

00377
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

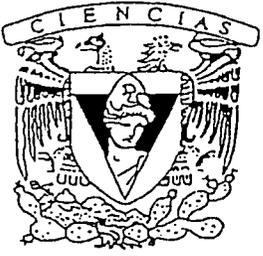
“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL COMPLEJO
SARCOGLICANO-SARCOSPÁN EN CÉLULAS DE
MÚSCULO LISO Y ENDOTELIO DE LA VENA Y
ARTERIA DEL CORDÓN UMBILICAL”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA:
ISRAEL RAMÍREZ SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. RAMÓN CORAL VÁZQUEZ



MÉXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**



FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL
 AUTÓNOMA DE
 MÉXICO

OFICIO FCIE/DEP/0209/03
Asunto: Asignación de Sinodales

DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

Presente

Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado(a) como Director(a) de Tesis del(a) **BIOL. ISRAEL RAMÍREZ SÁNCHEZ**, quien desarrolló el trabajo de tesis titulado: "ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL COMPLEJO SARCOGLICANO-SARCOSPÁN EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO Y ENDOTELIO DE LA VENA Y ARTERIA DEL CORDÓN UMBILICAL"

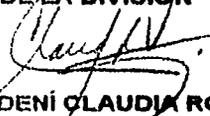
Asimismo comunico que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas en su sesión celebrada el día 20 de marzo del año en curso, ha designado a los siguientes sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de Maestro(a) en Ciencias Biológicas (Biología Experimental).

CARGO	GRADO,	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	MED. CIR.	FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ
VOCAL	DRA.	HAYDEE ROSAS VARGAS
SECRETARIO	DR.	RAMÓN CORAL VÁZQUEZ
SUPLENTE	DR.	GUILLELMO MANUEL CEBALLOS REYES
SUPLENTE	DR.	CARLOS CASTILLO HENKEL

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 Cd. Universitaria, D. F., a 24 de marzo del 2003.

JEFE DE LA DIVISIÓN


DRA. DENI CLAUDIA RODRÍGUEZ VARGAS



DCRVASRVoigs

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

"Como en muchas otras actividades humanas, como en la vida en general, la ciencia navega entre dos polos: lo deseable y lo posible. Sin lo posible, lo deseable no es más que un sueño. Sin lo deseable, lo posible no es sino un fastidio. Normalmente es difícil resistirse al sueño y a la utopía. Pero la experimentación pone límites a la imaginación. En cada etapa, el científico esta obligado a exponerse a la crítica y a la experiencia para limitar la parte que hay de sueño en la representación del mundo que construye. La ciencia avanza confrontando incesantemente lo que podría ser con aquello que es."

El ratón, la mosca y el hombre.

François Jacob.

...la Resistencia fue una democracia verdadera; tanto para el soldado como para el jefe había el mismo peligro, la misma responsabilidad, la misma libertad absoluta dentro de la disciplina. Así se constituyó, entre las sombras y en medio de la sangre, la más fuerte de las repúblicas. Cada uno de los ciudadanos sabía que se debía a todos y que sólo podía contar consigo mismo; cada cual realizaba, en el desamparo más total, su papel histórico. Cada cual acometía contra los opresores, la empresa de ser sí mismo irremediabilmente y, al elegirse a sí mismo en su libertad, elegía la libertad de todos...

La República del Silencio.

Jean Paul Sartre.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

*Entra. Este es el lugar donde el cuerpo se mueve al viento
como una más entre las plantas que brotan de la tierra.*

*Donde los sentidos florecen. Donde la cúpula del cielo y la geometría
de las estrellas forman el techo que cuida el vuelo libre del polen de los
sueños cuando éstos logran escapar de su reflejo en los estanques. Entra.*

*Quiero ir de mi mundo al tuyo y nunca regresar si no es contigo.
Quiero un pacto con lo más invisible de tu cuerpo que dentro de ti me llama.
Toco y huelo en ti lo que tantas veces no se ve. Mis manos te buscan a tientas.
Mi boca tampoco mira. Por eso creo en lo invisible de tu cuerpo hasta cuando
estas tan cerca que ya no es posible ver nada. Si se me escapa eso, tú me
levantas hacia ti porque también tú crees en lo invisible que nos une.
Quiero que mi nombre quede grabado para siempre en tu aliento.
Que nunca pueda salir de tus dominios. Quiero ir en ti de lo visible a lo invisible,
de lo que adoro a lo que todavía no conozco, de un asombro a otro.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APOYOS Y AGREDECIMIENTOS

Este proyecto fue apoyado por el Fondo para el Fomento a la Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social con el numero de proyecto IMSS 2002/024 y también por la Asociación Francesa Contra las Miopatías con el proyecto MNM2000.

Durante el desarrollo de este trabajo el estudiante fue becario de posgrado del: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
Instituto Mexicano del Seguro Social.

Quiero extender mi más profundo agradecimiento al Departamento de Educación Médica y al Departamento de Labor y Expulsión de la Clínica de Gineco-obstetricia numero 4 (Hospital Luis Castelazo Ayala) del IMSS por el suministro de cordones umbilicales para el desarrollo del proyecto y en particular a la enfermera Dolores Irma Pérez Mondragón por su valioso apoyo y cuidadosa colaboración y en la recolección de las muestras de cordón umbilical.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

RESUMEN.....	4
I. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1.- LOS SARCOGLICANOS Y EL COMPLEJO DE GLICOPROTEINAS ASOCIADAS A LA DISTROFINA.....	8
1.2.- REGULACIÓN DE LA EXPRESION DE LOS SARCOGLICANOS.....	15
1.3.-LAS SARCOGLICANOPATIAS DENTRO DEL GRUPO DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURA.....	19
1.4.- MORFOFISIOLOGIA DEL CORDÓN UMBILICAL.....	22
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
III. OBJETIVOS.....	27
3.1.- OBJETIVO GENERAL.....	27
3.2.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	28
4.1.- DIAGRAMA DE FLUJO.....	28
V. MATERIALES Y METODOS.....	29
5.1.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CORDÓN UMBILICAL.....	29
5.2.- DISECCIÓN DE LA VENA Y LAS ARTERIAS UMBILICALES.....	29
5.3.- EXTRACCIÓN DE CELULAS ENDOTELIALES DE VENA Y ARTERIA DE CORDÓN UMBILICAL	29
5.4.- EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE MÚSCULO LISO Y ENDOTELIO DE VENA Y ARTERIA UMBILICALES..	30

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.5.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN, PUREZA E INTEGRIDAD DEL RNA.....	31
5.6.-ENSAYOS DE RT-PCR SEMICUANTITATIVO.....	32
5.6.1.-SÍNTESIS DE cDNA.....	33
5.6.2.-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	34
5.7.-CINÉTICAS DE COAMPLIFICACION.....	36
5.8.-INMUNOFLUORESCENCIAS.....	38
VI. RESULTADOS.....	41
6.1.- EXPRESIÓN DE LOS TRANSCRITOS CODIFICANTES DEL COMPLEJO SG-SPN EN MÚSCULO LISO VASCULAR DE CORDÓN UMBILICAL.....	41
6.2.- CINÉTICAS DE COAMPLIFICACION POR RT-PCR DEL COMPLEJO SG-SPN Y GAPDH.....	43
6.3.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSCRITOS CODIFICANTES DEL COMPLEJO SARCOGLICANO-SARCOSPAN EN ENDOTELIO DE ARTERIA Y VENA DE CORDÓN UMBILICAL	45
6.4.- ANÁLISIS SEMI-CUANTITATIVO DE LA EXPRESIÓN DEL COMPLEJO SG-SPN EN MÚSCULO LISO Y ENDOTELIO DE VENA Y ARTERIA DEL CORDÓN UMBILICAL	56
6.5.-EXPRESIÓN DEL COMPLEJO SG-SPN Y PROTEINAS RELACIONADAS AL DGC EN CRIOSECCIONES DE VENA Y ARTERIA DE CORDÓN UMBILICAL..	60
VII. DISCUSIÓN.....	74
VIII. CONCLUSIONES.....	82
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	84

RESUMEN

El complejo sarcoglicano-sarcospán (SG-SPN) se encuentra compuesto por un grupo de proteínas transmembranales denominadas sarcoglicanos (SG) α , β , γ , δ , ϵ , ζ y sarcospán (SPN). La expresión de los SGs α y γ se encuentra restringida a músculo estriado, mientras que los SGs β , δ , ζ y ϵ , además de expresarse en músculo cardíaco y esquelético, también se encuentran presentes en músculo liso y en otros tejidos no musculares. Las mutaciones en los genes de los sarcoglicanos γ , α , β y δ , causan las distrofias musculares de cintura autosómico-recesivas del tipo LGMD2C-F, respectivamente (sarcoglicanopatías), que en ocasiones se presentan acompañadas del desarrollo de cardiomiopatías. Las mutaciones en el SG- ϵ no se han relacionado con patologías musculares, no obstante se sabe que éstas producen una patología neuromuscular asociada a manifestaciones psiquiátricas conocida como distonía mioclónica. Así mismo, existen ratones transgénicos deficientes en los SGs β ó δ que presentan una distrofia muscular grave y progresiva similar a la LGMD2D y F, respectivamente, que se ve acompañada por el desarrollo de cardiomiopatía dilatada. Al parecer, la pérdida del complejo SG-SPN en la microvasculatura coronaria es la causa primaria de las cardiomiopatías. En conjunción con otras evidencias, todo parece indicar que el complejo SG-SPN juega un papel importante en el mantenimiento de la morfofisiología vascular. Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se analizó la expresión de los transcritos y proteínas de los miembros del complejo SG-SPN en músculo liso y endotelio de vena y arteria de cordón umbilical como modelo vascular. Por vez primera, se detectó la presencia del transcrito del SG α en músculo liso vascular junto con el resto del complejo. No obstante, mediante los ensayos de inmunofluorescencia, en el mismo tejido, únicamente se detectó la presencia de los sarcoglicanos β , δ , ϵ y SPN, mientras que la expresión de los transcritos de los miembros del complejo SG-SPN en el tejido endotelial demuestra resultados sumamente interesantes, ya que se detectaron los transcritos para los SG's β , δ , ϵ y SPN, mientras que a nivel de

proteína sólo se detectó la presencia del SG- ϵ y SPN por medio de inmunofluorescencia.

Estos resultados sugieren que la regulación de la expresión de los sarcoglicanos α y γ en músculo liso y de los sarcoglicanos β y δ en endotelio podrían involucrar eventos transcripcionales y post-transcripcionales.

Adicionalmente se realizó la búsqueda de algunas otras proteínas pertenecientes al complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (DGC), en el mismo modelo de estudio, teniendo como meta describir la composición específica del DGC propia de células endoteliales y de músculo liso. Tales proteínas fueron la distrofina, la utrofina, β -dístroglicano, α -dístrobrevina y caveolina-1. Los resultados de esta búsqueda destacan la posible asociación del SG- ϵ , SPN, utrofina, β -dístroglicano, α -dístrobrevina y caveolina-1 en las células de endotelio y la completa ausencia de la proteína distrofina, así como de los SG's β y δ , mismas que se distribuyen en el músculo liso del mismo vaso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

The sarcoglycan-sarcospan complex (SG-SPN) is a group of transmembranal proteins named α , β , γ , δ , ϵ , ζ sarcoglycans (SG) and sarcospan (SPN). α and γ SG expression is restricted to striated muscle, while β , δ , ζ and ϵ SGs have a more generalized expression that includes muscle tissues and non-muscle tissues. The mutations in γ , α , β and δ SGs genes lead to limb-girdle muscular dystrophies type 2C-2F, respectably, occasionally companied of dilated cardiomyopat, presumably caused by the total loss of SG-SPN complex in the coronary microvasculature. This suggests the high functional importance of SG-SPN complex in the maintenance of vascular morphophysiology. ϵ -SG mutations have not been related to muscular pathology, however is known that some mutations in this gene are related with myoclonus-dystonia syndrome, a neuromuscular pathology associated with psiquiatric manifestations. In order to know more about the expression of the SG-SPN complex in the vascular tissue, in this work we analyzed the expression of transcripts and proteins of the SG-SPN complex in endothelium and smooth muscle cells from vein and artery of human umbilical cord.

The results of this work shows the transcripts expression of α , β , γ , δ , ϵ SG and SPN. In the case of α -SG, to our best knowledge, this is the first time that its transcript is detected in vascular smooth muscle. In contrast, by the immunofluorescence assays realized in the same tissue, there was evident only the expression of β , δ , ϵ SGs and SPN. On other hand, in endothelium we detected the transcripts expression of β , δ , ϵ SGs and SPN; while to protein level it was only detected ϵ -SG and SPN. Taken together all the results, it may be suggested a posttranscriptional down regulation process to α and γ SG in smooth muscle, and to β and δ SGs in endothelium.

Aditionally, with the aim to detect a particular form of dystrophin glycoprotein complex (DGC) for endothelium and smooth muscle it was searched by immunofluorescence, the presence of other proteins related to this complex (DGC), In endothelium cells it was observed the presence and a possible association of ϵ -SG,

SPN, utrophin, β -dystroglycan, α -dystrobrevin and caveolin-1 and the absence of dystrophin, β and δ SGs in the same tissue. With respect to smooth muscle it was detected the presence and a possible association of dystrophin, β , δ , and ϵ SGs, SPN, β -dystroglycan, α -dystrobrevin and caveolin-1. On other hand it was detected the presence and possible association of utrophin, β , δ , and ϵ SGs, SPN, β -dystroglycan, α -dystrobrevin and caveolin-1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I. INTRODUCCIÓN

1.1 LOS SARCOGLICANOS Y EL COMPLEJO DE GLICOPROTEINAS ASOCIADAS A LA DISTROFINA

El complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina (DGC) es un grupo de proteínas periféricas e integrales de la membrana celular de músculo cardíaco y esquelético (Fig.1) (Straub y Campbell, 1997). Si bien no se conoce la función específica de estas proteínas, se cree que son proteínas versátiles que entre otras funciones protegen al sarcolema del daño inducido por la contracción (Ervasti y Campbell, 1993). Además se piensa también que forman un puente de unión (Hynes R. O, 1992) y de comunicación entre el citoesqueleto y la matriz extracelular similar al que forma la familia de las integrinas (Vachon et al., 1997). El DGC a su vez se puede dividir en tres sub-grupos de acuerdo a sus características bioquímicas y a su ubicación subcelular:

PROTEINAS CITOPASMÁTICAS: El primero de estos sub-grupos es un componente citoplásmico que consiste de una serie de proteínas periféricas a la membrana. La distrofina con peso molecular de 427 kDa (Ervasti y Campbell, 1993), posee cuatro diferentes regiones de suma importancia: una región amino terminal con homología a α -actinina, la cual se encuentra unida a los filamentos de actina del citoesqueleto, una región central en forma de varilla que se compone de repetidos similares a espectrina, una región rica en cisteínas y una región carboxilo terminal. La región carboxilo terminal y la región rica en cisteínas contienen varios sitios de unión a proteínas, que incluyen un dominio altamente conservado de residuos de triptofano conocido como dominio WW (Chan y Kunkel 1997), un dominio putativo de unión a calcio y un dominio rico en cisteínas conocido como hand-EF, además de un dominio de dedo de zinc y un dominio plegado (Rentschler et al., 1999).

Por otra parte se encuentran las sintrofinas $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\beta 2$, las tres con un peso molecular de 58 kDa (Suzuki et al., 1995), presentan además una similitud a nivel de aminoácidos del 50% y son codificadas por diferentes genes (Adams et al., 1995; Ahn et al., 1996). Las tres proteínas son expresadas en músculo estriado a diferentes niveles, siendo la sintrofina $\alpha 1$ la que mayor nivel de

expresión presenta en este tejido encontrándose mayoritariamente concentrada en las uniones neuromusculares (Peters et al., 1997B), adicionalmente, las tres proteínas se encuentran expresadas en una gran variedad de tejidos no musculares (Ahn et al., 1994).

Una característica interesante de la familia de sintrofinas es que interactúan con varios miembros del DGC incluyendo la distrofina, la utrofina y la distrobrevina, (Dwyer et al., 1995). Actualmente se sabe que existen interacciones entre sintrofinas y distrofina determinadas por el dominio WW de la región carboxilo terminal de la distrofina y que son reguladas por calmodulina (Newbell et al., 1997) y por fosforilación o defosforilación de esta misma región de la distrofina (Milner et al., 1993), lo cual pone en evidencia la participación de estas proteínas en procesos de transducción de señales (Michalak et al., 1996).

Comparable a la familia de caveolinas, las sintrofinas tienen varios dominios especializados que promueven las interacciones proteína-proteína y reclutan moléculas de señalamiento a la membrana (Okamoto et al., 1998). Cada sintrofina presenta un dominio PDZ que se sabe facilita la homo y heterodimerización de proteínas con esta secuencia. Entre las asociaciones conocidas mediadas por el dominio PDZ de las sintrofinas en el DGC se encuentra la asociación con la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS), localizando a esta molécula de señalización en el sarcolema (Brenman et al., 1996).

A la fecha no se han encontrado mutaciones en las sintrofinas que se relacionen con patologías como las distrofias musculares, de hecho se han desarrollado modelos murinos con interrupción genética en la sintrofina $\alpha 1$, los cuales no presentan ninguna patología muscular, confirmando lo anterior (Kameya et al., 1999). En estos modelos animales la localización de la nNOS en el sarcolema sí se ve afectada, pero la regulación de la función contráctil por la actividad de la nNOS no se afecta de manera significativa (Thomas et al., 1999). Por otra parte, este modelo murino presenta anomalías en las uniones neuromusculares reflejadas en la reducción secundaria de utrofina, del receptor de acetilcolina y de acetilcolinesterasa, poniéndose de manifiesto la importancia de

las sintrofinas en el reclutamiento y estabilización de complejos de señalización en la membrana (Adams et al., 2000).

Adicionalmente, en la región citoplasmática se encuentra un par de proteínas asociadas a la región súper enrollada del extremo carboxilo terminal de la distrofina y de su homólogo autosómico la utrofina, estas proteínas son conocidas como distrobrevina α y distrobrevina β , (Sadoulet-Puccio et al., 1997) las cuales tienen un peso molecular de 80 kDa (Yoshida et al., 1994) y 59 kDa (Blake et al., 1998) respectivamente, estas dos proteínas se encuentran en una gran variedad de tejidos, aunque es la distrobrevina α la que se encuentra en músculo estriado (Peters et al., 1997) (fig. 1). Se ha reportado que las distrobrevinas presentan una región con una alta homología a la región carboxilo terminal de la distrofina, la cual presenta sitios ricos en tirosinas sugiriendo probables funciones de fosforilación (Balasubramanian et al., 1998). Por otro lado, esta importante región de las distrobrevinas además de su asociación con la distrofina también se asocia con las sintrofinas (Sadoulet-Puccio et al., 1997). Ambas proteínas se han encontrado en una gran variedad de tejidos dentro de los que destacan cerebro, hígado y pulmón (Sadoulet-Puccio et al., 1996) mientras que en músculo esquelético solo se ha detectado la presencia de la proteína distrobrevina α la cual se localiza en mayor proporción en la unión neuromuscular (Blake et al., 1996).

A pesar de la alta similitud de las distrobrevinas con la distrofina en la región carboxilo terminal, en humanos no se han detectado mutaciones en las distrobrevinas que las relacionen con alguna patología muscular o de otro tipo. Sin embargo en un modelo murino, el cual carece de la distrobrevina α , se observó la aparición de distrofia muscular de severidad media, aunque con la permanencia del DGC (Grady et al., 1999). Este fenómeno se atribuye a la posible participación de una isoforma de la distrobrevina α , la cual pudiera suplir la función de la proteína deficiente, es decir, como molécula de unión entre el complejo SG-SPN y las sintrofinas (Yoshida et al., 2000).

COMPLEJO DISTROGLICANO: El segundo sub-grupo en el DGC es el complejo distroglicano, el cual está compuesto de dos proteínas muy relacionadas. Estas dos proteínas son codificadas por un mismo gen (Henry y

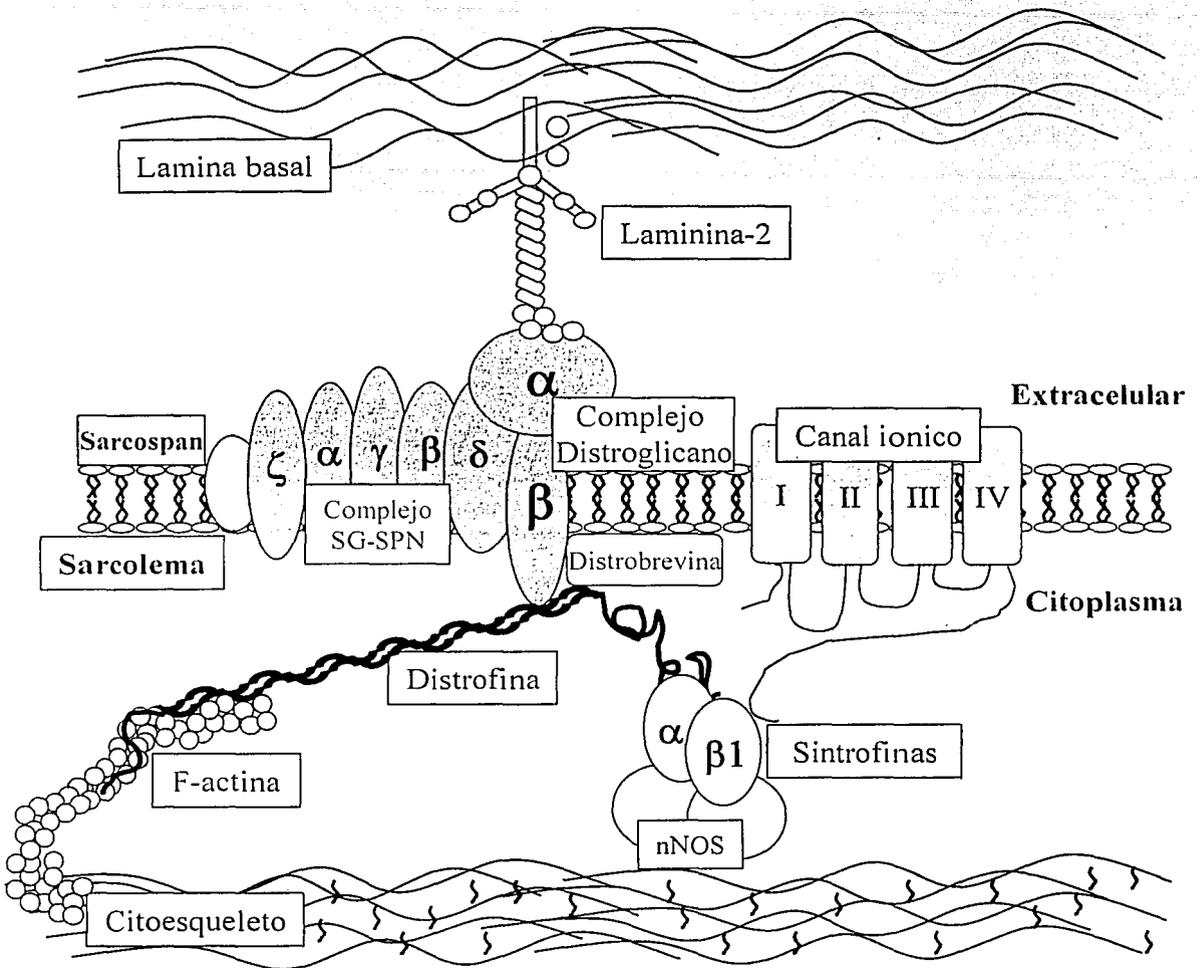


Fig. 1 Organización molecular del DGC en el músculo estriado en el cual se identifican algunos subcomplejos dentro de los que destacan el complejo distroglicano (distroglicanos α y β) y el complejo SG-SPN (sarcoglicanos α , β , γ , δ , ζ y sarcospan)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Campbell 1999), que se localiza en el cromosoma 3p25 del humano (Ibraghimov et al., 1993), el transcrito de este gen da origen a un polipéptido de 97 kDa (Ibraghimov et al., 1992), el cual sufre eventos de procesamiento post-traduccional de corte y glicosilación (Holt et al., 2000) que dan origen al distroglicano α con peso molecular de 156 kDa y el distroglicano β con peso de 43 kDa; estas dos proteínas se asocian y forman un complejo en el cual el distroglicano α tiene localización extracelular y se une a la laminina en la lamina basal, mientras que el distroglicano β atraviesa la membrana celular y se une mediante su porción extracelular al distroglicano α mientras que en su región citoplasmática se une al dominio WW de la región rica en cisteínas de la distrofina (Rentschler et al., 1999) o a su homólogo utrofina (Suzuki et al., 1994) (fig. 1).

COMPLEJO SARCOGLICANO-SARCOSPAN: El tercer sub-complejo consiste en una familia de proteínas transmembranales (Ozawa et al., 1998) las cuales son llamadas sarcoglicanos (SG) α , β , γ , δ , ϵ y ζ con pesos moleculares de 50, 43, 35, 35, 50 y 40 kDa, respectivamente (Campbell, 1995; Ettinger et al., 1997; Wheeler et al., 2002). A este complejo se le suma una proteína llamada sarcospán (SPN) con un peso de 25 kDa, por lo que en su conjunto constituyen el llamado complejo sarcoglicano-sarcospan (SG-SPN) (fig. 1) (Crosbie et al., 1997). Los genes que codifican para los sarcoglicanos α , β , γ , δ , ϵ y ζ están localizados en los cromosomas humanos 17q21, 4q12, 13q12, 5q33, 7q21 y 8p22 respectivamente (Nigro et al., 1996; Wheeler et al., 2002).

Los sarcoglicanos presentan entre sí una alta homología que se da de la siguiente manera: entre los SGs α y ϵ es de 63% de similitud genómica y 43% de identidad proteínica, (Ettinger et al., 1997), mientras que los SGs γ y δ presentan una homología de 70% a nivel de secuencia genómica y de 55% a nivel de secuencia proteínica (Hack et al., 2000), presentando además una idéntica estructura en el arreglo de sus intrones y exones, lo cual concuerda con lo observado en eventos de duplicación genética (Nigro et al., 1996B). Por su parte SG- ζ posee una alta homología con los SGs δ y γ que se da de la siguiente manera: 57% y 55.7% a nivel de aminoácidos y 74.8% y 74.2% de similitud a

nivel genómico respectivamente (fig. 2) (Wheeler et al., 2002) este alto grado de homología sugiere que estos genes se originaron de un evento de duplicación genética (Piccolo et al., 1995).

Todos los SGs tienen una topología similar en la membrana celular; cuentan con un largo dominio extracelular y un dominio citoplasmático corto, separados por un solo dominio transmembranal. La estructura primaria de los SGs α y ϵ indica que son proteínas transmembranales tipo I con la región carboxilo intracelular, y la región amino extracelular la cual cuenta con sitios de glicosilación (Hack et al., 2000). Mientras tanto, las secuencias de aminoácidos de los SGs β , γ , y δ indican que son proteínas transmembranales tipo II con la región amino intracelular y la región carboxilo extracelular (Liu et al., 1999) (fig. 2) adicionalmente presentan tres sitios de glicosilación ligados a la región amino terminal. Una característica fundamental de las proteínas transmembranales tipo II es la presencia de aminoácidos con carga inmediatamente antes del dominio transmembranal en la región citoplasmática lo cual cumplen a la perfección los SGs β , γ , y δ (Hack et al., 2000). Cuentan además con sitios potenciales de fosforilación en su dominio citoplasmático, por lo cual se cree que participan en procesos de transducción de señales (Campbell, 1995). Los SGs β , γ y δ tienen un grupo de residuos de cisteína localizado en la región carboxilo terminal, lo cual corresponde a una estructura frecuentemente encontrada en moléculas receptoras, (Matsumura et al., 1999) como el factor de crecimiento epidermal cuyo dominio extracelular comparte una alta homología (McNally et al., 1996B). Por su parte los SGs α y γ presentan fosforilación *in vitro* en residuos de tirosinas, lo cual se asocia con adhesión de células musculares (Thompson et al., 2000) y también con regulación de rutas de señalización celular que involucran interacciones de dominios SH2 (Chardin et al., 1995).

Adicionalmente se han encontrado evidencias de que el complejo SG tiene asociación directa con la distrofina (Vainzof et al., 1999) lo que estabiliza de manera general al DGC y de manera particular a la interacción distrofina-distroglicano (Yoshida et al., 2000). En otros estudios se ha demostrado que el complejo sarcoglicano también se une a la región amino terminal de distrobrevina

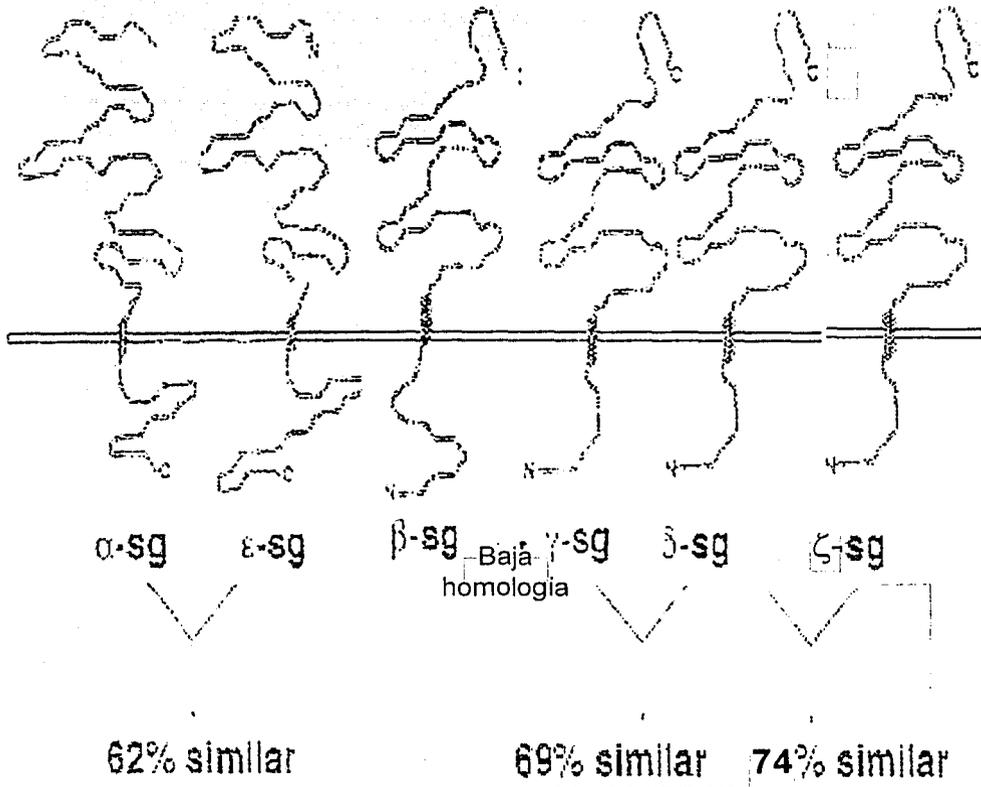


Fig. 2 Estructura primaria las proteínas miembros del complejo SG, en la cual se muestran además las similitudes a nivel de secuencia genómica.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

indicando la existencia de una interacción tripartita entre distrofina, distrobrevinas y el complejo sarcoglicano o distroglicano (Yoshida et al., 2000).

Investigaciones recientes (Thompson et al., 2000) han demostrado la existencia de una nueva interacción del complejo sarcoglicano con una proteína denominada filamina-2, la cual es miembro de la familia de proteínas filaminas implicadas en procesos de transducción de señales en diferentes tipos celulares.

La proteína sarcospán (SPN) que también se encuentra asociada al DGC por medio de su unión al complejo SG, pertenece a la familia de las proteínas tetraspan, llamadas así porque poseen cuatro dominios altamente conservados que atraviesan la membrana (Crosbie et al., 1997). Su expresión es específica de músculo estriado y músculo liso (Thomas 2001), no obstante nuestro grupo de investigación ha detectado la presencia de la proteína en retina murina posiblemente en asociación con los SG's β y δ (Estrada et al., com. pers). A la fecha no se han reportado dominios funcionales en esta proteína (Thomas 2001). Sin embargo se ha reportado que otros miembros de la familia de las proteínas tetraspan se encuentran muy estrechamente relacionados con las integrinas, lo cual implica una función en señalización y transducción; y que como las sintrofinas, puedan participar como moléculas adaptadoras y en procesos de reclutamiento de otras proteínas a la membrana para formar complejos de señalización estables (Maecker et al., 1997) (fig. 3).

1.2 REGULACIÓN DE LA EXPRESION DE LOS SARCOGLICANOS

Hasta hace poco, se pensaba que la expresión de los SGs α y γ se encontraba restringida a músculo estriado (Noguchi et al., 1995), sin embargo existen reportes recientes que indican que el SG γ también se expresa aunque en menor cantidad en músculo liso pulmonar (Barresi et al., 2000). En contraste, los SGs β , δ y ϵ tienen una expresión más generalizada que incluye músculo liso, esquelético y cardiaco, así como otros tejidos no musculares. Específicamente en el músculo liso de útero, aorta, pulmón e intestino, el complejo está formado por los SGs ϵ , β , δ y SPN (Straub et al., 1999). En el caso del músculo estriado

existen dos formas del complejo, una que incluye los SGs α , β , γ , δ y SPN, y otro que lo conforman los SGs ϵ , β , γ , δ y SPN (Liu et al., 1999) (Fig. 4).

Investigaciones recientes indican que el SG- ζ se puede encontrar asociado con las dos formas de complejo SG-SPN en el músculo estriado (Wheeler et al., 2002). Los resultados de varios estudios del complejo SG-SPN sugieren que los SGs β y δ son los más estrechamente asociados y forman un centro funcional en el complejo (Noguchi et al., 2000).

En cuanto al ensamblaje del complejo SG, se forma tan pronto como se sintetizan los SGs individuales en el retículo endoplasmico. Además, el complejo SG se encuentra asociado con el complejo distroglicano, formando un complejo de glicoproteínas durante su transporte desde el aparato de Golgi, donde son glicosilados, hasta la membrana celular donde finalmente son anclados (Noguchi et al., 2000). Algunos estudios bioquímicos proponen que SG δ es la proteína que se encuentra unida al complejo distroglicano y de esta manera une al resto de los SGs al DGC (Chan et al., 1998). Sin embargo, otros reportes indican que la proteína SG γ es la que se encuentra unida al complejo distroglicano (Noguchi et al., 2000). Teniendo como base el conocimiento de la similitud tan alta que existe a nivel de proteína entre estos dos SGs se puede suponer que ambos sean capaces de asociarse con el complejo distroglicano.

En miocitos que se encuentran proceso de diferenciación se pueden encontrar complejos SG incompletos (es decir carentes de alguna de las subunidades) en el citoplasma, e incluso en las inmediaciones del retículo endoplásmico, lo cual ha proporcionado información sobre la secuencia de ensamblaje del complejo. De acuerdo a lo reportado, el SG central del complejo es el SG- β , posteriormente se le unen los SGs γ y/o δ y finalmente el sarcoglicano α (Noguchi et al., 2000).

Existen reportes que indican que todos los transcritos de los diferentes sarcoglicanos están presentes en abundancia en músculo esquelético y cardiaco (Noguchi et al., 1999). Mediante un análisis de la expresión de los sarcoglicanos en relación con el proceso de diferenciación de células musculares, se detectaron todos los transcritos del complejo sarcoglicano en cantidad elevada en mioblastos

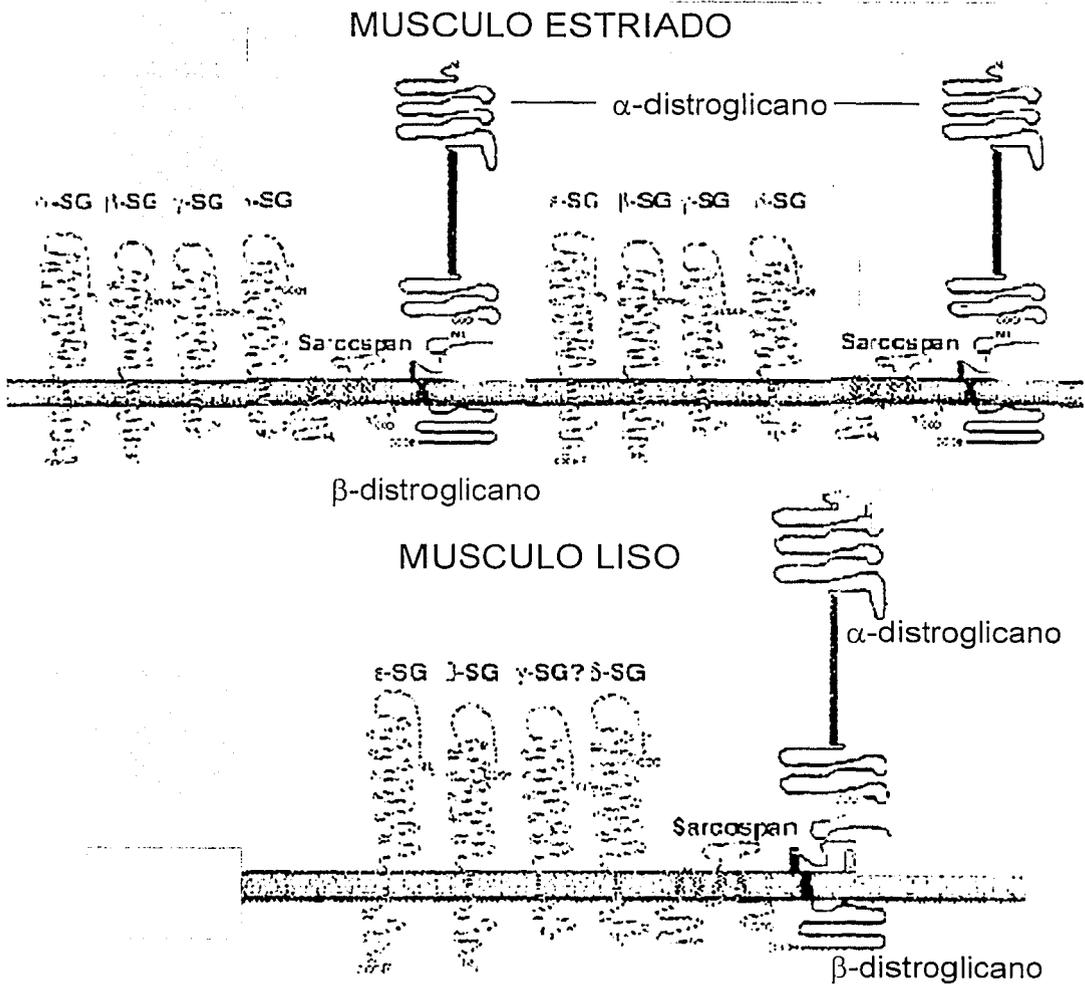


Fig. 4 Formas alternativas del complejo SG-SPN en el musculo estriado y la forma particular de complejo SG-SPN en musculo liso en el cual se muestra la ausencia del SG- α .

en proliferación, sin embargo cuando los mioblastos se diferencian hasta formar el miotubo, se disminuye considerablemente el nivel de expresión del transcrito del SG ϵ mientras que el resto de los transcritos de los SG's permanece sin cambio significativo (Noguchi et al., 1999).

Por otra parte se observó que ninguna de las proteínas del complejo SG-SPN aparece en las primeras cuarenta horas de diferenciación celular. No es sino hasta el cuarto día de diferenciación cuando se observan pequeñas cantidades de los sarcoglicanos β y δ , mientras que los sarcoglicanos α y γ se encuentran a partir del día seis, y al día ocho todo el complejo sarcoglicano se detecta en grandes cantidades (Noguchi et. al. 1999). Conforme la diferenciación progresa, la expresión de los mRNAs de los sarcoglicanos α y γ incrementa hasta veinte y cincuenta veces, respectivamente. Por lo tanto las respuestas transcripcionales de cada uno de los genes del complejo sarcoglicano durante la diferenciación celular son claramente diferentes (Noguchi et. al. 1999). Estas grandes variaciones en los niveles de expresión de los transcritos de los miembros del complejo SG-SPN, se sugiere son debidas a los diferentes tiempos en vida media que tienen los transcritos del complejo SG-SPN (Noguchi et. al. 1999).

1.3 LAS SARCOGLICANOPATIAS DENTRO DEL GRUPO DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURA

La presencia de mutaciones en los genes de los sarcoglicanos α , β , γ y δ causan las distrofias musculares de cintura autosomico-recesivas del tipo LGMD2D, LGMD2E, LGMD2C y LGMD2F, respectivamente (Nigro et al., 1996), mismas que en su conjunto se denominan como sarcoglicanopatias (Ozawa et al.1995). Las mutaciones más comunes de los sarcoglicanos α , β , γ y δ se han encontrado en sus dominios extracelulares (Lim y Campbell 1998). Con el reciente descubrimiento del SG- ζ y su estrecha asociación con el resto del complejo, se sugiere que una deficiencia en este sarcoglicano produce también algún tipo de distrofia muscular (Wheeler et al., 2002). La deficiencia primaria en alguno de los sarcoglicanos, deriva en una disminución secundaria o pérdida total

del resto de los miembros del complejo SG-SPN, sugiriendo con esto que la biosíntesis y ubicación en la membrana celular de estas proteínas esta estrechamente ligada (Hotl y Campbell 1998).

Sin embargo existen casos particulares que no cumplen con lo anterior, por ejemplo, se ha reportado el caso de un paciente con una mutación en el SG- γ en cuyo músculo se podía encontrar una proteína truncada y el resto de los SGs expresados de manera normal junto con el resto del DGC (Crosbie et al., 2000). A pesar de la preservación del DGC completo este paciente presentó una severa distrofia muscular. Este hallazgo indica que la porción extracelular del SG- γ es un domino critico para la persistencia del tejido muscular, sugiriendo además una interacción funcional con un ligando extracelular aun no identificado (Thomas 2001).

Por otra parte, en un modelo murino carente del SG- α se detectan niveles residuales de los SG's β y δ . Al parecer la existencia del complejo caracterizado por el SG- ε juega un papel compensatorio tanto en el ratón carente de SG- α como en pacientes con una deficiencia en el mismo (Liu y Engvall 1999).

En la década de los 60' se encontró un animal con una sarcoglicanopatía espontánea (Homburger et. al. 1962), dicho animal es el hamster miopático BIO 14.6, que es un excelente modelo para estudiar las cardiomiopatías asociadas a las sarcoglicanopatías, pues en estos animales que carecen del sarcoglicano δ la incidencia de cardiomiopatía es de 100% (Sakamoto et al., 1999). Para entender los aspectos moleculares de las sarcoglicanopatías, se han aislado varias sublíneas a partir del hamster BIO 14.6 tales como la UMX7.1 y la TO-2 (Li et al., 1995) los cuales tienen una eliminación genómica en la región promotora del extremo 5' del gen para el sarcoglicano δ que impide la síntesis del transcrito y por lo tanto de la proteína (Sakamoto et al., 1997).

Por otro lado se han desarrollado modelos animales deficientes en los sarcoglicanos α (Duclos et al., 1998), β (Durbeej et al., 2000), γ (McNally et al., 1996B) y δ (Coral-Vázquez et al., 1999). Los ratones deficientes en el sarcoglicano β o δ , muestran una distrofia muscular grave, con grandes regiones de necrosis como característica distintiva, de forma semejante a lo observado en tejidos

infartados. La severidad de estas distrofias, se puede explicar en base a la importancia de los sarcoglicanos β y δ durante la formación del complejo como se explicó anteriormente. Ambos ratones presentan una distrofia muscular progresiva similar a las LGMD2E y LGMD2F, respectivamente (Coral-Vázquez et al., 1999 y Durbeej et al., 2000). Así mismo, estos modelos animales desarrollan cardiomiopatía dilatada, misma que se propone es causada por la pérdida completa del complejo SG-SPN en músculo liso vascular. a ausencia de estas proteínas en dicho tejido ocasiona que haya un decremento en el tamaño del lumen vascular, lo cual conduce a una lesión isquémica que da como resultado la aparición de áreas de necrosis y el inicio de la cardiomiopatía, acompañado de un agravamiento de la distrofia muscular (Coral-Vázquez et al., 1999 , Durbeej et al., 2000).

De manera interesante el ratón carente del SG- γ también desarrolla cardiomiopatía dilatada además de la presencia de distrofia muscular similar a la LGMD2C (Hack et al., 1999), solo que en este modelo la cardiomiopatía no se atribuyó a la carencia de la proteína en el músculo liso vascular, pues se pensaba que en este tejido la proteína no se expresaba, fue hasta el trabajo de Barresi y colaboradores en el 2000 que se demostró lo contrario, y se pudo sugerir entonces que la razón al fenómeno cardiomiopático en este modelo se debía a la carencia de la proteína en el músculo liso vascular, aunque esto no ha sido demostrado experimentalmente (Cohn y Campbell, 2000).

La importancia de la integridad del complejo SG-SPN en la morfología vascular queda confirmada con el estudio del hamster cardiomiopático BIO 14.6 el cual, debido a la carencia natural del SG- δ , pierde como consecuencia el resto de los sarcoglicanos (Ervasti et al 1990). Adicionalmente se piensa que la patología del músculo liso vascular en este modelo animal es desarrollada a causa de una función vascular alterada y una contractilidad anormal de las aortas (Crespo et al 1997), disfunciones que son originadas a partir de la pérdida total del complejo SG-SPN en el músculo liso vascular (Coral-Vázquez et al 1999).

Con base en estas evidencias, es claro que la importancia del complejo SG-SPN no se remite únicamente a su función en músculo esquelético, sino que

es sumamente importante su presencia e integridad en músculo liso. A pesar de ello, no se ha ahondado en estudios al respecto, es por ello que decidimos iniciar con el análisis de la expresión del complejo SG-SPN en los vasos de cordón umbilical como modelo de músculo liso vascular.

1.4 MORFOFISIOLOGIA DEL CORDÓN UMBILICAL

Las características anatómicas generales del cordón umbilical se presentan de la siguiente manera; su color es blanco aperlado y un poco translúcido. la longitud del cordón se ve incrementada conforme avanza la gestación, en condiciones normales esta es de entre 55 y 65 cm y presenta un grosor de 1.5 cm.

El análisis histológico del cordón umbilical revela varias capas distintas. Sobre la superficie se encuentra una capa bien definida de epitelio amniótico. Este epitelio es escamoso y en la región de inserción fetal el cordón es a menudo multicapeado lo cual tiene una similitud con su contigüidad epidermal. Estudios de microscopía electrónica realizados en células amnióticas del cordón umbilical sugieren que el epitelio es responsable de actividades de equilibrio de fluidos. La metaplasia escamosa del cordón umbilical es considerada una variante normal, y estudios estructurales de este epitelio revela similitudes morfológicas entre este epitelio y la epidermis fetal.

Más profundo al epitelio amniótico, el cual comprende la superficie del cordón umbilical, se encuentra una matriz estructural conocida como la gelatina de Wharton, este material esta compuesto en gran medida por los mucopolisacáridos ácido hialuronico y sulfato de condroitina. El análisis ultraestructural de este material revela la presencia de microfibrillas intercaladas y colágena esparcida, además de que los mastocitos son prominentes y su frecuencia se incrementa en la cercanía de la periferia de los vasos del cordón umbilical. En esta misma región y en el cordón en general, los macrófagos han sido raramente identificados.

Embebidos en la gelatina de Wharton se encuentran los vasos umbilicales los cuales consisten de una vena y dos arterias. La vena ocupa una posición

central, está desprovista de fibras elásticas y tiene dos capas de músculo liso unidas: una externa longitudinal y una interna, circular y más gruesa. Las dos arterias carecen de fibras elásticas, y contienen dos capas de músculo liso que se enrollan en sentido opuesto. Las arterias, que son más largas que la vena, se enrollan alrededor del eje funicular establecido por la vena, formando de esta manera un número variable de espirales. Aunque la vasculatura del cordón umbilical es de calibre considerable no hay canales linfáticos o *vasa vasuorum* presentes en esta estructura (Kliman 1999).

En el humano, la vena umbilical penetra en el hígado y forma una arcada de la que emergen diversas ramas mayores. Estas ramas conducen la sangre fetal más oxigenada. La rama mayor que parece ser la unión principal entre la vena umbilical y la vena cava inferior constituye el ducto venoso.

En cuanto a la inervación del cordón umbilical, aún se encuentra en discusión la presencia de elementos neurales en la parte extra-abdominal próxima al feto, en cambio, ha quedado establecida la existencia de tales estructuras en la porción intra-abdominal. Los nervios adrenérgicos aumentan en cantidad en dirección del ducto venoso y son más numerosos en el lugar de origen del mismo. Así mismo, en la zona de unión de la vena umbilical y del ducto venoso se hallan presentes fibras nerviosas del plexo iliaco y del tronco vagal anterior y posterior (Iffy, 1986).

Recientemente, mediante técnicas que utilizan tiocolina y acetilcolinesterasa se ha puesto de manifiesto la presencia de nervios autónomos en el extremo proximal al feto del cordón umbilical. Tales hallazgos son compatibles con la persistencia de elementos neurales vagales asociados con el ducto venoso, los cuales se encuentran aglomerados en la porción proximal del cordón umbilical (Iffy, 1986).

La anatomía general de los vasos sanguíneos presenta diversas capas de células altamente especializadas que se encuentran en contacto directo con la luz del vaso e interactúa por medio de sus receptores de membrana con los elementos de la sangre; la íntima que se compone de tejido conectivo, células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas, fibroblastos y en gran proporción células de músculo liso, linfocitos y monocitos; la capa media que esta formada

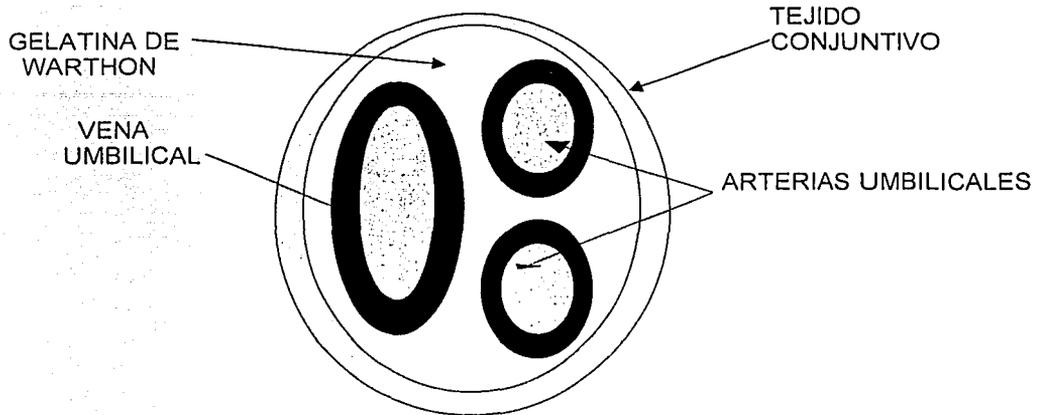
por la lamina elástica interna y por la lamina elástica externa, ambas laminas tienen un 90% de células de músculo liso; por ultimo se encuentra la adventicia que es la capa más externa de los vasos sanguíneos y esta formada por fibroblastos, colágeno y fibras nerviosas (López-Jaramillo, 2001) (fig. 5).

Una característica sumamente importante es que, a diferencia del resto de los vasos sanguíneos, los vasos umbilicales tienen circulación invertida, ya que la vena umbilical es la que transporta la sangre oxigenada al feto y las arterias umbilicales son las que sacan la sangre contaminada del mismo (Iffy, 1986).

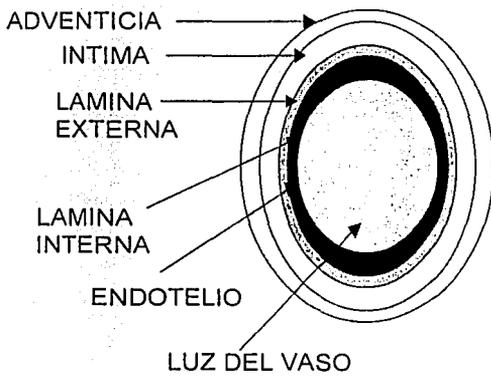
Por estas interesantes características, los vasos del cordón umbilical representan un excelente modelo de músculo liso vascular para el estudio de la expresión del complejo SG-SPN.

ESTRUCTURA ANATOMICA DEL CORDON UMBILICAL Y SUS VASOS

a) CORDON UMBILICAL



c) ARTERIA UMBILICAL



b) VENA UMBILICAL

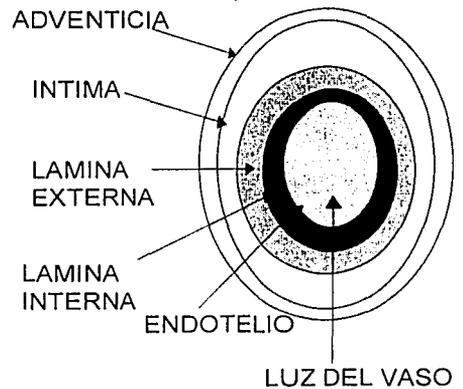


Fig. 5 Estructura anatómica del cordón umbilical humano, a) visión transversal del cordón umbilical, en donde se observan las dos arterias y la vena, b) vena umbilical y c) arteria umbilical, en estas dos figuras se muestran las diferentes capas que conforman el vaso.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con los antecedentes reportados, es evidente que los estudios encaminados a conocer la expresión del complejo SG-SPN se han enfocado principalmente al estudio del músculo estriado. Sin embargo, recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia del complejo SG-SPN en el funcionamiento del músculo liso vascular y su participación en el desarrollo de cardiomiopatías asociadas a las LGMD's. Además, debido a la estrecha relación de comunicación molecular, y unión intercelular que existe entre el músculo liso vascular y el endotelio se presume que pudiera existir alguna posible participación del complejo SG-SPN en esta íntima relación. Debido a esto, en el presente trabajo se realizó un estudio sobre la expresión del complejo SG-SPN en el músculo liso y endotelio utilizando los vasos sanguíneos de cordón umbilical como modelo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL:

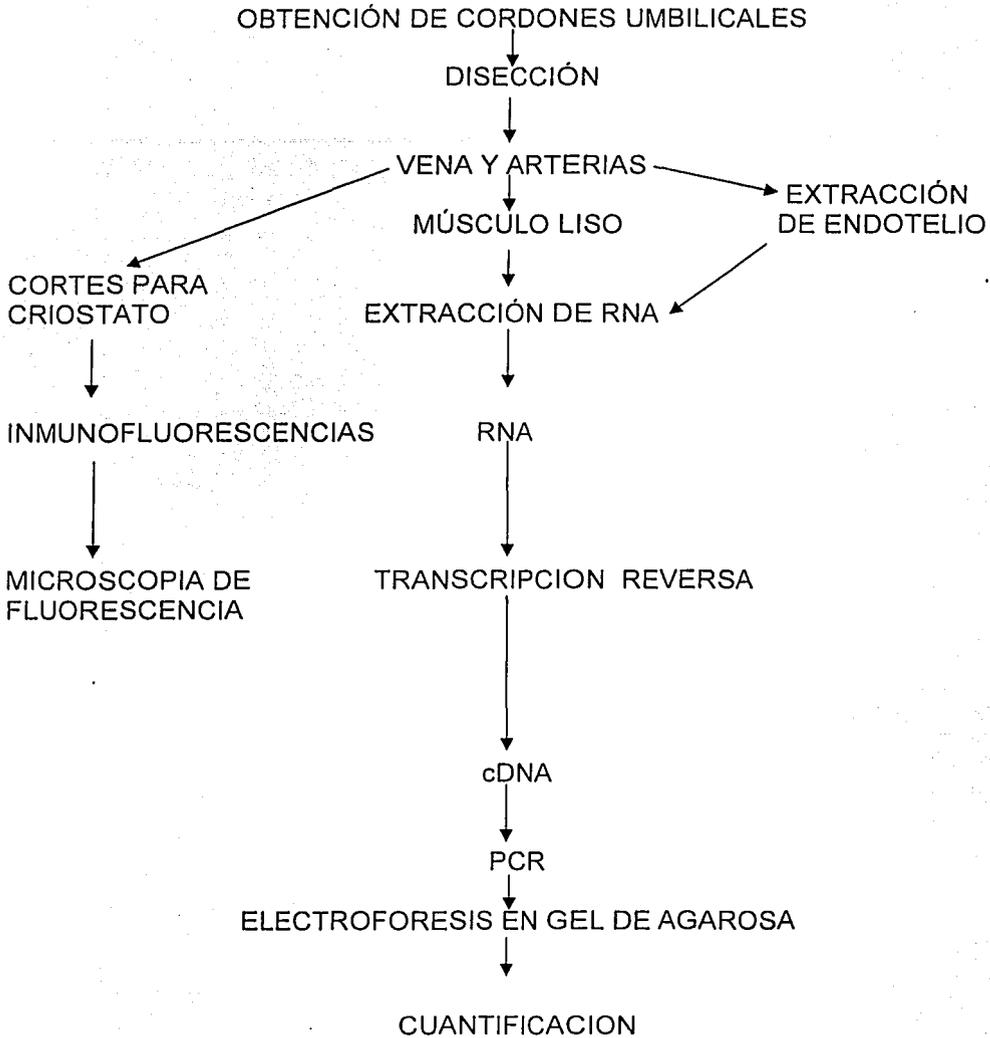
- Analizar la expresión de cada uno de los componentes del complejo SG-SPN en músculo liso y endotelio de vena y arteria de cordón umbilical.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Analizar la expresión de los mRNAs de cada uno de los componentes del complejo SG-SPN por medio de RT-PCR semi-cuantitativo en músculo liso y endotelio de vena y arteria de cordón umbilical.
- Determinar la localización de cada uno de los miembros del complejo SG-SPN en células de músculo liso y endotelio por medio de inmunofluorescencia y doble inmunofluorescencia en criosecciones de vena y arteria de cordón umbilical.

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

DIAGRAMA DE FLUJO



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CORDÓN UMBILICAL.

Las muestras de cordón umbilical fueron proporcionadas por el servicio de Ginecobstetricia de la Clínica 4 (Hospital Luis Castelazo Ayala) del IMSS con autorización y previa revisión de nuestro protocolo por el comité de educación médica y evaluación ética del propio hospital Luis Castelazo Ayala. Los cordones de aproximadamente 10 cm de largo, se colocaron en un tubo cónico estéril con solución de NaCl al 0.9% y fueron transportados en hielo hasta el laboratorio. De inmediato se procedió a la disección para aislar los fragmentos de vena y arteria a partir de los cuales se obtuvo el RNA total tanto de músculo liso de vena y arteria así como de endotelio de ambos vasos y también se obtuvieron los fragmentos de tejido para los ensayos de inmunofluorescencia mismos que se conservaron a -70°C.

5.2 DISECCIÓN DE LA VENA Y LAS ARTERIAS UMBILICALES.

El cordón umbilical se colocó en una tapa de caja de Petri en NaCl 0.9%, posicionada sobre una palangana con hielo. Con equipo de disección estéril, se extrajeron las arterias y la vena del cordón umbilical y se colocaron en un tubo cónico estéril sumergido en hielo hasta el momento de realizar la separación de las células endoteliales del músculo liso y la posterior extracción de RNA.

5.3 EXTRACCIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES A PARTIR DE VENA Y ARTERIA DE CORDÓN UMBILICAL.

Una vez que se disectaron las arterias y la vena se hizo un corte a lo largo de todo el vaso de tal forma que la luz del vaso quedara expuesta. Se incubaron los vasos por separado 30 min. a 4°C en un tubo cónico con solución fisiológica (NaCl 0.9%), con una mezcla de colagenasa tipo I y IV (Gibco BRL™) 0.75 mg/ml de cada una. Transcurrido el tiempo se colocaron los vasos sobre una tapa de caja petri posicionada sobre una palangana con hielo y se raspó la luz del vaso con el embolo de una jeringa para desprender las células endoteliales. Se colectó el raspado y se centrifugó 10 min a 3500 rpm a 4°C. Se deshechó el sobrenadante y

la pastilla se resuspendió en solución salina y se centrifugó de la misma forma. Se recuperó la pastilla y se sometió a procesamiento para extracción de RNA. Este proceso se llevo a cabo para cordones umbilicales de sexo femenino y masculino y también para los fragmentos de cordón umbilical de las tres diferentes porciones: distal, media y proximal al feto.

5.4 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE MÚSCULO LISO Y ENDOTELIO DE VENA Y ARTERIA UMBILICALES.

El RNA total fue aislado a partir de las células de músculo liso vascular y endotelio de cordón umbilical (vena y arteria), por medio del método de extracción fenólica (Chomczyk y Sacchi, 1987) con TRIZOL (Gibco, BRL™). Para extraer el RNA de músculo liso se pesó 1 gr de cada uno de los vasos en un tubo cónico de 50 ml nuevo y estéril, y se adicionó a cada uno 20 ml de TRIZOL (fenol-sales de guanidina), se homogenizó el tejido con un homogenizador con aspas de metal, las cuales fueron previamente lavadas con agua DEPC (dietil-pirocarbonato) 0.1%, NaOH 0.2 N, RNAsaway (Gibco, BRL™) y por ultimo con agua DEPC en orden secuencial. El tejido se homogenizó hasta disgregarse por completo y de inmediato se centrifugó a 3500 xg por 5 min a 4°C; en este paso se precipitan restos celulares grandes y proteínas. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de cristal templado de 30 ml frio el cual fue previamente lavado con agua DEPC y horneado a 200°C por 3 horas. Se adicionaron 2 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 seg. y se incubó en hielo por 15min. Posteriormente la muestra se centrifugó a 12000 xg a 4°C por 15 min. en este paso se formaron dos fases por diferencia de densidad, la fase fenólica orgánica que contiene el DNA y restos de proteínas desnaturalizadas y la fase superior de cloroformo con el RNA . Esta fase se transfirió a un tubo cónico de plástico nuevo estéril, y se adicionó un volumen igual de isopropanol el cual minimiza la hidrólisis química del RNA, se agitó y almacenó a -20°C, al menos por 45 min. Enseguida se tomaron alícuotas de 1 ml y se transpasaron a en tubos de plástico de 1.5 ml estériles que se centrifugaron por 15 min. a 12000 xg a 4°C, con lo que el RNA se precipitó formando una pastilla. Para lavar y deshidratar el RNA se decantó el sobrenadante

y la pastilla se resuspendió en etanol al 75%, luego se centrifugó por 5 min. a 12000 xg a 4°C (2 veces). Se decantó el etanol y la pastilla se secó por 10 min. Al final la pastilla de RNA se disolvió en un volumen aproximado de 50 µl de agua DEPC al 0.1 % y se almacenó a -70°C. Este procedimiento se realizó con guantes de látex estéril cambiándolos al menos por dos ocasiones, manteniendo las muestras a 4°C de manera constante.

Para el caso de la extracción del RNA total de endotelio se realizó el mismo procedimiento que para la extracción de RNA del músculo liso. Debido a que el tamaño de la muestra fue mucho menor, (el peso total de las células endoteliales fue de aprox. 10 mg.) se ajustaron los volúmenes de los reactivos utilizados para la extracción fenólica. Este proceso se llevo a cabo para los cordones umbilicales de productos de sexo femenino y masculino y también para los fragmentos de cordón umbilical de las tres diferentes porciones: distal, media y proximal al feto.

5.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION, PUREZA e INTEGRIDAD DEL RNA:

Para conocer la concentración que tiene el RNA obtenido de los dos tipos celulares de ambos vasos, se tomó una pequeña alícuota del RNA obtenido y se preparó una dilución 1:100 con agua DEPC y se midió la absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro con lámpara UV. Una vez que se obtuvieron los valores de absorbancia de los RNAs se realizó la siguiente ecuación para conocer los valores precisos de concentraciones de RNA:

$$\text{CONCENTRACIÓN (ng/}\mu\text{l)} = \frac{(\text{ABSORBANCIA a 260 nm}) (\text{VOLUMEN TOTAL}) (40)}{(\text{VOLUMEN DE MUESTRA})}$$

Para conocer la integridad del RNA extraído se sometió una muestra del mismo a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. La técnica de electroforesis se basa en el corrimiento de las muestras a través de la matriz porosa formada por la agarosa polimerizada, siendo el tamaño del poro determinado por la concentración de este reactivo en una solución de sales. Al aplicarse una corriente eléctrica a través del gel, los ácidos nucleicos que poseen

una carga negativa conferida por los grupos fosfato, migran hacia el ánodo en condiciones de pH neutro. (Maniatis et al., 1989).

El gel de agarosa al 1%, adicionalmente contiene 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio, este compuesto es un colorante fluorescente a la luz UV que posee en su estructura un anillo plano que brinda a la molécula la capacidad de intercalarse entre las bases de los ácidos nucleicos. Para preparar este gel además se requirieron los siguientes reactivos: Amortiguador 1x de Tris-base 890 mM, ácido bórico 890 mM y EDTA 2 mM que funciona como intercambiador de iones durante el corrimiento electroforético (Maniatis et al., 1989). Agarosa y cámara de electroforesis con peine previamente lavados con agua DEPC y NaOH 0.2 N. El tamaño del gel empleado fué de 11.5 x 13.5 cm con un espesor de 0.8 mm aproximadamente. Se mezcló 1 μl de la muestra de RNA con 5 μl de colorante de corrida, el cual contiene azul de bromofenol al 0.1% y glicerol al 30%. El voltaje al que se corrieron las muestras de RNA en el gel de agarosa fue de 100 voltios. Para visualizar el RNA en el gel, este se transilumina en una lámpara de luz ultravioleta a 260 nm. La radiación UV es absorbida por el DNA y emitida al bromuro de etidio que a su vez reemite la radiación a 590 nm en la región rojo naranja del espectro visible, entonces se le toma una fotografía y se almacena para los resultados.

5.6 ENSAYOS DE RT-PCR SEMICUANTITATIVO.

Recientemente, se han desarrollado varios adelantos moleculares que involucran la detección y cuantificación de moléculas individuales de RNA. Una de las técnicas más sensibles para este análisis es la reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa (RT-PCR), la cual tiene la ventaja de detectar bajas copias de RNA mensajero a partir de una pequeña cantidad de células.

Debido a que el proceso de amplificación es exponencial, una pequeña diferencia en alguna de las variables que controlan la amplificación pueden afectar de gran manera la cantidad de DNA producido. Un método producido para la

cuantificación de RNA compara la señal de RT – PCR de un RNA determinado con la señal dada por el RNAm de un gen constitutivo (Chelly et al., 1990).

Para el análisis de la cantidad de RNAm de cada uno de los componentes del complejo SG-SPN, el RNA total obtenido de las células de músculo liso vascular y endotelio de la vena y la arteria de cordón umbilical fue sometido al método semi-cuantitativo de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Förster, 1994), para lo cual se requirió de la elaboración del cDNA y posteriormente se realizaron los ensayos de PCR.

5.6.1 SÍNTESIS DE cDNA:

El DNA complementario o cDNA es una molécula de DNA copiada a partir de un RNA mensajero por medio de transcripción reversa, por lo tanto carente de los intrones presentes en el DNA geonómico (Lodish et al 1995). Esta técnica se realiza una vez que se ha obtenido el RNA total del tejido y se fundamenta en la creación de una cadena complementaria del mRNA, el cual funciona como molde, con la participación de los hexameros al azar que funcionan como primers y de los nucleótidos que funcionan como sustrato para la transcriptasa reversa, de lo que resulta una doble hebra de DNA complementario (Alberts et al., 1994). El molde de cDNA o DNA copia para los ensayos de RT-PCR fue sintetizado a partir del RNA total por medio de transcripción reversa utilizando el método de hexameros al azar, el cual se realizó en dos fases y es de la siguiente manera:

Una vez obtenida la concentración del RNA de cada uno de los tipos celulares analizados se calculó el volumen necesario para tener 1 µg y posteriormente se realizó la siguiente reacción:

Primera fase de la reacción:

2 µg de RNA

0.5 µl de hexameros 100 µM

agua para llevar el volumen final de ambas fases de la reacción a 20 µl

Segunda fase de la reacción:

4 µl de amortiguador 5x para cadena molde el cual contiene 50 mM de Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl y 3 mM de MgCl₂.

1 μ l de mezcla de dinucleótidos trifosfato (dNTP's) a las siguientes concentraciones: 2 mM de adenina trifosfato (d ATP), 2 mM de citosina trifosfato (d CTP), 2 mM de guanina trifosfato (d GTP), 2 mM de timina trifosfato (d TTP), neutralizados a pH 7 con NaOH.10 mM.

1 μ l (5U/ μ l) de la enzima transcriptasa reversa MMLV (virus de la leucemia murina de Moloney)

2 μ l del detergente DTT (dithiothreitol) como inhibidor de RNAsas.

La primera fase de la reacción la cual contiene el RNA, se sometió a un ciclo de desnaturalización a 72°C por 3 minutos en un termociclador , transcurrido este tiempo se sacó de inmediato el tubo que contiene la reacción del termociclador y se puso en hielo. En seguida se llevó a cabo la segunda fase de la reacción, en la que se le agregó a este primer tubo la mezcla de la reacción, que contiene la enzima transcriptasa reversa. Una vez que se adiciono esta mezcla, se sometió a un ciclo de síntesis del cDNA a 37°C por 60 min. en el termociclador. Finalmente la mezcla de reacción se somete a un ciclo de 72°C por 7 min en el termociclador. Una vez que terminaron todos los ciclos el cDNA se almacenó a -20°C.

5.6.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR):

La PCR consiste en la amplificación logarítmica de un segmento definido de DNA. Para amplificar las regiones transcritas de los miembros del complejo SG-SPN, las secuencias de los oligonucleótidos que fueron utilizados son las siguientes: SG- β sentido 5'- ATGCGTGAGAAGGCTGTTGA-3' (nt 106 a 126), antisentido 5'-TTTGGTCCAATGCGAATCAC-3' (nt 307 a 327), secuencia en GenBank E15251, el tamaño esperado del amplificado es de 221 bases; SG- γ sentido 5'-TACTCATCATCCTCGTTGTG-3' (nt 252 a272), antisentido 5'-TACAGTCACATTCTGGGTTG-3' (nt 444 a 464) secuencia en GenBank E15252, el tamaño esperado del amplificado es de 212 bases; SG- ϵ sentido 5'-TCCACCTTACCCAAAACCTG-3' (nt 252 a 272), antisentido 5'-AACGGGAAGTCTTCTGCAGA-3' (nt 493 a 513) secuencia en GenBank AF036364, el tamaño esperado del amplificado es de 261 bases ; SG- δ , sentido 5'- ACACCTAATGTCAGGGCAGAC-3' (nt 576 a 597), antisentido 5'-

TCTGTCCTTCTCATCCCTCAC-3' (nt 738 a 759) secuencia en GenBank U58331, el tamaño esperado del amplificado es de 183 bases. Para el SG- α los primers utilizados fueron, sentido 5'-GCAATTGGTGAGCAGAGCAGCAGAT-3' (nt 118 a 153) antisentido 5'-GGTGCAATGTGACCCTGGTGGATAA-3' (nt 396 a 421) secuencia en GenBank E15249, el tamaño esperado del amplificado es de 650 bases. Para el sarcospan los primers fueron, sentido 5'-CTAGTCAGGGACACTCCATT-3' (nt 244 a 264), antisentido 5'-GGCACTCAGCAGAAAGTATAA-3' (nt 371 a 392) secuencia en GenBank AF016028, con un tamaño esperado de amplificado de 147 bases. Como control interno se amplificó simultáneamente un fragmento de GAPDH (gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa) con los siguientes primers sentido 5'-ATCCCATCACCATCTTCCAG-3' (nt 275 a 295), antisentido 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3' (nt 572 a 592) secuencia en GenBank NM002046, con un tamaño esperado de amplificado de 317 bases. Los ensayos de PCR fueron realizados con los siguientes reactivos y con el método tradicional:

2.5 μ l de cDNA

0.2 μ l de Taq-Polimerasa (5U/ μ l)

0.5 μ l de dNTP's a las siguientes concentraciones: 2 mM de d ATP, 2 mM de d CTP, 2 mM de d GTP, 2 mM de TTP, neutralizados a pH 7 con NaOH.

2.5 μ l de amortiguador 10x para PCR, el cual contiene 0.5 M de KCl, 0.1 M Tris-HCl pH 8.4,

1.5 μ l de MgCl₂ 15 mM

0.5 μ l de cada uno de los primers utilizados para cada sarcoglicano (5pmoles) agua para llevar la reacción a 25 μ l

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

Un ciclo de desnaturalización de la doble cadena de cDNA a 95°C por 5 min, seguido de 32 ciclos de PCR de 30 segundos a 95°C de desnaturalización, 30 seg. de alineamiento de los primers a 62°C en el caso del sarcoglicano β y δ ; 59°C, en el caso de los sarcoglicanos ϵ , γ y sarcospan; 72°C para el caso del sarcoglicano α . 72°C por 30 seg de extensión de los primers alineados en el caso

de todos los SG's y por ultimo 72°C por 7 min. de extensión final. Transcurridos los 32 ciclos de reacción la muestra se almacenó a -20°C

Los productos obtenidos del PCR se corrieron en electroforesis en gel de agarosa horizontal al 2% teñido con bromuro de etidio 0.5 µg/ml. De los 25 µl totales del producto de PCR se tomaron 10 µl y se mezclaron con 5 µl de colorante de corrida, azul de bromofenol al 0.1% y 30% de glicerol para el caso del SG-α; para el caso de los SGs β, γ, δ, ε y SPN el colorante de corrida es cianolxileno al 0.1% y 30% de glicerol. Para la preparación del gel se requirieron los siguientes reactivos: agarosa, amortiguador de corrida 1X el cual contiene tris-base 89 mM, ácido bórico 89mM y EDTA 2 mM (Maniatis et al. 1989). Las dimensiones del gel utilizado fueron de 11 x 13.5 cm y se corrió a un voltaje de 100 voltios. Los productos amplificados por PCR se visualizaron en el gel por medio de una lámpara UV, se les tomo una fotografía y posteriormente se cuantificaron los productos de RT-PCR obtenidos a través de densitometría y se normalizaron los valores obtenidos del transcrito del sarcoglicano correspondiente entre el control GAPDH.

5.7 CINÉTICAS DE COAMPLIFICACION.

Para realizar el análisis semicuantitativo de todos los transcritos del complejo SG-SPN, se hicieron ensayos de cinéticas de coamplificación por medio de RT-PCR utilizando los transcritos de los miembros del complejo SG-SPN y el transcrito de la enzima gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) el cual es un gen constitutivo de la mayoría de los tipos celulares y en este caso funge como control interno de la reacción y además sirve para la normalización de los valores obtenidos por medio de densitometría de los transcritos del complejo SG-SPN amplificados por RT-PCR.

Las cinéticas de coamplificación se realizaron con los siguientes reactivos y de la siguiente manera:

2.5 µl de cDNA

0.2 µl de Taq-Polimerasa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

0.5 μ l de dNTP's a las siguientes concentraciones: 2 mM de d ATP, 2 mM de d CTP, 2 mM de d GTP, 2 mM de TTP, neutralizados a pH 7 con NaOH.

2.5 μ l de amortiguador 10x para PCR, el cual contiene 0.5 M de KCl, 0.1 M Tris-HCl pH 8.4,

1.5 μ l de MgCl₂ 15 mM

0.5 μ l de cada uno de los primers utilizados para amplificar cada sarcoglicano.

0.5 μ l de cada uno de los primers utilizados para amplificar el transcrito del gen constitutivo (GAPDH).

agua para llevar la reacción a 25 μ l

NOTA: exclusivamente para el caso de la co-amplificación del transcrito del SG- α y GAPDH se utilizo DMSO (dimetil sulfoxido) a una concentración del 4% en el volumen final de la reacción, este reactivo se utiliza para eliminar bandas inespecíficas en la reacción, debido a su condición como desnaturante de asas en el DNA.

Las condiciones de la PCR fueron las mismas que para la amplificación de cada transcrito del complejo SG-SPN de manera individual, solo que en este ensayo los productos de la reacción de PCR se analizaron en los ciclos 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32 y 34.

Las condiciones de amplificación para el transcrito del SG- α requirió de los siguientes cambios:

Un ciclo de desnaturalización de la doble cadena de cDNA a 95°C por 5 min, a partir de los siguientes parámetros; se realizaron 32 ciclos de PCR, 30 segundos a 95°C de desnaturalización, 30 seg a 62°C para alineamiento de los primers, 30 seg a 72°C para la extensión y por ultimo 72°C por 7 min. de extensión final.

La muestra de cada uno de los ciclos de PCR que se utilizaron, se visualizó por medio de electroforesis en gel de agarosa horizontal a una concentración del 2%, teñido con bromuro de etidio como se menciona con anterioridad. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

5.8 INMUNOFLUORESCENCIAS.

Con el fin de determinar la localización de cada uno de los componentes del complejo SG-SPN en las células de músculo liso vascular y endotelio de cordón umbilical se tomaron fragmentos de la vena y la arteria umbilicales de aproximadamente 2 cm de largo los cuales se sellaron con hilo de sutura por uno de los extremos, por el extremo que quedó libre se rellenaron con resina de fijación (Tissue Tec) con la ayuda de una jeringa y una aguja de punta roma. Una vez que se rellenaron los vasos se selló este otro extremo de la misma manera que el extremo anterior con hilo de sutura. De inmediato se montaron sobre una hoja de corcho se cubrieron por completo con Tissue Tec, y enseguida se sumergieron las preparaciones en isopentano frío. Para enfriar el isopentano, se vertieron 300 ml. de este reactivo en un recipiente de aluminio, este se colocó dentro de una palangana que contenía nitrógeno líquido sin permitir su mezcla con el isopentano. La temperatura del isopentano es adecuada cuando se forman en el recipiente de aluminio precipitados blancos. Una vez que la resina solidificó dentro del isopentano se recuperaron las muestras y se almacenaron de inmediato a -70°C . Posteriormente se hicieron cortes transversales de un grosor de $7\ \mu\text{m}$ de ambos vasos en un criostato. Los cortes se montaron y se adhirieron sobre un portaobjetos el cual previamente fue sumergido toda la noche a temperatura ambiente en una solución de poli-L-lisina disuelta 1:10 con agua desionizada. Los cortes ya montados sobre el portaobjetos se permeabilizaron por 3 min. con Tritón X 100 al 0.3% v/v en PBS 1X frío, transcurrido el tiempo se lavaron las preparaciones con PBS 1X por 5 min. Para bloquear la señal de fondo los cortes se incubaron con solución bloqueadora la cual se compone de amortiguador de sales de fosfato de sodio 0.5 M, albúmina sérica de bovino al 5% p/v y 0.5% p/v de gelatina de laboratorio durante 60 min. a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se incubaron los cortes con el anticuerpo primario para los sarcoglicanos α (NCL-a-SARC) que reconoce la región carboxilo de la proteína; β (NCL-b-SARC) que reconoce la región amino de la proteína; γ (NCL-g-SARC) que reconoce la región carboxilo de la proteína; y δ (NCL-d-SARC) que reconoce la región amino terminal de la proteína; anticuerpo contra la región

carboxilo de la distrofina (NCL-Dys 2); anticuerpo contra la región amino de la distrofina (NCL-Dys 2) (Laboratorios Novo Castra) los cuales fueron utilizados como marcador de músculo liso, a una dilución de 1:200 con PBS 1X por 3 hr. a temperatura ambiente o 4°C toda la noche. Para los anticuerpos anti SG-ε (C-17) que reconoce la región carboxilo terminal de la proteína, anti utrofina región amino (N-19) y anti utrofina región carboxilo (H-300), así como anti región carboxilo de β-distroglucano (C-20), anti región carboxilo terminal de la proteína α-distrobrevina (V-19), anti caveolina-1 (H-97) (Laboratorios Santa Cruz) la dilución manejada fue 1:100 en PBS 1X bajo las mismas condiciones de incubación. Para el caso del anticuerpo anti-sarcospan diseñado y obsequiado generosamente por el Dr. Dominique Mornet la dilución utilizada fue 1:100 en solución de bloqueo bajo las mismas condiciones de incubación. El anticuerpo utilizado como proteína específica o marcador de endotelio fue anti caveolina-1 (H-97) (CAV-1) dirigido contra la porción carboxilo terminal de la proteína (Laboratorios Santa Cruz) a una dilución de 1:100 en PBS 1X bajo las mismas condiciones de incubación. Al término de este tiempo se lavaron las preparaciones tres veces con PBS 1X frío por 5 min cada vez. Enseguida se incubaron por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario que es inmunoglobulina G (IgG) de ratón acoplada a un fluorocromo cianina (Cy3) a una dilución de 1:250 en PBS 1X para el caso de los anticuerpos anti SGs α, β, γ y δ, distrofina región carboxilo (Dys 2) y distrofina región amino (Dys 3). Para el caso de los anticuerpos anti SG-ε, y anti utrofina región amino el anticuerpo secundario que se utiliza es IgG de cabra acoplada al mismo fluorocromo, la dilución utilizada fue 1:200 en PBS 1X bajo las mismas condiciones de incubación. El anticuerpo anti utrofina región carboxilo, el anti CAV-1, utilizan como anticuerpo secundario IgG de conejo acoplado con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FICT) bajo las mismas condiciones de dilución e incubación que el Cy3. Para el caso específico del anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario anti-sarcospan este fue FICT anti-conejo en dilución 1:100 con solución de bloqueo, bajo las mismas condiciones de incubación. Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario, se

lavarón las muestras cuatro veces con PBS 1X frío, 5 minutos cada vez. Posteriormente a las muestras se les quitó el exceso de solución amortiguadora y se les adicionó 5 μ l de medio de montaje Vecta Shield con DAPI (Laboratorios Vector), el cual tiñe los núcleos de inmediato se colocó el cubreobjetos sobre la muestra y se sellaron las orillas del mismo con un poco de barniz de uñas para evitar que la muestra se seque y que el cubre objetos se deslice sobre el portaobjetos (Kaaren y Janssen, 1989). Se dejaron secar un poco y se observaron las muestras en el microscopio de fluorescencia.

La manera de realizar las dobles inmunofluorescencias fue la siguiente:

Primero se incubaron los cortes de ambos vasos con el anticuerpo primario anti caveolina-1 (marcador endotelial), posteriormente se incubó el anticuerpo secundario, se hicieron los lavados correspondientes y se incubó el anticuerpo primario contra la proteína de interés y posteriormente el anticuerpo secundario correspondiente, como ya ha sido establecido. En el caso de la doble inmunofluorescencia para la proteína sarcospán esta se ensayo con las proteínas SG- β , δ , ϵ , región amino y carboxilo de la distrofina, así como β -dístroglicano, sin importar el orden de incubación de los anticuerpos primarios, seguido de la incubación de sus correspondientes anticuerpos secundarios especie específicos, bajo las condiciones antes mencionadas. Al término de los lavados, el proceso de montaje del cubre objetos sobre las muestras es el mismo que para las inmunofluorescencias sencillas, al finalizar se observaron al microscopio de fluorescencia (Hagiwara et al., 2002). Una colocación de dos proteínas con diferente marca fluorescente implica un viraje de color de los fluorocromos originales a un color resultado de la mezcla de estos dos, por ejemplo FICT (verde) más Cy3 (rojo) da como resultado tonalidades amarillo-naranja. Mientras que en las regiones de tejido donde no exista colocación de proteínas los fluorocromos permanecerán con su color original.

De esta manera y tomando en cuenta el patrón de expresión de la proteína marcadora se puede inferir las zonas de expresión de las proteínas de interés.

VI. RESULTADOS

6.1 EXPRESIÓN DE LOS TRANSCRITOS CODIFICANTES DEL COMPLEJO SG-SPN EN MÚSCULO LISO VASCULAR DE CORDÓN UMBILICAL

Para el análisis de la expresión de los transcritos codificantes de los componentes del complejo SG-SPN, se extrajo RNA total de vena y arteria de ambos vasos del cordón umbilical humano en fase terminal de gestación como único criterio de inclusión, independientemente del tipo de parto del recién nacido. Adicionalmente se realizaron extracciones de RNA de los tejidos de interés a partir de cordón umbilical de sexo femenino y masculino con la finalidad de saber si existían diferencias en los niveles de expresión de los genes estudiados como posibles moléculas involucradas en procesos de recepción de hormonas sexuales. Además, también se realizó extracción de RNA de las porciones proximal, media y distal del cordón umbilical del recién nacido tanto de músculo liso como de endotelio de ambos vasos, teniendo como objetivo conocer el patrón de expresión de los genes estudiados a lo largo del cordón umbilical (fig. 6).

Se obtuvo una concentración de RNA de 100 -200 ng/ μ l, de cada uno de los tejidos, lo cual fue óptimo para llevar a cabo los ensayos de RT-PCR. En la figura 6 se puede observar el corrimiento electroforético de los RNAs obtenidos a partir de músculo liso de vena y arteria así como de endotelio de ambos vasos del cordón umbilical, tanto de sexo masculino como femenino (fig. 6). También se realizó extracción de RNA total de las porciones proximal media y distal al feto, así como también de músculo esquelético humano (dato no mostrado), mismo que se utilizó en algunos ensayos como control positivo. Una vez cuantificado y habiendo verificado la integridad de los RNAs a utilizar, se procedió a continuar con los ensayos de RT-PCR.

Para llevar a cabo los ensayos de RT-PCR, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada uno de los transcritos de los miembros del complejo SG-SPN, así como de la enzima GAPDH, cuyo transcrito fue considerado como control endógeno o constitutivo. Como resultado de la RT-PCR se obtuvieron los

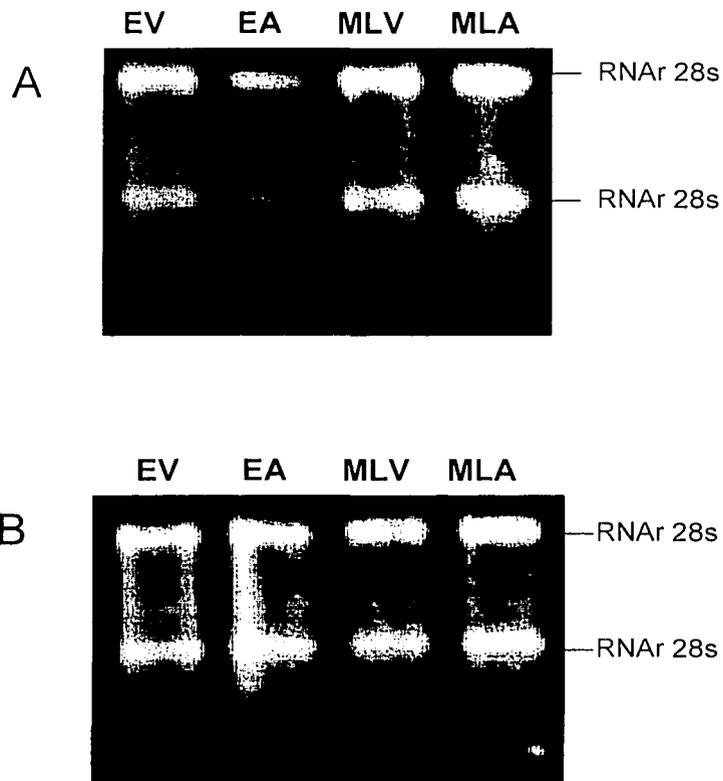


Fig. 6 Analisis de la integridad del RNA extraido a partir de vena y arteria de cordón umbilical humano. Corrimiento electroforetico en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. RNA total vasculatura de cordón umbilical se sexo femenino (A) y de sexo masculino (B) EV=endotelio de vena; EA=endotelio de arteria; MLV=musculo liso de vena; MLA=musculo liso de arteria.

amplificados de los tamaños esperados: 147 pares de bases (pb) para el caso del sarcospán; 183 pb para el SG- δ ; 212 pb para el SG- γ ; 221 pb para el SG- β ; 261 pb para el SG- ϵ ; 730 pb para el SG- α e y el tamaño esperado del amplificado para la GAPDH es de 317 pb. (fig. 7). Los mRNAs de los SG β , δ , ϵ y del SPN se expresaron en niveles elevados tanto en vena como en arteria. En el caso del SG- γ la expresión fue cualitativamente menor en comparación con lo observado para los otros sarcoglicanos y con el nivel de expresión observado para el músculo esquelético. Se observó un patrón similar de expresión para el SG- α , que sin embargo, se detecta en mayor concentración que el SG- γ . (Fig. 7).

6.2 CINÉTICAS DE COAMPLIFICACION POR RT-PCR DEL COMPLEJO SG-SPN Y GAPDH

Habiendo corroborado la expresión de todos los transcritos del complejo SG-SPN en el músculo liso vascular de cordón umbilical, se procedió a analizar los niveles de expresión de los mismos. Para obtener los datos semicuantitativos es necesario contar con un control interno de expresión constitutiva. Este transcrito se amplifica en la misma reacción de RT-PCR que el transcrito a analizar, es decir que se lleva a cabo un ensayo de coamplificación. Esto nos sirve para normalizar los valores obtenidos tomando en cuenta cualquier variación en la reacción de amplificación, que se refleja directamente en la cantidad de producto obtenido del control interno. Para este propósito, decidimos utilizar el transcrito de la enzima GAPDH, cuyos niveles deben permanecer constantes de manera independiente a los del complejo SG-SPN. Para obtener los valores relativos de expresión de los transcritos a cuantificar, es necesario llevar a cabo una cinética de amplificación en la que se determine el ciclo óptimo para detectar diferencias en la cantidad de producto de PCR resultante. Esto sucede durante la fase exponencial de amplificación, antes de que la reacción alcance la fase estacionaria, en cuyo caso las diferencias serían prácticamente indetectables. Al mismo tiempo, se debe analizar este parámetro en el control constitutivo, ya que está sometido a las mismas condiciones de amplificación y es cuantificado siguiendo el mismo

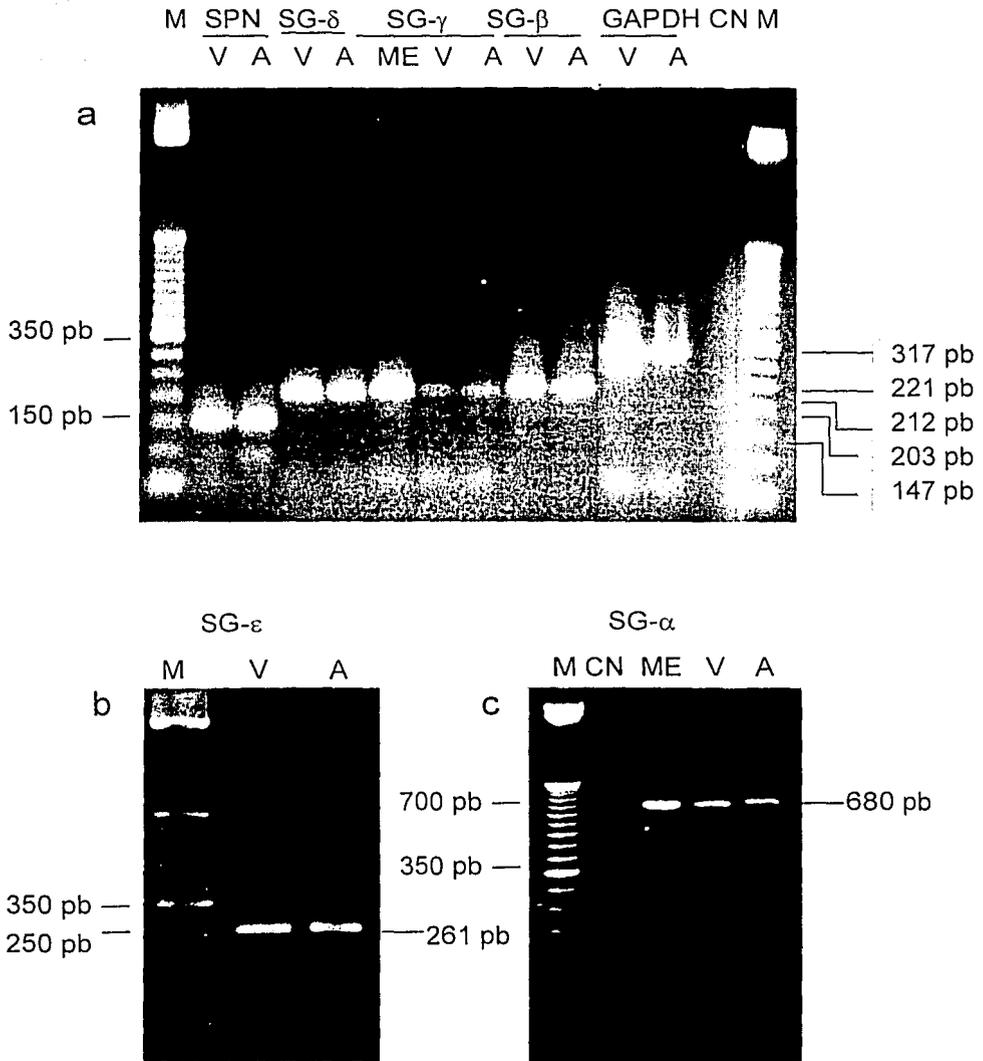


Fig. 7 Analisis de la expresión por RT-PCR de complejo SG-SPN en musculo liso de arteria y vena de cordón umbilical. Corrimiento electroforetico en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Los RNA mensajeros de los SG's β , γ , δ , sarcospan (SPN) y gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (a), SG- ε (b) y SG- α (c) fueron amplificados a partir de RNA total de vena (V) y arteria (A) del cordón umbilical por medio de RT-PCR utilizando oligonucleotidos especificos. Para el caso de los SG's α y γ se utilizó como control positivo el amplificado a partir de músculo esquelético (ME). M: marcador de peso molecular escalera de 50 pares de bases (pb), CN: control negativo sin cDNA.

principio. Finalmente, se elige el ciclo óptimo en que ambos productos de PCR se encuentren en fase exponencial y sean perfectamente detectables.

La cinética de coamplificación se llevó a cabo tomando muestras de los ciclos 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 de la PCR. Como se puede observar en la figura 8 todos los transcritos del complejo SG-SPN se coamplificaron aceptablemente con el control interno GAPDH lo cual nos indica que este gen presenta una expresión uniforme en nuestro modelo de estudio, lo que lo hace sumamente confiable para los ensayos semi-cuantitativos. Se hizo el análisis densitométrico de cada uno de los productos de PCR y los valores obtenidos fueron graficados (fig. 9). De acuerdo a los valores obtenidos, decidimos tomar el ciclo 30 como el óptimo para llevar a cabo los ensayos semicuantitativos, ya que es en este ciclo en el que los productos de PCR se encuentran en fase exponencial, de tal forma que nos permite detectar diferencias de expresión. A partir del ciclo 32 de amplificación se pudimos observar que los amplificados comienzan a entrar en la zona estacionaria o de decaimiento de la amplificación, en dicho punto se comienzan a perder las diferencias existentes entre el control endogeno y el transcrito de nuestro interés.

6.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSCRITOS CODIFICANTES DEL COMPLEJO SARCOGLICANO-SARCOSPAN EN ENDOTELIO DE ARTERIA Y VENA DE CORDÓN UMBILICAL

Para el análisis de la expresión de los transcritos de los componentes del complejo SG-SPN en endotelio, se extrajo RNA total de endotelio de ambos vasos del cordón umbilical bajo las mismas características de inclusión que para el caso del músculo liso. Adicionalmente se realizaron extracciones de RNA de endotelio de cordón umbilical de sexo femenino y masculino, además de endotelio de ambos vasos de las porciones proximal, de igual forma que para el músculo liso.

A partir de endotelio se obtuvo una concentración de RNA total de 50 -100 ng/ μ l, lo cual fue suficiente para llevar a cabo los ensayos de RT-PCR. Una vez cuantificado y habiendo verificado la integridad de los RNAs a utilizar, se procedió

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

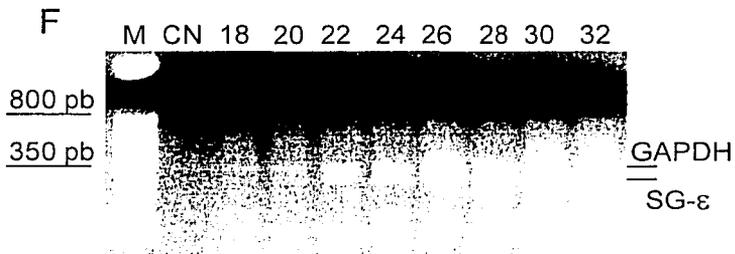
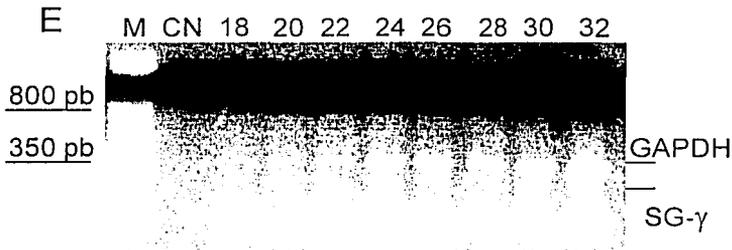
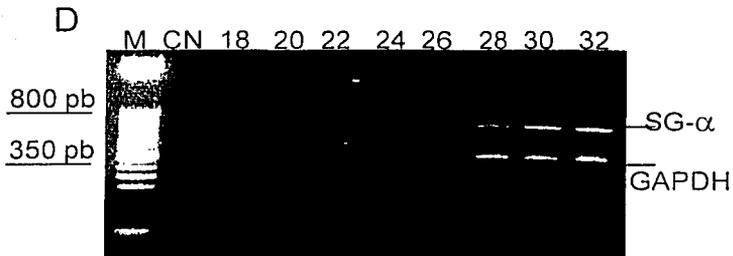
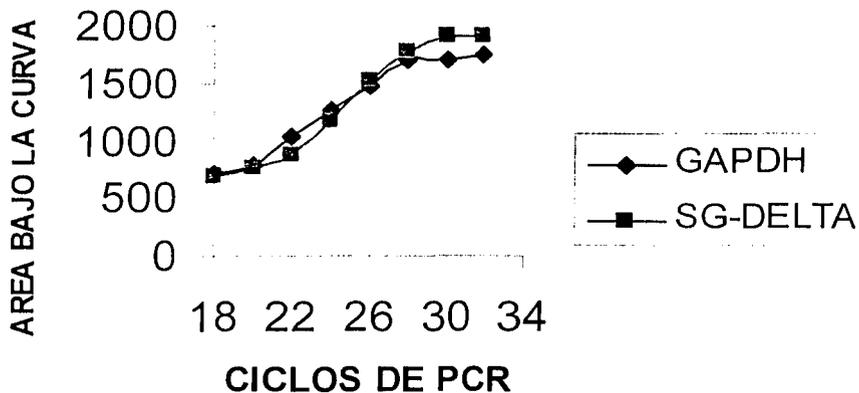


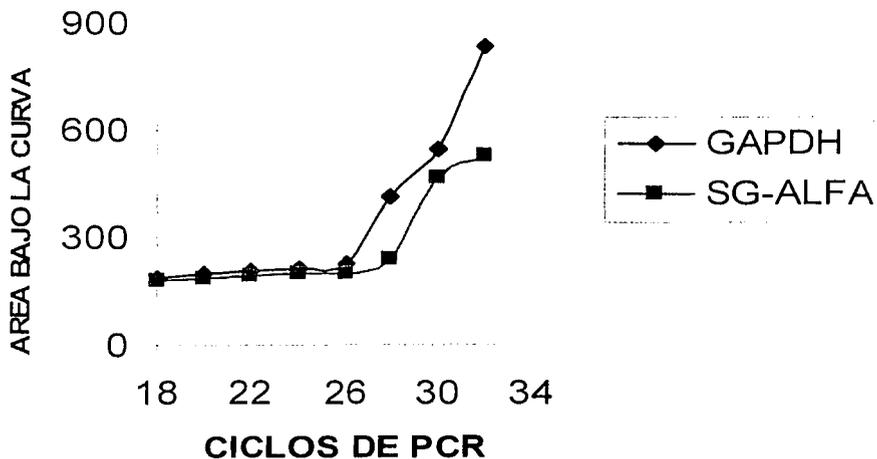
Figura 8. Cinéticas de coamplificación de los transcritos del complejo SG-SPN y GAPDH. Electroforésis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR correspondientes a las cinéticas de coamplificación de los transcritos del complejo SG-SPN de vena umbilical de 18 a 32 ciclos. M: marcador de peso molecular en escalera de 50 pb CN: control negativo de la reacción sin cDNA. A: SG- β ; B: SG- δ ; C: SPN; D: SG- α ; E: SG- γ ; F: SG- ϵ

CINETICAS DE COAMPLIFICACIÓN DEL COMPLEJO SG-SPN Y GAPDH

A

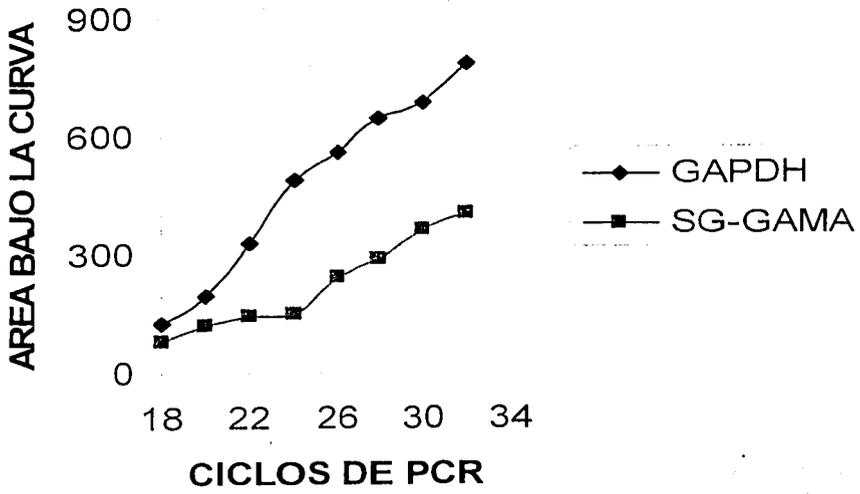


B

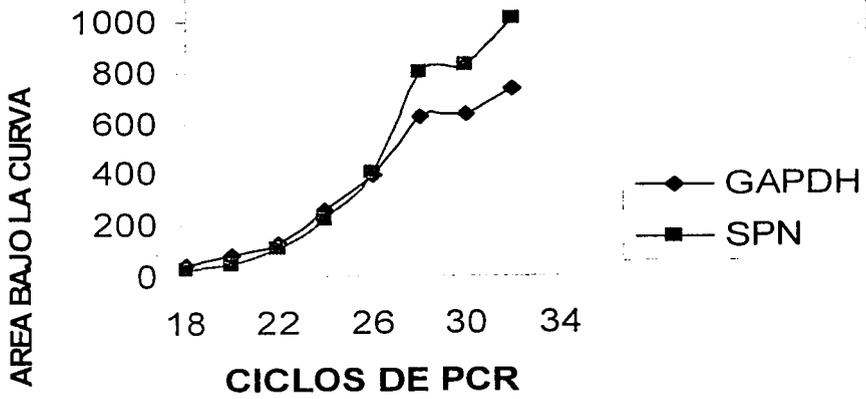


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C

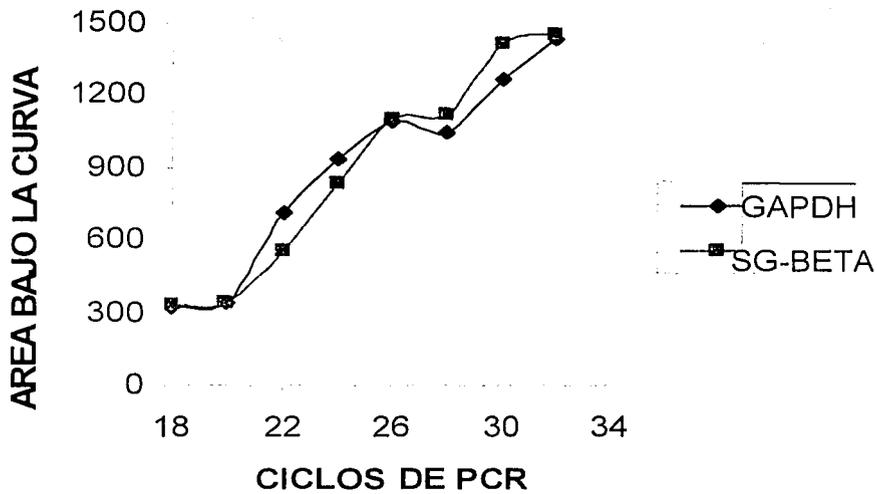


D

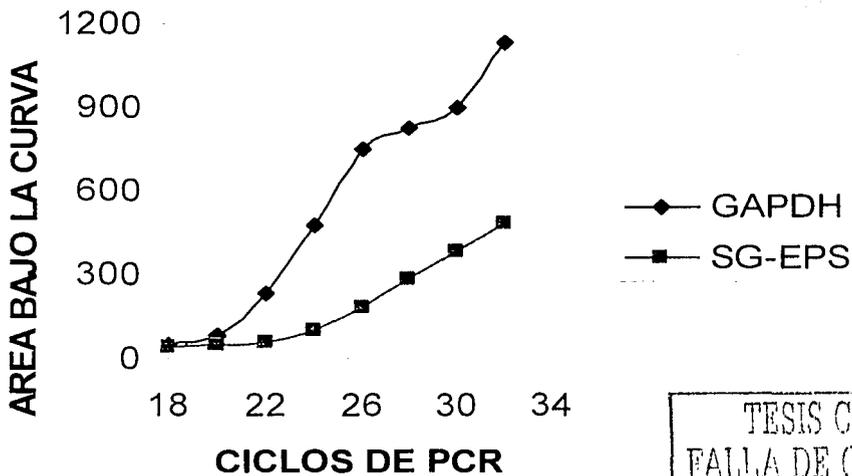


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

E



F



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 9.- Cinética de coamplificación del (A) SG- δ y GAPDH, (B) del SG- α y GAPDH (C) del SG- γ y GAPDH, (D) del SPN y GAPDH (E) del SG- β y GAPDH y (F) del SG- ϵ y GAPDH en músculo liso de vena de cordón umbilical. El eje "ciclos de PCR" indica el número de ciclos de PCR, el eje "área bajo la curva" indica el valor de la intensidad relativa de la banda amplificada de los SG's, SPN y GAPDH y teñida en el gel.

a continuar con los ensayos de RT-PCR. En lo que respecta al análisis de los transcritos del complejo SG-SPN en el endotelio de ambos vasos, se debe mencionar que es el primer reporte en el que se analiza la expresión del complejo en este tipo celular, los hallazgos fueron interesantes, se pudieron detectar los mRNAs de los SGs β , δ , ϵ y SPN en un nivel elevado de expresión como lo demuestra el análisis semi-cuantitativo tomando como control el nivel de expresión del transcrito del gen GAPDH, con el cual se normalizaron los valores obtenidos de los transcritos analizados (figs 10-14). El transcrito del SG- ϵ fue el que se detectó en menor nivel en el endotelio mostrando diferencias significativas con respecto a los niveles de expresión observados para músculo liso de ambos vasos (fig. 15).

Estos resultados son interesantes debido a que detectamos la presencia de los transcritos de los SG's β , δ , ϵ y sarcospán como se puede observar en la figura 10, 11 y 12 respectivamente en los tamaños esperados por medio de RT-PCR utilizando los mismos pares de primers que fueron utilizados para amplificar el complejo en músculo liso. Los mRNAs de los SG α (dato no mostrado) y γ (fig. 11) no se detectaron en células endoteliales de ninguno de los vasos a diferencia de lo que se observó en el músculo liso vascular en donde si se detectó su expresión tanto en vena como en arteria (fig. 12 y 11 respectivamente). Es importante señalar que no se observaron diferencias en los niveles de expresión de los transcritos de los sarcoglicanos en los cordones umbilicales de ambos sexos (fig. 10, 11, 12 y 13) ni en las tres regiones del cordón umbilical analizadas (dato no mostrado), por lo que en adelante se trabajó indistintamente con cualquier región.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

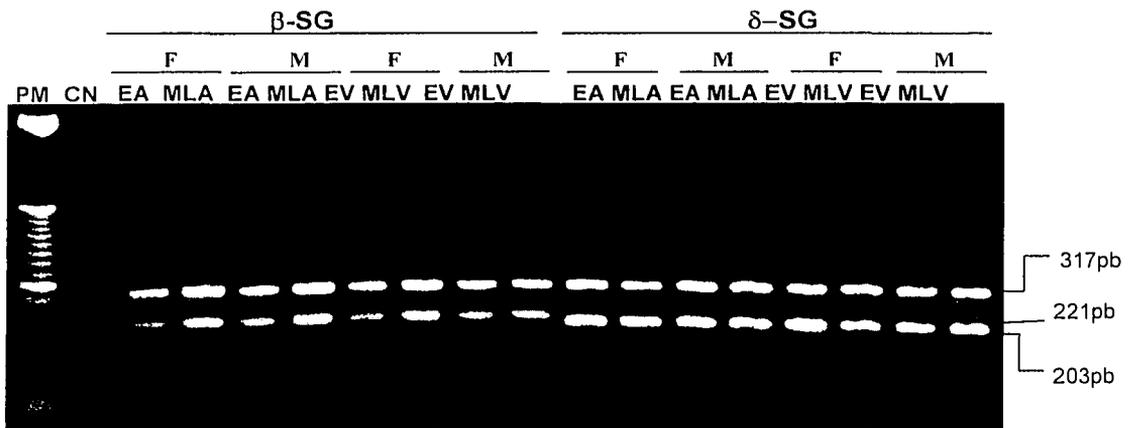


Fig. 10.- Analisis de la expresi3n por RT-PCR del SG- β y SG- δ coamplificado con GAPDH a partir de RNA total de musculo liso y endotelio de vena y arteria de cord3n umbilical de neonato femenino y masculino. PM=marcador de peso molecular 50 pares de bases (pb); CN=control negativo EA=endotelio de arteria; EV=endotelio de vena; MLA=musculo liso de arteria; MLV=musculo liso de vena; F=femenino; M=masculino.

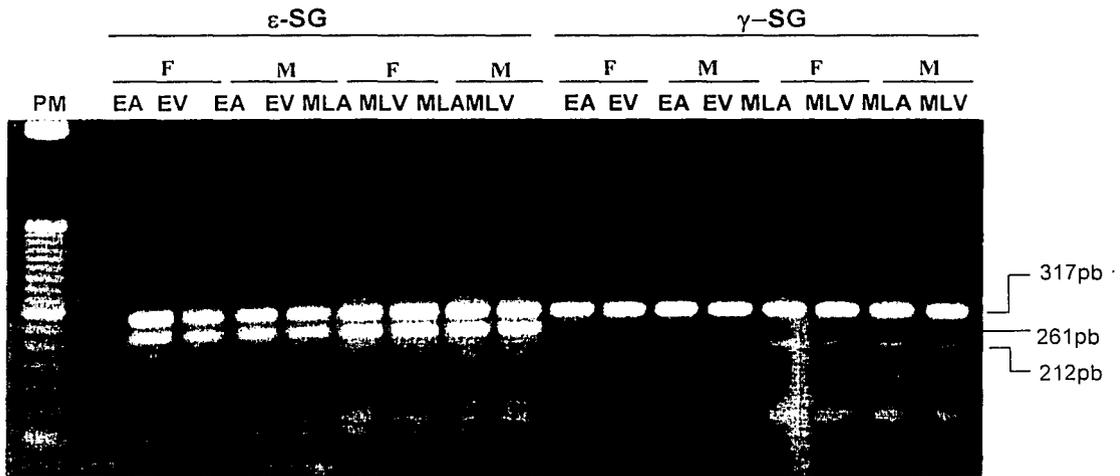


Fig. 11.- Analisis de la expresión por RT-PCR del SG- ϵ y SG- γ coamplificado con GAPDH a partir de RNA total de musculo liso y endotelio de vena y arteria de cordón umbilical de neonato femenino y masculino. PM=marcador de peso molecular 50 pares de bases (pb); CN=control negativo EA=endotelio de arteria; EV=endotelio de vena; MLA=musculo liso de arteria; MLV=musculo liso de vena; F=femenino; M=masculino

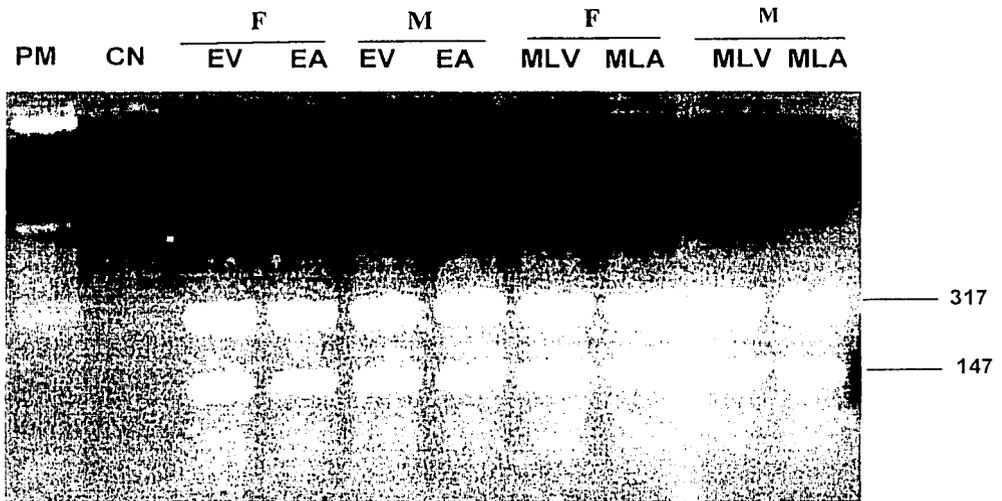


Fig. 12.- Analisis de la expresión por RT-PCR del sarcospan coamplificado con GAPDH a partir de RNA total de musculo liso y endotelio de vena y arteria de cordón umbilical de neonato femenino y masculino PM=marcador de peso molecular 50 pares de bases (pb); CN=control negativo EA=endotelio de arteria; EV=endotelio de vena; MLA=musculo liso de arteria; MLV=musculo liso de vena; F=femenino; M=masculino.

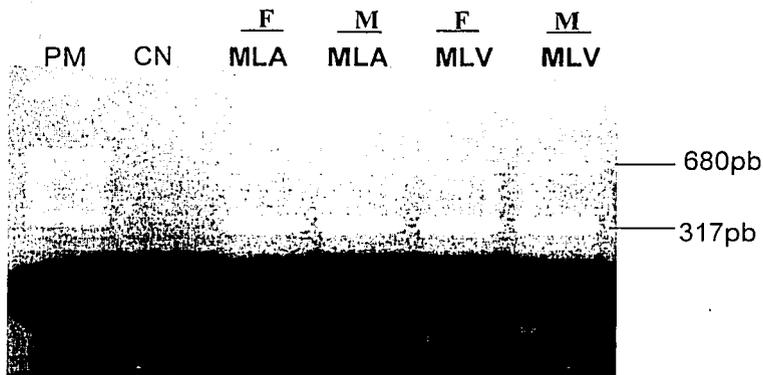


Fig. 13.- Analisis de la expresión por RT-PCR del SG- α coamplificado con GAPDH a partir de RNA total de musculo liso de vena y arteria de cordón umbilical de neonato femenino y masculino PM=marcador de peso molecular 50 pares de bases (pb); CN=control negativo; MLA=musculo liso arteria; MLV=musculo liso de vena; F=femenino; M=masculino

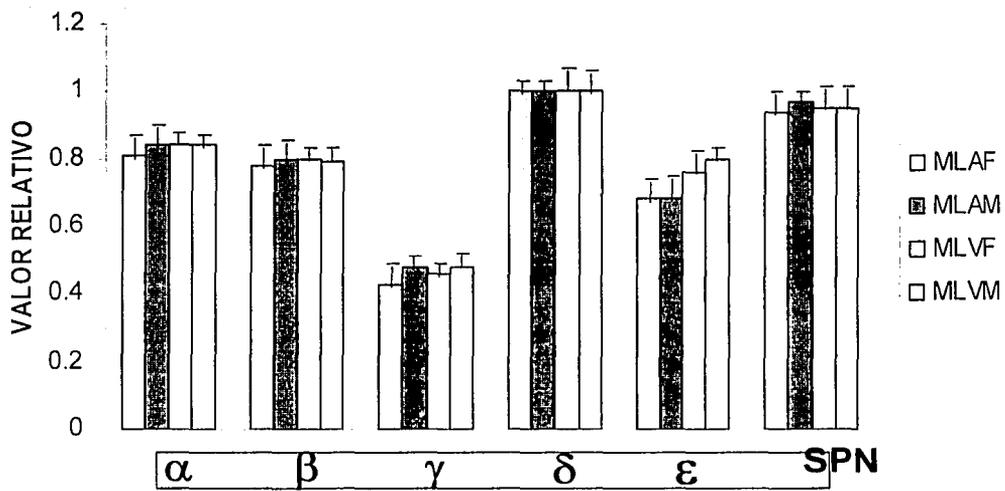


Fig. 14.- Expresión relativa de los transcritos del complejo SG-SPN en músculo liso de arteria y vena de cordón umbilical de neonato masculino y femenino. Valores normalizados con el control endógeno (GAPDH) a 30 ciclos de PCR MLAF=músculo liso arteria femenino; MLAM=músculo liso arteria masculino; MLVF=músculo liso vena femenino; MLVM=músculo liso vena masculino.

6.4 ANÁLISIS SEMI-CUANTITATIVO DE LA EXPRESIÓN DEL COMPLEJO SG-SPN EN MÚSCULO LISO Y ENDOTELIO DE VENA Y ARTERIA DEL CORDÓN UMBILICAL

Este análisis se llevó a cabo por medio de un programa computacional el cual se encarga de hacer una cuantificación del nivel de intensidad que presentan las bandas del amplificado teñidas con bromuro de etidio en el gel de agarosa, lo que nos permite conocer la expresión relativa de transcrito amplificado. Para analizar los resultados, se normalizaron los valores de la expresión de cada uno de los transcritos amplificados entre el valor obtenido del control endógeno (GAPDH), (fig. 15) lo cual elimina las variaciones intrínsecas de cada reacción de PCR a lo largo de todo el proceso. Una vez normalizados los valores, se graficó la expresión relativa de todos los transcritos (fig. 14 y 15). Los resultados demuestran que, para ambos vasos, existen ligeras diferencias en los niveles de expresión de los transcritos del complejo SG-SPN aunque estas diferencias no son significativas como lo demuestra la prueba de desviación estándar, de la misma forma no existieron diferencias significativas en el análisis de los dos sexos (fig. 14 y 15). En donde se encontró diferencia, fue en los niveles de expresión de cada uno de los SG's de manera individual. El transcrito de mayor expresión en vena de ambos sexos fue el SG- δ seguido por SPN que se expresa en promedio 0.95 veces y después por el SG- α , que se expresa en promedio 0.83 veces, a éstos los siguen los SGs β y ϵ , que se expresan en promedio 0.79 y 0.78 veces, respectivamente, con respecto al nivel más alto de expresión que corresponde al transcrito del SG- δ . Por último, el transcrito de SG γ fue el que mostró una menor nivel de expresión de todos los miembros del complejo, con un nivel de 0.47 veces, en promedio, con respecto al SG- δ en la vena del cordón umbilical de ambos sexos.

En cuanto a los transcritos de arteria, el de mayor expresión fue el correspondiente al SG δ , seguido por los transcritos de SPN y SG α que se expresan 0.95 y 0.82 veces en promedio, respectivamente con respecto al nivel del transcrito del SG- δ . El transcrito del SG- β presentó igual nivel de expresión que

en la vena con un valor de 0.79 veces, el SG ϵ , al igual que en vena, mostró un nivel de expresión de 0.66 veces contra el transcrito de mayor expresión. Finalmente, del transcrito de SG γ que es el que menor nivel de expresión presenta, se observaron los mismos niveles que en vena, es decir, 0.47 veces con respecto al transcrito de mayor expresión que fue SG- δ .

En cuanto a los niveles de expresión relativa de los mRNA's del complejo SG-SPN en el endotelio de ambos vasos, SG- α y SG- γ no se expresaron en el endotelio de ninguno de los vasos. Por su parte los niveles de expresión del mRNA del SG- δ fueron los que mayor nivel de expresión presentaron en comparación con el resto de los miembros del complejo en el endotelio de arteria y vena de ambos sexos. El SG- β presentó un nivel de expresión muy homogéneo en el endotelio de los vasos analizados y no existió diferencia en el nivel de expresión en ambos sexos, para el endotelio de arteria de sexo femenino el nivel de expresión fue de 0.76 veces, en el endotelio de arteria para sexo masculino el nivel fue de 0.76 veces, para el caso del endotelio de vena en sexo femenino el nivel de expresión fue de 0.76 veces y para el caso del endotelio de vena de sexo masculino fue de 0.78 veces, con respecto a los valores del SG- δ .

El nivel de expresión del transcrito del sarcospán presento los siguientes valores; en endotelio de arteria de sexo femenino el valor de expresión fue de 0.88 veces, en endotelio de arteria de sexo masculino el valor fue de 0.84 veces, para el caso del endotelio de la vena de sexo masculino y femenino los niveles de expresión fueron iguales con 0.9 veces (fig. 14 y 15).

El caso más interesante fue presentado por el SG- ϵ ya que su transcrito fue el que menor nivel de expresión presentó en comparación con el nivel de expresión que presentaron los transcritos del resto de los miembros del complejo SG-SPN, para el endotelio de arteria de sexo femenino y masculino el nivel de expresión fue de 0.6 y 0.62 veces respectivamente, para el caso del endotelio de vena de sexo femenino y masculino los niveles de expresión fueron de 0.8 y 0.77 veces respectivamente.

Es importante destacar que no existieron diferencias significativas en los niveles de expresión de los transcritos del complejo SG-SPN analizados en el

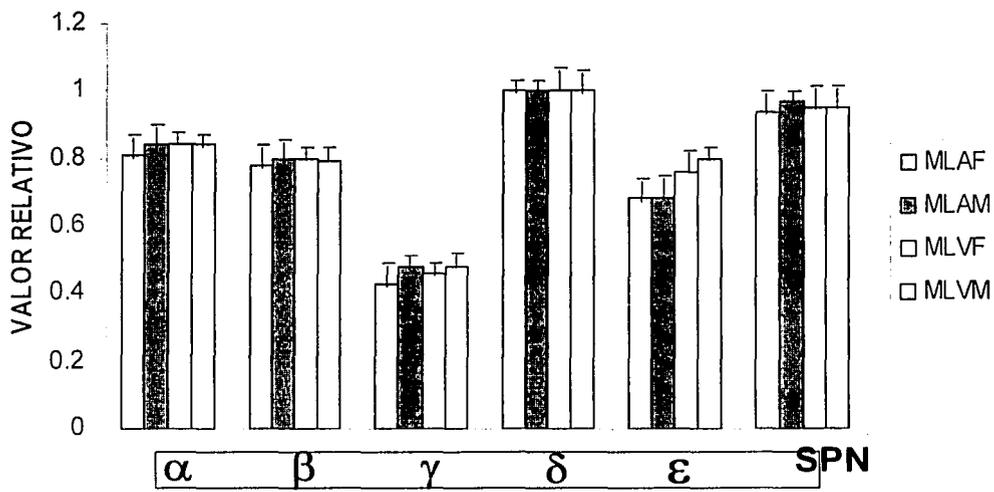


Fig. 14.- Expresión relativa de los transcritos del complejo SG-SPN en músculo liso de arteria y vena de cordón umbilical de neonato masculino y femenino. Valores normalizados con el control endógeno (GAPDH) a 30 ciclos de PCR. MLAF=músculo liso arteria femenino; MLAM=músculo liso arteria masculino; MLVF=músculo liso vena femenino; MLVM=músculo liso vena masculino.

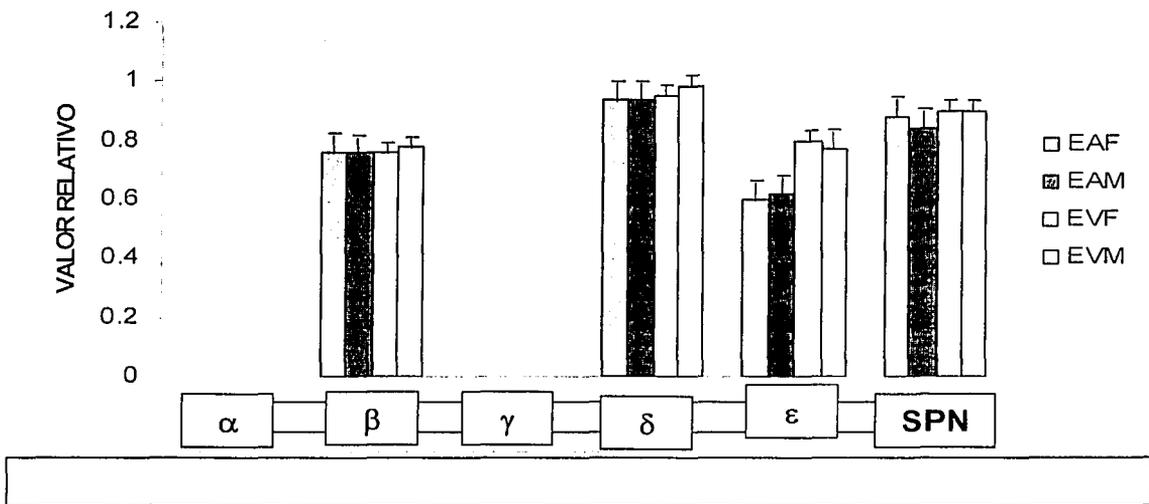


Fig. 15.- Expresion relativa de los transcritos del complejo SG-SPN en endotelio de arteria y de vena de cordón umbilical de neonato femenino y masculino. Valores normalizados con el control endogeno (GAPDH) a 30 ciclos de PCR. EAF=endotelio arteria femenino; EAM=endotelio arteria masculino EVF=endotelio vena femenino; EVM=endotelio vena masculino

cordón umbilical de los dos sexos, ni tampoco se presentó diferencia en el nivel de expresión de los transcritos en las diferentes porciones del cordón umbilical analizadas.

6.5 EXPRESIÓN DEL COMPLEJO SG-SPN Y PROTEINAS RELACIONADAS AL DGC EN CRIOSECCIONES DE VENA Y ARTERIA DE CORDÓN UMBILICAL

La presencia del complejo SG-SPN, (excepto α y γ SG), y proteínas asociadas al DGC tales como la distrofina, utrofina, β -dístroglicano, α -dístrobrevina y caveolina-1 se hizo evidente en músculo liso vascular de vena y arteria del cordón umbilical, mientras que en el endotelio sólo se detectó la presencia del SG- ϵ , SPN, utrofina, β -dístroglicano, α -dístrobrevina y caveolina 1. Esto se analizó por medio de ensayos de doble inmunofluorescencia e inmunofluorescencia sencilla en criosecciones transversales de ambos vasos como se describe en material y métodos. Sin embargo debido a que ambos vasos presentaron el mismo patrón de expresión de las proteínas las imágenes de los resultados solo muestran los ensayos realizados en arteria umbilical. Para este tipo de ensayos, se utilizaron anticuerpos específicos para los sarcoglicanos α , γ , β , δ y ϵ , así como para sarcospán, β -dístroglicano, α -dístrobrevina, utrofina y caveolina-1. Como control positivo de músculo liso se utilizaron anticuerpos específicos contra la porción amino y carboxilo de la distrofina, mientras que para el endotelio se utilizó como control positivo el anticuerpo contra caveolina-1. Para la estandarización de los ensayos se utilizaron cortes transversales de músculo esquelético, de cuyo complejo se conoce el patrón de expresión. Como se demuestra en los ensayos, los sarcoglicanos β (fig. 26 A), ϵ (fig. 16 A), δ (fig. 27 A) la proteína sarcospán (fig. 18 B) utrofina (fig. 17 A), β -dístroglicano (fig. 19 A), α -dístrobrevina (fig. 34 A) y caveolina-1 (fig. 16 B) se expresan en músculo liso de la arteria del cordón umbilical de la misma manera que la región amino (fig. 21 A) y carboxilo de la distrofina (fig. 20 A). Por su parte sólo las proteínas SG- ϵ (fig. 16 C), SPN (fig. 18 C), utrofina (fig. 17 C), β -dístroglicano (fig. 19 C), α -dístrobrevina (fig. 34 C), presentaron expresión en el endotelio así como en el músculo liso de ambos

vasos, de la misma forma que la proteína caveolina-1 de la cual se esperaba su expresión en tejido endotelial (fig. 16 B) este resultado es destacable ya que hasta hace poco tiempo se pensaba que la proteína caveolina-1 se expresaba exclusivamente en endotelio, no obstante reportes recientes demuestran la expresión de esta proteína en músculo liso vascular de mono (Hagiwara et al., 2002). En cuanto a los sarcoglicanos α y γ , no se observó su presencia en músculo liso ni en endotelio de vena ni de arteria por esta metodología (dato no mostrado).

Así mismo algunas otras proteínas pertenecientes al DGC tales como β -dístroglicano, α -dístrobrevina, de las cuales no se conocía su expresión en endotelio, en este reporte no solo se hace evidente su presencia en dicho tejido, sino que además se propone una posible asociación de estas con algunas otras proteínas tanto del complejo SG-SPN como del DGC, para de esta manera dar origen a lo que nosotros creemos sean formas alternativas del DGC carentes de distrofina en el endotelio.

Los ensayos de doble inmunofluorescencia (todas las figuras "C") demuestran los posibles patrones de colocalización de las proteínas analizadas y nos dan una idea de las probables formas alternativas de complejos formadas tanto en músculo liso como en endotelio (fig. 36).

Para una explicación más sencilla y detallada de los resultados mencionados con anterioridad, en la tabla 1 se muestra el patrón de expresión del complejo SG-SPN y algunas otras proteínas del DGC en músculo liso (ML) y endotelio (E) de vena y arteria de cordón umbilical analizadas por doble inmunofluorescencia.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La tabla 1 describe de manera simplificada los patrones de expresión y colocalización del complejo SG-SPN y proteínas relacionadas en el músculo liso y endotelio de cordón umbilical.

Proteínas analizadas	Figura	Tejido en el que colocalizan	Proteínas analizadas	Figura	Tejido en el que colocalizan
SG-ε + UTR	32 A, B y C	ML y E	DYS-2 + CAV-1	20 A, B y C	Pocos puntos en ML
SG-ε + SPN	18 A, B y C	ML y E	DYS-3 + CAV-1	21 A, B y C	Pocos puntos en ML
SG-ε + CAV-1	16 A, B y C	ML y E	DYS-2 + SPN	22 A, B y C	Varios puntos en ML
UTR + CAV-1	17 A, B y C	ML y E	DYS-3 + SPN	23 A, B y C	Varios puntos en ML
βdistroglicano+SPN	19 A, B y C	ML y E	UTR + DYS-2	24 A, B y C	No colocalizan
βdistroglicano+UTR	33 A, B y C	ML y E	UTR + DYS-3	25 A, B y C	No colocalizan
SG-β + UTR	30 A, B y C	Pocos puntos en ML	SG-β + CAV-1	26 A, B y C	Pocos puntos en ML
αdistrobrevin+SPN	35 A, B y C	ML y E	SG-δ + CAV-1	27 A, B y C	Pocos puntos en ML
αdistrobrevin+UTR	34 A, B y C	ML y E	SG-β + SPN	28 A, B y C	Varios puntos en ML
SG-δ + UTR	31 A, B y C	Pocos puntos en ML	SG-δ + SPN	29 A, B y C	Varios puntos en ML

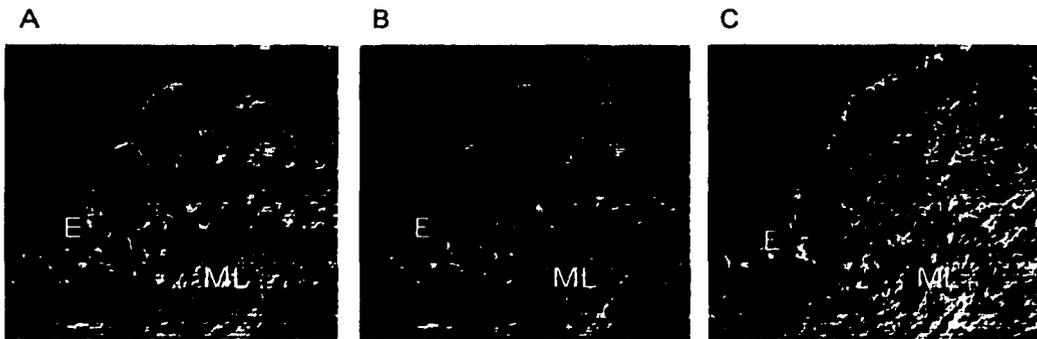


Fig. 16. Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para SG- ϵ (A) y caveolina 1 (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

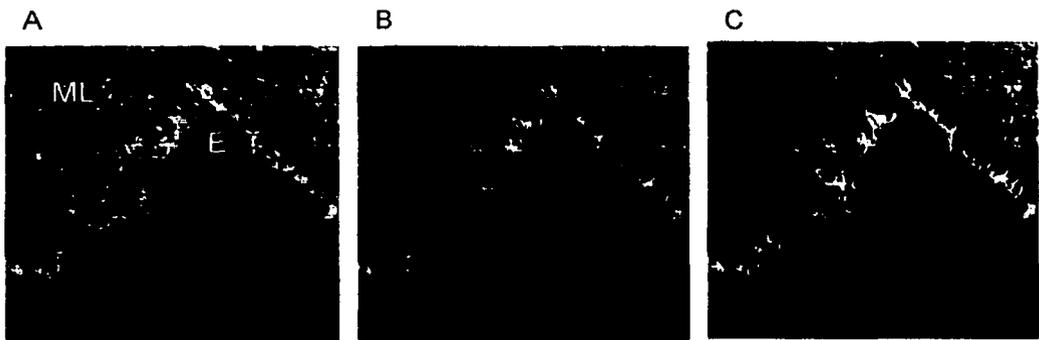


Fig. 17. Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para utrofina (A) y caveolina 1 (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

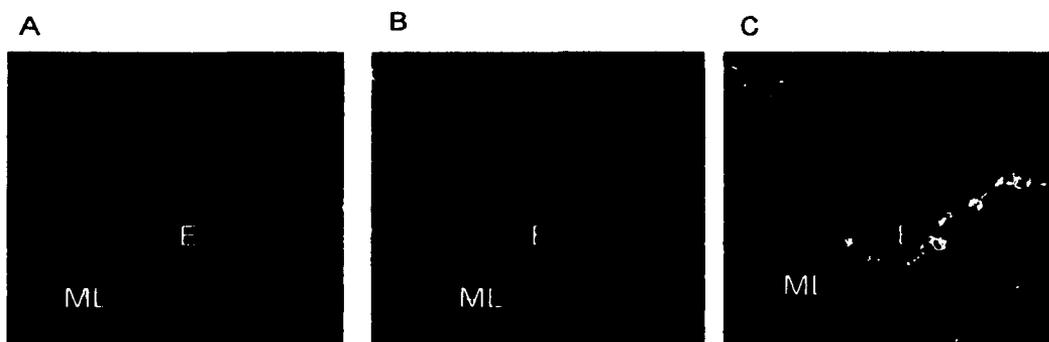


Fig. 18. Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para SG- ϵ (A) y sarcospan (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

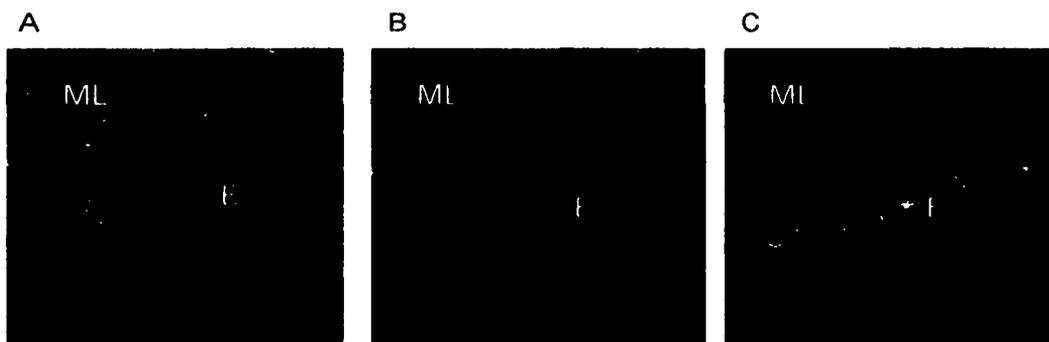


Fig. 19. Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para β -dístroglicano (A) y sarcospan (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

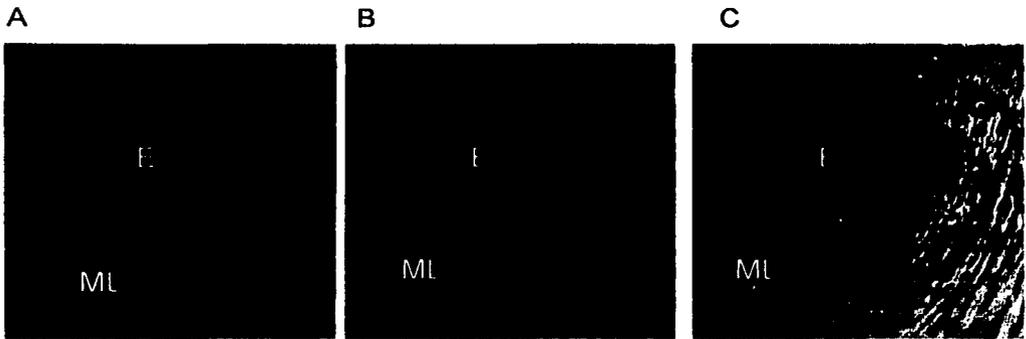


Fig. 20 Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para la región carboxilo de la distrofina (DIS-2) (A) y para caveolina 1 (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endoteio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

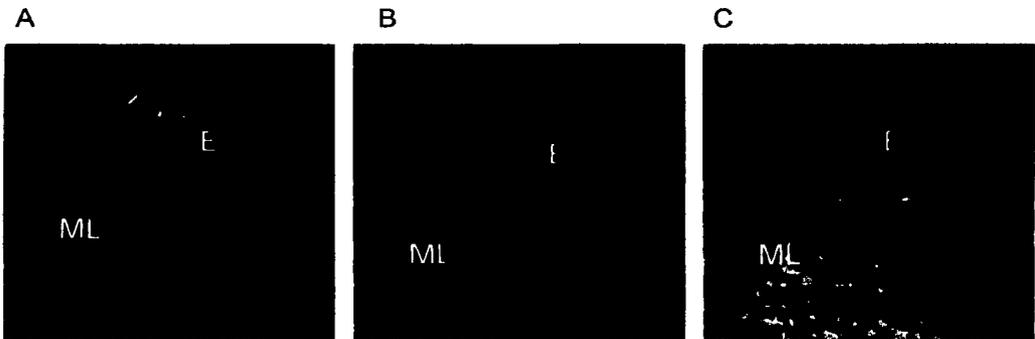


Fig. 21 Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para la región amino de la distrofina (DIS-3) (A) y para caveolina 1 (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

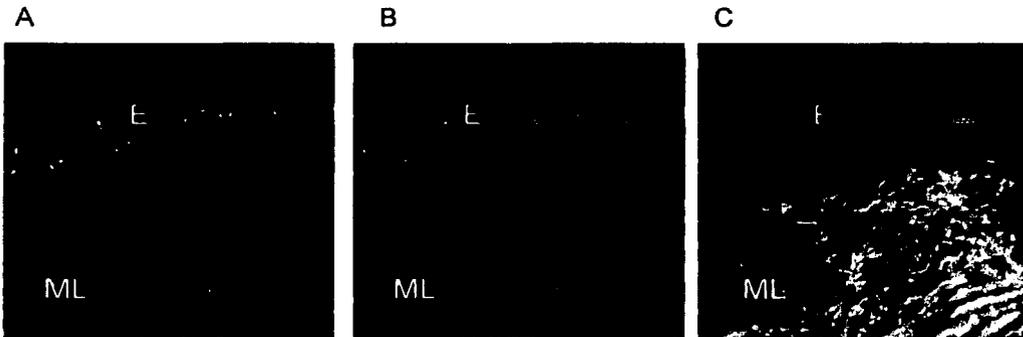


Fig. 22 Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para la región carboxilo de la distrofina (DIS-2) (A) y para sarcospan (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

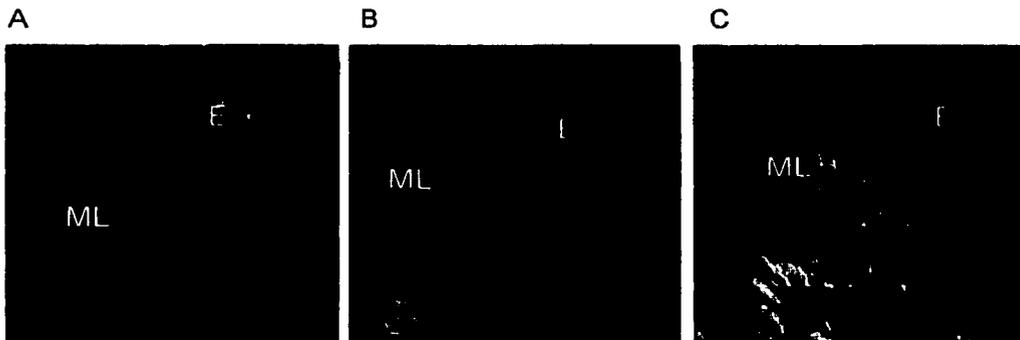


Fig. 23 Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para la región amino de la distrofina (DIS-3) (A) y para sarcospan (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

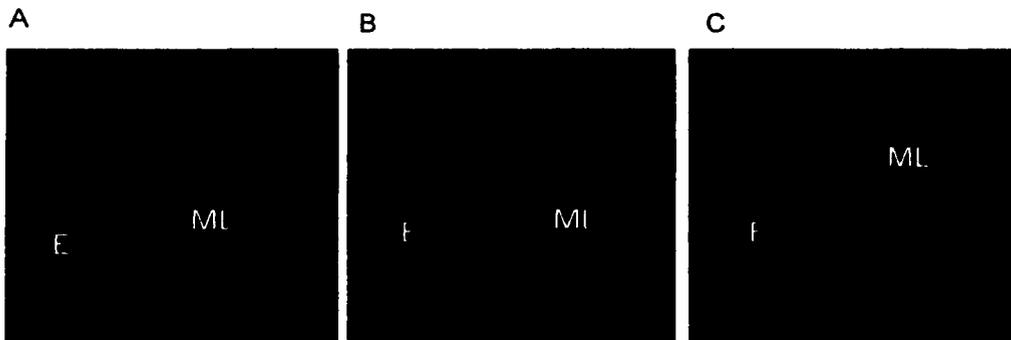


Fig. 24 Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para la región carboxilo de la distrofina (DIS-2) (A) y para utrofina (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

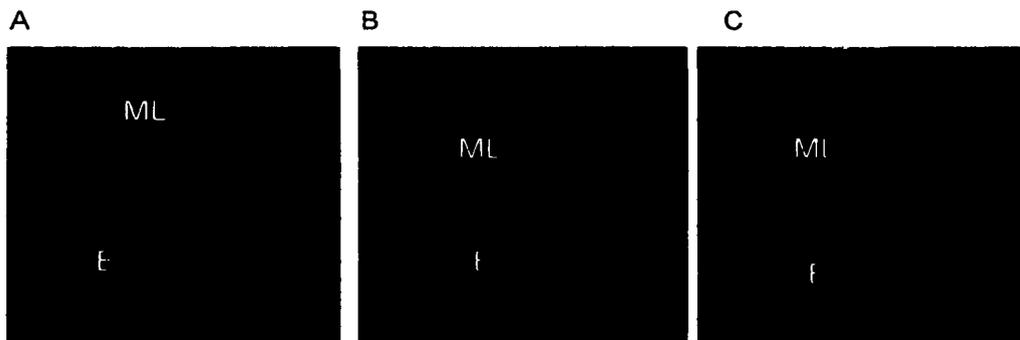


Fig. 25 Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para la región amino de la distrofina (DIS-3) (A) y para utrofina (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

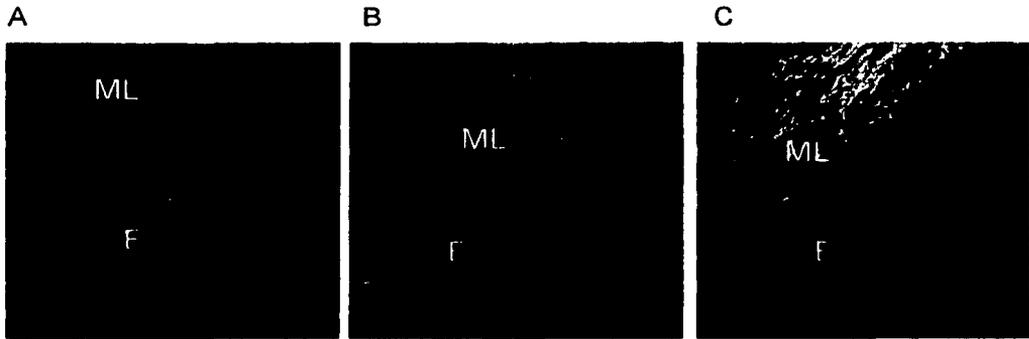


Fig. 26 Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para SG- β (A) y para caveolina 1 (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

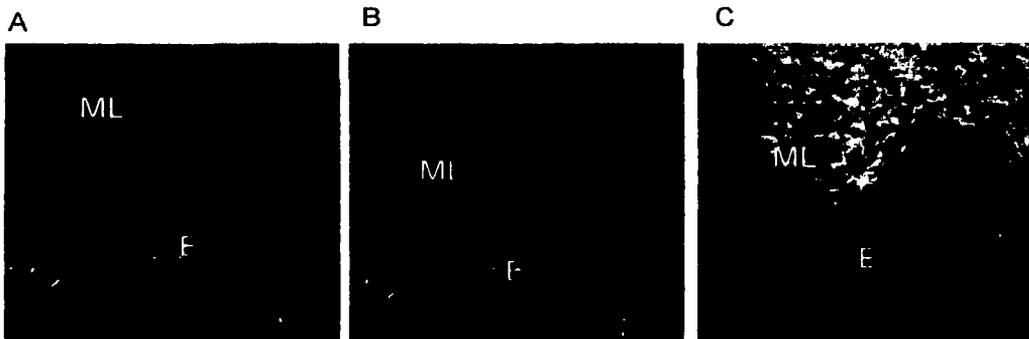


Fig. 27 Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para SG- δ (A) y para caveolina 1 (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.



Fig. 28 Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para SG- β (A) y para sarcospan (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

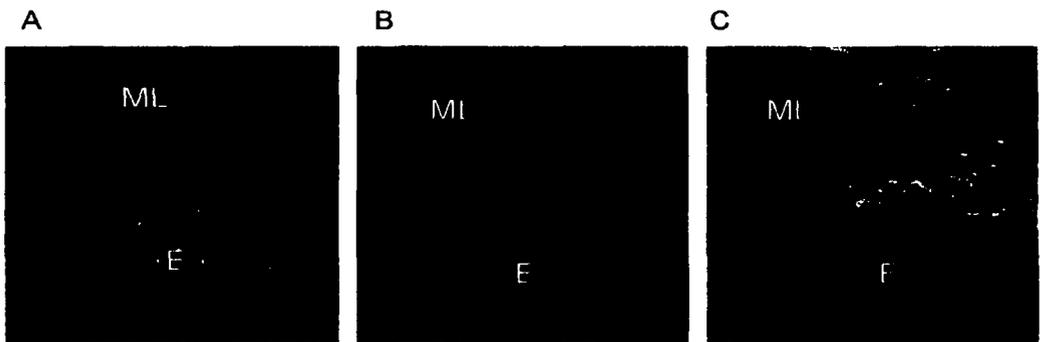


Fig. 30 Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para SG- δ (A) y para sarcospan (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

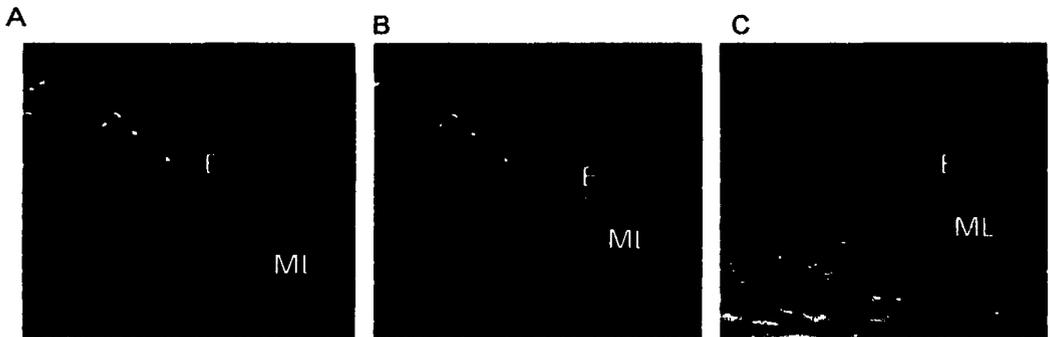


Fig. 30 Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para SG- β (A) y para utrofina (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

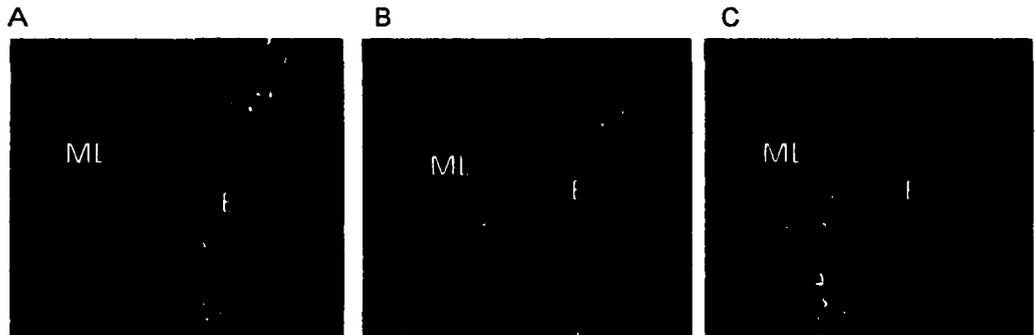


Fig. 31 Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para SG- δ (A) y para utrofina (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.



Fig. 32 Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para SG- ϵ (A) y para utrofina (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

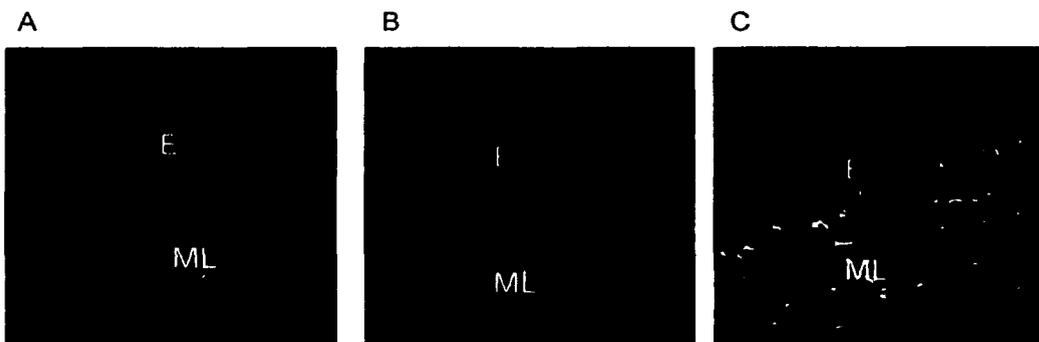


Fig. 33 Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para β -dístroglicano (A) y para utrofina (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

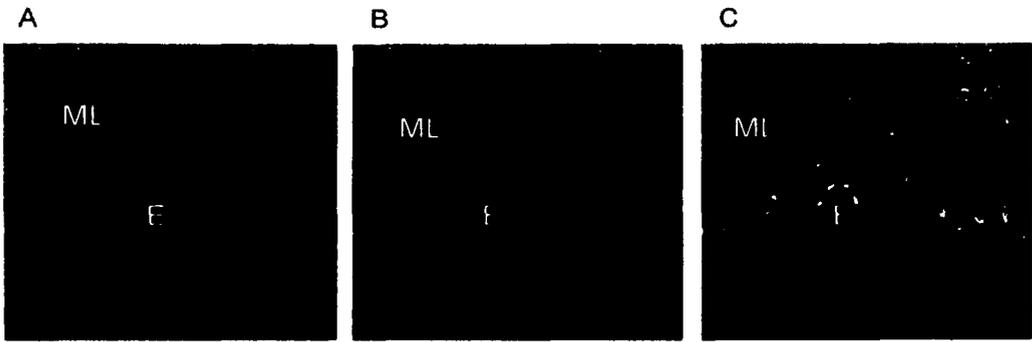


Fig. 34 Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para α -distrobrevina (A) y para utrofina (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

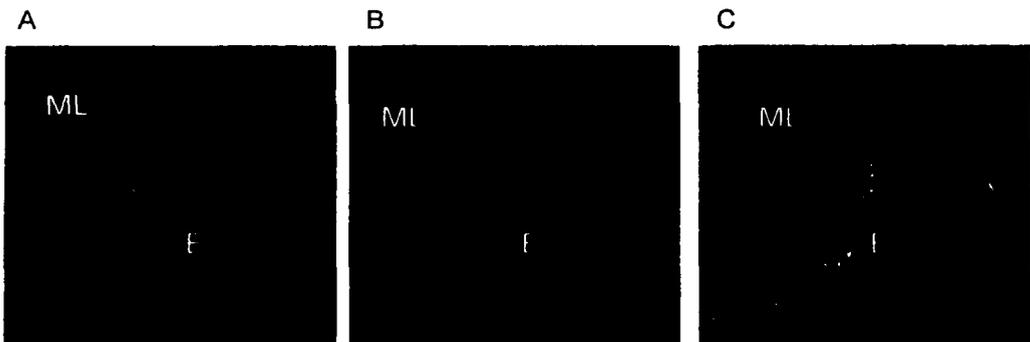


Fig. 35 Ensayos de doble fluorescencia con anticuerpos específicos para α -distrobrevina (A) y para sarcospan (B) en arteria de cordón umbilical, sobreposición de A y B (C), E=endotelio, ML=musculo liso, tinción azul= DAPI.

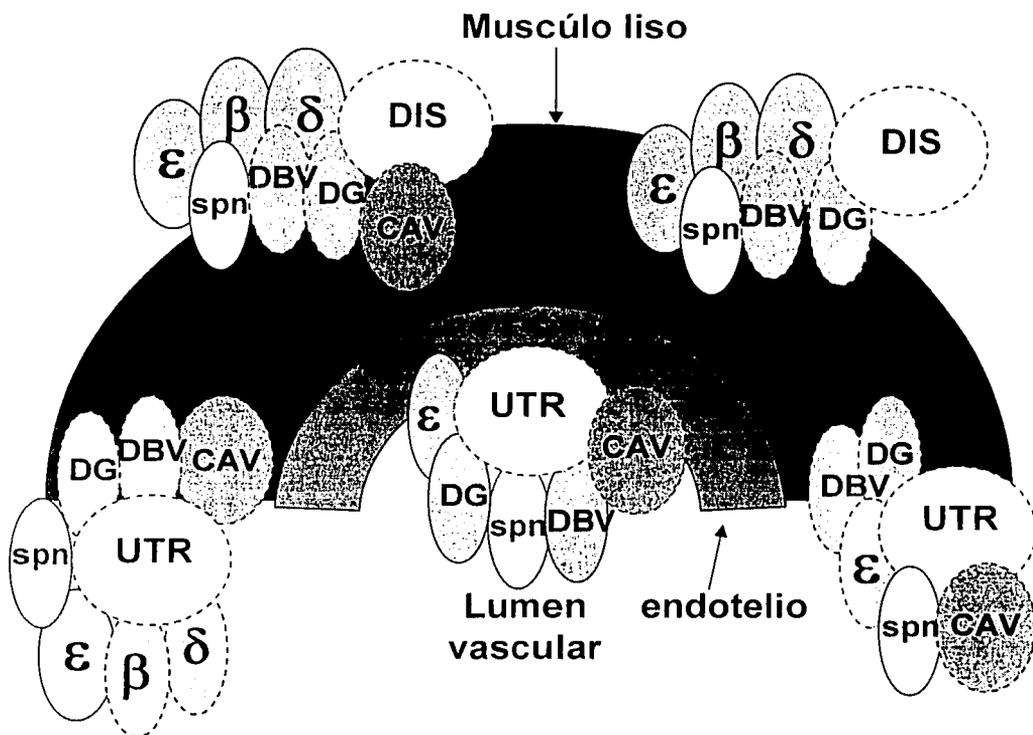


Fig. 36 Modelo propuesto del patrón de expresión de las formas alternativas del complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina en músculo liso y endotelio de vena y arteria de cordón umbilical. DIS=distrofina, UTR=utrofina, CAV=caveolina-1, DBV=α-distrobrevina, DG=β-distroglicano, spn=sarcospan, β, δ, ε son los sarcoglicanos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII. DISCUSIÓN

Mediante este trabajo, se analizó la expresión del complejo SG-SPN en el músculo liso vascular y endotelio de la arteria y la vena del cordón umbilical humano por medio de RT-PCR, por inmunofluorescencia y por doble inmunofluorescencia, así como la presencia de otras proteínas asociadas al DGC, tales como distrofina, utrofina, β -dístroglicano, α -dístrobrevina, además de la proteína caveolina-1.

Los resultados que aquí se presentan, prueban que los transcritos de todos los miembros del complejo SG-SPN se encuentran expresados en músculo liso tanto de vena como de arteria umbilicales, también se muestra que no existieron diferencias en el nivel de expresión de los transcritos del complejo SG-SPN. Por otra parte a nivel de proteína en el músculo liso se detectaron únicamente los SG's β , δ , ϵ y sarcospan, la ausencia de los SG's α y γ a nivel de proteína sugiere un posible evento de regulación post-transcripcional. Adicionalmente y de igual manera que los transcritos, en las proteínas no se detectaron diferencias entre los niveles de expresión de manera cualitativa entre los sexos ni entre las porciones del cordón umbilical analizadas.

Reportes previos claramente han demostrado la expresión de los SG- β , δ , ϵ y sarcospán en músculo liso, aunque no de tipo vascular, por medio de inmunofluorescencia e inmunoblot (Straub et al., 1999), lo cual concuerda con la detección del SG- β , δ , ϵ y sarcospán por medio de inmunofluorescencia en nuestro modelo de estudio. Un hecho muy interesante es que en el músculo liso de los vasos del cordón umbilical, se encuentra la presencia del transcrito del SG- α y del SG- γ , mismos que se han considerado por mucho tiempo como específicos de músculo estriado (Hack et al., 2000). Se han realizado múltiples experimentos para detectar el SG- γ a nivel de proteína por medio de inmunofluorescencia en músculo liso vascular sin tener éxito (Durbeej y Campbell 1999), no obstante Barresi y col. (2000) reportaron recientemente la expresión de SG- γ en músculo liso de algunos tejidos, tanto a nivel de transcrito como de la

proteína. En nuestro caso en los músculos lisos analizados, se detectó el transcrito de este gen pero no la proteína.

Al realizar ensayos de inmunofluorescencia, en el músculo liso de los vasos analizados, no pudimos detectar la presencia de los SGs α y γ . Sin embargo, esto no significa necesariamente que no se exprese la proteína, ya que al localizarse transmembranalmente, es muy posible que el epitopo contra el cual están dirigidos los anticuerpos utilizados no se encuentre accesible por estar embebido en la membrana o por estar altamente glicosilado. Esto se encuentra ejemplificado en lo descrito por Barresi y col. (2000), que al realizar ensayos de inmunoblot con extractos proteínicos de algunos órganos que contienen músculo liso y utilizando un grupo de nuevos anticuerpos producidos en su laboratorio y que se encuentran dirigidos contra diferentes porciones del SG- γ , que engloban toda la proteína, detecta una banda de aproximadamente 35 kDa. Esto indica la presencia de la proteína en estos tejidos, aún cuando anteriormente no se habían logrado detectar por inmunofluorescencia, lo cual se presume pueda estar ocurriendo en nuestro estudio. La ventaja del análisis por inmunoblot en este caso, consiste en que al solubilizar la proteína y desdoblar su estructura cuaternaria por medio de detergentes tanto en el buffer de lisis celular para la extracción proteica, así como durante la electroforesis en un gel desnaturalizante, de esta manera los anticuerpos pueden localizar porciones de la proteína que cuando se encuentra embebida en la membrana no pueden localizar, como es en el caso de las inmunofluorescencias.

En lo que respecta a la expresión del SG- α en músculo liso, no existen reportes anteriores que indiquen este fenómeno (Hack et. al, 2000); por el contrario, se afirma que SG- α esta ausente en músculo liso. Nosotros en este trabajo detectamos la presencia del transcrito del SG- α en músculo liso de vena y arteria del cordón umbilical y al igual que el SG- γ , es muy posible que también se exprese la proteína, pero que no hayamos podido detectarla por medio de inmunofluorescencia, lo cual se ve respaldado por el hecho de que el nivel de expresión del transcrito del SG- α en los vasos analizados es considerablemente elevado.

En contraparte, es posible que la ausencia tanto del SG- α así como del SG- γ a nivel de proteína, se deba en realidad a una posible regulación post-transcripcional negativa del mismo, debido a un patrón de expresión específico. Fenómenos de regulación post-transcripcional han sido demostrados por Pawlak y cols. (2002) quienes estudiando rutas de señalización dependientes de Ras las cuales se encuentran involucradas en la disrupción del citoesqueleto, han detectado la regulación post-transcripcional de genes implicados con la propia estabilidad del organelo como la vinculina y la actina (Pawlak y Elfman, 2002).

Se sabe que durante el desarrollo embrionario, el músculo liso y el músculo estriado presentan diferente composición de SG's (Noguchi et al., 1999). Tomando en cuenta lo anterior, se ha observado que la proteína SG- ϵ se detecta en niveles altos a través del desarrollo embrionario en el músculo liso, al tiempo que se observa muy disminuido en el músculo estriado (Straub et al 1999), por su parte el SG- α nunca se detecta en músculo liso, mientras que en músculo estriado se ve incrementado conforme el desarrollo del embrión va progresando (Straub et al., 1999). Esto puede ser un indicativo de un patrón de expresión inverso que presentan estos dos sarcoglicanos en los dos tipos musculares, similar a lo que se ha descrito para la distrofina y su homólogo autosómico la utrofina (Radojevic et al., 2000), mismas que se asocian con los sarcoglicanos en el DGC. Para estas dos proteínas se ha observado que mientras en las primeras etapas del desarrollo embrionario utrofina se expresa predominantemente en músculo esquelético, distrofina apenas es detectable en pequeñas cantidades en este tipo muscular. Conforme avanza el desarrollo embrionario, la expresión de ambas proteínas se invierte con una expresión preponderante de distrofina y una evidente disminución de utrofina, (Radojevic et al., 2000) comportamiento que es comparable con lo que ocurre en el desarrollo embrionario del músculo esquelético con los SGs α y ϵ .

El bajo nivel del SG- α con respecto al SG- ϵ en el músculo esquelético durante el desarrollo embrionario temprano, y el cambio de expresión inversa de estos dos SG's en etapas embrionarias tardías, sugiere que el SG- ϵ se va sustituyendo por el SG- α conforme progresa el desarrollo, sin que el primero llegue a desaparecer. De esta manera se constituyen dos tipos de complejo SG-

SPN en el músculo estriado uno conformado por los SG's ϵ , β , γ , δ y SPN y otro caracterizado por la presencia de los SG's α , β , γ , δ y SPN (Ettinger et al 1997).

Este antecedente nos hace pensar en la posibilidad de que en el músculo liso vascular de cordón umbilical pueda estar ocurriendo en fenómeno similar inverso en el que se regule de manera negativa la expresión del SG- α a nivel postranscripcional a pesar de que trabajamos con un tejido completamente diferenciado.

Por su parte el transcrito de los SG's δ y β presenta elevados niveles de expresión, esto sugiere una función fundamental en el músculo liso vascular tal como lo reportan Coral-Vázquez y col. (1999) y Durbeej y col. (2000) en sus modelos de ratones transgenicos carentes del SG- δ y β los cuales desarrollan cardiomiopatía dilatada severa además de la distrofia aguda.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se sugiere la presencia de al menos un complejo SG-SPN de músculo liso vascular de la vena y la arteria del cordón umbilical, constituido por los SG's ϵ , β , δ y sarcospan, aunque habrá que incluir la expresión de los SGs α y γ , al menos a nivel de transcrito, como parte del mismo complejo o de un complejo alternativo.

En lo que respecta a la expresión de los transcritos del complejo SG-SPN en el endotelio de ambos vasos del cordón umbilical, tejido en el cual no se había analizado con anterioridad el complejo, los resultados fueron de igual manera interesantes; los transcritos de los SGs β , δ y sarcospán fueron los que se detectaron en mayor nivel de expresión similar a lo que se observó en el músculo liso, un hallazgo interesante fue que a pesar de que se detectaron los transcritos de estos dos SGs en niveles elevados en el endotelio, las proteínas no se detectaron por medio de inmunofluorescencia, fenómeno que indica con amplia posibilidad un evento de regulación postranscripcional. Por su parte el transcrito del SG- ϵ presento niveles de expresión ligeramente menores en comparación con los niveles de los transcritos de los SG's mencionados con anterioridad. Hecho interesante ya que el SG- ϵ junto con el sarcospán fueron los únicos miembros del complejo SG-SPN que se detectaron a nivel de proteína por medio de

inmunofluorescencia en este tipo celular, fenómeno que destaca la gran importancia de la presencia del SG- ϵ no solo en este tipo de tejido sino en la totalidad de los tejidos en los que ha sido analizado, a pesar de que no se conoce su función precisa (Piras et. al, 2000). Un evento que es importante destacar fue la ausencia de los transcritos de los SGs α y γ en el endotelio tanto de la vena como de la arteria del cordón umbilical, lo cual respalda la idea que se tiene de que la expresión de estos dos genes es músculo específica (Hack et. al., 2000).

Adicionalmente es importante señalar que no se presentaron diferencias cuantitativas significativas en cuanto al nivel de expresión de los transcritos del complejo SG-SPN en el endotelio de los cordones umbilicales de los dos sexos, ni tampoco se presentó diferencia en las distintas porciones del cordón umbilical analizadas.

Por medio de inmunofluorescencia, se detectó la presencia de la proteína distrofina y algunas otras proteínas relacionadas al DGC, como la utrofina, β -dístroglicano, α -dístrobrevina, así como también la proteína caveolina-1 en el músculo liso; de la proteína caveolina-1 se conocía, hasta hace poco, que su expresión era específica de endotelio (Scherer et al., 1996), sin embargo recientemente se detectó su presencia en algunos tipos de músculo liso incluido el vascular (Hagiwara et. al., 2002), por lo cual se tornan aún más interesantes y quedan respaldados los resultados obtenidos en este trabajo. Adicionalmente en el mismo reporte se demostró que caveolina-1 colocaliza con algunos miembros del DGC sugiriendo con esto una estrecha relación y una posible función de esta proteína dentro del complejo (Hagiwara et al., 2002) o bien una participación del DGC dentro de la caveola (Sotgia et. al., 2000).

Nuestros resultados indican que la proteína caveolina-1 colocaliza en músculo liso con el SG- ϵ , utrofina, β -dístroglicano, α -dístrobrevina y de acuerdo a los resultados de las colocalizaciones principalmente del SG- ϵ podemos decir que seguramente caveolina-1 también colocaliza con sarcospán, formando de esta manera una forma alternativa de complejo para el músculo liso. Otro hallazgo interesante que arrojan los ensayos de doble inmunofluorescencia es que los

SG's β y δ así como distrofina ensayados con la proteína caveolina-1, la colocalización se presenta en varios puntos en el músculo liso, mas no en la totalidad del tejido. Un resultado similar exhibió el ensayo de doble inmunofluorescencia para sarcospan y para los SG's β y δ así mismo para la distrofina, proteínas que mostraron varios puntos de colocalización con la proteína sarcospan en el músculo liso de ambos vasos, lo cual indica que tanto la caveolina-1 como el sarcospan se pueden encontrar participando en la formación de al menos dos formas de complejo; en la primera de ellas tanto caveolina-1 como sarcospan se encontrarían en asociación con los SG's β , δ y ϵ así como con la distrofina, β -dístroglicano y α -dístrobrevina en varios puntos del músculo liso formando de esta manera un complejo alternativo en músculo liso, en la segunda forma se pueden encontrar en asociación con utrofina y de igual manera con β -dístroglicano y α -dístrobrevina (fig. 35).

Estos resultados nos sugieren por un lado, que de acuerdo a las funciones de la caveola, entre las que destacan transito de moléculas, regulación de la entrada de calcio a la célula y transducción de señales nosotros podemos que estas formas alternativas de complejo en las que se encuentre presente la caveolina-1 pueden participar en procesos propios de dicho organelo, tal como ocurre en el músculo estriado en donde se ha encontrado asociación del DGC con la caveolina-3 específica de caveolas de músculo estriado (Galbiati et. al, 2001).

Por otro lado se sugiríe con esto una posible participación de los SG's β y δ y distrofina en la caveola o de la caveolina-1 dentro del DGC como ocurre con la caveolina-3 en el músculo estriado en donde se forma un complejo de proteínas que incluye a la caveolina-3 y al DGC en la caveola el cual se cree participa en complejos procesos de señalización celular (Okamoto et al., 1998 y Smart et al., 1999).

Por su parte la expresión del complejo SG-SPN y algunas otras proteínas asociadas al DGC en células endoteliales nunca antes había sido reportada y al igual que en el músculo liso fue sumamente interesante. Las células endoteliales tanto de vena como de arteria del cordón umbilical presentaron la expresión de las proteínas SG- ϵ , utrofina, β -dístroglicano, α -dístrobrevina y sarcospan,

adicional a la presencia del marcador endotelial caveolina-1 con el cual colocalizaron en dicho tejido además de su colocalización en el músculo liso como ya se mencionó. De sumo interés fue la ausencia de la proteína distrofina en el tejido endotelial, carencia que es compensada por la presencia de la proteína utrofina la cual colocaliza con la proteínas mencionadas con anterioridad, formando de esta manera una forma de complejo DGC carente de distrofina particular para el endotelio, pudiendo atribuirle a este complejo funciones que se presume son llevadas a cabo por la utrofina como es la de anclaje de otras proteínas de membrana como lo proponen Rivier y cols. (1997) además de las funciones propias llevadas a cabo por la caveola, como lo proponen Galbiati y cols. (2001).

Por otra parte, un reporte que fundamenta el análisis del complejo SG-SPN a lo largo de los vasos del cordón umbilical es el realizado por Rivier y cols. (1997) en el que se demuestra la presencia de distrofina y utrofina como parte de formas alternativas de complejo, en diferentes regiones a lo largo de venas y arterias femorales de conejo (Rivier et al, 1997), en este estudio además se pone de manifiesto que existe diferencia en la expresión de estas dos proteínas dependiendo del calibre de las venas y las arterias, de tal forma que en venas delgadas se prescinde de la distrofina, lo cual sugiere que esta proteína tiene una función más mecánica dentro de los procesos de contracción muscular, lo cual queda respaldado con los resultados de nuestro estudio en donde solo se detecta la distrofina en el tejido contráctil, mientras que la utrofina, homólogo autosómico de la distrofina, se encuentra formando parte del complejo tanto de músculo liso como de endotelio en vena y en arterias, con lo cual se piensa que esta proteína tiene funciones más relacionadas con el anclaje de otras proteínas de membrana muscular (Rivier et al, 1997), lo cual concuerda una vez más con nuestros resultados. En nuestro estudio realizamos un análisis comparativo del complejo SG-SPN en distintas porciones a lo largo de la vena y la arteria umbilical sin encontrar diferencias en los niveles de expresión de los transcritos analizados de manera semi-cuantitativa ni de las proteínas analizadas en el músculo liso ni en el endotelio de los vasos del cordón umbilical.

En el presente trabajo analizamos la presencia de todos los miembros del complejo SG-SPN y otras proteínas relacionadas tales como la distrofina, la utrofina, β -dístroglicano, α -dístrobrevina y caveolina-1, proteína que adicionalmente se asocia con el DGC tanto en músculo liso como en propio endotelio de los vasos del cordón umbilical, tal hecho nos proporciona la evidencia para proponer la posible presencia de una nueva forma de complejo DGC carente de distrofina en endotelio de los vasos del cordón umbilical.

Otro hallazgo interesante que no había sido reportado, fue la ausencia de la proteína distrofina en el endotelio de ambos vasos, siendo esta ausencia compensada por la presencia de la proteína utrofina la cual se detectó tanto en el endotelio así como en músculo liso de la vena y la arteria del cordón umbilical, la proteína utrofina colocaliza además con las proteínas SG- ϵ , SPN, β -dístroglicano, α -dístrobrevina, las cuales a su vez colocalizan con caveolina-1 la cual funge como marcador endotelial, este resultado es muy importante ya que por vez primera se reporta un posible DGC parcial el cual carece de distrofina en las células de endotelio de los vasos analizados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. CONCLUSIONES

La expresión del transcrito de todos los sarcoglicanos y del sarcospán se hizo evidente mediante los ensayos de RT – PCR en músculo liso tanto de vena como de arteria del cordón umbilical. En el caso de los sarcoglicanos ϵ y γ la expresión de los RNA's mensajeros fue reducida en comparación con lo obtenido para el resto de los transcritos miembros del complejo SG-SPN, siendo más evidente esta reducción para el SG- γ como lo indica el análisis semi-cuantitativo de la RT – PCR. A su vez no se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de los sarcoglicanos comparando músculo liso de vena contra arteria, ni comparando los sexos de los cordones umbilicales, ni tampoco en las distintas regiones de cordón umbilical analizadas. A nivel de proteína, en el músculo liso, se observaron por medio de inmunofluorescencia los productos de los genes de los sarcoglicanos β , δ , ϵ y sarcospán pero no los productos de los genes de los sarcoglicanos α y γ . Este resultado junto con los de RT – PCR sugieren que la regulación de la expresión de estos dos últimos genes puede estar dada a nivel post-transcripcional. Por otro lado el análisis de colocalización del complejo SG-SPN y otras proteínas relacionadas al DGC en el músculo liso muestran evidencia de al menos cuatro formas de complejo las cuales se componen de las siguientes proteínas: la primera forma de DGC se compone de los SGs β , δ , ϵ y sarcospan junto con distrofina, β -dístroglicano y α -dístrobrevina, por otro lado dentro del mismo músculo liso se encuentra una forma de complejo compuesta por la caveolina-1, además de los SGs β , δ , ϵ y sarcospan, junto con distrofina, β -dístroglicano, α -dístrobrevina y utrofina un tercer complejo dentro del músculo liso esta compuesto de los SGs β , δ , ϵ y sarcospan junto con β -dístroglicano y α -dístrobrevina, utrofina y caveolina-1 y por ultimo se encuentra una forma de complejo la cual presenta solo al SG- ϵ y sarcospán, junto con β -dístroglicano, α -dístrobrevina, utrofina y caveolina-1, es importante señalar que en estas dos últimas formas de complejo se destaca la presencia de la utrofina en sustitución de la distrofina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por su parte el análisis de la expresión de los transcritos del complejo SG-SPN en células endoteliales de ambos vasos demuestran la presencia de los mRNAs de los SG's β , δ , ϵ y sarcospan en niveles elevados como lo demuestra el análisis semi-cuantitativo, siendo el transcrito del SG- ϵ el que menor nivel de expresión presentó en este tejido, los análisis de RT-PCR adicionalmente demostraron la ausencia de los mRNA de los SG's α y γ sugiriendo un patrón de expresión específico para estos dos genes. Por medio de análisis de inmunofluorescencia para las proteínas miembros del complejo SG-SPN se detectó la presencia, en tejido endotelial, únicamente del SG- ϵ y del sarcospán, las cuales colocalizaron con utrofina, β -dístroglicano, α -dístrobrevina y caveolina-1, estableciendo de esta manera la presencia de una forma alternativa de DGC carente dístrofina para células endoteliales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. BIBLIOGRAFÍA

Adams, ME, Dwyer, TM, Dowler, LL, White, RA, Froehner, SC (1995) Mouse α 1- and β 2-syntrophin gene structure, chromosome localization, and homology with a disc large domain. *J. Biol. Chem.* 270:25859-25865.

Adams, ME, Kramarcy, N, Krall, SP, Possi, SG, Rotundo, RL, Sealock, R, Froehner, SC (2000) Absence of α -syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin. *J. Cell. Biol.* 150:1385-1398.

Ahn, AH, Yoshida, M, Anderson, MF, Freener, CA, Seling, S, Hagiwara, Y, Ozawa, E, Kunkel, LM (1994) Cloning of human basic A1, a distinct 59-kDa dystrophin-associated protein encoded on chromosome 8q23-24. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:4446-4450.

Ahn, AH, Freener, CA, Gussoni, E, Yoshida, M, Ozawa, E, Kunkel, LM (1996) The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J. Biol. Chem.* 271:2724-2730.

Alberts, B, Bray, D, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K, Watson, JD (1994) *Molecular Biology of the Cell*. Third edition, Garland Publishing Inc. New York, USA-London, England.

Balasubramanian, S, Fung, ET, Haganir, RL (1998) Characterization of the tyrosine phosphorylation and distribution of dystrobrevin isoforms. *FEBS Lett.* 432:133-140.

Barresi, R, Moore, SA, Stolle, A, Mendell, R, Campbell, KP (2000) Expression of γ -arcoglycan in smooth muscle and its interaction with the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J. Biol. Chem.* 275: 38554-38560.

Blake, DJ, Nawrotzki, R, Peters, MF, Froehner, SC, Davies, KE (1996) Isoform diversity of dystrobrevin, the murine 87k-Da postsynaptic protein. *J. Biol. Chem.* 271:7802-7810.

Blake, DJ, Nawrotzki, R, Loh, NY, Gorecki, DC, Davies, KE (1998) β -dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95:241-246.

Brenman, JE, Chao, DS, Gree, SH, McGee, AW, Craven, SE, Santillano, DR, Wu, Z, Huang, F, Xia, H, Peters, MF, Froehner, SC, Bredt, DS (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the post-synaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84:757-767.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Campbell, KP (1995) Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80: 675-679.

Chamley-Campbell J, Campbell, GR, Ross, R (1979) The smooth muscle cell in culture. *Physiol. Rev.* 59:11-14.

Chan, YM y Kunkel, LM (1997) *In vitro* expressed dystrophin fragments do not associate with each other. *FEBS Letters.* 410:153-159.

Chan, YM, Bonnemann, CG, Lidov, HG, Kunkel, LM (1998) Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture. *J. Cell Biol.* 143:2033-2044.

Chardin, P, Cussac, D, Maignan, S, Ducruix, A, (1995) The Grb2 adaptor. *FEBS Lett.* 369:47-51.

Chelly, J, Montarras, D, Pinset, C, Berwald-Netter, Y, Kaplan, JC, Kahn, A. (1990) Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. Application to dystrophin mRNA in cultures myogenic and brain cells. *Eur. J. Biochem.* 187:691-698.

Chomczynski, P y Sacchi, N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Annal. Biochem.* 162: 156-159.

Cohn, RD, and Campbell, KP (2000) Molecular basis of muscular dystrophies *Musc. and Nerve* 23:1456-1471.

Coral-Vazquez, R, Cohn, RD, Moore, SA, Hill, JA, Weiss, RM, Davidson, RL, Straub, V, Barresi, R, Bansal, D, Hrstka, RF, Williamson, R, Campbell KP (1999) Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell* 99: 465-474.

Cox, R.A. (1968) The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. *Methods in Enzymol* 12:120-129.

Crosbie, RH, Heighmay, J, Venzke, DP, Lee, JC, Campbell, KP (1997) Sarcospan the 25kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex *J. Biol. Chem.* 272: 31221-31224.

Crosbie, RH, Lim, LE, Moore, SA, Hirano, M, Hays, AP, Maybaum, SW, Collin, H, Dovico, SA, Stolle, CA, Fardeau, M, Tome, FM, Campbell, KP (2000) Molecular and genetic characterization of sarcospan: insights into sarcoglycan-sarcospan interactions. *Hum. Mol. Genet.* 9:2019-2027.

Duclos, F, Straub, V, Moore, SA, Venzke, DP, Hrstka, RF, Crosbie, RH, Durbeej, M, Lebakken, CS, Ettinger, AJ, van der Meulen, J, Holt, KH, Campbell, KP (1998)

Progressive muscular dystrophy in alfa-sarcoglycan deficient mice. J. Cell Biol. 142: 1461-1471.

Durbeej, M y Campbell, KP (1999) Biochemical characterization of the epithelial dystroglycan complex. J. Biol. Chem. 274:26609-26616.

Durbeej, M, Cohn, RD, Hrstka, F, Moore, SA, Allamand, V, Davidson, BL, Williamson, RA, Campbell, KP (2000) Disruption of beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. Mol. Cell. Biol. 5: 141-151.

Dwyer, TM, Froehner, SC (1995) Direct binding of *Torpedo* syntrophin to dystrophin and the 87 kDa dystrophin homologue. FEBS Lett 375:91-94.

Ervasti, JM, Ohlendieck, K, Kahl, SD, Gaver, MG, Campbell, KP (1990) Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. Nature 345, 315-319.

Ervasti, JM and Campbell, KP (1993) A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. J. Cell Biol. 122: 809-823.

Ettinger, AJ, Feng, G, Sanes JR (1997) Epsilon-sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutate in limb-girdle muscular dystrophy 2D. J. Biol. Chem. 272: 32534-32538.

Föster, E (1994) An improved general method to generate internal standards for competitive PCR. Biotechniques 16: 18-20.

Galbiati, F, Engelman, J, Volonte, D, Zhang, X, Minetti, C, Li, M, Hou, H, Kneitz, B, Edelmann, W, Lisanti, MP (2001) Caveolin-3 null mice shows a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and T-tubule abnormalities. J. Biol. Chem. 276:21425-21433.

Grady, RM, Grange, RW, Lau, KS, Maimone, MM, Nichol, MC, Stull, JT, Sanes, JR (1999) Role of α -dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin dependent muscular dystrophies. Nat. Cell. Biol. 1:215-220.

Hack, AA, Cordier, L, Shoturna, DI, Lam, MY, Sweeny, HL, McNally, EM (1999) Muscle degeneration without mechanical injury in sarcoglycan deficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:10723-10728.

Hack, AA, Groh, M, McMally, EM (2000) Sarcoglycans in Muscular Dystrophy. Micros. Res. and Tech. 48: 167-180.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hagiwara, Y, Nishina, Y, Yorifuji, H, Kikuchi, T (2002) Immunolocalization of Caveolin-1 and Caveolin-3 in Monkey skeletal, cardiac and uterine smooth muscles. *Cell. Struct. Func.* 27:375-382.

Henry, MD, Campbell, KP (1999) Dystroglycan inside and out. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:602-607.

Hinton, R and Dobrata, M (1978) Density gradient ultracentrifugation. *Laboratory Techniques in Biochemistry and molecular biology.* U.S.A. Ed. John Willey and Sons, INC.

Holt, KH and Campbell, KP (1998) Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.* 273:34667-34670.

Holt, KH, Crosbie, RH, Venzke, DP, Campbell, KP (2000) Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide. *FEBS Lett* 468:79-83.

Homburger, F, Baker, JR, Nixon, CW, Whitney, R (1962) Primary generalized polymyopathy and cardiac necrosis in a inbred line of syrian hamsters. *Med. Exp.* 6: 339-345.

Hynes, R. O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69: 1125.

Ibraghimov-Beskrovnaya, O, Ervasti, JM, Leveille, CJ, Slaughter, CA, Sernett, SW, Campbell, KP (1992) Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355:696-702.

Ibraghimov-Beskrovnaya, O, Milatovich, A, Ozcelik, T, Yang, B, Koepnick, K, Francke, U, Campbell, KP (1993) Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum. Mol. Genet.* 2:1651-1657.

Iffy, J. (1986) *Obstetricia y Perinatologia* Vol. 1 Editorial Panamericana.

Kaaren Janssen (1989) *Immunochemistry. Current Protocols in Molecular Biology* vol. 2 Ed John Wiley and Sons, INC.

Kameya, S, Miyagoe, Y, Nonaka, I, Ikemoto, T, Endo, M, Hanaoka, K, Nabeshima, Y, Takeda, S (1999) α 1-syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. *J. Biol. Chem.* 274:2193-2200.

Kliman, H.J. (1999) The umbilical cord, *Encyclopedia of reproduction.* Yale University.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Li, GR, Ferreir, GR, Howlett, SE (1995) Calcium currents in ventricular myocytes of prehypertrophic cardiomyopathic hamsters. *Am. J. Physiol.* 268 part 2: H999-H1005.

Lim, LE and Campbell, KP (1998) The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr. Opin. in Neurol.* 11: 443-452.

Liu, LA and Engvall, E (1999) Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 272: 38171-38176.

Lodish, H, Baltimore, D, Berk, A, Zipurski, SL, Matsudaira, P, Darnell, J (1995) *Molecular cell biology*. Third edition. Scientific American Books, New York, USA.

López-Jaramillo, P. (2001) *Bioquímica del endotelio vascular: Implicaciones fisiológicas y clínicas*. Quinta edición. Publicaciones de Laboratorios Pfizer. Colombia.

Maercker, HT, Todd, SC, Levy, S (1997) The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J.* 11:428-442.

Maniatis, T, Fritsch, EF, Sambrook, J (1989) *A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U.S.A.

Matsamura, K, Saito, F, Yamada, H, Hase, A, Sunada, Y, Shimizu, T (1999) Sarcoglycan complex: a muscular supporter of dystroglycan-dystrophin interplay? *Cell. and Mol. Biol.* 45: 751-762.

McNally, EM, Passos-Bueno, MR, Bonnemann, CG, Vainzof, M, de sa Moreira, E, Lidov, HG, Othmane, KB, Denton, PH, Vance, JM, zatz, M, Kunkel, LM (1996) Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 1040-1047.

McNally, EM, Duggan, D, Gorospe, JR, Bonnemann, CG, Fanin, M, Pegoraro, E, Lidov, HG, Noguchi, S, Ozawa, E, Finkel, RS, Cruse, RP, Angelini, C, Kunkel, LM, Hoffman, EP, (1996B) Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of γ -sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 5:1841-1847.

Michalak, M, Fu, SY, Milner, RE, Busaan, JL, Hance, JE (1996) Phosphorylation of the carboxyl-terminal region of dystrophin. *Biochem. Cell. Biol.* 74:431-437.

Milner, RE, Busaan, JL, Holmes, CF, Wang, JH, Michalak, M (1993) Phosphorylation of dystrophin. The carboxyl-terminal region of dystrophin is a substrate for in vitro phosphorylation by p34^{cdc2} protein kinase. *J. Biol. Chem.* 268:21901-21905.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mizuno, Y, Noguchi, S, Yamamoto, H, Yoshida, M, Nonaka, I, Hirai, S, Ozawa, E (1995) Sarcoglycan complex is selectively loss in dystrophic hamster muscle. *Am. J. Phat.* 146: 530-536.

Monaco, AP, Neve, RL, Colletti-Feener, C, Bertelson, CJ, Kunit, DM, Kunkel, LM. (1986) Isolation of a candidate cDNA for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323: 646-650.

Newbell, BJ, Anderson, JT, Jarrett, HW (1997) Ca^{2+} -calmodulin binding to mouse $\alpha 1$ syntrophin: syntrophin is also a Ca^{2+} -binding protein. *Biochemistry* 36:1295-1305.

Nigro, V, de sa Moreira, E, Piluso, G, Vainzof, M, Beisito, A, Politano, L, Puca, AA, Pasos-Bueno, MR, Zatz, M (1996) Autosomal recesive limb-girdle muscular dystrophy LGMD2F is caused by a mutation in delta-sarcoglycan gene. *Nat. Genet.* 14: 195-198.

Nigro, V, Piluso, G, Belsito, A, Politano, L, Puca, AA, Papparella, S, Rossi, E, Viglietto, G, Esposito, MG, Abbondanza, C (1996B) Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemal 35 kDa glycoprotein. *Hum. Mol. Genet.* 5: 1179-1186. ¿?

Noguchi, S, McNally, EM, Ben Otmane, K., Hagiwara, Y, Mizuno, Y, Yoshida, M, Yamamoto, H, Bonnemann, CG, Gussoni, E, Denton, PH, Kyriakides, T, Middleton, L, Hentati, F, Ben-Hamida, M, Nonaka, I, Vance, JM, Kunkel, LM, Ozawa, E (1995) Mutation on the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in cromosome 13 causes muscular dystrophy. *Science* 270: 819-822.

Noguchi, S, Wakabayashi, E, Imamura, M, Yoshida, M, Ozawa, E (1999) Developmental expression of sarcoglycan gene products in cultured myocytes. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 262: 88-93.

Noguchi, S, Wakabayashi, E, Imamura, M, Yoshida, M, Ozawa, E (2000) Formation of sarcoglycan complex with differentiation in cultured myocytes. *Eur. J. of Biochem.* 267: 640-648.

Okamoto, T, Schlegel, A, Scherer, PE, Lisanti, MP (1998) Caveolins a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complex" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273:5419-5422.

Ozawa, E, Yoshida, M, Suzuki, A, Mizuno, Y, Hagiwara, Y, Noguchi, S (1995) Dystrophin associated proteins in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 4: 1711-1716.

Ozawa, E, Noguchi, S, Mizuno, Y, Hagiwara, Y, Yoshida, M (1998) From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 21:421-438.

Pawlak, G, and Elfman, DM (2002) Post-transcriptional down-regulation of ROCK1/Rho-kinase through an MEK-dependent pathway leads to cytoskeleton disruption in Ras-transformed fibroblasts. *Mol. Biol. Cell.* 13:336-347.

Peters, MF, O'Brien, KF, Sadoulet-Puccio HM, Kunkel, LM, Adams, ME, Froehner, SC (1997) β -dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification cloning, and protein associations. *J. Biol. Chem.* 272:31561-31569.

Peters, MF, Adams, ME, Froehner, SC (1997B) Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J. Cell. Biol.* 138:81-93.

Piccolo, F, Roberds, SL, Jeanpierre, M, Leturcq, F, Azibi, K, Beldjord, C, Carrie, A, Recan, D, Chaouch, M, Reghis, A (1995) Primary adhalinopathy: a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity. *Nat Genet.* 10:243-245.

Piras, G, Kharroubi, A, Kozlov, S, Escalante-Alcalde, D, Hernandez, L, Copeland, N, Gilbert, D, Jenkins, N, Stewart, C (2000) *Zac1 (Lot1)*, a potential tumor suppressor gene, and the gene for ϵ -sarcoglycan are maternally imprinted genes: Identification by a subtractive screen of novel uniparental fibroblast lines. *Mol and Cell Biol.* 20:3308-3315.

Radojevic, V, Lin, S, Burgunder, JM (2000) Differential expression of dystrophin, utrophin, and dystrophin-associated proteins in human muscle culture. *Cell Tiss. Res.* 300:447-457.

Rentschler, S, Linn, H, Deininger, K, Bedford, MT, Espanel, X, Sudol, M (1999) The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with dystroglycan. *Biol. Chem.* 380:431-442.

Rivier, F, Robert, A, Hugon, G, Mornet, D (1997) Different utrophin and dystrophin properties related to their vascular smooth muscle distributions. *FEBS Lett.* 408 94-98.

Sadoulet-Puccio, HM, Khurana, TS, Cohen, JB, Kunkel, LM (1996) Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the *Torpedo* electric organ post-synaptic membrane. *Hum. Mol. Genet.* 5:489-496.

Sadoulet-Puccio, HM, Rajala, M, Kunkel, LM (1997) Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 12413-12418.

Sakamoto, A, Ono, K, Abe, M, Jasmin, G, Eki, T, Murakami, Y, Mazaki, T, Toyooka, T, Hanoaka, F (1997) Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan in hamster: an animal

model of disrupted dystrophin – associated glycoprotein complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 13873-13878.

Sakamoto, A, Abe, M, Masaki, T (1999) Delineation of genomic deletion in cardiomyopathic hamster. F.E.B.S. Lett. 447: 124-128.

Scherer, PE, Okamoto, T, Chun, M, Nishimoto, I, Lodish, HF, Lisanti, MP (1996). Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:131-135.

Shore, GC and Tata, JR (1977) Two fractions of rough endoplasmic reticulum from rat liver. J. Cell. Biol. 72:726-743.

Siebert, PD and Larrick, JW (1998) Gene cloning and analysis by RT – PCR, The biotechniques on molecular laboratory methods, number 1, cap. 4.

Smart, EJ, Graf, GA, McNiven, MA, Sessa, WC, Engelman, JA, Scherer, PE, Okamoto, T, Lisanti, MP (1999) Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. Mol. Cell. Biol. 19:7289-7304.

Sotgia, F, Lee, K, Das, K, Bedford, M, Petrucci, T, Macioce, P, Sargiacomo, M, Bricarelli, F, Minetti, C, Sudol, M, Lisanti, MP (2000) Caveolin-3 directly interacts with the c-terminal tail of β -dystroglycan. J. Biol. Chem. 275:38048-38048.

Straub, V and Campbell, KP (1997) Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. Curr. Opin. in Neurol. 10:168-175.

Straub, V, Ettinger, AJ, Durbeej, M, Venzke, DP, Cutshall, S, Sanes, J, Campbell, KP (1999) Epsilon - sarcoglycan replaces alpha - sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin - glycoprotein complex. Jour. Biol. Chem. 274: 27989-27996.

Suzuki, A, Yoshida, M, Hayashi, K, Mizuno, Y, Hagiwara, Y, and Ozawa, E (1994) Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin: three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin. Eur. J. Biochem. 220: 283-292.

Suzuki, AM, Yoshida, M and Ozawa, E (1995) Mammalian α -1 and β -1 dystrophin bind to the alternatively splice-prone region of the dystrophin COOH terminus. J. Cell. Biol. 128:373-381.

Taylor, JM (1979) The isolation of eukariotic messenger RNA. Ann. Rev. Biochem. 48:681-717.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Thomas, GD, Sander, M, Lau, KS, Huang, PL, Stull, JT, Victor, RG (1998) Impaired metabolic modulation of α -adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:15090-15095.

Thomas, AR (2001) The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle and Nerve* 24:1575-1594.

Thompson, TG, Chan, YM, Hack, AA, Brosius, M, Rajala, M, Lidov, HG, McNally EM, Watkins, S, Kunkel, LM (2000) Filamin-2 (FLN2): a muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J. Cell. Biol.* 148:115-126.

Towbin, JA (1998) The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr. Opin. in Cell. Biol.* 10: 131-139.

Vachon, PH, F, Xu H, Lui, L, Loechel, F, Hayashi, Y, Arahata, K, Reed, JC, Wewer, UM, Engvall, E (1997) Integrins ($\alpha7\beta1$) in muscle function and survival. Disrupted expression in merisin-deficient congenital muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* 100:1870-1881.

Vainzof, M, Moreira, ES, Ferraz, G, Pasos-Bueno, MR, Marie, SK, Zatz, M (1999) Further evidence for the organization of the four sarcoglycan proteins within the dystrophin-glycoprotein complex. *Eur. J. Hum. Genet.* 7:251-254.

Voet, D, and Voet, JG (1995) *Biochemistry*. Second edition, John Wiley and sons, inc, New York, U.S.A.

Wheeler, MT, Zarnegar, S, McNally, EM (2002) ζ -sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Gen.* 18:2147-2154.

Worthing, RG and Thompson, MW (1988) Genetics of Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Rev. Genet.* 22:601-629.

Yoshida, M, Suzuki, A, Yamamoto, H, Noguchi, S, Mizuno, M, Ozawa, E (1994) Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl β -D-glucoside. *Eur. J. Biochem.* 222: 1055-1061.

Yoshida, M, Hama, H, Ishikawa-Sakurai, M, Imamura, M, Mizuno, Y, Araishi, K, Wakabayashi-Takai, E, Noguchi, S, Sasaoka, T, Ozawa, E (2000) Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum. Mol. Genet.* 9:1033-1040.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN