



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

INHIBICIÓN IN VITRO DEL SARCOGLICANO DELTA
POR ARN DE INTERFERENCIA EN CÉLULAS DE
MÚSCULO LISO VASCULAR DE ORIGEN HUMANO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

MARÍA DEL ROCÍO JUÁREZ VELÁZQUEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. HAYDEÉ ROSAS VARGAS

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2007



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.

Índice

Índice de tablas y figuras

Abreviaturas

Resumen

Abstract

Introducción

Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina

Complejo sarcoglicano-sarcospán

Ensamblaje del complejo sarcoglicano sarcospán

Complejos alternativos sarcoglicano-sarcospán

Sarcoglicanopatías

Cardiomiopatías asociadas a la deficiencia de sarcoglicanos

Justificación

Hipótesis

Objetivos

Objetivo General

Objetivos Particulares

Metodología

Consideraciones éticas

Obtención de la vena de cordón umbilical

Cultivo celular primario de músculo liso

Selección de sitios blanco a siRNAs

Síntesis de los casetes de expresión de siRNAs

Clonación de los casetes de expresión funcionales en un vector de expresión

Transformación de células E. coli

Transfección de MLVH

RT-PCR

Inmunofluorescencia indirecta

Determinación de la activación de la respuesta por interferón

Resultados

Discusión

Conclusiones

Perspectivas

Referencias

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Características de los modelos murinos deficientes de los sarcoglicanos y su relación con la cardiomiopatía dilatada

Figura 1. Estructura y organización del complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina

Figura 2. Homología entre las proteínas sarcoglicanos

Figura 3. Ensamblaje del complejo sarcoglicano

Figura 4. Cultivo de células de músculo liso vascular de origen humano

Figura 5. Ubicación de los blancos de siRNA dentro de la secuencia del mRNA de δ -SG

Figura 6. Casetes de expresión de los siRNAs

Figura 7. Mapa del vector de expresión pSECneo

Figura 8. Caracterización por PCR de las colonias positivas

Figura 9. Corrimiento electroforético de los plásmidos purificados

Figura 10. Doble restricción con EcoRI y HindIII del vector pSECneo

Figura 11. Secuencia de nucleótidos de los diferentes SECs

Figura 12. Inmunofluorescencia indirecta de δ -SG, en células de músculo liso vascular humano tratadas con los diferentes siRNAs

Figura 13. Expresión de la proteína δ -SG

Figura 14. RNA total de células de MLVH

Figura 15. Amplificación de GAPDH a partir de cDNA

Figura 16. Coamplificación de δ -SG y GAPDH

Figura 17. Niveles de mRNA de δ -SG

Figura 18. Niveles de expresión de los transcritos de β - y ϵ -SG

Figura 19. Evaluación de la respuesta por interferón

Abreviaturas

°C	Grado centígrado
A	Adenina
a	Aleatorio
AA	Dimero de Adenina
C	Citocina
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario
cm ²	Centímetro cuadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
DCM	Cardiomiopatía dilatada
DGC	Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfato
D'TT	Dithiothreitol
e3	Exón 3
e4	Exón 4
e6	Exón 6
e7	Exón 7
G	Guanina
GAPDH	Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína verde fluorescente
HCl	Ácido clorhídrico
HCM	Cardiomiopatía hipertrófica
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
Kb	Kilopares de bases
KDa	Kilodalton
krpm	Kilorevoluciones por minuto
LGMD	Distrofia muscular de cinturas
mg	Miligramo
µg	Microgramo
min	Minuto
µl	Microlitro
ml	Mililitro
µl	Microlitro
MLVH	Músculo liso vascular humano
mM	Milimolar
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MMLV	Virus de la leucemia murina de Molones
NaCl	Cloruro de Sodio
ng	Nanogramos
ng	Nanogramos
nt	Nucleótido

nm	Nanómetros
nNOS	Sintasa de oxido nítrico neuronal
OAS	Oligoadenilato sintetasa
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pmol	Picomolar
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SEC	Casete de expresión
SECe3	Casete de expresión exón 3
SECe4	Casete de expresión exón 4
SECe6	Casete de expresión exón 6
SECe7	Casete de expresión exón 7
seg	Segundos
SGC-SSPN	Complejo sarcoglicanos sarcospán
SG	Sarcoglicano
siRNA	Pequeño RNA de interferencia
SPN	Sarcospán
T	Timina
U	Unidades
UGC	Complejo de glicoproteínas asociadas a utrofina

Resumen

El complejo sarcoglicano sarcospán (SG-SSPN) forma parte del complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (DGC), el cual está conformado por proteínas membranales como de citoesqueleto. El DGC protege al sarcolema de daños durante el proceso de contracción y al parecer participa en otras funciones tales como adhesión celular y transducción de señales. El complejo SG-SSPN está compuesto por la familia de proteínas α -, β -, γ -, δ -, ε - y ζ - sarcoglicanos (SGs), así como de una tetraspanina llamada sarcospán. Mutaciones en α -, β -, γ - o δ -SG causan distrofia muscular de cintura autosómica recesiva. Pacientes y modelos animales con mutaciones en β -, γ - o δ -SGs, generalmente desarrollan cardiomiopatía dilatada de manera adicional a la distrofia muscular. En el ratón cardiomiopático carente de δ -SG se ha observado que la deficiencia de este sarcoglicano provoca la pérdida secundaria del resto del complejo no solo en músculo esquelético y cardíaco, si no también en músculo liso vascular. El análisis de perfusión de la vasculatura coronaria de estos ratones, evidencian áreas de constricciones. De la misma manera el ratón nulo de γ -SG desarrolla cardiomiopatía acompañada de vasoconstricciones aunque la pérdida secundaria del resto del complejo SG se da únicamente en el sarcolema de los cardiocitos. Estas observaciones conducen hacia dos orígenes del daño a nivel de músculo liso vascular derivados de un proceso tanto intrínseco como extrínseco, que conducen a la cardiomiopatía en la ausencia de δ o γ -SG. De tal manera que aunque parezca contradictorio, ambas hipótesis coinciden en la formación de vasoconstricciones. Lo consecuente a esta alteración en el tejido vascular no ha sido explorado. Sobre estos antecedentes nosotros generamos un modelo de tipo knock-down de δ -SG en cultivo celular de músculo liso vascular humano, utilizando pequeños RNAs de interferencia (siRNAs), dirigidos específicamente al RNA mensajero (mRNA) del δ -SG. El nivel de reducción de la proteína fue corroborado mediante análisis de inmunofluorescencia y RT-PCR semicuantitativa. Un siRNA cuya secuencia blanco se encuentra en una región del exón tres del mRNA de δ -SG generó una reducción en los niveles de proteína en un setenta y ocho por ciento con respecto al control. El análisis de expresión del mRNA mostró una reducción del cuarenta y cinco por ciento. En conclusión, con la implementación de la tecnología de los siRNAs logramos inhibir de forma estable y específica, la expresión de la proteína δ -SG en células de músculo liso vascular de origen humano.

Abstract

The sarcoglycan-sarcospan (SG-SSPN) complex is part of the dystrophin-glycoprotein complex (DGC) which includes membrane and cytoskeletal proteins. The DGC protects the sarcolemma from injuries during muscular contraction and may be involved in other functions such as cell adhesion and signal transduction. The SG-SSPN complex is composed of a set of proteins named α -, β -, γ -, δ -, ϵ - and ζ - sarcoglycans (SGs), as well as a tetraspanin called sarcospan. Mutations in α -, β -, γ -, or δ -SG cause autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies (LGMD2). Patients and animal models with mutations in β -, γ -, or δ -SG, usually develop dilated cardiomyopathy in addition to muscular dystrophy. Concerning the cardiomyopathic δ -SG null mice it has been observed that the deficiency of this SG causes a secondary loss of the rest of the complex not only in skeletal and cardiac muscle, but also in vascular smooth muscle. Perfusion experiments of the vasculature coronary of these mutant mice, demonstrates areas of pronounced constrictions. The γ -SG null mice also show cardiomyopathy accompanied with vasoconstrictions, however, the SG complex is absent only in the sarcolemma of cardiocytes. Both observations points towards an intrinsic and extrinsic process that lead to vasoconstriction and in consequence to cardiomyopathy in absence of δ - or γ -SG. So, although contradictory, the intrinsic and the extrinsic hypothesis coincide in the production of vasoconstrictions. The consequences of this alteration in vascular tissue have not been explored. On that basis we generated a knock-down model of δ -SG in human vascular smooth muscle cell cultures, using specific short interfering RNAs (siRNA), directed toward δ -SG messenger RNA (mRNA). The level of protein reduction was corroborated by immunofluorescence and semiquantitative RT-PCR assays. A siRNA whose target is within in the exon three of the mRNA of δ -SG showed a reduction of the seventy eight percent in the protein level compared to the wild type control. The analysis of the mRNA expression demonstrated a reduction of the forty five percent with the same siRNA. In conclusion, with the implement of siRNA technology we inhibited stable and specific way the expression of δ -SG protein in human vascular smooth muscle cells.

Introducción

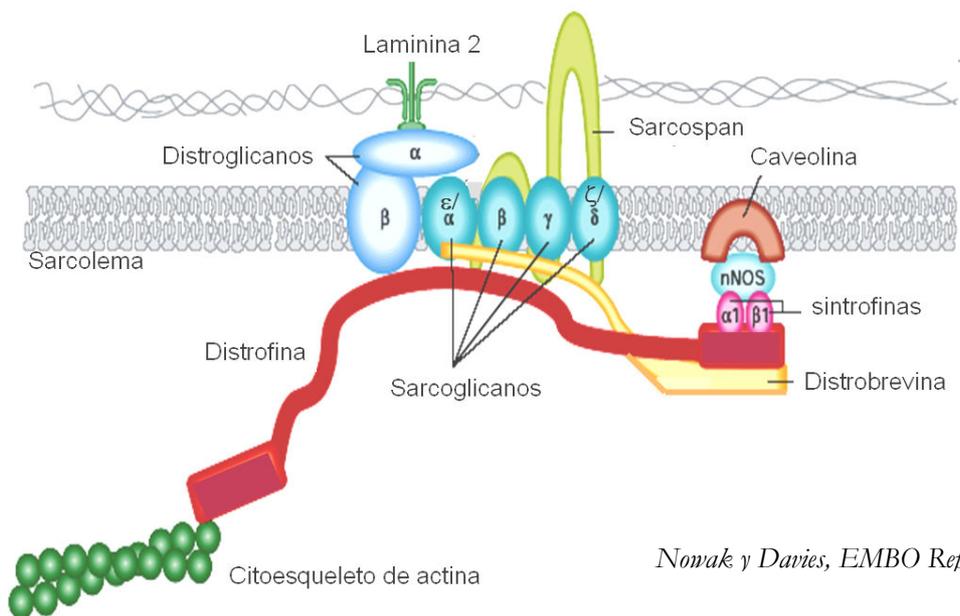
Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina

El complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (DGC por sus siglas en inglés: Dystrophin glycoprotein complex), es un complejo de proteínas asociadas a la membrana citoplásmica (figura 1), cuya principal función es la de proveer soporte y protección a la membrana de las fibras musculares durante los procesos de contracción-relajación (Hoffman et. al., 1987; Yoshida y Ozawa 1990; Ervasti y Campbell 1991; Petrof et. al., 1993; Helbling-Leclerc et. al., 1995; Campbell 1995; Vainzof et. al., 1996). Así mismo, existen evidencias de que el DGC además de conferir un soporte mecánico al sarcolema, puede estar participando en procesos de transducción de señales, ya que presentan una alta homología con el complejo de las integrinas, además de su asociación con la nNOS (Yoshida et. al., 1998; Burkin et. al., 2001; Crosbie et. al., 2002; Griffin et. al., 2005; Barton 2006). El DGC está constituido principalmente por tres subcomplejos: complejo distroglicano, complejo distrofina- distrobrevinas/sintrofinas y complejo sarcoglicano-sarcospán, cuya interacción es determinante para el mantenimiento y funcionamiento normal del sarcolema.

La distrofina fue la primer proteína descrita perteneciente al DGC, y cuya presencia es indispensable para mantener el puente estructural entre el citoesqueleto y la matriz extracelular conformado por las proteínas que componen el DGC (Nowak y Davies, 2004). Esta proteína se une en su región amino terminal a los filamentos de F-actina y en su porción carboxilo terminal con la α -distrobrevina (Blake et. al., 2002). Las sintrofinas alfa1, gama1 y gama2, son otro grupo de proteínas pertenecientes al DGC cuya expresión principal se observa en músculo esquelético (Piluso, et. al., 2000). Estas proteínas interaccionan con la distrofina y distrobrevinas estableciendo además una conexión directa

con la sintasa de oxido nítrico neuronal (nNOS) (Lapidos et. al., 2004). De forma paralela se ha demostrado que las sintrofinas unen a otro tipo de proteínas involucradas en procesos de señalización tales como la calmodulina y Grb2 (Newbell et. al., 1997; Oak et. al., 2001), quedando de manifiesto su posible participación durante procesos de señalización.

El complejo distroglicano conformado por las subunidades α y β forman el núcleo primordial del DGC (Lapidos et. al., 2004). Los distroglicanos son producidos por un mismo gen cuyo producto es modificado post-traduccionalmente, generando ambas subunidades, de las cuales β -distroglicano es la subunidad transmembranral que se une directamente al dominio carboxilo terminal de la distrofina en el citoplasma (Jung et. al., 1995), e interactúa con α -distroglicano en el dominio extracelular. Finalmente, es a través de la interacción de α -distroglicano con la proteína laminina α -2 (Montanaro et. al., 1999) que se integra un puente entre el sarcolema y el ambiente extracelular.



Nowak y Davies, EMBO Reports. 2004

Figura 1. Estructura y organización del complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina. En la imagen se muestran los componentes que conforman el DGC, entre los que se pueden identificar los distroglicanos α y β , la distrobrevina, las sintrofinas α y β , y el complejo sarcoglicano-sarcospan conformado por los sarcoglicanos α , β , γ , δ , ϵ , y ζ ; y sarcospan.

Complejo sarcoglicano-sarcospán

El complejo sarcoglicano-sarcospán (SGC-SSPN por sus siglas en inglés) está constituido por las proteínas transmembranales α -, β -, γ -, δ -, ϵ - y ζ -sarcoglicanos (SGs) además de la tetraspanina denominada sarcospán (SPN) (Ozawa et. al., 2005; Wheeler y McNally, 2003). Este complejo proteínico se encuentra en la membrana celular de músculo esquelético, cardíaco, y liso, así como en tejidos no musculares tales como cerebro, endotelio vascular, retina y riñón (Haenggi y Fritschy, 2006; Durbeej y Campbell, 1999; Straub et. al., 1999). El complejo SGC-SPN cumple con una función tanto estructural y de soporte mecánico al sarcolema, como de manera indirecta en vías de señalización a través de su interacción con otras proteínas (Barton, 2006; Hashimoto y Yamaguchi, 2006; Thompson et. al., 2000).

Si bien por sus características estructurales pertenecen a una misma familia, los sarcoglicanos se encuentran codificados por diferentes genes originados a través de múltiples eventos de duplicación (Lapidos et. al., 2004; Nigro et. al., 1996). Los genes que codifican para los sarcoglicanos se encuentran, respectivamente en los loci: 17q21 para α -SG; 4q12 para β -SG; 13q12 para γ -SG; 5q33 para δ -SG; 7q21 para ϵ -SG y 8p22 para ζ -SG (Ozawa et. al., 2005). Estas proteínas tienen un peso molecular de 50, 43, 35, 35, 50 y 40 KDa correspondiente a α , β , γ , δ , ϵ y ζ -SGs, respectivamente (Lapidos et. al., 2004; Wheeler y McNally, 2003).

Los sarcoglicanos poseen una estructura similar consistente en un dominio intracelular, un dominio transmembranal, y un dominio extracelular, mismo que contiene múltiples sitios de glicosilación, así como numerosos residuos de cisteínas que son conservados en diferentes especies (McNally et. al., 1996). La región intracelular de α , β y γ -SGs presenta residuos de tirosina potencialmente fosforilables, mediante los cuales pueden estar participando activamente en vías de señalización (Hashimoto y Yamaguchi, 2006; Griffin et. al., 2005; Yoshida et. al., 1998). En base a la estructura proteínica, los sarcoglicanos pueden dividirse en proteínas tipo I y II. (figura 2) Los sarcoglicanos α y ϵ corresponden a proteínas tipo I, ya que su dominio carboxilo se encuentra hacia la cara intracelular, mientras que su dominio amino se localiza del lado extracelular. Por otra parte, los sarcoglicanos β , γ , δ y ζ , pertenecen al grupo de proteínas tipo II, las cuales presentan de manera extracelular su dominio carboxilo mientras que su dominio amino está localizado intracelularmente.

Entre los diferentes sarcoglicanos se comparte cierto grado de identidad a nivel genómico la cual es de 63% entre α y ϵ SGs, 69% entre γ y δ SGs, 74.8% entre ζ y δ SGs y 74.2% entre ζ y γ SGs ; mientras que la similitud de aminoácidos es de 43% entre α y ϵ SGs; 55% entre γ y δ SGs, 57% entre ζ y δ SGs y 55.7% entre ζ y γ SGs (Ettinger et. al., 1997; Hack et. al., 2000).

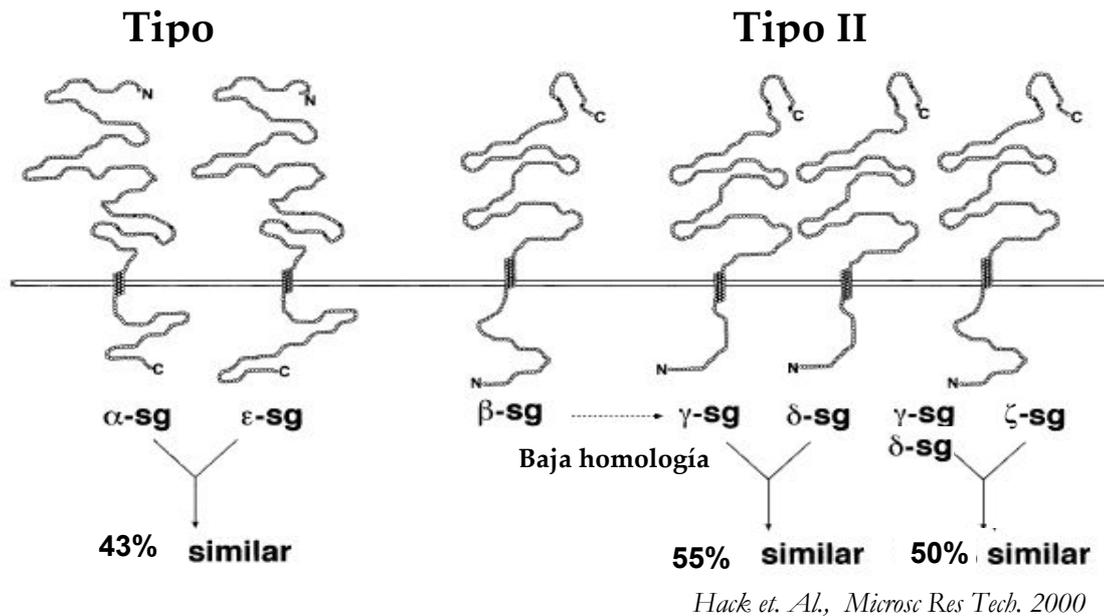


Figura 2. Homología entre las proteínas sarcoglicanos. En la figura se muestra una representación esquemática de los sarcoglicanos indicando el porcentaje de homología a nivel de secuencia genómica.

En cuanto a la proteína sarcospán, la cual se encuentra localizada en la membrana citoplasmática e interactuando fuertemente con el complejo SG, se le ha descrito como una proteína que posee cuatro dominios transmembranes conservados dentro de la superfamilia tetraspaninas. Su función aún no ha sido bien definida (Crosbie et. al., 1997), sin embargo debido a su homología con otras tetraspaninas que se encuentran estrechamente relacionadas con algunas integrinas, se ha propuesto un posible papel como proteína de señalización y transducción (Maecker et. al., 1997).

Ensamblaje del complejo sarcoglicano sarcospán

Los diferentes sarcoglicanos que conforman el SGC son sintetizados en el retículo endoplásmico, pasando posteriormente al aparato de Golgi, en donde las proteínas son glicosiladas antes de llegar finalmente a la membrana plasmática como un complejo completamente estructurado (Holt y Campbell, 1998; Hack et. al., 2000; Shi et. al., 2004). La formación del SGC comienza en primera instancia con la presencia de dímeros entre β -SG y δ -SG. Durante esta etapa, el β -SG juega un papel primordial funcionando como un factor de iniciación, para lo cual es necesario la glicosilación en su extremo amino, tras lo cual se asocia en con δ -SG formando un complejo denominado nucleador que es esencial para la integración del resto de los componentes del complejo, así como para promover su localización en la membrana celular (Araishi et. al., 1999; Hack et. al., 2000; Shi et. al., 2004). Una vez formado, este primer complejo nucleador δ -SG sufre cambios conformacionales que funcionan como señal para su localización membranal así como para la unión con γ -SG (Shi et. al., 2004), formándose así complejos triméricos de β -, δ -, y γ -SGs, y por último el complejo conformado por β -, δ -, γ - y α -SGs (figura 3) (Noguchi et. al., 2000).

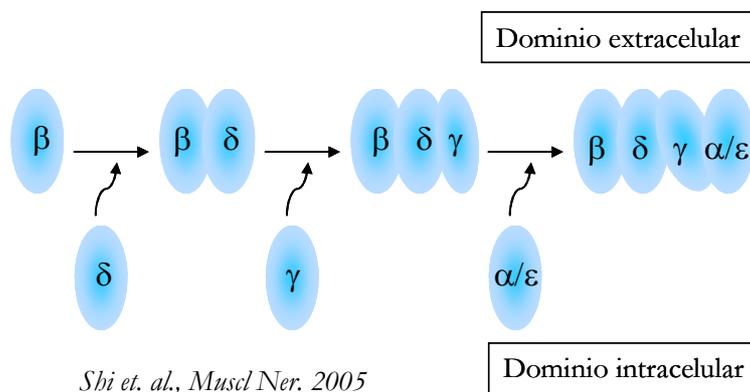


Figura 3. Ensamblaje del complejo sarcoglicano. Una vez formado el complejo nucleador conformado por β - y δ -SG se unen γ - y α/ϵ -SG.

Complejos alternativos sarcoglicano-sarcospán

Además del SGC de músculo esquelético anteriormente descrito, se han caracterizado otros complejos tejido-específicos. En particular los sarcoglicanos α y γ se expresan únicamente en músculo esquelético y cardíaco (Noguchi et. al., 1995), mientras que β -, δ - y ϵ -SGs, tienen una expresión más amplia en diversos tejidos entre los que se incluye, músculo esquelético, músculo cardíaco, y músculo liso (Straub et. al., 1999). Por otra parte, se ha observado que α - y ϵ -SGs son mutuamente excluyentes y existen dos formas alternativas de SGC en músculo esquelético y cardíaco; uno conformado por α -, β -, γ -, y δ -SG y otro constituido por ϵ -, β -, γ - y δ -SG. En el caso de los cardiomiocitos el complejo formado por ϵ -, β -, γ - y δ -SG se encuentra preferentemente expresado sobre el complejo α -, β -, γ -, y δ -SG (Wheeler et. al., 2004). De manera reciente se determinó a través de estudios *in Vitro*, en células de ovario de hamster chino, la capacidad de ζ -SG para substituir a γ -SG en la formación del SGC; esto da lugar a la aparición de otros dos complejos alternativos resultando en un total de cuatro complejos que estarían conformados de la siguiente manera: complejo 1 α -, β -, γ - y δ -SG, Complejo 2 α -, β -, ζ - y δ -SG, complejo 3 ϵ -, β -, γ - y δ -SG y complejo 4 ϵ -, β -, ζ - y δ -SG (Shiga et. al., 2006). Si bien γ - y ζ - SGs se expresan en los mismos tejidos, ζ -SG muestra una expresión particularmente abundante en cerebro, por lo que se piensa que pueda tener una función específica en sistema nervioso central (Shiga et. al., 2006).

Sarcoglicanopatías

La presencia de mutaciones en los genes que codifican para α -, β -, γ - y δ -SGs es causa de las distrofias musculares de cintura autosómicas recesivas de tipo LGMD2D, LGMD2E, LGMD2C Y LGMD2F (por sus siglas en inglés: limb girdle muscular dystrophy; LGMD) respectivamente, conocidas en conjunto como sarcoglicanopatías (Passos-Bueno et. al., 1999; Lim et. al., 1995; Lasa et. al., 1998; Duggan et. al., 1997). De manera interesante las mutaciones que se han encontrado para el gen de ϵ -SG no está relacionado con un fenotipo distrófico sino con desórdenes de tipo neurológico como la distonia mioclónica y la epilepsia (Zimprich et. al., 2001). La deficiencia de ζ -SG no ha sido aún asociada con ninguna patología, sin embargo, su estrecha homología con γ -SG sugiere que esta proteína podría producir una distrofia muscular de cintura (Wheeler et. al., 2002).

Una característica de las sarcoglicanopatías es que la ausencia de tan solo uno de los sarcoglicanos provoca la desestabilización del resto de los componentes del complejo, dando como resultado la ausencia o una reducción significativa de todos los demás sarcoglicanos (Coral-Vázquez et. al., 1999, Barresi et. al., 2000; Wheeler et. al., 2004). A través de estudios *in vitro* con células heterólogas, se ha observado que la ubicación membranal del complejo SG es dependiente de la coexpresión de α -, β -, γ - y δ -SG (Chan et. al., 1998; Holt y Campbell, 1998), lo que en conjunto ha llevado a proponer que la pérdida de todo el complejo en las sarcoglicanopatías se debe esencialmente al ensamblaje y transporte defectuosos hacia la membrana (Chan et. al., 1998; Holt et. al., 1998; Chen et. al., 2006). La generación de modelos murinos carentes de los sarcoglicanos α (Duclos et. al., 1998), β (Durbeej et. al., 2000), γ (McNally et. al., 1996),

y δ (Coral-Vázquez et. al., 1999), han ayudado al estudio de las sarcoglicanopatías. El modelo murino carente del α -SG desarrolla distrofia muscular progresiva acompañada de una disminución de β -, γ - y δ -SG. El hecho de que no se observe una deficiencia total en el resto de los sarcoglicanos se explica con base en la presencia de complejos alternativos formados por ε -SG que pueden compensar de alguna manera la pérdida de α -SG (Liu y Engvall, 1999). Por otro lado, el ratón deficiente de γ -SG desarrolla distrofia muscular y cardiomiopatía dilatada, con la disminución característica en la expresión del resto de los sarcoglicanos (Hack et. al., 1999). Mientras tanto, los modelos deficientes en β -SG y δ -SG, respectivamente, desarrollan una distrofia muscular severa y progresiva con grandes regiones de necrosis aunado al desarrollo de cardiomiopatía dilatada. En estos modelos la deficiencia primaria del sarcoglicano correspondiente, provoca la pérdida total del resto de los componentes del SGC tanto en músculo estriado como en músculo liso a diferencia de los modelos deficientes de α - y γ - SG (Coral-Vázquez et. al., 1999; Hack et. al., 1999; Barresi et. al., 2000). Esto apoya la hipótesis de que es indispensable la formación del complejo nucleador formado por β y δ -SGs durante el ensamblaje del complejo SG (Shi et. al., 2004).

Cardiomiopatías asociadas a la deficiencia de sarcoglicanos

La función cardíaca adecuada esta sustentada por la generación de fuerza contráctil en el sarcómero y su transmisión hacia la matriz celular. La inadecuada ejecución en cualquiera de los componentes involucrados durante esta función, provoca una remodelación cardíaca que da como resultado la cardiomiopatía, misma que se puede clasificar en tres tipos: cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía dilatada, y

cardiomiopatía restrictiva (Priva y Mattos, 2006; Towbin y Bowles, 2006; Aguirre et. al., 2006). La cardiomiopatía dilatada es la principal causa de disfunción cardíaca y está caracterizada por dilatación del ventrículo izquierdo, un incremento en el volumen del ventrículo derecho además de disfunción sistólica (Towbin, 1998). Cualquiera de estas tres formas de cardiomiopatía pueden tener un origen heredado o adquirido, no obstante en cualquiera de los casos resulta difícil la elucidación de la causa primaria (Towbin, 1998).

Estudios genéticos y bioquímicos han permitido conocer, la etiología de algunos de estos desórdenes cardíacos, y de manera significativa se han encontrado alteraciones en las proteínas que conforman el citoesqueleto, tanto en la cardiomiopatía hipertrófica como en la cardiomiopatía dilatada. En el caso de la cardiomiopatía hipertrófica se han localizado mutaciones en los genes de la cadena pesada de miosina cardíaca- β , troponina T cardíaca, troponina I, α -tropomiosina, actina y titina (Seidman y Seidman, 2001; Morita et. al., 2002; Richard et. al., 2003). Aproximadamente en el 30% de los casos de cardiomiopatía dilatada se logra identificar una causa genética (Michels et. al., 1992; Keeling et. al., 1995). Hay una gran diversidad en los genes involucrados en la cardiomiopatía dilatada, pero se ha propuesto una vía común para todos ellos en la que las mutaciones afectan elementos de la citoarquitectura celular, primordialmente alrededor del citoesqueleto y el sarcolema, incluyendo elementos que interactúan directamente con el citoesqueleto, entre los que se incluyen los componentes del DGC (Tsubata et. al., 2000). Es así que la cardiomiopatía dilatada se ha relacionado específicamente con mutaciones en los genes de miosina, troponina, teletonina, α -actina y componentes del DGC, entre los que se encuentra distrofina y β -, γ - y δ -SG. (Badorff et. al., 1999; Coral-Vázquez et. al., 1999; Tsubata et. al., 2000; Wheeler et. al., 2004).

Un modelo natural que ha sido extensamente estudiado por desarrollar cardiomiopatía dilatada de manera espontánea, es el hamster cardiomiopático TO-2, el cual presenta una delección del exón 1 y 2 del gen δ -SG (Sakamoto et. al., 1997). En humanos las alteraciones en este gen son comúnmente causa de distrofia muscular de cintura, sin embargo se ha reportado la identificación una familia con la mutación c.451.T>G que provoca un cambio de aminoácido serina por alanina, así como un par de casos esporádicos con eliminaciones en el exón 9 que ocasionan la pérdida de la lisina 238 de δ -SG, en los cuales solo se presenta el desarrollo de cardiomiopatía dilatada en ausencia de distrofia muscular (Tsubata et. al., 2000).

El estudio del modelo murino deficiente en δ -SG (Coral-Vázquez et. al., 1999) antes mencionado, mostró que estos animales desarrollan cardiomiopatía dilatada con áreas focales de necrosis, a los tres meses de edad. Además se encontraron anomalías en la morfofisiología de la arteria coronaria, particularmente constricciones y reducción del diámetro del lumen vascular, lo que indica que la deficiencia de δ -SG provoca una alteración a nivel de músculo liso vascular. De manera similar, se encontraron este tipo de lesiones en la vasculatura coronaria en los modelos murinos deficientes de γ - y β -SGs, respectivamente (McNally et. al., 1996; Durbeej et. al., 2003), con lo que resulta más evidente la hipótesis de que el daño a nivel vascular contribuye de manera significativa al desarrollo de la cardiomiopatía dilatada. En la tabla 1 se muestran las características de los modelos animales carentes de los sarcoglicanos y su asociación con la cardiomiopatía.

Tabla 1. Características de los modelos murinos deficientes de los sarcoglicanos y su relación con la cardiomiopatía dilatada.

Deficiencia	Distrofia progresiva	Pérdida CSG-SPN Cardiocitos	Pérdida CSG-SPN Músculo liso	Obstrucción vascular	Cardiomiopatía dilatada
α-sarcoglicano	SI	SI	NO	NO	NO
β-sarcoglicano	SI	SI	SI	SI	SI
γ-sarcoglicano	SI	Disminución	NO	SI	SI
δ-sarcoglicano	SI	SI	SI	SI	SI

Justificación

La deficiencia de la proteína δ -SG es causa de distrofia muscular de cinturas y cardiomiopatía dilatada. El desarrollo de la cardiomiopatía dilatada se encuentra estrechamente ligado a la presencia de daño vascular primordialmente constricciones en la vasculatura coronaria de los modelos murinos carentes de esta proteína. Por lo cual resulta importante generar modelos de estudio que nos permitan analizar la participación de esta proteína en el daño a nivel vascular.

Hasta la fecha existen dos modelos knock-out para δ -SG que han sido de gran utilidad, sin embargo, existe el inconveniente de que son modelos animales cuyo mantenimiento requiere de una inversión considerable, tanto en infraestructura como en su mantenimiento, sin olvidar que se trata de modelos murinos de los cuales no se pueden extrapolar los resultados al humano sin grandes reservas. Es por ello que desarrollamos un modelo de estudio de origen humano a través de RNAs de interferencia. Estos modelos están siendo ampliamente utilizados en todo el mundo como una opción más práctica y económica para el estudio de genes y sus proteínas, así como su participación en procesos biológicos.

Hipótesis

La utilización de siRNAs dirigidos contra el mRNA de la proteína δ -SG en células de músculo liso vascular de origen humano, inhibe de manera específica la expresión de la proteína δ -SG.

Objetivos

Objetivo General

- Generar un modelo knock-down de delta sarcoglicano en células de músculo liso vascular de origen humano.

Objetivos Particulares

- Obtener y caracterizar un cultivo celular de músculo liso vascular humano a partir de la vena del cordón umbilical.
- Sintetizar y clonar casetes de expresión de diferentes RNAs de interferencia dirigidos hacia el transcrito de delta sarcoglicano.
- Inhibir de manera específica la expresión de delta sarcoglicano por siRNAs, en células de músculo liso vascular de origen humano.

Metodología

Consideraciones éticas

El manejo de muestras biológicas de origen humano durante el desarrollo de este proyecto fue aprobado por el comité local de ética del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Obtención de la vena de cordón umbilical

Se colectaron cordones umbilicales provenientes de partos de mujeres con embarazo normal del servicio de ginecología de la Clínica 4 del IMSS (Hospital Luis Castelazo Ayala). Los cordones se mantuvieron en botellas estériles con solución salina fisiológica (NaCl 0.09%) a la cual se adicionó 1% de una mezcla de antibióticos (penicilina 1000U/ml, estreptomycin 1000mg/ml y anfotericina B 25mg/ml; Gibco, Invitrogen) a una temperatura de 4°C hasta su procesamiento.

Bajo condiciones estériles se localizó la vena y se lavó con solución salina balanceada Hanks (Gibco, Invitrogen) para eliminar los restos de sangre contenidos dentro del vaso, posteriormente se eliminó el endotelio vascular mediante una digestión enzimática, introduciendo dentro de la vena una solución de Tripsina-EDTA diluida en Hanks a una concentración final de 0.12%. Se incubó el cordón con esta solución durante 15 min a una temperatura de 37°C, posteriormente se eliminó la solución y se lavó el vaso con solución de Hanks para eliminar cualquier remanente de endotelio vascular y/o tripsina. Finalmente se realizó la disección de la vena con el fin de separarla del tejido conectivo y las arterias que conforman al cordón umbilical.

Cultivo celular primario de músculo liso

Una vez aislada la vena del resto de tejido del cordón umbilical se realizó un corte longitudinal con la finalidad de dejar expuesta la luz del vaso. A continuación se realizaron cortes rectangulares de aproximadamente 3mm X 5mm. Estos explantes fueron colocados en placas de cultivo de 6 pozos de 95cm² (dos explantes por cada pozo) haciendo contacto con la luz del vaso hacia la superficie del pozo. De manera cuidadosa para no romper la adherencia del explante con la superficie de la placa se adicionaron 2ml de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Media (D-MEM; Gibco, Invitrogen), suplementado con 30% de suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen) y 1% de penicilina G (10 000U/ml; SIGMA). Los explantes se mantuvieron a 37° C y 5% de CO₂ por 10 días sin cambiar el medio de cultivo, tras lo cual se revisó la periferia de cada uno de los explantes para detectar la migración de las células de músculo liso hacia la placa de cultivo con ayuda de un microscopio invertido (Axiovert 25, Carl Zeiss). Se seleccionaron los cultivos en los que se detectó crecimiento de células de músculo liso y se retiró el explante; posteriormente se realizaron tres lavados con Hanks a cada pozo y se despegaron las células por medio de tripsina (0.25%) durante 5min a 37° C. Enseguida, la actividad enzimática fue inhibida con suero fetal bovino al 2%, y las células en suspensión se recolectaron en tubos de 15ml, en los que se centrifugaron a 2800 rpm a 4° C durante 7 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla celular fue resuspendida en 2ml de medio de cultivo suplementado. Una vez teniendo las células en suspensión se sembraron en una botella de 25cm², e incubaron a 37° C y 5% de CO₂ para su propagación.

Selección de sitios blanco a siRNAs

A partir de la secuencia del RNA mensajero del gen de delta sarcoglicano (NM_172244 GeneBank) se realizó la búsqueda de sitios blanco candidatos a ser reconocidos por siRNAs. Esta búsqueda se llevó a cabo mediante un algoritmo proporcionado por la compañía Ambion en la página web: http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_design.html. Dicho algoritmo se basa en la búsqueda de los 19 nucleótidos siguientes a dinucleótidos de adenina (AA) adyacentes al extremo 3', partiendo del codón de inicio adenina, uracilo, guanina (AUG) ya que se ha observado son potencialmente sitios blanco a siRNA. Con este algoritmo se obtuvo una serie de secuencias candidatas para la generación de siRNAs, de las cuales se seleccionaron cuatro ya que la reducción típica obtenida mediante este método es aproximadamente del 50% y aproximadamente 1 de 4 siRNAs provee una reducción de entre el 75-95% de la proteína, los criterios que se siguieron para la elección de las cuatro secuencias fueron:

- ❑ Un contenido de guanina-citosina (GC) de entre el 30-50% ya que los siRNAs con un alto contenido en GC han mostrado tener una actividad disminuida.
- ❑ Poseer entre 4-6 nucleótidos poli-T que sirvan como señal de terminación a la RNA polimerasa III.
- ❑ Estar distribuidos a lo largo del RNA mensajero.

Finalmente se realizó una comparación de las secuencias blanco candidatas con el resto del genoma humano para asegurar que las secuencias elegidas no presentaran homología con otras secuencias codificantes, para lo cual se utilizó el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast).

Las cuatro secuencias seleccionadas fueron: 3'-aaggagactctgaattcttac-5', que se encuentra en el exón 3; 3'-a aagtgctaactcagcttata-5' dirigido hacia el exón 4; 3'-aaagaactaaggttggagtcc-5', dirigido hacia el exón 6 y 3'-aagctggcaatatggaagcca-5', dirigido hacia el exón 7 del gen SGCD.

Síntesis de los casetes de expresión de siRNAs

Con las secuencias seleccionadas para ser utilizadas como blanco de siRNAs, se diseñaron oligonucleótidos para la síntesis de casetes de expresión (SEC) mediante tres PCR (reacción en cadena de la polimerasa) consecutivas utilizando el kit Silencer™ Express (Human U6) siRNA Expresión Cassette (Ambion). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados son:

Oligonucleótido sentido para el siRNA dirigido hacia el exón 3:

5'- TACCTACACAAAGTAAGAATTCAGACTCTCCCGGTGTTTCGTCTTCCACAAG -
3';

Oligonucleótido antisentido para el siRNA dirigido hacia el exón 3:

5'- CGGCGAAGCTTTTCCAAAAAAGGAGACTCTGAATTCCTTACCTACACAAAG - 3'

Oligonucleótido sentido para el siRNA dirigido hacia el exón 4:

5' - ATACTACACAAATATAAGCTGAGTTAGCACTCGGTGTTTCGTCTTCCACAAC -
3

Oligonucleótido antisentido para el siRNA dirigido hacia el exón 4:

5' - CGGCGAAGCTTTTCCAAAAAAGTGCTAACTCAGCTTATACTACACAAATATA -
3'

Oligonucleótido sentido para el siRNA dirigido hacia el exón 6:

5' – TCCCTACACAAAGGACTCCAACCTTAGTCTCTCGGTGTTTCGTCCTTCCACAAG –
3'

Oligonucleótido antisentido para el siRNA dirigido hacia el exón 6:

5' – CGGCGAAGCTTTTTCCAAAAAAGAAGCTTGGAGTCCCTACACAAAGGAC
–3'

Oligonucleótido sentido para el siRNA dirigido hacia el exón 6:

5' – CCACTACACAAATGGCTTCCATATTGCCAGCCGGTGTTCGTCCTTCCACAAG –
3'

Oligonucleótido antisentido para el siRNA dirigido hacia el exón 6:

5' – CGGCGAAGCTTTTTCCAAAAAAGCTGGCAATATGGAAGCCACTACACAAATGGC
– 3'

Los SECs funcionales están constituidos en el extremo 5' un sitio de reconocimiento para la endonucleasa EcoRI, seguido de una secuencia promotora para la RNA polimerasa (promotor HU6 humano), las secuencia sentido de cada uno de los siRNAs, una secuencia formadora de una estructura en forma de asa, la secuencia antisentido de cada uno de los siRNAs, una secuencia terminadora para la RNA polimerasa y finalmente un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Hind III, en el extremo 3'. La secuencia final de cada uno de los casetes de expresión fué:

SEC dirigido hacia el exón 3 (SECe3):

5'-CGGCGAAGCTTTTTCACAAAAAAGGAGACTCTGAATTCTTACCTACACAAAGTAAGA
ATTCAGAGTCTCCCGGTGTTTCGTCCTTTCACACAAG -3'

SEC dirigido hacia el exón 4 (SECe4):

5'-CGGCGAAGCTTTTTCACAAAAAAGTGTAACTCAGC
TTATACTACACAAATATAAGCT GAGTTAGCACTCGGTGTTTCGTCCTTTCACACAAG -3'

SEC dirigido hacia el exón 6 (SECe6):

5'-CGGCGAAGCTTTTTCACAAAAAAGAACTAAGGTGG AGTCCCTACACA
AAGGACTC CA ACCTTAGTCTCTCGGTGTTTCGTCCTTTCACACAAG -3'

SEC dirigido hacia el exón 7 (SECe7):

5'-
CGGCGAAGCTTTTTCACAAAAAAGCTGGCAATATGGAAGCCACTACACAAATGGCTTC
C A TATTGCCAGCCGGTGTTCGTCCTTTCACACAAG -3'

La construcción de estos casetes de expresión se realizó mediante tres PCRs consecutivas, en la primer PCR se agregó 1 µl de DNA precursor HU6 (proporcionada por el Kit), 1µl (10µM) de oligonucleotido promoter PCR HU6 (proporcionado por el Kit), 1 µl (10µM) del Oligonucleótido sentido para cada uno de los diferentes siRNAs, 1.5 unidades de enzima Taq polimerasa, 0.2 mM de dinucleótidos trifosfatados (dNTP's), 3 mM de cloruro de magnesio, 50 mM de cloruro de potasio, 20mM de Tris-HCl (pH 8.4) y agua para llevar a un volumen final de 20 µl. La PCR consistió de una desnaturalización

inicial de 1 minuto a 96° C, seguida de 25 ciclos conformados por desnaturalización de 30 segundos a 94° C, alineamiento 30 segundos a 55° C y extensión de 30 segundos a 72° C. Con esta primer PCR se generó una primera estructura constituida por el sitio de reconocimiento para la endonucleasa EcoRI, seguido de una secuencia promotora para la RNA polimerasa (promotor HU6 humano), las secuencia sentido de cada uno de los siRNAs, y la secuencia correspondiente a la horquilla.

Para la segunda PCR se agrego 1µl de una dilución 1:50 del producto de la primer PCR, 1µl (10µM) de oligonucleótido promoter PCR HU6 (proporcionado por el Kit), 1 µl (10µM) del oligonucleotido antisentido para cada uno de los diferentes siRNAs, 1.5 unidades de enzima Taq polimerasa, 0.2 mM de dNTP's, 3 mM de cloruro de magnesio, 50 mM de cloruro de potasio, 20mM de Tris-HCl (pH 8.4) y agua para llevar a un volumen final de 20 µl. La PCR consistió de una desnaturalización inicial de 1 minuto a 96° C, seguida de 25 ciclos conformados por desnaturalización de 30 segundos a 94° C, alineamiento 30 segundos a 55° C y extensión de 30 segundos a 72° C. La construcción conseguida por esta segunda PCR incluye lo ya descrito en la primera fase, más la secuencia antisentido de cada uno de los siRNAs. Esta estructura es considerada como el precursor del SEC.

Finalmente se llevó a cabo una tercera reacción de PCR para tener el casete de expresión funcional en donde la construcción ya contiene la secuencia terminadora y el sitio de restricción para la endonucleasa Hind III. Para esta tercera reacción de amplificación se utilizó 0.5 µl de una dilución 1:50 del producto de la segunda PCR, 4µl (10µM) de oligonucleótido promoter PCR HU6 (proporcionado por el Kit), 4µl (10µM) de oligonucleótido terminator PCR HU6 (proporcionado por el Kit), 6 unidades de enzima Taq polimerasa, 3 mM de cloruro de magnesio, 50 mM de cloruro de potasio, 20mM de

Tris-HCl (pH 8.4) y agua para llevar a un volumen final de 100 μ l. La PCR consistió de una desnaturalización inicial de 2 min a 96° C, seguida de 30 ciclos conformados por desnaturalización de 1 minuto a 94° C, alineamiento 30 segundos a 52° C, extensión de 30 segundos a 72° C y una extensión final de 3 min a 72° C.

Se comprobó la presencia del SEC funcional separando 5 μ l del producto de PCR (434 pb) en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio a 120 Volts durante 25 min, y se observó a través de un transiluminador con luz ultra violeta.

Una vez comprobado el tamaño de las construcciones, se purificaron mediante el Kit PureLink™ (Invitrogen) y se cuantificaron por espectrofotometría midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260nm y 280nm. La lectura obtenida a longitud de onda de 260 nm se multiplicó por un factor de 50 correspondiente a los ng de DNA por una unidad de absorbancia, y el resultado se multiplicó por el factor de dilución (50). Con la relación de absorbancias 260/280 se determinó la pureza de la muestra que en condiciones óptimas debe ser de 1.8 a 2.0.

Bajo las mismas condiciones anteriormente descritas, además de los cuatro casetes de expresión para los siRNAs dirigidos hacia el sarcoglicano delta, se generó un SEC que funcionó como control. Este SEC consistió en un casete de expresión como control negativo con la misma composición de nucleótidos que los siRNAs funcionales, pero cuya secuencia es aleatoria y no es complementaria con ninguna secuencia codificante dentro del genoma. Los oligonucleótidos para generar el control son proporcionados por el kit. Este siRNA se obtuvo ya validado por el proveedor.

Clonación de los casetes de expresión funcionales en un vector de expresión

Para la clonación de los SECs en el vector de expresión pSEC neo® (Ambion), se realizó una digestión enzimática con las endonucleasas EcoRI y HindIII (New England Biolabs). La digestión se llevó a cabo durante 16 horas a 37° C. La mezcla de digestión consistió en los siguientes componentes: 500ng de SEC, 4 unidades de cada endonucleasa, 5 µl de 1x NEB Buffer 2® y agua para un volumen final de 50µl. Al concluir la digestión enzimática, el ADN se purificó mediante fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), siguiendo la siguiente técnica: se agregó un volumen de fenol-cloroformo frío a la reacción de restricción, se mezcló mediante vortex y centrifugó a 12 krpm durante 30 min a temperatura de 4° C, se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ADN con dos volúmenes de etanol absoluto, incubando dos horas a -20° C. Posteriormente se centrifugó a 12 krpm durante 30 min a una temperatura de 4° C, se eliminó el sobrenadante, se secó la muestra durante 10 min a temperatura ambiente, y finalmente se resuspendió en 10µl de agua estéril libre de nucleasas.

Para la ligación del SEC al vector de expresión pSEC neo®, se preparó la siguiente mezcla: 50ng del SEC (digerido y purificado), 1µl de buffer 10x de ligasa de DNA T4, 4 unidades de enzima ligasa de DNA T4, 1 µl de pSEC Neo® (linearizado) y agua para llevar a un volumen final de 10 µl. La reacción incubó durante 16 horas a 4° C.

Transformación de células *E. coli*

Se transformaron células *E. coli* competentes de la cepa HB101 con el vector de expresión el cual contenía como inserto los diferentes casetes de expresión de siRNA. Para la transformación de células *E. coli* se tomaron 5µl de la reacción de ligación y se mezclaron con las células competentes. Dichas células se incubaron a 4° C durante 20 min, posteriormente se llevó a una temperatura de 42° C por 45 segundos para finalmente realizar una última incubación a 4° C por 5 min. Una vez realizado esto se adicionaron 900µl de medio LB libre de ampicilina y se promovió el crecimiento bacteriano incubando a una temperatura de 37°C por 90 min en agitación constante de 180 rpm. Por último se tomaron 200µl del cultivo y se plaquearon en agar LB con ampicilina (0.1mg/ml), este antibiótico funciona como marcador de selección positiva debido a la resistencia adquirida por las bacterias al contener el plásmido.

Una vez seleccionadas las colonias positivas y con la finalidad de corroborar si las bacterias contenían el plásmido ligado con el inserto, se realizó una amplificación por PCR del mismo, para lo cual se utilizaron dos oligonucleótidos que flanquean la secuencia del inserto y cuya secuencia esta contenida dentro del vector: los oligonucleótidos utilizados son: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' para la cadena sentido y 5'-GAGTTAGCTCACTCATTAGGC-3' para la cadena antisentido. Las condiciones de reacción fueron: una muestra pequeña de la colonia de bacterias tomada con una punta de pipeta, 1.5 unidades de enzima Taq polimerasa, 10pmol de cada primer, 0.2mM dNTP's, 3mM de cloruro de magnesio, 50mM de cloruro de potasio, 20mM de Tris-HCl (pH 8.4) y agua para llevar a un volumen final de 25µl. La PCR consistió de una desnaturalización inicial de 5 min a 94° C, seguida de 33 ciclos conformados por desnaturalización de 30 seg a 94° C, alineamiento 30 seg a 57° C, extensión de 1 min a 72° C y extensión final de 5

min a 72° C. Se comprobó la amplificación del fragmento esperado de 598 pb separando 3 µl del producto de PCR en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio a 120 Volts durante 25 min.

Una vez que se seleccionaron las colonias que contuvieran el inserto de acuerdo con el resultado de la PCR, se seleccionó una de ellas para cada uno de los casetes de expresión y se llevó a cabo la purificación de plásmido mediante el Kit Endofree® (QIAGEN) para su posterior transfección en células de músculo liso vascular de vena de cordón umbilical humano (MLVH).

Para la caracterización de cada uno de los plásmidos obtenidos se sometió a una restricción enzimática con EcoRI y HindIII, para liberar el inserto. La reacción de restricción se llevó a cabo con 500ng de plásmido, 4 unidades de cada una de las enzimas, 2µl de 1x NEB Buffer 2® y agua para llegar a un volumen final de 20µl. Al concluir la digestión enzimática, se comprobó la liberación del inserto separando el volumen total de la reacción en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio a 120 Volts durante 25 min.

Finalmente se secuenció parte del plásmido y la totalidad de los insertos para cada uno de los plásmidos con los diferentes SECs y de esta manera corroborar la secuencia de cada una de las construcciones obtenidas. La reacción de secuenciación se realizó con 500ng de plásmido, 4 µl de Big Dye (Applied Biosystems), 10pmol de oligonucleótido para cada una de las cadenas en reacciones separadas y agua estéril para completar un volumen final de 20µl. La reacción de PCR para secuenciar constó de desnaturalización inicial 5 min a 96° C, seguido de 40 ciclos, cada uno con las siguientes características: 10 seg a 96° C, 5 seg a 57° C y cuatro min a 60° C.

Transfección de MLVH

Para la transfección de los vectores de expresión en las células de MLVH se utilizaron células de un cuarto pasaje de duplicación celular. Se utilizó el reactivo siPORT™ XP-I® (Ambion), que es una formulación de poliamidas para una alta eficiencia de transfección en células eucariontes con una baja toxicidad. Para determinar las condiciones y eficiencia de la transfección se utilizó el plásmido pQBI25, con el cual se produce la proteína verde fluorescente (GFP), se analizó la fluorescencia en las proteínas mediante el sistema ApoTome (Zeiss), con lo cual se determinó una eficiencia de transfección del 75% y mediante el examen de viabilidad de azul de Tripano se encontró una muerte celular menor al 15%.

Veinticuatro horas antes de la transfección se sembraron células MLVH en placas de cultivo a una confluencia del 40% (60000 células en placas de 2cm²). El día de la transfección se preparó el reactivo siPORT™ XP-I mezclando 0.6µl de éste con medio DMEM libre de suero para un volumen final de 50µl. Se mezcló por vórtex durante un segundo e incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente se adicionaron 400ng del plásmido para obtener una relación siPORT™ XP-I: plásmido 3:2. Se mezcló por pipeteo e incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se ajustó el volumen de medio de cultivo suplementado a 500µl y se adicionó la mezcla siPORT™ XP-I/plásmido por goteo. Se distribuyó homogéneamente mediante movimientos oscilatorios teniendo cuidado de no formar remolinos, y finalmente se incubaron las células en condiciones normales. Transcurridas 24 horas después de haberse realizado la transfección, el medio de cultivo fue reemplazado por medio de cultivo más geneticina (350µg/ml), antibiótico que nos permite seleccionar células transfectadas

debido a que el vector pSECneo contiene un marcador de resistencia a este antibiótico. Las células se mantuvieron durante 96 horas bajo estas condiciones, reemplazando el medio de cultivo adicionado con el antibiótico cada 48 horas; transcurridas las 96 horas post-tranfección las células fueron analizadas para observar el efecto de los diferentes siRNAs.

RT-PCR

Para analizar el efecto de los diferentes siRNAs en la expresión transcripcional del sarcoglicano delta, se extrajo RNA de las células tranfectadas mediante el Kit RNAqueous®-96 (Ambion) siguiendo las condiciones dadas por el proveedor. Partiendo de 2µg de RNA total se generó el DNA complementario (cDNA), mediante una reacción de retro-transcripción (Förster, 1994) siguiendo las siguientes condiciones:

Componentes de la primer fase de la reacción: 2µg de RNA, 0.5µl de hexameros 100mM, agua para un volumen final de ambas fases de la reacción de 20µl.

Componentes de la segunda fase de la reacción: 4µl de amortiguador 5x para la cadena molde (50mM de Tris-HCl pH 8.3, 75mM KCl y 3mM de MgCl₂), 0.2 mM de dNTP's, 5 unidades de enzima transcriptasa reversa MMLV (Virus de la leucemia murina de Molones), 2µl de DTT (dithiothreitol) como inhibidor de RNAsas.

La primera fase de la reacción se sometió a desnaturalización a 72°C por 3 min, inmediatamente el tubo de reacción se colocó en hielo y se agregó la mezcla de reacción de la segunda fase de incubación de 60 min a 37° C y una etapa final de 7 min a 72° C.

Una vez que se sintetizó el cDNA, se realizó una PCR multiplex para el sarcoglicano delta y GAPDH como control endógeno, los oligonucleótidos utilizados fueron; para el caso del sarcoglicano delta: 5'-ACACCTAATGTCAGGGCAGAC-3' para

la secuencia sentido y 5'- TCTGTCCTTCTCATCCCTCAC- 3' para la secuencia antisentido; para GAPDH fueron: 5'- ATCCCATCACCATCTTCCAG - 3' para la secuencia sentido y 5'- TGTGGTCATGAGTCCTTCCA - 3' para la secuencia antisentido. El tamaño de los productos de amplificación esperados fue de 183 y 317 pb, respectivamente.

Las reacción de amplificación por PCR consistió en los siguientes componentes: 1µl de cDNA, 1.5 unidades de enzima Taq polimerasa, 10pmol de cada primer (delta sarcoglicano) y 5pmol de cada primer (GAPDH), 0.2mM de dNTP's, 3mM de cloruro de magnesio, 50mM de cloruro de potasio, 20mM de Tris-HCl (pH 8.4) y agua desionizada para llevar a un volumen final de 25µl. La PCR consistió de una desnaturalización inicial de 5 min a 94° C, seguida de 28 ciclos conformados por desnaturalización de 30 seg a 94° C, alineamiento 30 seg a 62° C, extensión de 1 min a 72° C y extensión final de 5 min a 72° C. Se comprobó la amplificación separando 3µl de los producto de PCR en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio a 120 Volts durante 25 min.

Con las bandas observadas en el gel de agarosa se realizó un análisis densitométrico utilizando el software Alphamager 2002® . Se realizó una normalización de los valores obtenidos dividiendo el valor del problema (delta sarcoglicano) entre el control endógeno (GAPDH).

Inmunofluorescencia indirecta

Para evaluar el efecto inhibitorio de los siRNAs sobre la expresión proteínica de δ -SG en las células MLVH se realizaron inmunotinciones de las células transfectadas con las diferentes construcciones, para lo cual las células fueron sembradas sobre placas de vidrio de 8mm de diámetro cubiertas con colágena de cola de rata (Sigma-Aldrich) y se transfectaron como se describió anteriormente. 96 horas post transfección se eliminó el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS 1X para eliminar trazas de medio, se fijaron las células con metanol absoluto durante 10 min a una temperatura de -20°C , posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1X. Las células fijadas se permeabilizaron con Tritón al 0.3% en PBS 1X. Para eliminar la señal de fondo se realizó un bloqueo durante 1hr a temperatura ambiente con una solución de albúmina sérica de bovino al 5% en PBS 1X. Enseguida las células fueron incubadas en presencia de los anticuerpos primarios, anti-delta sarcoglicano (NCL-d-SARC, Novocastra) con una dilución 1: 150; alfa-actina de músculo liso (IA4, Zymed) prediluido y anti GAPDH (V-18, Santa Cruz) en una dilución 1:100, todas las diluciones en PBS 1X. Se incubó en cámara húmeda durante 16 hrs a 4°C , posteriormente se realizaron tres lavados de 5 min en PBS 1X y las preparaciones se cubrieron respectivamente con diluciones del anticuerpo secundario anti-ratón marcado con Cy3 (CyTM3-conjugated, Jackson) en una dilución 1:250 para la identificación de delta sarcoglicano y alfa actina de músculo liso, y de anticuerpo secundario anti-cabra marcado con rodamina (sc-39-45, Santa Cruz) para la identificación de GAPDH. Ambos anticuerpos secundarios se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad, y una vez finalizado el tiempo de incubación se hicieron tres lavados de 5 min con PBS 1X. Se eliminó el exceso de PBS y los cubreobjetos con las células se montaron sobre un portaobjetos con 5 μl de medio de montaje VectaShield® con DAPI (Vector) el cual tiñe los núcleos de las células. Una vez montadas las placas de vidrio se sellaron las orillas de la placa de vidrio con esmalte para uñas transparente para conservar la preparación en óptimas condiciones (Janssen, 1989). Finalmente las

preparaciones fueron analizadas por microscopia de fluorescencia utilizando el sistema ApoTome® (Zeiss).

Determinación de la activación de la respuesta por interferón

Debido a que la utilización de RNAs de doble cadena endógenos pueden llegar a desencadenar una respuesta de defensa celular inducida por interferón que da como consecuencia la degradación de mRNA a nivel generalizado, es necesario verificar si en nuestro sistema no se está activando este tipo de respuesta para lo cual se realizó una RT-PCR del gen 2'-5'- oligoadenilato sintetasa 1 (OAS 1), cuyo mensajero se sobre expresa al desencadenarse la respuesta por interferón.

Los oligonucleótidos utilizados para la reacción fueron: 5'-CATCCGCCTAGTCAAGCACTG 3' para la cadena sentido y 5' CCACCACCCAAGTTTCCTGTAG 3' para la cadena antisentido. Los componentes de la reacción fueron: 2µl de cDNA, 1.5 unidades de enzima Taq polimerasa, 10pmol de cada oligonucleótido, 0.2mM de dinucleótidos trifosfatados (dNTP's), 3mM de cloruro de magnesio, 50mM de cloruro de potasio, 20mM de Tris-HCl (pH 8.4) y agua para llevar a un volumen final de 25µl. La PCR consistió de una desnaturalización inicial de 5 min a 94° C, seguida de 28 ciclos conformados por desnaturalización de 30 segundos a 94° C, alineamiento 30 segundos a 67° C, extensión de 1min a 72° C y extensión final de 5 min a 72° C. Se comprobó la amplificación separando 3µl del producto de PCR (309 pb) en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio a 120 Volts durante 25 min.

Resultados

A partir de la vena de cordones umbilicales de origen humano, se obtuvo un cultivo primario de músculo liso vascular, mismo que se caracterizó mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-alfa actina de músculo liso (figura 4). El resultado de este análisis fue mayor al 99% de células positivas al marcador, por lo que contamos con un cultivo lo suficientemente puro para continuar con nuestros experimentos.

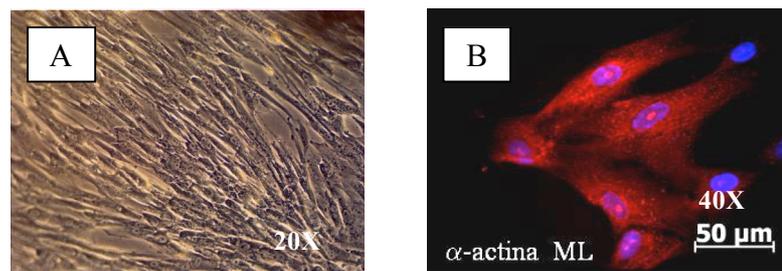


Figura 4. Cultivo de células de músculo liso vascular de origen humano. A, Contraste de fases de cultivo de MLVH. B, Inmunofluorescencia indirecta de alfa-actina de músculo liso.

Con el objetivo de elegir los mejores blancos potenciales de siRNAs dirigidos contra el mRNA de delta sarcoglicano, se utilizó el programa (siRNA Desing Ambion®). Se tomaron en cuenta los parámetros establecidos por Elbashir et al. (2001) que incluyen: considerar 19 nucleótidos de posteriores a un dímero de adeninas a partir del codón de inicio AUG debido a son sitios blanco para siRNA, y un contenido entre 30 y 50% de CG. Se seleccionaron los cuatro mejores blancos distribuidos a lo largo de la secuencia del mRNA de delta sarcoglicano (Locus NM_000337 GenBank) (figura 5).

Respectivamente, las secuencias blanco elegidas se localizaron en los exones 3, 4, 6 y 7. Dichas secuencias fueron: Exón 3 5'-aaggagactctgaattcttac-3'; exón 4, 5'-aaagtgctaactcagcttata-3', exón 6, 5'-aaagaactaaggttgagtc-3'; y por último exón 7 5'-aagctggcaatatggaagcca-3'.

La generación de los casetes de expresión (SEC) para cada uno de los siRNAs se realizó mediante tres PCR's, para obtener finalmente casetes de expresión funcionales, los cuales presentaran diferentes elementos estructurales mencionados a continuación, mismos que se muestran en la figura 6A. En los extremos hay dos sitios de restricción para las enzimas EcoRI y HindIII, una secuencia promotora para la RNA polimerasa, la secuencia sentido que es la secuencia blanco dentro del mRNA, una secuencia no complementaria que forma una asa, la secuencia antisentido que es la responsable del reconocimiento de la secuencia blanco dentro del mRNA y una secuencia que indica el sitio de terminación de la transcripción. La generación del producto de la segunda PCR que es el precursor del SEC, así como el SEC funcional con un tamaño final de 434pb para cada uno de los diferentes siRNAs, se identificaron mediante un corrimiento electroforético en agarosa, mostrado en la figura 6B.



Figura 6. Casetes de expresión de los siRNAs. En el panel A, se muestran los elementos estructurales que conforman al SEC; el panel B muestra el corrimiento electroforético en agarosa al 2% del precursor los diferentes SECs (1, 3, 5, 7, 9) y los SECs funcionales (2, 4, 6, 8, 10) con una longitud de 434pb. M corresponde a la escalera de marcador de 100 pb.

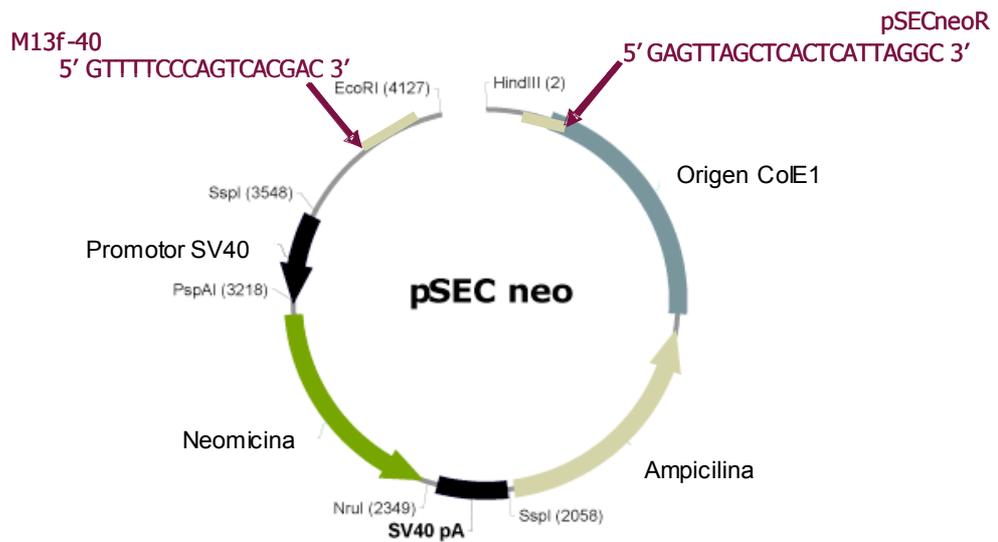


Figura 7. Mapa del vector de expresión pSECneo. En el que se ubica el promotor de SV40, dos marcadores de selección por resistencia a antibióticos, sitios de corte a las endonucleasas EcoRI y HindIII. Las flechas indican la ubicación de los oligonucleótidos utilizados para la selección de clonas positivas.

Una vez generados los diferentes casetes de expresión de siRNAs, fueron clonados en el vector pSECneo® (Ambion) (figura 7) con lo que se transformaron bacterias *E. coli*.

Las colonias obtenidas después de la transformación con el vector pSECneo y positivas a la selección por ampicilina, se propagaron en medio selectivo. Posteriormente se llevó a cabo una PCR de forma directa a partir de una muestra de la colonia con oligonucleótidos que flanquean la secuencia del inserto que corresponde a cada uno de los SEC de siRNAs y están dentro de la secuencia del vector pSECneo como se muestra en la figura 7. De esta manera, a partir de las colonias que contuvieron el vector con inserto se obtuvo un producto de PCR con una longitud de 598pb (figura 8). De cada uno de los SECs se eligieron seis colonias para ser probadas por PCR y finalmente se continuó trabajando con aquellas a partir de las cuales fue posible obtener el producto esperado, para posteriormente purificar el plásmido y secuenciarlo.

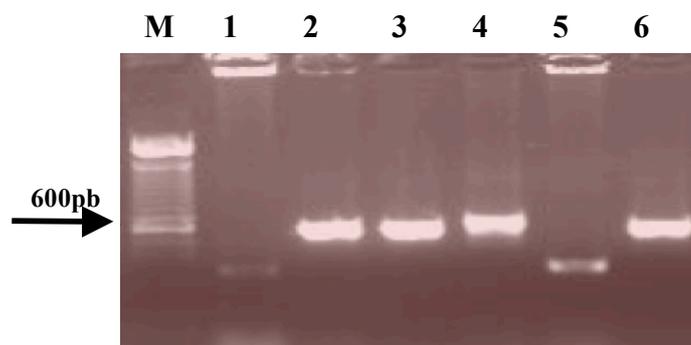


Figura 8. Caracterización por PCR de las colonias positivas. La figura muestra la electroforesis representativa del producto de PCR de 598pb de las clonas que contienen el inserto, los carriles 2, 3, 4 y 6 se muestran que se encuentra el inserto del casete de expresión dentro del vector pSECneo, mientras que los carriles 1 y 5 muestran un producto de PCR de menor longitud al esperado. M corresponde a la escalera de marcador de 100pb.

Una vez que se contó con una clona positiva confirmada por medio de PCR para cada uno de los casetes de expresión construidos, se propagaron y purificaron cada uno de los vectores. Los plásmidos purificados se cuantificaron y observaron mediante una electroforesis en gel de agarosa (figura 9), posteriormente se realizó una doble digestión enzimática con las enzimas EcoRI y HindIII de cada vector y el producto de la digestión se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa para confirmar la liberación del inserto (598pb) y la linearización del vector que tiene un tamaño de 4.1 Kb (figura 10).

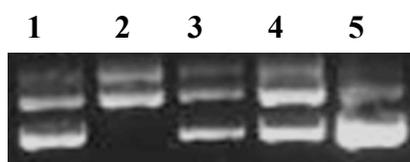


Figura 9. Corrimiento electroforético de los plásmidos purificados. Los carriles corresponden cada uno de los vectores que contienen los diferentes SECs 1: e3, 2: e4, 3: e6, 4: e7 y 5:a.

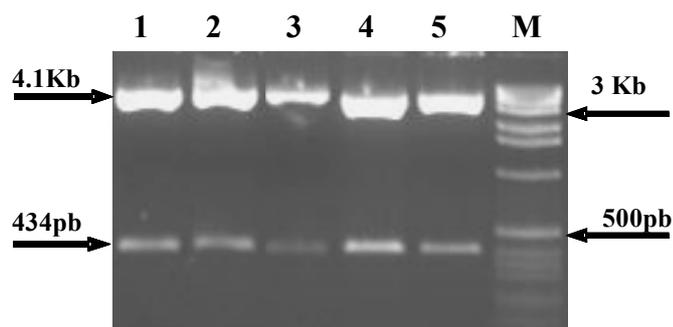
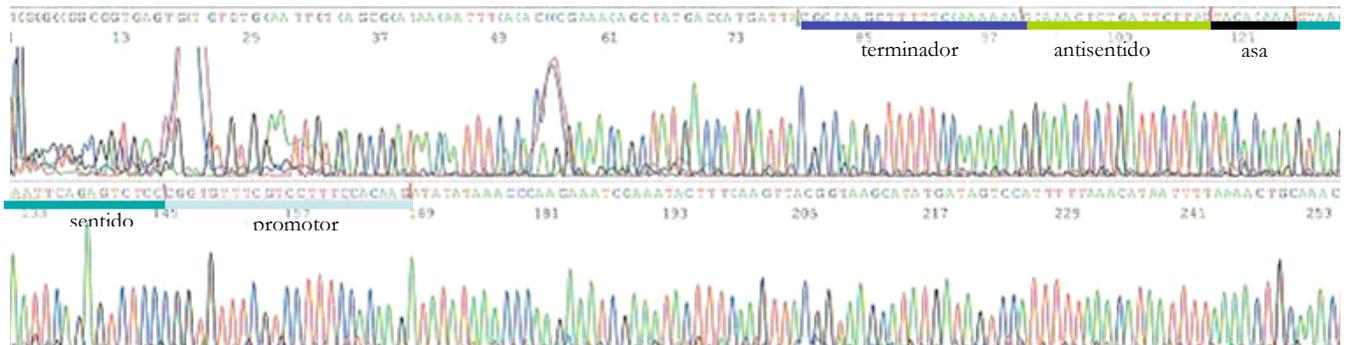


Figura 10. Doble restricción con EcoRI y HindIII del vector pSECneo. En la figura se muestra el vector linearizado de 4.1Kb y una banda de 434pb correspondiente al inserto liberado por la digestión enzimática. Los carriles corresponden cada uno de los vectores que contienen los diferentes SECs 1: e3, 2: e4, 3: e6, 4: e7, 5: a. y M corresponde a la escalera de marcador de 1kb.

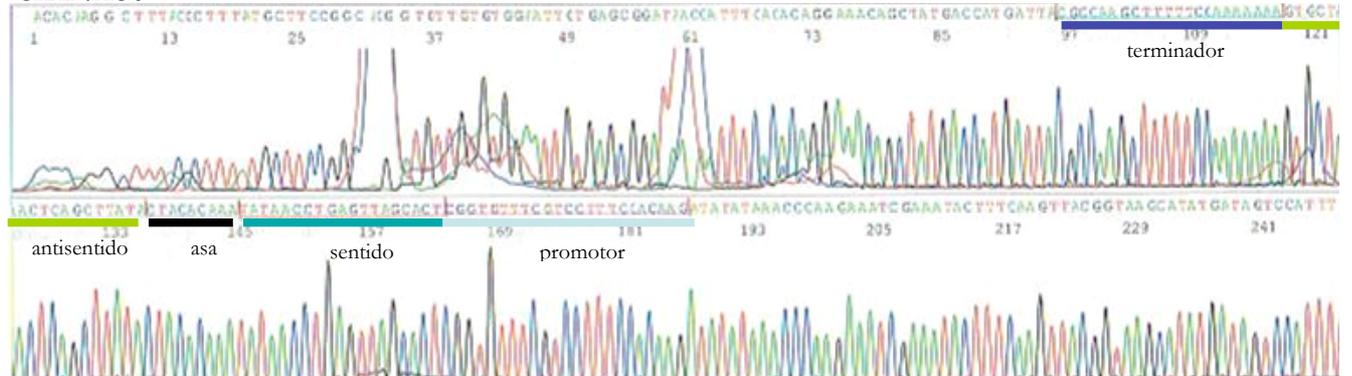
Con el propósito de verificar si cada una de las construcciones clonadas en el vector de expresión contenían todos los elementos necesarios para ser funcionales y corroborar su secuencia, se realizó la secuenciación en ambas direcciones de cada uno de los casetes de expresión funcionales (figura 11).

Para iniciar los ensayos de transfección del cultivo celular de MLVH, se realizó una transfección inicial con el vector pQBI25, el cual contiene como reportero a la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés). Se probaron diferentes proporciones plásmido/poliamida con el fin de seleccionar la proporción que mostrara una mayor eficiencia de transfección, la cual se determinó mediante un análisis por microscopia de fluorescencia. Se determinó una proporción de 3:2 poliamida-plásmido como la mejor para obtener una alta eficiencia de tranfección de aproximadamente un 70%.

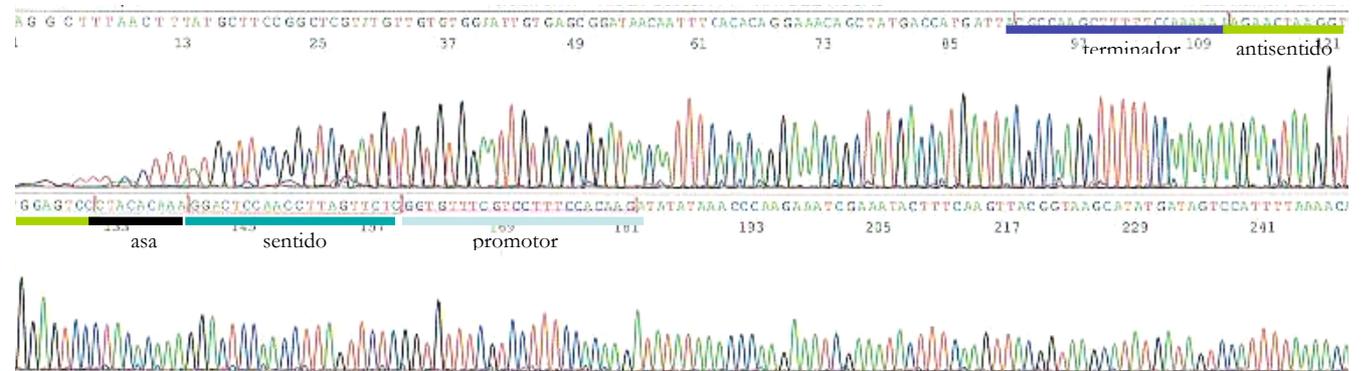
siRNAe3



siRNAe4



siRNAe6



siRNAe7

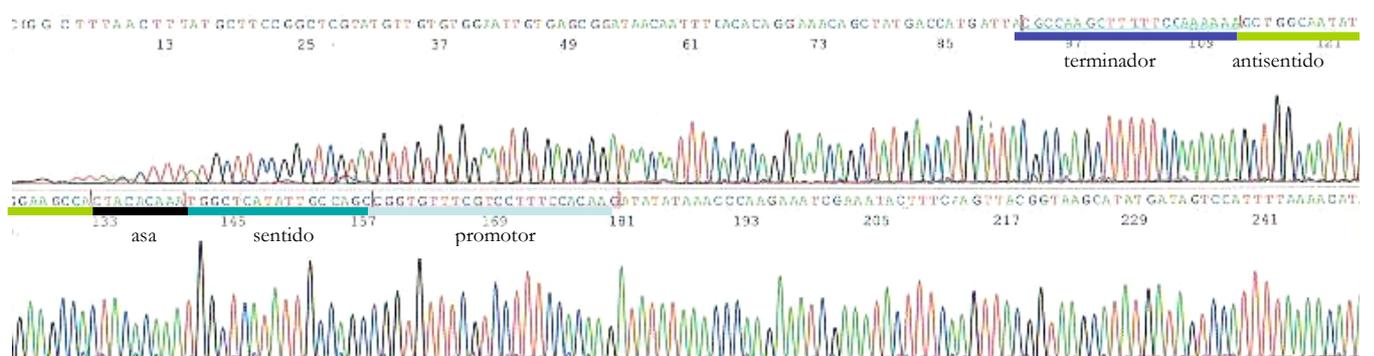


Figura 11. Secuencia de nucleótidos de los diferentes SECs. Se muestra la gráfica de la secuencia de los cuatro SECs de los siRNAs dirigidos a los exones 3, 4, 6 y 7 del mRNA de δ -SG. En cada secuencia se indican los elementos que conforman estos SECs: secuencia

terminadora, secuencia antisentido, asa, secuencia sentido y promotor para la RNA polimerasa.

Por otra parte se determinó la concentración de antibiótico (geneticina) necesaria para hacer seleccionar las células transfectantes. Se probó una curva de concentración de antibiótico que abarcó de 100 hasta 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aumentando 50 μg de antibiótico en cada punto de la curva. Se seleccionó la concentración que provocó una muerte celular masiva cinco días posteriores al inicio del tratamiento y muerte total a los ocho días de tratamiento, la cual fue de 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$. De igual manera se determinó el porcentaje de confluencia del cultivo celular óptimo para la selección. La prueba se realizó en un rango del 10 al 80% de confluencia, subiendo en cada cultivo diez puntos porcentuales. La mayor eficiencia de selección se obtuvo a una confluencia inicial del cultivo del 40%.

Para definir la eficiencia de silenciamiento de la proteína por cada uno de los siRNAs, se transfectaron células en cultivo con cada una de los diferentes casetes de expresión y se realizaron inmunofluorescencias de estos cultivos a 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la transfección. Los primeros resultados obtenidos a partir del análisis de imágenes por microscopia de fluorescencia revelaron que 24 horas posteriores a la transfección ya se observa una disminución en la expresión de la proteína que fue mucho más clara a las 48 horas y se mantuvo al menos durante 96 horas posteriores a la transfección. Los siRNAs que mostraron una mayor eficiencia en la inhibición de la expresión de delta sarcoglicano fueron los dirigidos hacia el exón 3 y exón 4. Los cultivos transfectados fueron sometidos al proceso de selección en presencia del antibiótico. Los siguientes experimentos se realizaron a 96 horas posteriores a la transfección.

Una vez que se determinaron todas las condiciones, se transfectaron cuatro cultivos independientes para cada uno de los diferentes SECs y se realizó el análisis de inhibición de

la proteína por medio de inmunofluorescencia (figura 12). Para cada una de las cuatro réplicas de los SECs se analizaron en microscopio de fluorescencia diez campos. A partir de este análisis se seleccionaron tres campos para hacer una cuantificación en la imagen de la intensidad de fluorescencia indirecta debida a la presencia de la proteína δ -SG.

De igual forma se trabajaron tres controles negativos (cultivo sin transfectar, cultivo con reactivo de transfección sin plásmido y cultivo transfectado con un SEC que expresa un siRNA aleatorio) con los cuales se logró determinar que el tratamiento dado a los cultivos durante la transfección no altera de manera inespecífica la expresión de la proteína δ -SG. Así mismo se compararon los valores de expresión de δ -SG encontrados en los controles contra los valores provenientes de los cultivos de células transfectantes con SECs dirigidos hacia el mensajero de δ -SG. Los porcentajes de inhibición de la proteína δ -SG por los diferentes siRNAs utilizados fueron los siguientes: 78% con el dirigido hacia el exón 3; 86.6% con el dirigido hacia el exón 4; 41% con el dirigido hacia el exón 6 y por último 70.5% con el siRNA dirigido al exón 7. En consecuencia los porcentaje de expresión de la proteína δ -SG fueron de 26.2, 13.1, 59 y 29.5% para los cultivos tratados con los siRNAs dirigidos los exones 3, 4, 6 y 7, respectivamente (figura 13).

De manera paralela al análisis de la expresión de la proteína δ -SG, se realizó la extracción de RNA total (figura 14) a partir de los cultivos transfectados con los diferentes casetes de expresión de siRNAs. Se llevó a cabo una reacción de RT-PCR para amplificar el transcrito maduro de δ -SG, a fin de verificar si la inhibición de la proteína observada se debía a la degradación del mRNA descrita como mecanismo de acción de los siRNAs. La eficiencia de la transcripción reversa se comprobó mediante una PCR para amplificar un fragmento de GAPDH de una longitud de 340 pb (figura 15).

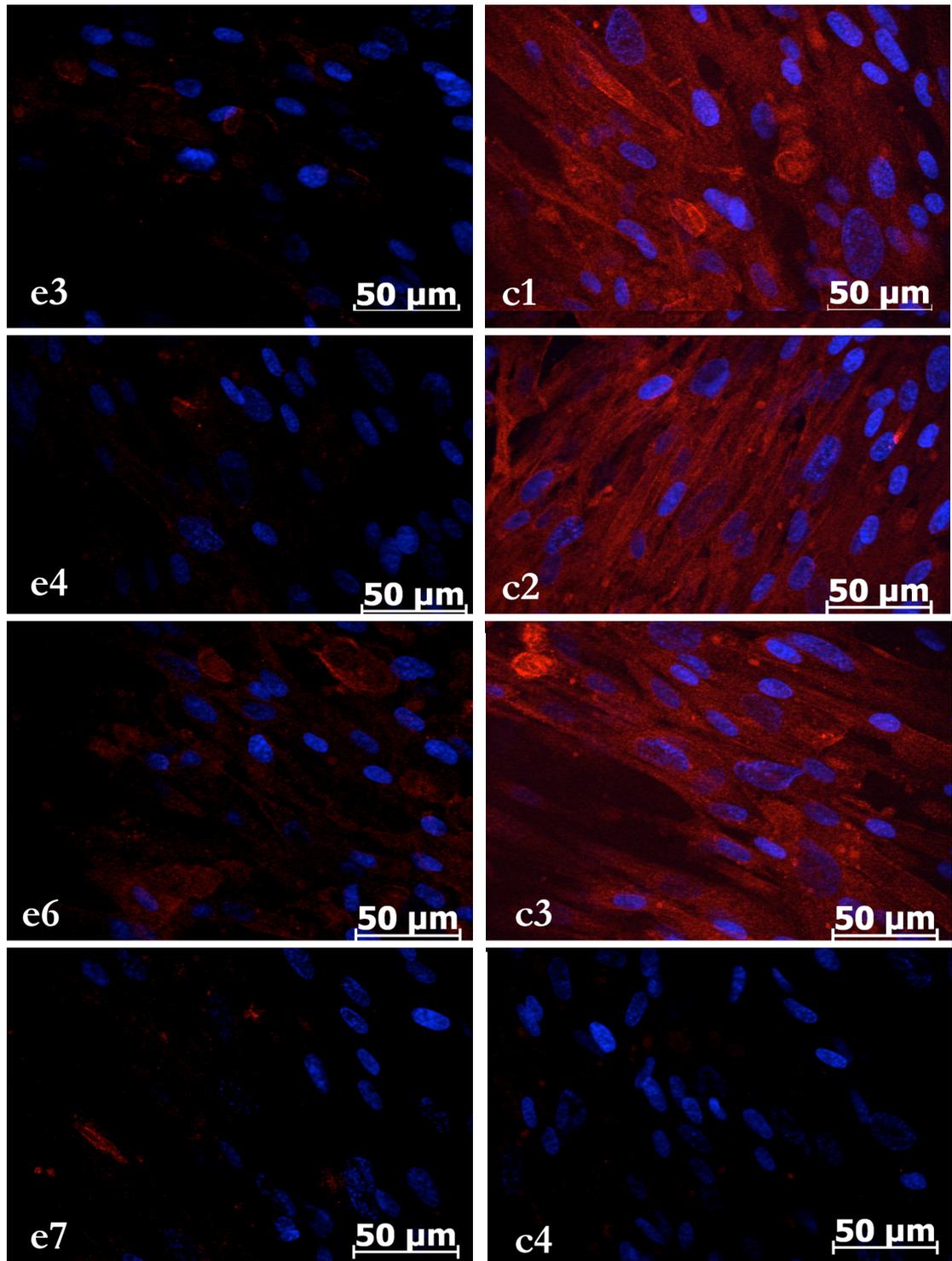
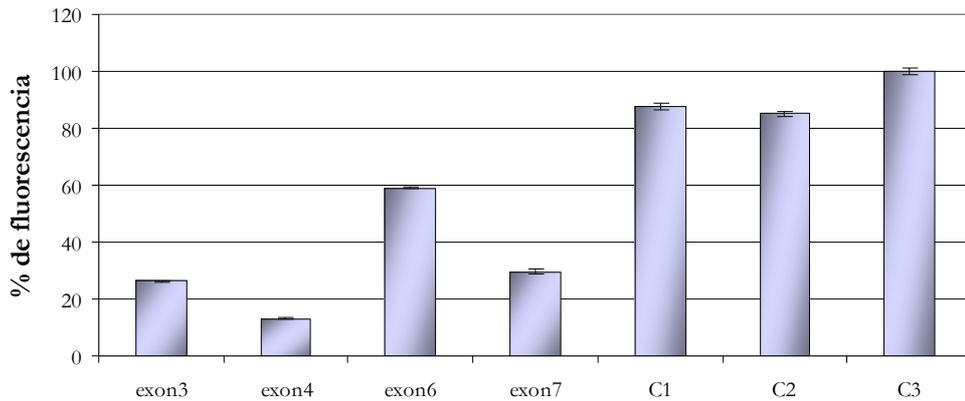


Figura 12. Inmunofluorescencia indirecta de δ -SG, en células de músculo liso vascular humano tratadas con los diferentes siRNAs. En la imagen se muestra en rojo la expresión de la proteína δ -SG, en los paneles del lado izquierdo se muestra la inhibición del δ -SG por los diferentes siRNAs dirigidos hacia los exones 3, 4, 6 y 7. En los paneles del lado derecho se muestra la expresión normal de la proteína en los diferentes controles: c1- control sin transfectar, c2- control reactivo de transfección; c3- control siRNA aleatorio; c4- control negativo para el anticuerpo secundario.



repeticiones = 4

Figura 13. Expresión de la proteína δ -SG. En la gráfica se representan los valores de fluorescencia obtenidos a partir del análisis de las diferentes inmunofluorescencias de las células transfectantes con los diferentes SECs de siRNAs; y los diferentes controles: c1- control sin transfectar, c2- control reactivo de transfección; c3- control siRNA aleatorio.

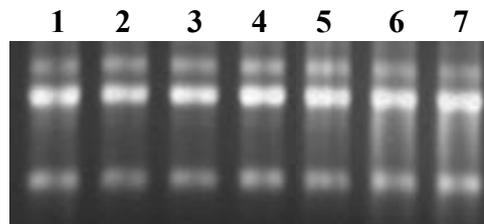


Figura 14. RNA total de células de MLVH. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5% de RNA total de los cultivos transfectados con los diferentes SECs. Los carriles 1, 2, 3, 4 corresponden a las células tratadas con los siRNAs dirigidos a los exones 3, 4, 6 y 7, respectivamente, carriles 5, 6 y 7 corresponden a los controles siRNA aleatorio, reactivo de transfección y sin transfectar, respectivamente.

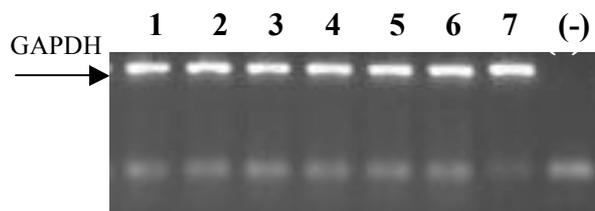


Figura 15. Amplificación de GAPDH a partir de cDNA. Electroforesis del producto de PCR de GAPDH en gel de agarosa al 2%. Los carriles 1, 2, 3, 4 corresponden a las células tratadas con los siRNAs dirigidos a los exones 3, 4, 6 y 7, respectivamente, carriles 5, 6 y 7 corresponden a los controles siRNA aleatorio, reactivo de transfección y sin transfectar, respectivamente. El carril (-) corresponde al control negativo de la reacción.

Para determinar de una manera semicuantitativa los niveles del mensajero de δ -SG se realizó una coamplificación de los transcritos de δ -SG y GAPDH, esta última utilizada como un control endógeno para la normalización de los valores. Los productos de la PCR de 183pb y 317pb para δ -SG y GAPDH respectivamente (Figura 16), se separaron en un gel de agarosa al 2% y se analizó la densidad óptica de cada uno de los productos. Los resultados obtenidos a partir de este análisis muestran que el siRNA dirigido a una región del exón 3 del mRNA de δ -SG degrada el transcrito en un 45%, mientras que para los demás siRNAs utilizados el mRNA conservo sus niveles normales de expresión (Figura 17).

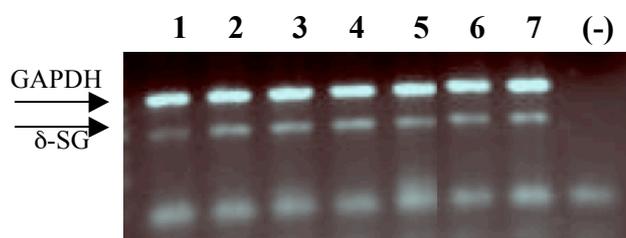
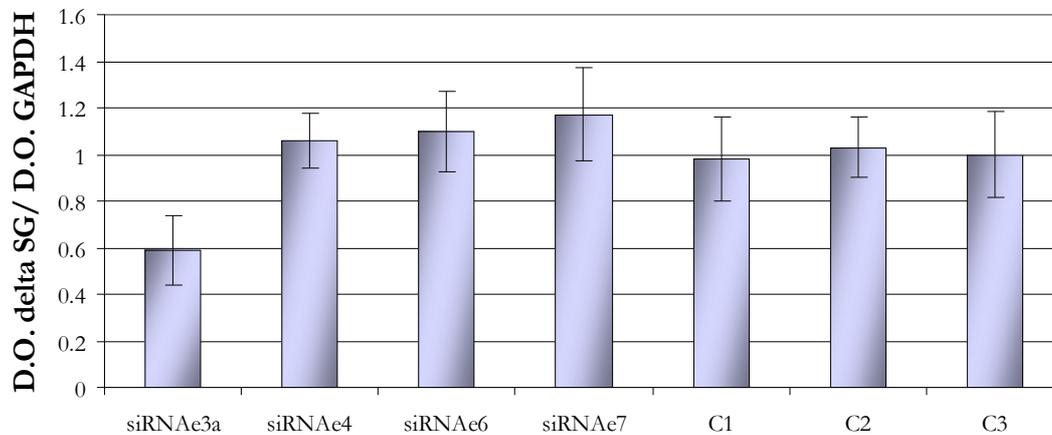


Figura 16. Coamplificación de δ -SG y GAPDH. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR para el mRNA de δ -SG y GAPDH, de 183 y 340pb respectivamente. Los carriles 1, 2, 3, 4 corresponden a las células tratadas con los siRNAs dirigidos a los exones 3, 4, 6 y 7, respectivamente, carriles 5, 6 y 7 corresponden a los controles siRNA aleatorio, reactivo de transfección y sin transfectar, respectivamente. El carril (-) corresponde al control negativo de la reacción.



repeticiones = 4

Figura 17. Niveles de mRNA de δ -SG. En el gráfico se muestran los valores normalizados del nivel de expresión del transcrito de la proteína δ -SG en células tratadas con los diferentes siRNAs así como en los controles c1: siRNA aleatorio, c2: reactivo de transfección y c3: células no transfectadas. En rojo se indica la expresión basal de la proteína δ -SG.

Una vez que se analizó la eficiencia de inhibición por los diferentes siRNAs probados y se encontró que específicamente el siRNA dirigido hacia el exón tres provoca la degradación del mRNA de δ -SG, se realizó una RT-PCR para determinar los niveles de transcrito de los sarcoglicanos β y ϵ los cuales se expresan en músculo liso. Este análisis se realizó a partir de las células transfectantes con el siRNA exón tres y los controles de transfección, siRNA aleatorio y células sin ningún tipo de tratamiento, con el fin de confirmar si el siRNA actúa de manera específica sobre el transcrito de δ -SG. Para determinar de manera semicuantitativa los niveles de dichos transcritos, se realizó la coamplificación de los sarcoglicanos con GAPDH. Los productos de PCR tienen una longitud de 221pb, 261pb y 340pb para b-SG, e-SG y GAPDH respectivamente (figura 22).

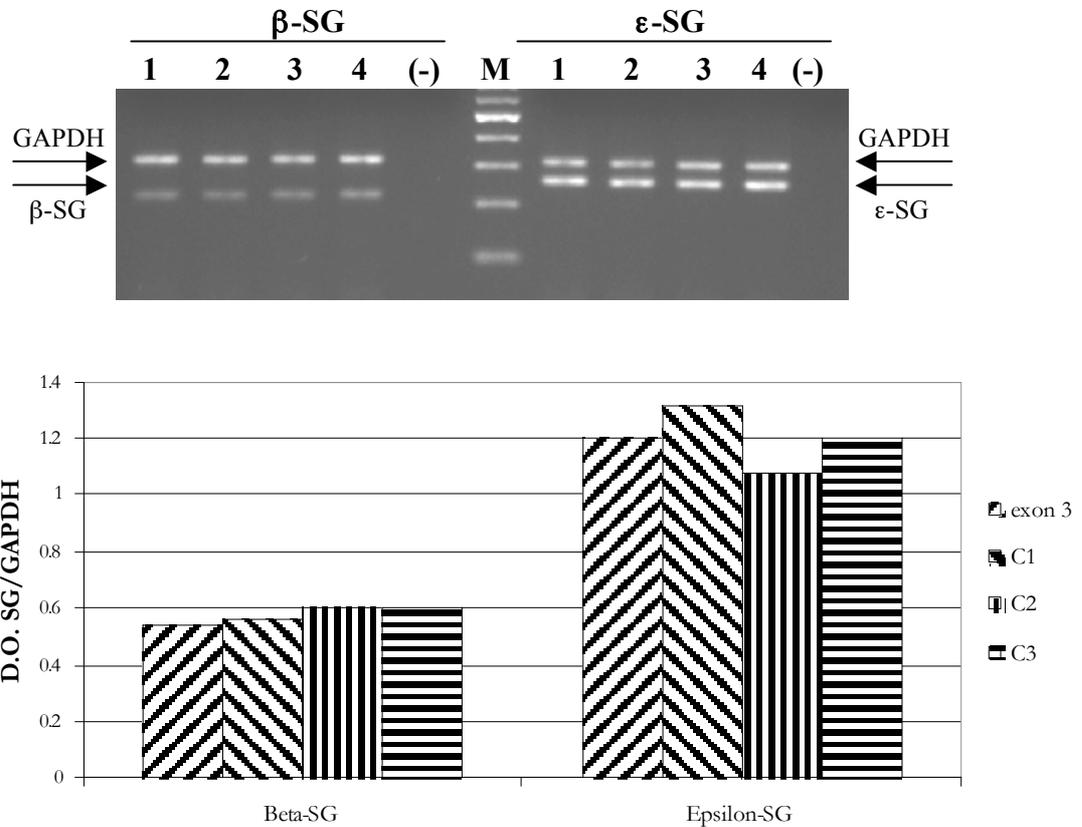
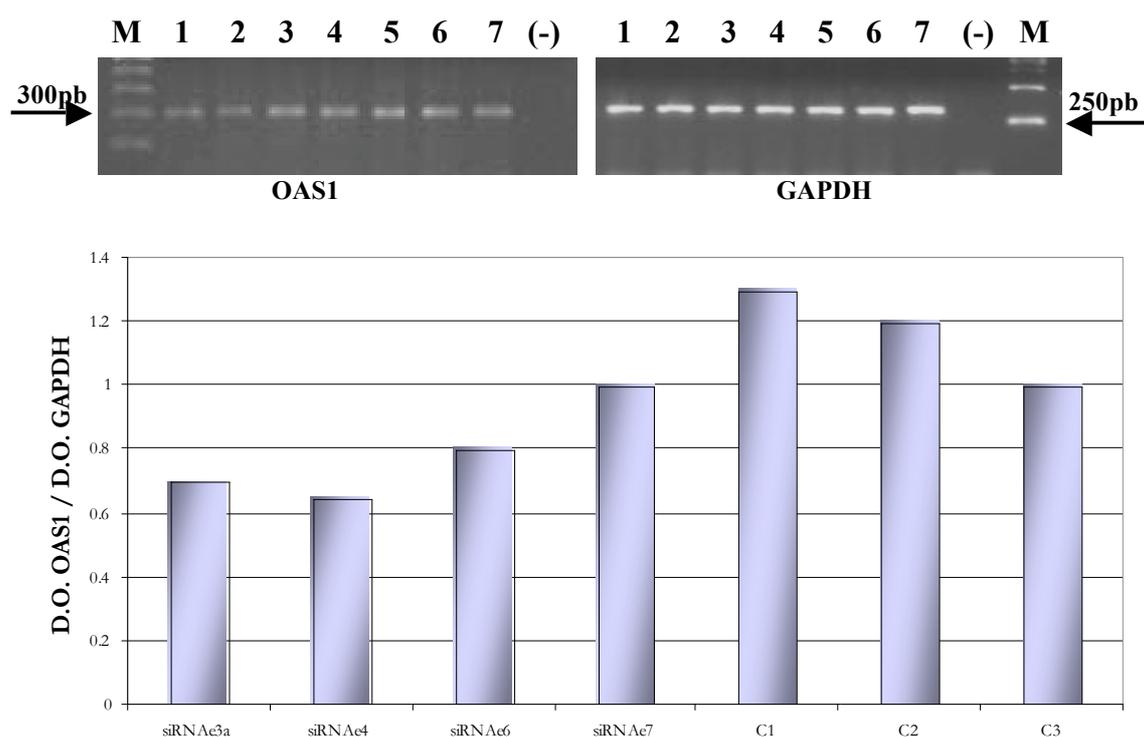


Figura 18. Niveles de expresión de los transcritos de β - y ϵ -SG. En la parte superior se muestran los productos de PCR de los transcritos β -SG 221pb, ϵ -SG 261pb y GAPDH 340pb. El carril 1 corresponde a las células tratadas con el siRNA dirigido al exón 3, los carriles 2, 3 y 4 corresponden a los controles siRNA aleatorio, reactivo de transfección y sin transfectar, respectivamente; M corresponde a la escalera de marcador de 100pb. El carril (-) corresponde al control negativo de la reacción.

Finalmente se verificó que la inhibición observada por el tratamiento con los diferentes siRNAs se debiera exclusivamente al mecanismo de acción del siRNA y no a alguna respuesta de defensa celular como lo es la respuesta mediada por interferón, en la cual se provoca una degradación generalizada de los mRNAs producidos por las células durante infecciones virales. Esta respuesta también puede ser activada al introducir en la célula RNAs exógenos de doble cadena con una longitud mayor a 30 nucleótidos, por lo

que resulta necesario eliminar la posibilidad de que este mecanismo de defensa este siendo activado en nuestro sistema, para lo cual se realizó una RT-PCR del gen OAS1, el cual es sobre-expresado en la respuesta mediada por interferón. Para realizar la evaluación semicuantitativa de los niveles de expresión del gen OAS1, se midió la densidad óptica del producto de PCR y los valores se normalizaron con el control constitutivo GAPDH de la misma manera que para δ -SG. Los productos de PCR de OAS1 y GAPDH (figura 18) se corrieron de manera independiente debido a la cercanía en las longitudes 319 pb para OAS1 y 317 pb para GAPDH. Los valores observados se encontraron dentro de los límites de expresión normales (Scacheri et. al., 2004), por lo que se descartó una respuesta generalizada por vía del interferón.



repeticiones = 2

Figura 19. Evaluación de la respuesta por interferón. En la parte superior se muestran los productos de PCR del transcrito de OAS1 y GAPDH. Los carriles 1, 2, 3, 4 corresponden a las células tratadas con los siRNAs dirigidos a los exones 3, 4, 6 y 7, respectivamente, carriles 5, 6 y 7 corresponden a los controles siRNA aleatorio, reactivo de transfección y sin transfectar, respectivamente, M corresponde al marcador de pb y el carril (-) corresponde al control negativo de la reacción. En la parte inferior se la gráfica de los valores normalizados a partir del análisis densitométrico.

Discusión

El estudio de enfermedades genéticas en humanos resulta evidentemente difícil, por lo que es necesario buscar alternativas como los modelos animales y/o cultivos celulares con los que se pueda realizar investigación para conocer la función específica de los genes, así como determinar los procesos biológicos en los que están involucrados, y de esta manera entender con mayor precisión la fisiopatología de estos padecimientos. En este trabajo se desarrolló, a través de RNAs de interferencia, un modelo de origen humano deficiente en la proteína delta sarcoglicano cuya ausencia provoca distrofia muscular de cinturas tipo 2F así como cardiomiopatía dilatada (Hack et al, 1998, Coral-Vázquez 1999)

El desarrollo de este proyecto se realizó con la certeza de contar con un cultivo de origen de músculo liso, ya que se encontró la expresión de la proteína α -actina específica de músculo liso en aproximadamente el 99% de las células del cultivo celular de músculo liso vascular de origen humano (MLVH). En este cultivo se probaron cuatro pequeños RNAs de interferencia, moléculas que han sido recientemente utilizadas para generar de manera eficiente y en corto tiempos modelos de tipo *knock-down* de células somáticas (Dykxhoorn, 2003). Para lograr la expresión de los diferentes siRNAs se utilizó la maquinaria celular por lo que se transfectaron los casetes de expresión de siRNAs al cultivo celular de MLVH bajo un proceso de selección por genética.

La inhibición de proteína esperada durante la utilización de siRNAs fluctuó en un intervalo aproximado del 70 al 90%. Los siRNAs dirigidos hacia los exones 3, 4 y 7 provocaron un porcentaje de inhibición dentro del intervalo óptimo cuyos valores

fueron de 78%, 86.6% y 70.5%, respectivamente. El caso particular del siRNA dirigido al exón 6 mostró una baja eficiencia de inhibición menor al 50%, porcentaje que se encuentra fuera del intervalo esperado. Estudios previos con siRNAs han permitido conocer que la eficiencia del silenciamiento genético dentro del intervalo esperado corresponde a una proporción de uno de cada cuatro siRNAs, por lo cual para desarrollar este trabajo se eligieron cuatro diferentes secuencias blanco distribuidas a lo largo del mensajero de δ -SG, esperando que el reconocimiento de siRNAs para al menos una de esta cuatro secuencias provocara niveles de inhibición de la expresión de la proteína blanco dentro del intervalo óptimo.

Los resultados obtenidos a partir del siRNA aleatorio utilizado como vector permitió la comprobación de que los siRNAs trabajados solo interaccionan con su secuencia blanco ya que la expresión de proteína en este control muestra valores idénticos a los obtenidos de un cultivo celular sin ningún tipo de tratamiento.

El mecanismo de acción descrito de los siRNAs se basa en el control de la expresión de los genes por la degradación de sus mRNAs (Hutvagner y Zamora, 2002; Kawasaki y Taira, 2003). La determinación de este mecanismo para el silenciamiento genético en nuestro sistema se realizó a través del análisis de los niveles de expresión del mRNA de δ -SG. Este análisis mostró una disminución del transcrito, mediada por el siRNA dirigido al exón 3, al correlacionar los valores de inhibición a nivel proteína y de degradación del mRNA de la proteína estudiada se observa que la degradación del transcrito ocurre en niveles inferiores a lo que se observa a nivel de inhibición de proteína, lo cual puede explicarse ya que el proceso de transcripción del gen blanco no se ve alterado por esta metodología y es posible que la célula responda a la deficiencia de la proteína sobreexpresando el gen blanco aumentando su transcripción, sin olvidar que un aumento

en la generación de mRNA no significa una mayor generación de proteína. Por otro lado siRNAs dirigidos hacia los exones 4, 6 y 7 no ejercieron ningún efecto aparente sobre el transcrito, aún a pesar de que se obtuvo una inhibición favorable de la proteína. Si bien es conocido que los siRNAs son efectivos al ser utilizados en células de mamíferos para el silenciamiento genético post-transcripcional, no se ha encontrado la expresión endógena de siRNAs en estos organismos, sin embargo se sabe de la presencia de micro RNAs (miRNAs) que inducen también un silenciamiento genético post-transcripcional, pero que a diferencia de los siRNAs, no conducen a la degradación del transcrito blanco, si no que interfieren con la síntesis de proteínas bloqueando el proceso de traducción (Ambros, 2004; Grishok et. al., 2001; Mourelatos et. al., 2002). Con base en lo anterior, pensamos que el efecto inhibitorio observado a partir de los siRNAs contra los exones 4, 6, y 7, sigue el mecanismo propuesto para los miRNAs bloqueando únicamente la síntesis de proteínas.

Al analizar los niveles de expresión de los transcritos de β - y ϵ -SG cuyas proteínas forman parte del DGC que se expresa en músculo liso, a partir de RNA extraído de las células tratadas con el siRNA dirigido hacia el exón 3, el cual provoca una degradación del transcrito de δ -SG, pudimos observar que los niveles de expresión de ambos transcritos se encuentran sin ninguna variación con respecto a los controles utilizados, este resultado corrobora la especificidad del siRNA utilizado para inhibir la expresión de la proteína blanco ya que los transcritos pertenecientes a proteínas de la misma familia que el δ -SG, no se ven alterados.

Tanto el uso de RNAs de doble cadena como vectores de expresión para el silenciamiento de genes pueden generar limitaciones en modelos de mamíferos debido a que la introducción de este tipo de moléculas llegan a inducir respuestas celulares mediadas por interferón (Elbashir et. al., 2001; Bridge et. al., 2003). El interferón

desencadena la degradación de los mRNA induciendo la producción de 2'-5' oligoadenilato sintetasa (OAS) la cual a su vez activa la RNasa I, llegando finalmente a una inhibición global por degradación de los mRNAs. La evaluación de la activación de la respuesta mediada por interferón en las células transfectantes a través del análisis de la expresión del transcrito de OAS1, confirmó que la inhibición de la expresión de la proteína δ -SG se debía únicamente a la acción de los siRNAs sobre el mRNA blanco y no por una respuesta celular generalizada de tipo inespecífica.

De manera general y de acuerdo a los resultados obtenidos ya antes mencionados se logró inhibir de manera estable la expresión de la proteína δ -SG en células de músculo liso vascular humano mediante la utilización de pequeños RNAs de interferencia, de manera particular un siRNA dirigido a una región ubicada dentro del exón 3 del mRNA de δ -SG, el induce una inhibición del 78% a consecuencia de la degradación del mRNA en aproximadamente un 45%, siendo esta inhibición específica del siRNA ya que además la generación de este siRNA en nuestro sistema celular no induce la activación de la respuesta mediada por interferón.

La utilización de siRNAs de interferencia para el silenciamiento genético confiere ventajas sobre diversas metodologías utilizadas para este mismo fin, dichas ventajas incluyen tiempos cortos en lograr la inhibición de la expresión de manera estable y un costo mucho menor principalmente comparado con la generación de modelos animales a través de la interrupción de genes lograda por medio de recombinación homóloga. Esta técnica resulta poco práctica debido a que se requiere de un largo tiempo para obtener resultados favorables y resulta con un costo muy elevado (Marth, 1996) aunado a que el empleo de este método de silenciamiento genético es restringido a líneas celulares y modelos animales.

Dentro de las metodologías utilizadas para el silenciamiento de un gen por medio de la desestabilización de su mRNA, se encuentran la utilización de oligonucleótidos antisentido para los cuales es imprescindible la participación de la RNasa H para unir el híbrido DNA-RNA e hidrolizar el RNA resultando en un cambio drástico del transcrito, sin embargo un pequeño cambio en la posición 2' del azúcar del oligonucleótido impide que la RNasa H pueda unirse al híbrido formado y se desestabilice el mRNA, por lo que esta técnica resulta complicada. Otra de las moléculas utilizadas son las ribozimas, las cuales tienen la habilidad de romper enlaces de tipo fosfodiéster, por lo que se da el rompimiento catalítico del mRNA (Rossi, 1999). Debido a que las ribozimas tienen actividad enzimática, pueden llegar a tener diferentes sustratos que provoquen la disociación enzima-sustrato, lo cual se ha considerado una característica limitante (Hertel et al, 1994; Hegg y Fedor, 1995), aunado al hecho de que algunas ribozimas requieren elevadas concentraciones de iones metálicos divalentes para una actividad enzimática eficiente sobre el sustrato, lo que resulta inconveniente en ambientes intracelulares.

El contar con un modelo de músculo liso vascular deficiente de δ -SG de origen humano provee la posibilidad de realizar estudios a distintos niveles tales como un análisis del transcriptoma mediante el uso de microarreglos, o a nivel funcional con estudios de proteómica, con los que se pueden detectar los procesos biológicos alterados por la deficiencia de la proteína δ -SG durante el daño en la vasculatura coronaria en el desarrollo de la cardiomiopatía dilatada. Y así una vez localizados los genes y proteínas blanco de los procesos biológicos alterados, es posible buscar terapias de tipo farmacológico que ayuden a la prevención y retardo de la cardiomiopatía dilatada.

Conclusiones

- Se obtuvo un cultivo celular de músculo liso de vena de cordón umbilical humano con un alto grado de pureza cercano al 99%.
- Se sintetizaron y clonaron cuatro diferentes casetes de expresión de RNA de interferencia dirigidos hacia los exones 3, 4, 6 y 7 del transcrito de la proteína delta sarcoglicano.
- Se inhibió de manera específica la expresión de delta sarcoglicano con la utilización de siRNAs dirigidos hacia el exón 3 del mRNA de δ -SG, en células de músculo liso vascular de origen humano con una eficiencia del 70%.
- Se generó un modelo knock-down de δ -SG sarcoglicano utilizando siRNAs en células de músculo liso vascular de origen humano.

Perspectivas

En este trabajo se generó por primera vez un modelo de músculo liso vascular deficiente de δ -SG, el cuál permitirá abordar de manera directa estudios que nos acerquen al entendimiento del origen del daño observado en músculo liso en los modelos animales carentes de δ -SG. Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo (Ramírez, 2005; Palma, 2006) han demostrado que en células de músculo liso de vena de cordón umbilical humano la presencia de al menos dos diferentes complejos proteínicos asociados a distrofina fuera de las caveolas o a utrofina (UGC) dentro de las caveolas. También se ha demostrado que en células de endotelio de vena de cordón umbilical humano se encuentra asociada la sintasa de oxido nítrico (NOS) con el complejo de glicoproteínas asociadas a utrofina, además se demostró que durante procesos de estiramiento de las células endoteliales se lleva a cabo la activación de la NOS con la consecuente liberación de oxido nítrico (Ramírez, 2007). Por otro lado es bien conocido que la sintasa de oxido nítrico es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del sistema vascular. De acuerdo a estos datos y contando con el modelo de músculo liso vascular deficiente de δ -SG, resultaría interesante estudiar la asociación de la NOS con el DGC/UGC en células de músculo liso vascular; y debido a la controversia que existe acerca del tipo de origen (intrínseco o extrínseco) del daño a nivel vascular que conlleva al desarrollo de cardiomiopatía dilatada en los modelos murinos carentes de δ -SG, resulta importante analizar alteraciones en las concentraciones de oxido nítrico al someter a las células deficientes de δ -SG a un estiramiento mecánico, con lo que se demostraría por primera vez que el daño provocado por la deficiencia de δ -SG en músculo liso vascular se debe a un mecanismo de origen intrínseco.

Referencias

1. Aguirre Molina CA, Espinola Zavaleta N, Cordova Gomez F (2006). "Restrictive cardiomyopathy of the right ventricle: differential diagnosis. Series of three cases". *Arch Cardiol Mex.* **76**(3):290-6.
2. Ambros V (2004). "The functions of animal microRNAs." *Nature.* **431**(7006):350-5.
3. Araishi K, Sasaoka T., Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E, Yoshida M, Hori T, Ozawa E (1999) "Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice." *Hum Mol Genet.* **8**(9): 1589-98.
4. Badorff C, Lee G., Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, Knowlton KU (1999). "Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy." *Nat Med.* **5**(3): 320-6.
5. Barresi R, D. Blasi C., Negri T, Brugnoli R, Vitali A, Felisari G, Salandi A, Daniel S, Cornelio F, Morandi L, Mora M (2000). "Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations." *J Med Genet.* **37**(2): 102-7.
6. Barton, E (2006). "Impact of sarcoglycan complex on mechanical signal transduction in murine skeletal muscle." *Am J Physiol Cell Physiol.* **290**(2): C411-9.
7. Blake DJ (2002). "Dystrobrevin dynamics in muscle-cell signalling: a possible target for therapeutic intervention in Duchenne muscular dystrophy?" *Neuromuscul Disord.* **12**:S110-7.
8. Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R (2003). "Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells". *Nat Genet.* **34**(3):263-4.

9. Burkin DJ, Wallace G., Nicol KJ, Kaufman DJ, Kaufman SJ (2001). "Enhanced expression of the alpha 7 beta 1 integrin reduces muscular dystrophy and restores viability in dystrophic mice." *J Cell Biol.* **152**(6): 1207-18.
10. Campbell, K (1995). "Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage." *Cell.* **80**(5): 675-9.
11. Chan YM, Bonnemann C., Lidov HG, Kunkel LM (1998). "Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture." *J Cell Biol.* **143**(7): 2033-44.
12. Chen J, Shi W, Zhang Y, Sokol R, Cai H, Lun M, Moore BF, Farber MJ, Stepanchick Js, Bonnemann CG, Cahn YM (2006). "Identification of functional domains in sarcoglycans essential for their interaction and plasma membrane targeting." *Exp Cell Res.* **312**(9): 1610-25
13. Coral-Vazquez R, Cohn R., Moore SA, Hill JA, Weiss RM, Davisson 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.* **98**(4): 465-74.
14. Grishok APasquinelli AE, C. D., Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DI, Fire A, Ruvkun G, Mello CC (2001). "Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing." *Cell* **106**(1): 23-34.
15. Crosbie RH, Barresi R., Campbell KP (2002). "Loss of sarcolemma nNOS in sarcoglycan-deficient muscle." *FASEB J.* **16**(13): 1786-91.
16. Crosbie RH, Heighway J., Venzke DP, Lee JC, Campbell KP (1997). "Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex." *J Biol Chem.* **272**(50): 31221-4.
17. Duclos F, Straub V., Moore SA, Venzke DP, Hrstka RF, Crosbie RH, Durbeej M, Lebakken CS, Ettinger AJ, van der Meulen J, Holt KH, Lim LE, Sanes JR,

- Davidson BL, Faulkner JA, Williamson R, Campbell KP (1998). "Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice." *J Cell Biol.* **142**(6): 1461-71.
18. Durbeej M, Cohn RD, Hrstka RF, Moore SA, Allamand V, Davidson BL, Williamson RA, Campbell KP (2000). "Disruption of the beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E." *Mol Cell.* **5**(1): 141-51.
19. Duggan DJ, Manchester D, Stears KP, Mathews DJ, Hart C, Hoffman EP (1997). Mutations in the delta-sarcoglycan gene are a rare cause of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2). *Neurogenetics.* 1: 49-58.
20. Durbeej M, Campbell K (1999). "Biochemical characterization of the epithelial dystroglycan complex." *J Biol Chem.* **274**(37): 26609-16.
21. Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA (2003). "Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression." *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**(6):457-67.
22. Elbashir SM, H. J., Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature.* **411**(6836): 494-8.
23. Ervasti JM, Campbell K (1991). "Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex." *Cell.* **66**(6): 1121-31.
24. Föster, E (1994). "An improved general method to generate internal standards for competitive PCR." *Biotechniques.* 16: 18-20.
25. Griffin MA, Feng H., Tewari M, Acosta P, Kawana M, Sweeney HL, Discher DE (2005). "gamma-Sarcoglycan deficiency increases cell contractility, apoptosis and MAPK pathway activation but does not affect adhesion." *J Cell Sci.* **118**(Pt 7): 1405-16.

26. Hack AA, Cordier L., Shoturma DI, Lam MY, Sweeney HL, McNally EM (1999). "Muscle degeneration without mechanical injury in sarcoglycan deficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(19): 10723-8.
27. Hack AA, Groh M., McNally EM (2000). "Sarcoglycans in muscular dystrophy." *Microsc Res Tech.* **48**(3-4): 167-80.
28. Haenggi T, Fritschy SM (2006). "Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue". *Cell Mol Life Sci.* **63**(14): 1614-31.
29. Hashimoto R, Yamaguchi M (2006). "Genetic link between beta-sarcoglycan and the Egfr signaling pathway." *Biochem Biophys Res Commun.* **348**(1): 212-21.
30. Hegg LA, Fedor M (1995). "Kinetics and thermodynamics of intermolecular catalysis by hairpin ribozymes." *Biochemistry* **34**(48): 15813-28.
31. Helbling-Leclerc A, Zhang X., Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, Tome FM, Schwartz K, Fardeau M, Tryggvason K (1995). "Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy." *Nat Genet.* **11**(2): 216-8.
32. Hertel KJ, H. D., Uhlenbeck OC (1994). "A kinetic and thermodynamic framework for the hammerhead ribozyme reaction." *Biochemistry* **33**(11): 3374-85.
33. Hoffman EP, Brown R. J., Kunkel LM (1987). "Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus." *Cell.* **51**(6): 919-28.
34. Holt KH, Campbell K (1998) "Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy." *J Biol Chem.* **273**(52): 34667-70.
35. Hutvagner G, Zamora P (2002). "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex." *Science.* **297**(5589): 2056-60.

36. Jung D, Yang B, Meyer J, Chamberlain JS, Campbell KP (1995). "Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan." *J Biol Chem.* **270**(45): 27305-10.
37. Janssen Karen (1989) *Immunochemistry. Current Protocols in Molecular biology* vol. 2 Ed Hohn Wiley and Sons, INC.
38. Kawasaki H, Taira K (2003). "Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells." *Nucleic Acids Res* **31**(2): 700-7.
39. Keeling PJ, Gang Y., Smith G, Seo H, Bent SE, Murday V, Caforio AL, McKenna WJ (1995). "Familial dilated cardiomyopathy in the United Kingdom." *Br Heart J.* **73**(5): 417-21.
40. Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM (2004). "The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma". *Circ Res.* **94**(8):1023-31.
41. Lasa A, Piccolo F de Diego C, Jeanpierre M, Colomer J, Rodriguez MJ, Urtizberea, JA., Baiget M, Kaplan JC, Gallano P (1998). Severe limb girdle muscular dystrophy in Spanish gypsies: further evidence for a founder mutation in the gamma-sarcoglycan gene. *Europ. J. Hum. Genet.* 6: 396-399.
42. Lim LE, Duclos F, Broux O, Bourg N, Sunada Y, Allamand V, Meyer J, Richard I, Moomaw C, Slaughter C, Tome FMS, Fardeau M, Jackson CE, Beckmann JS, Campbell KP (1995). Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nature Genet.* 11: 257-265.
43. Liu LA, Engvall E (1999). "Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle." *J Biol Chem.* **274**(53): 38171-6.

44. Maecker HT, Todd S., Levy S (1997). "The tetraspanin superfamily: molecular facilitators." *FASEB J* **11**(6): 428-42.
45. Marth, J (1996). "Recent advances in gene mutagenesis by site-directed recombination." *J Clin Invest.* **97**(9): 1999-2002.
46. 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 (1996). "Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy." *Hum Mol Genet.* **5**(11): 1841-7.
47. Michels VV, Moll P., Miller FA, Tajik AJ, Chu JS, Driscoll DJ, Burnett JC, Rodeheffer RJ, Chesebro JH, Tazelaar HD (1992). "The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy." *N Engl J Med.* **326**(2): 77-82.
48. Montanaro F, Lindenbaum M., Carbonetto S (1999). "alpha-Dystroglycan is a laminin receptor involved in extracellular matrix assembly on myotubes and muscle cell viability." *J Cell Biol.* **145**(6): 1325-40.
49. Morita H, DePalma S., Arad M, McDonough B, Barr S, Duffy C, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG (2002). "Molecular epidemiology of hypertrophic cardiomyopathy." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **67**: 383-8.
50. Mourelatos Z, D. J., Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2002). "miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs." *Genes Dev* **16**(6): 720-8.
51. Newbell BJ, Anderson J., Jarrett HW (1997). "Ca²⁺-calmodulin binding to mouse alpha1 syntrophin: syntrophin is also a Ca²⁺-binding protein." *Biochemistry.* **36**(6): 1295-305.
52. Nigro V, Piluso G., Belsito A, Politano L, Puca AA, Papparella S, Rossi E, Viglietto G, Esposito MG, Abbondanza C, Medici N, Molinari AM, Nigro G, Puca GA

- (1996*). "Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein." *Hum Mol Genet.* **5**(8): 1179-86.
53. Noguchi S, McNally E., Ben Othmane 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). "Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy." *Science.* **270**(5237): 819-22.
54. Noguchi S, Wakabayashi E, Imamura M, Yoshida M, Ozawa E (2000). "Formation of sarcoglycan complex with differentiation in cultured myocytes". *Eur J Biochem.* **267**(3):640-8.
55. Nowak JK, Davies K (1994). " Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment." *EMBO reports.* **5**: 872-76.
56. Oak SA, Russo K., Petrucci TC, Jarrett HW (2001). "Mouse alpha1-syntrophin binding to Grb2: further evidence of a role for syntrophin in cell signaling." *Biochemistry.* **40**(37): 11270-8.
57. Ozawa E, Mizuno Y, Hagiwara Y, Sasaoka T, Yoshida M (2005). "Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex". *Muscle Nerve.* **32**(5): 563-76.
58. Palma Flores Carlos (2006). Caracterización bioquímica del DGC/UGC en músculo liso de vena de cordón umbilical. TESIS profesional. Facultad de estudios superiores Cuautitlán. UNAM.
59. Passos-Bueno MR, Vainzof M, Moreira ES, Zatz M (1999). Seven autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies in the Brazilian population: from LGMD2A to LGMD2G. *Am. J. Med. Genet.* **82**: 392-398.
60. Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL (1993). "Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(8): 3710-4.

61. Piluso G, Muabella M, Ricci E, Belsito A, Abbondanza C, Servidei S, Puca AA, Tonali P, Puca GV, Nigro V (2000). "Gamma 1 and gamma 2- syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localization neuronal cells. *Biol Chem.* **275**(21): 15851-60.
62. Priva, Mattos B (2006). "Sudden death risk stratification in hypertrophic cardiomyopathy: genetic and clinical bases". *Arq Bras Cardiol.* **87**(3):391-9.
63. Ramirez-Sanchez I, R.-V. H., Ceballos-Reyes G, Salamanca F, Coral-Vazquez RM (2005). "Expression analysis of the SG-SSPN complex in smooth muscle and endothelial cells of human umbilical cord vessels." *J Vasc Res* **42**(1): 1-7.
64. Ramirez-Sanchez I, Ceballos-Reyes G, Rosas-Vargas H, Cerecedo-Mercado D, Zentella-Dehesa A, Salamanca F, Coral-Vazquez RM (2007). "Expression and function of utrophin associated protein complex in stretched endothelial cells: dissociation and activation of eNOS". *Front Biosci.* **1**(12): 1956-62.
65. Richard P, Charron P., Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burbani M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M; EUROGENE Heart Failure Project (2003). "Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy." *Circulation.* **107**(17): 2227-32.
66. Rossi, J. J (1999). "Ribozymes, genomics and therapeutics." *Chem Biol.* **6**(2): R33-7.
67. Sakamoto A, Ono K., Abe M, Jasmin G, Eki T, Murakami Y, Masaki T, Toyooka T, Hanaoka 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**(25): 13873-8.

68. Sacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC (2004). "Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells." *PNAS*. **101**(7): 1892-97.
69. Seidman JG, Seidman C (2001). "The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms." *Cell*. **104**(4): 557-67.
70. Shi W, Chen Z., Schottenfeld J, Stahl RC, Kunkel LM, Chan YM (2004). "Specific assembly pathway of sarcoglycans is dependent on beta- and delta-sarcoglycan." *Muscle Nerve*. **29**(3): 409-19.
71. Shiga K, Yoshioka H, Mtsumiya T, Kimura I, Takeda S, Imamura M (2006). "Zeta-sarcoglycan is a functional homologue of gamma-sarcoglycan in the formation of the sarcoglycan complex". *Exp Cell Res*. **312**(11):2083-92.
72. Straub V, Ettinger A., Durbeej M, Venzke DP, Cutshall S, Sanes JR, Campbell KP (1999). "epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex." *J Biol Chem*. **274**(39): 27989-96.
73. Thompson TG, Cha YM, Hack AA, Brobius M, Rajala M, Lidov HG, McNally EM, Walkins S, Kunkel LM. (2000). "Filamin Z (FLN2). A muscle-specific sarcoglycan interacting protein". *J Cell Biol*. **148**(1): 115-26.
74. Towbin, J (1998). "The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies." *Curr Opin Cell Biol*. **10**(1): 131-9.
75. Towbin J, Bowles N(2006). "Dilated cardiomyopathy: a tale of cytoskeletal proteins and beyond." *J Cardiovasc Electrophysiol*. **17**(8):919-26.
76. Tsubata S, Bowles K., Vatta M, Zintz C, Titus J, Muhonen L, Bowles NE, Towbin JA (2000). "Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy." *J Clin Invest*. **106**(5): 655-62.

77. Vainzof M, Passos-Bueno M., Canovas M, Moreira ES, Pavanello RC, Marie SK, Anderson LV, Bonnemann CG, McNally EM, Nigro V, Kunkel LM, Zatz M (1996). "The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies." *Hum Mol Genet.* **5**(12): 1963-9.
78. Wheeler MT, Allikian M., Heydemann A, Hadhazy M, Zarnegar S, McNally EM (2004). "Smooth muscle cell-extrinsic vascular spasm arises from cardiomyocyte degeneration in sarcoglycan-deficient cardiomyopathy." *J Clin Invest.* **113**(5): 668-75.
79. Wheeler MT, McNally EM (2003). "Sarcoglycans in vascular smooth and striated muscle". *Trends Cardiovasc Med.* **13**(6): 238-43.
80. Wheeler MT, Zarnegar S., McNally EM (2002). "Zeta-sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy." *Hum Mol Genet.* **11**(18): 2147-54.
81. Yoshida M, Ozawa E (1990). "Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma." *J Biochem (Tokyo).* **108**(5): 748-52.
82. Yoshida T, Pan Y., Hanada H, Iwata Y, Shigekawa M (1998). "Bidirectional signaling between sarcoglycans and the integrin adhesion system in cultured L6 myocytes." *J Biol Chem.* **273**(3): 1583-90.
83. Zimprich A, Grabowski M, Asmus F, Naumann M, Berg D, Bertram M, Scheidtmann K, Kern P, Winkelmann J, Muller-Myhsok B, Riedel L, Bauer M, Muller T, Castro M, Meitinger T, Strom TM, Gasser T (2001). Mutations in the gene encoding epsilon-sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome. *Nature Genet.* **29**: 66-69.