-On/Dp71d₇₁₋₇₄. En color rojo las proteínas que se relacionan con el ciclo celular, en color amarillo las proteínas relacionadas con el citoesqueleto. Resultados obtenidos mediante String.

Para entender mejor cuales proteínas podrían estar participando en procesos biológicos específicos, se realizó el interactoma de manera independiente. Como resultado, en el interactoma de las proteínas que disminuye su expresión, encontramos proteínas que se asocian con la regulación positiva del ciclo celular específicamente, con el proceso de mitosis ([figura 26](#)). Esto podría justificar la disminución de la proliferación de las células PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71-74.

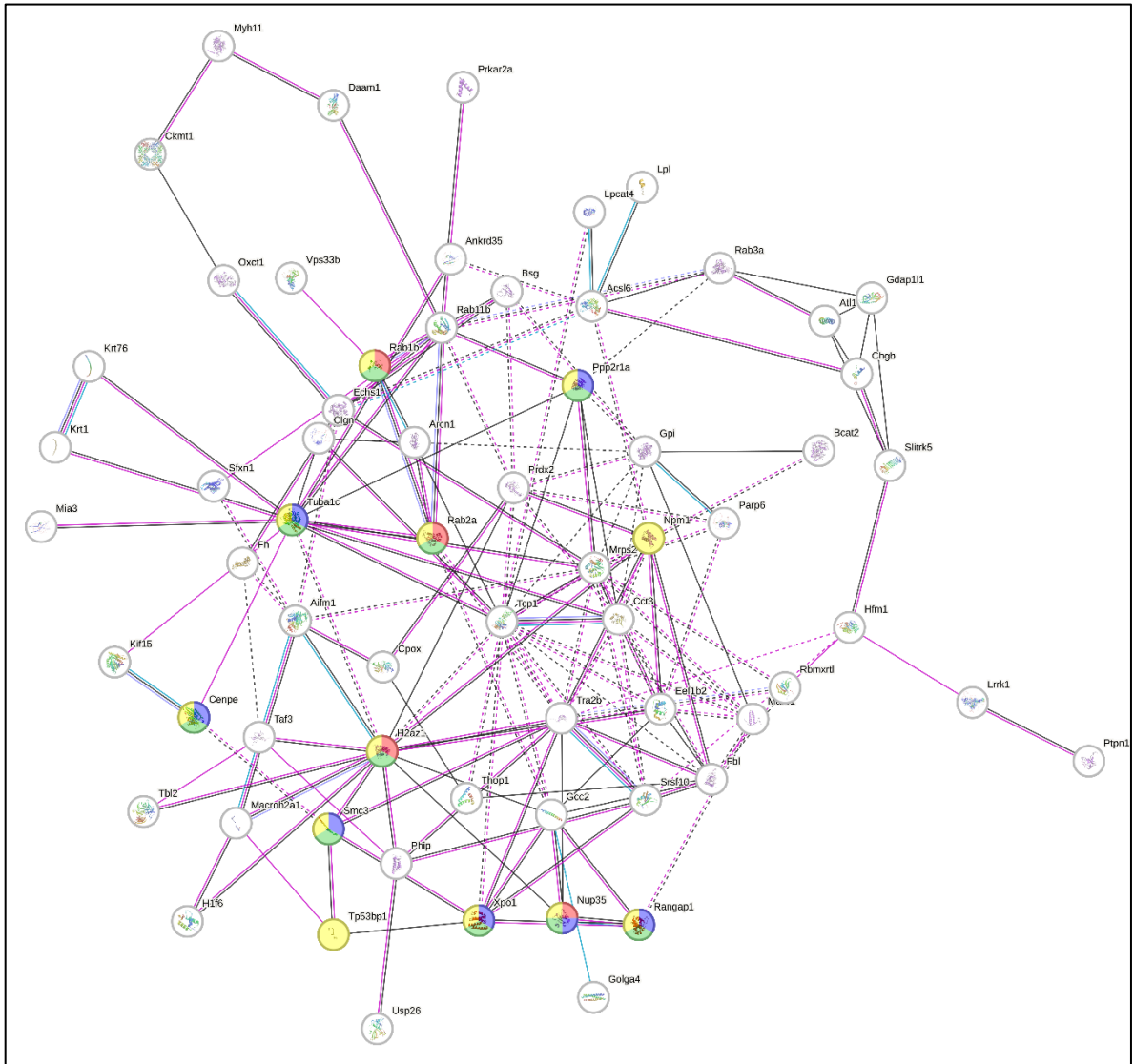


Figura 26. Interactoma de las proteínas con expresión disminuida en las células PC12 Tet-On/Dp71 Δ 71-74. Cada color representa la relación de la proteína con un proceso, rojo=profase, azul=anafase, verde=fase M y amarillo=ciclo celular. Resultados obtenidos mediante String.

Mientras que, el interactoma de las proteínas con expresión aumentada refleja relación con procesos como proyecciones neuronales, dendritas, citoesqueleto y desarrollo neuronal ([figura 27](#)). En este análisis es más clara la participación de VGF, HspB1 y periferina en estos procesos, aunque deja ver que probablemente la manera en la que llevan a cabo sus funciones es independiente entre sí. En el caso de anexina A1, no se observa relación con algún proceso relacionado con la diferenciación neuronal.

Por lo que podríamos relacionar entonces la sobreexpresión de Myc/Dp71 Δ 71-74 con la diferenciación celular, específicamente el desarrollo de neuritas, al encontrar niveles aumentados de la expresión de proteínas que participan en procesos relacionados como el re-arreglo del citoesqueleto. Y, por otro lado, entendiendo también la lenta proliferación de esta línea celular, al tener bajos niveles de proteínas que regulan positivamente el ciclo celular.

9. CONCLUSIONES

- En las tres líneas celulares anexina A1 se encuentra ubicada en el citoplasma, al diferenciar las células esta también se extiende por las neuritas. Colocaliza en el citoplasma y neuritas con las proteínas recombinantes.
- HspB1 se distribuye por todo el citoplasma en las tres líneas celulares, al diferenciar las células se extiende también por las neuritas, en PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 se extiende además en los conos de crecimiento. Colocaliza con PC12 Tet-On/Control y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 en células no diferenciadas en el citoplasma y diferenciadas en citoplasma y neuritas, mientras que con PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 únicamente en diferenciadas en citoplasma, neuritas y conos de crecimiento.
- En las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 los niveles de HspB1 aumenta 2 veces en células sin diferenciar y 3 veces en células diferenciadas comparadas con las PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Control.
- Periferina se distribuye por el citoplasma en las tres líneas celulares sin diferenciar, pero, en PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 además se acumula a lado del núcleo. En células diferenciadas la acumulación a lado del núcleo es más evidente en las tres líneas celulares y en PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 se encuentra también en los conos de crecimiento. Únicamente colocaliza con las células diferenciadas de PC12 Tet-On/Control a lado del núcleo y con PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 en las neuritas y conos de crecimiento.
- Los niveles de periferina en las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 aumentaron 2 veces en las células sin diferenciar y diferenciadas con respecto a las células PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71, y en PC12 Tet-On/Control 3 veces en ambas condiciones
- En las tres líneas celulares sin diferenciar VGF se encuentra en el citoplasma, al diferenciar se ubica en las neuritas y en el extremo de estas en las tres líneas celulares. Colocaliza en el citoplasma con PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y en las neuritas y conos de crecimiento con PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74.

- VGF fue la proteína que mostró más diferencia en su expresión aumentando 3 veces en las células sin diferenciar y 30 veces en las células diferenciadas en la línea celular PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 comparada con la PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71, mientras que en PC12 Tet-On/Control fue 3 y 2 veces respectivamente.
- La ubicación subcelular de lámina A/C en células sin diferenciar es el núcleo y para PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71 y PC12 Tet-On/Dp71d Δ 71-74 además está en la periferia nuclear. En las células diferenciadas, para las tres líneas celulares lámina A/C cambia de distribución y se encuentra tanto en el núcleo, en la periferia nuclear y además en el citoplasma.
- Se ha validado el incremento en la expresión de las proteínas identificadas en el análisis proteómico. A pesar de que los niveles de cambio de expresión no son iguales entre el análisis proteómico y western blot, todas mostraron un incremento.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar el triplicado de los experimentos de western blot, para saber si existe una diferencia significativa en el nivel de expresión de las proteínas HspB1, periferina y VGF.
- Analizar mediante ensayos de co-inmunoprecipitación la interacción entre las proteínas recombinantes Dp71 y las proteínas HspB1, periferina y VGF, que permitirá identificar si las proteínas en estudio forman parte de complejos.
- Confirmar mediante ensayos de western blot el aumento de la expresión de lámina A/C.
- También sería interesante analizar las proteínas que tienen expresión disminuida y entender mejor por qué Tet-On/ Dp71 Δ 71-74 prolifera más lento.
- Con el objeto de confirmar la participación de estas proteínas en la diferenciación neuronal, bloquear las proteínas HspB1, anexina A1, periferina y VGF mediante anticuerpos y así ver su efecto sobre el desarrollo de neuritas.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, R., Montañez, C., Fuentes-Mera, L., Gonzalez, E., Gómez, P., Quintero-Mora, L., Mornet, D., Alvarez-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>
- Almeida-Souza, L., Asselbergh, B., De Winter, V., Goethals, S., Timmerman, V., & Janssens, S. (2013). HSPB1 Facilitates the Formation of Non-Centrosomal Microtubules. *PLoS ONE*, 8(6), 66541. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0066541>
- Anderson, J. L., Head, S. I., Rae, C., & Morley, J. W. (2002). Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain: A Journal of Neurology*, 125(Pt 1), 4–13. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWF012>
- Aragón, J., González-Reyes, M., Romo-Yáñez, J., Vacca, O., Aguilar-González, G., Rendón, A., Vaillend, C., & Montañez, C. (2018). Dystrophin Dp71 Isoforms Are Differentially Expressed in the Mouse Brain and Retina: Report of New Alternative Splicing and a Novel Nomenclature for Dp71 Isoforms. *Molecular Neurobiology*, 55(2), 1376–1386. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0405-x>
- Aragón, J., Martínez-Herrera, A., Romo-Yáñez, J., Ceja, V., Azotla-Vilchis, C., Siqueiros-Márquez, L., Soid-Raggi, G., Herrera-Salazar, A., & Montañez, C. (2016). Identification of Dp71 Isoforms Expressed in PC12 Cells: Subcellular Localization and Colocalization with β -Dystroglycan and α 1-Syntrophin. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 58(2), 201–209. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0657-8>
- Aragón, J., Romo-Yáñez, J., Martínez-Herrera, A., Ceja, V., Rendon, A., & Montañez, C. (2011). Characterization of Dp71 Δ (78-79), a novel dystrophin mutant that stimulates PC12 cell differentiation. *Journal of Neurochemistry*, 119(4), 697–707. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2011.07347.X>
- Austin, R. C., Howard, P. L., D'Souza, V. N., Klamut, H. J., & Ray, P. N. (1995). Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Human Molecular Genetics*, 4(9), 1475–1483. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.9.1475>
- Azotla-Vilchis, C. (2020). *Identificación de proteínas que interaccionan con las distrofínas Dp71d[delta]₇₁, Dp71d[delta]₇₁₋₇₄ y Dp40 en células PC12*. CINVESTAV.
- Bar, S., Barnea, E., Levy, Z., Neuman, S., Yaffe, D., & Nudel, U. (1990). A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *The Biochemical Journal*, 272(2), 557–560. <https://doi.org/10.1042/bj2720557>
- Bladen, C. L., Salgado, D., Monges, S., Foncuberta, M. E., Kekou, K., Kosma, K., Dawkins, H., Lamont, L., Roy, A. J., Chamova, T., Guerguelcheva, 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), 395–402. <https://doi.org/10.1002/HUMU.22758>
- Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., & Davies, K. E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological Reviews*, 82(2), 291–329. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2001>
- Brady, S. T., & Lasek, R. J. (1982). Chapter 18 Axonal Transport: A Cell-Biological Method for Studying Proteins That Associate with the Cytoskeleton. *Methods in Cell Biology*, 25(C), 365–398. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61434-X](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61434-X)
- Bringmann, A., & Reichenbach, A. (2001). Role of Muller cells in retinal degenerations. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 6, E72–92. <https://doi.org/10.2741/bringman>
- 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>
- Cerna, J., Osuna-Castro, J. A., Muñiz, J., Mornet, D., García-Sierra, F., & Cisneros, B. (2009). Dystrophin Dp71f associates with components of the beta1-integrin adhesion complex in PC12 cell neurites. *Acta Neurologica Belgica*, 109(2), 132–135.
- 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)
- Crawford, A. H., Hildyard, J. C. W., Rushing, S. A. M., Wells, D. J., Diez-Leon, M., & Piercy, R. J. (2022). Validation of DE50-MD dogs as a model for the brain phenotype of Duchenne muscular dystrophy. *Disease Models & Mechanisms*, 15(3). <https://doi.org/10.1242/dmm.049291>
- D'alessandro, R., Ragusa, N., Vacchetti, M., Rolle, E., Rossi, F., Brusa, C., Davico, C., Vitiello, B., Mongini, T., & Ricci, F. S. (2021). Assessing Cognitive Function in Neuromuscular Diseases: A Pilot Study in a Sample of Children and Adolescents. *Journal of Clinical Medicine*, 10(20). <https://doi.org/10.3390/JCM10204777>
- Daoud, F., Angeard, N., Demerre, B., Martie, I., Benyaou, R., Leturcq, F., Cossée, M., Deburgrave, N., Saillour, Y., Tuffery, S., Urtizberea, 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>

- Daoud, F., Candelario-Martínez, A., Billard, J.-M., Avital, A., Khelifaoui, M., Rozenvald, Y., Guegan, M., Mornet, D., Jaillard, D., Nudel, U., Chelly, J., Martínez-Rojas, D., Laroche, S., Yaffe, D., & Vaillend, C. (2008). Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions. *PloS One*, 4(8), e6574–e6574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006574>
- Davies, K. E., & Nowak, K. J. (2006). Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(10), 762–773. <https://doi.org/10.1038/NRM2024>
- Deconinck, N., & Dan, B. (2007). Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatric Neurology*, 36(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2006.09.016>
- Doorenweerd, N. (2020). Combining genetics, neuropsychology and neuroimaging to improve understanding of brain involvement in Duchenne muscular dystrophy - a narrative review. *Neuromuscular Disorders: NMD*, 30(6), 437–442. <https://doi.org/10.1016/J.NMD.2020.05.001>
- Emery, A. E. H. (2002). The muscular dystrophies. *Lancet (London, England)*, 359(9307), 687–695. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07815-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07815-7)
- Ervasti, J. M., & Campbell, K. P. (1991). Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, 66(6), 1121–1131. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90035-W](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90035-W)
- Escurat, M., Djabali, K., Gumpel, M., Gros, F., & Portier, M. M. (1990). Differential expression of two neuronal intermediate-filament proteins, peripherin and the low-molecular-mass neurofilament protein (NF-L), during the development of the rat. *The Journal of Neuroscience*, 10(3), 764. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-03-00764.1990>
- Fargali, S., Garcia, A. L., Sadahiro, M., Jiang, C., Janssen, W. G., Lin, W. J., Cogliani, V., Elste, A., Mortillo, S., Cero, C., Veitenheimer, B., Graiani, G., Pasinetti, G. M., Mahata, S. K., Osborn, J. W., Huntley, G. W., Phillips, G. R., Benson, D. L., Bartolomucci, A., & Salton, S. R. (2014). The granin VGF promotes genesis of secretory vesicles, and regulates circulating catecholamine levels and blood pressure. *The FASEB Journal*, 28(5), 2120. <https://doi.org/10.1096/FJ.13-239509>
- Flynn, K. C. (2013). The cytoskeleton and neurite initiation. *Bioarchitecture*, 3(4), 86. <https://doi.org/10.4161/BIOA.26259>
- Fort, P. E., Sene, A., Pannicke, T., Roux, M. J., Forster, V., Mornet, D., Nudel, U., Yaffe, D., Reichenbach, A., Sahel, J. A., & Rendon, A. (2008). Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Müller retinal glial cell membrane. *Glia*, 56(6), 597–610. <https://doi.org/10.1002/glia.20633>
- 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>
- 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 Δ 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, A. L., Han, S. K., Janssen, W. G., Khaing, Z. Z., Ito, T., Glucksman, M. J., Benson, D. L., & Salton, S. R. J. (2005). A prohormone convertase cleavage site within a predicted alpha-helix mediates sorting of the neuronal and endocrine polypeptide VGF into the regulated secretory pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(50), 41595–41608. <https://doi.org/10.1074/JBC.M509122200>
- Górecki, D. C., Monaco, A. P., Derry, J. M., Walker, A. P., Barnard, E. A., & Barnard, P. J. (1992). Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Human Molecular Genetics*, 1(7), 505–510. <https://doi.org/10.1093/hmg/1.7.505>
- 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>
- 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>
- Helfand, B. T., Mendez, M. G., Pugh, J., Delsert, C., & Goldman, R. D. (2003). A Role for Intermediate Filaments in Determining and Maintaining the Shape of Nerve Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 14(12), 5069. <https://doi.org/10.1091/MBC.E03-06-0376>
- Hendriksen, R. G. F., Hoogland, G., Schipper, S., Hendriksen, J. G. M., Vles, J. S. H., & Aalbers, M. W. (2015). A possible role of dystrophin in neuronal excitability: a review of the current literature. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 51, 255–262. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2015.01.023>

- Holmgren, A., Bouhy, D., De Winter, V., Asselbergh, B., Timmermans, J. P., Irobi, J., & Timmerman, V. (2013). Charcot–Marie–Tooth causing HSPB1 mutations increase Cdk5-mediated phosphorylation of neurofilaments. *Acta Neuropathologica*, *126*(1), 93. <https://doi.org/10.1007/S00401-013-1133-6>
- 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 & 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)
- Hozak, P., Sasseville, A. M. J., Raymond, Y., & Cook, P. R. (1995). Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells. *Journal of Cell Science*, *108* (Pt 2)(2), 635–644. <https://doi.org/10.1242/JCS.108.2.635>
- Hugnot, J. P., Gilgenkrantz, H., Vincent, N., Chafey, P., Morris, G. E., Monaco, A. P., Berwald-Netter, Y., Koulakoff, A., Kaplan, J. C., & Kahn, A. (1992). Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(16), 7506–7510. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7506>
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J. M., Leveille, C. J., Slaughter, C. A., Sernett, S. W., & Campbell, K. P. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, *355*(6362), 696–702. <https://doi.org/10.1038/355696A0>
- Koenig, M., Beggs, A. H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Müller, C. R., Lindlöf, M., Kaariainen, H., de la Chapelle, A., Kiuru, A., Savontaus, M. L., Gilgenkrantz, H., Récan, D., Chelly, J., Kaplan, J. C., Covone, A. E., Archidiacono, N., ... Kunkel, L. M. (1989). The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *American Journal of Human Genetics*, *45*(4), 498–506. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2491009>
- Koenig, M., & Kunkel, L. M. (1990). Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *The Journal of Biological Chemistry*, *265*(8), 4560–4566.
- 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)
- Kofuji, P., Ceelen, P., Zahs, K. R., Surbeck, L. W., Lester, H. A., & Newman, E. A. (2000). Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(15), 5733–5740.
- Le, S., Yu, M., Hovan, L., Zhao, Z., Ervasti, J., & Yan, J. (2018). Dystrophin As a Molecular Shock Absorber. *ACS Nano*, *12*(12), 12140–12148.

<https://doi.org/10.1021/acsnano.8b05721>

- Lee, W. C., Chen, Y. Y., Kan, D., & Chien, C. L. (2012). A neuronal death model: overexpression of neuronal intermediate filament protein peripherin in PC12 cells. *Journal of Biomedical Science*, 19(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-8>
- Leon, G., Sanchez-Ruiloba, L., Perez-Rodriguez, A., Gragera, T., Martinez, N., Hernandez, S., Anta, B., Calero, O., Garcia-Dominguez, C. A., Dura, L. M., Peña-Jimenez, D., Castro, J., Zarich, N., Sanchez-Gomez, P., Calero, M., Iglesias, T., Oliva, J. L., & Rojas, J. M. (2014). Shoc2/Sur8 protein regulates neurite outgrowth. *PLoS One*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0114837>
- Levi, A., Ferri, G.-L., Watson, E., Possenti, R., & Salton, S. R. J. (2004). Processing, Distribution, and Function of VGF, a Neuronal and Endocrine Peptide Precursor. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 24(4), 517–533. <https://doi.org/10.1023/B:CEMN.0000023627.79947.22>
- Liemann, S., & Lewit-Bentley, A. (1995). Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function. *Structure (London, England : 1993)*, 3(3), 233–237. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00152-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00152-6)
- Manzur, A. Y., Kinali, M., & Muntoni, F. (2008). Update on the management of Duchenne muscular dystrophy. *Archives of Disease in Childhood*, 93(11), 986–990. <https://doi.org/10.1136/adc.2007.118141>
- 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)
- 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>
- McArthur, S., Loiola, R. A., Maggioli, E., Errede, M., Virgintino, D., & Solito, E. (2016). The restorative role of annexin A1 at the blood–brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS*, 13(1), 17. <https://doi.org/10.1186/S12987-016-0043-0>
- Merighi, A. (2018). Costorage of High Molecular Weight Neurotransmitters in Large Dense Core Vesicles of Mammalian Neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 272. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2018.00272>
- Merino-Jiménez, C. (2020). *Participación de la distrofina Dp71dΔ71-74 en el proceso de diferenciación de las células PC12 Tet-On.*
- Merino-Jiménez, C., Aragón, J., Ceja, V., Rodríguez-Martínez, G., Cázares-Raga, F. E., Chardonnet, S., Pionneau, C., Rendon, A., & Montañez, C. (2016).

- Dp71 Δ 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>
- Miranda, R., Nudel, U., Laroche, S., & Vaillend, C. (2011). Altered presynaptic ultrastructure in excitatory hippocampal synapses of mice lacking dystrophins Dp427 or Dp71. *Neurobiology of Disease*, 43(1), 134–141. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2011.02.017>
- Montes de Oca, R., Shoemaker, C. J., Gucek, M., Cole, R. N., & Wilson, K. L. (2009). Barrier-to-Autointegration Factor Proteome Reveals Chromatin-Regulatory Partners. *PLoS ONE*, 4(9), 7050. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0007050>
- Moreno León, L. C. (2016). *Estudio del efecto de la sobreexpresión de las distrofinas Dp71a y Dp71c en las células PC12*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Muntoni, F., 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)
- Naidoo, M., & Anthony, K. (2020). Dystrophin Dp71 and the Neuropathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Neurobiology*, 57(3), 1748–1767. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01845-w>
- Nudel, U., Zuk, D., Einat, P., Zeelon, E., Levy, Z., Neuman, S., & Yaffe, D. (1989). Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature*, 337(6202), 76–78. <https://doi.org/10.1038/337076a0>
- Petrof, B. J., Shrager, J. B., Stedman, H. H., Kelly, A. M., & Sweeney, H. L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8), 3710. <https://doi.org/10.1073/PNAS.90.8.3710>
- Prior, T. W., & Bridgeman, S. J. (2005). Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Molecular Diagnostics*, 7(3), 317–326. [https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60560-0](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60560-0)
- Réty, S., Osterloh, D., Arié, J. P., Tabaries, S., Seeman, J., Russo-Marie, F., Gerke, V., & Lewit-Bentley, A. (2000). Structural basis of the Ca(2+)-dependent association between S100C (S100A11) and its target, the N-terminal part of annexin I. *Structure (London, England: 1993)*, 8(2), 175–184. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00093-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00093-9)
- 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>

- 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>
- Romo-Yáñez, J., Rodríguez-Martínez, G., Aragón, J., Siqueiros-Márquez, L., Herrera-Salazar, A., Velasco, I., & Montañez, C. (2020). Characterization of the expression of dystrophins and dystrophin-associated proteins during embryonic neural stem/progenitor cell differentiation. *Neuroscience Letters*, *736*. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2020.135247>
- Rybakova, I. N., Amann, K. J., & Ervasti, J. M. (1996). A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *The Journal of Cell Biology*, *135*(3), 661–672. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.3.661>
- Sanchez-Perez, L. (2022). *Caracterización del efecto de las proteínas mutantes Dp40ΔL170 /Dp71fΔ71ΔL170 en la diferenciación de células PC12*. CINVESTAV.
- Severini, C., Ciotti, M. T., Biondini, L., Quaresima, S., Rinaldi, A. M., Levi, A., Frank, C., & Possenti, R. (2008). TLQP-21, a neuroendocrine VGF-derived peptide, prevents cerebellar granule cells death induced by serum and potassium deprivation. *Journal of Neurochemistry*, *104*(2), 534–544. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2007.05068.X>
- Sheikh, M. H., & Solito, E. (2018). Annexin A1: Uncovering the Many Talents of an Old Protein. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS19041045>
- Spann, T. P., Goldman, A. E., Wang, C., Huang, S., & Goldman, R. D. (2002). Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *The Journal of Cell Biology*, *156*(4), 603. <https://doi.org/10.1083/JCB.200112047>
- Swairjo, M. A., & Seaton, B. A. (1994). Annexin structure and membrane interactions: a molecular perspective. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, *23*, 193–213. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BB.23.060194.001205>
- Tadayoni, R., Rendon, A., Soria-Jasso, L. E., & Cisneros, B. (2012). Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Molecular Neurobiology*, *45*(1), 43–60. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8218-9>
- Tidball, J. G., Welc, S. S., & Wehling-Henricks, M. (2018). Immunobiology of Inherited Muscular Dystrophies. *Comprehensive Physiology*, *8*(4), 1313. <https://doi.org/10.1002/CPHY.C170052>
- Undamatla, J., & Szaro, B. G. (2001). Differential expression and localization of neuronal intermediate filament proteins within newly developing neurites in dissociated cultures of *Xenopus laevis* embryonic spinal cord. *Cell Motility and*

the Cytoskeleton, 49(1), 16–32. <https://doi.org/10.1002/CM.1017>

- Vaudry, D., Stork, P. J. S., Lazarovici, P., & Eiden, L. E. (2002). Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5573), 1648–1649. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1071552>
- Villarreal-Silva, M., Centeno-Cruz, F., Suárez-Sánchez, R., Garrido, E., & Cisneros, B. (2011). Knockdown of dystrophin Dp71 impairs PC12 cells cycle: localization in the spindle and cytokinesis structures implies a role for Dp71 in cell division. *PloS One*, 6(8), e23504–e23504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023504>
- Weerkamp, P. M. M., Mol, E. M., Sweere, D. J. J., Schrans, D. G. M., Vermeulen, R. J., Klinkenberg, S., Hurks, P. P. M., & Hendriksen, J. G. M. (2022). Wechsler Scale Intelligence Testing in Males with Dystrophinopathies: A Review and Meta-Analysis. *Brain Sciences*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/BRAINSCI12111544>
- Wenninger, S., Montagnese, F., & Schoser, B. (2018). Core Clinical Phenotypes in Myotonic Dystrophies. *Frontiers in Neurology*, 9, 303. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00303>