



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**“Clonación de cDNA de Sox 9 y la región
promotora del gen *sgca* (α -sarcoglicano)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

AGUILLON HUERTA VERONICA

ASESORES: Dr. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ
QFB. JOSÉ MANUEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

EL DILEMA

*REÍR ES ARRIESGARSE A PARECER TONTO.
LLORAR ES ARRIESGARSE A PARECER SENTIMENTAL.
BUSCAR A ALGUIEN ES CORRER EL RIESGO DE
INVOLUCRARSE.*

*EXPRESAR LOS PROPIOS SENTIMIENTOS
ES ARRIESGARSE A SER RECHAZADO.
MOSTRAR LOS SUEÑOS A LA GENTE ES ARRIESGARSE
AL RIDÍCULO*

*AMAR AL FIN ES ARRIESGARSE A NO SER AMADO A
SU VEZ.*

*E IR HACIA DELANTE CONTRA LA SUERTE
ES ARRIESGARSE A FRACASAR.*

*PERO DEBE CORRERSE EL RIESGO,
PORQUE EL MAYOR PELIGRO EN LA VIDA
ES NO ARRIESGAR NUNCA NADA.*

*EL QUE NO ARRIESGA NADA
NUNCA HACE NADA, NO TIENE NADA, NO ES NADA.
PUEDE EVITAR EL SUFRIMIENTO Y EL DOLOR,
PERO NO PUEDE APRENDER, SENTIR, CAMBIAR,
CRECER... NI AMAR.*

*ENCADENADO POR SU SEGURIDAD Y SU CERTEZA,
ES UN ESCLAVO.
HA PECADO CONTRA LA LIBERTAD.
PORQUE SÓLO AQUEL QUE TOMA RIESGOS ES
REALMENTE LIBRE*

Anónimo

AGRADECIMIENTOS:

A DIOS

Por sus bendiciones día a día, por estar siempre conmigo y guiarme en la vida pero sobre todo por darme la oportunidad de vivir.

A MI MAMA

Mariana por darme la vida y estar ahí cuando la necesite, por sus consejos, sus regaños y por quererme y apoyarme en cada nuevo proyecto.

A TONY

Mi hermanito, por su apoyo incondicional a lo largo de mis estudios, sus consejos, su paciencia y su cariño.

A MARIO

Por su compañía, sus consejos, su amor, la motivación día a día por concluir con los proyectos y su apoyo incondicional siempre y en todo momento.

A ALMA

Por el tiempo juntas por los momentos compartidos por su cariño y su apoyo incondicional.

A ALICIA

Por el tiempo compartido, por su cariño y su apoyo en todo por todos los momentos lindos y las experiencias que compartimos.

A LA GENERACION 29

En especial a todos mis amigos, Alicia, Lupe, Mario, Rosario, Aideé, Nanci, Alejandro, Orquidea, Marco, Sara, por todos esos momentos maravillosos compartidos.

A CENTRO MEDICO.

De manera muy especial a las personas que trabajan en pediatría por todo el apoyo recibido, a Manolo por su asesoría y sus consejos a Chio, Alhondra, Gabo, Sofi, Bladi, Deyanira, Vicky, Adrian, Dra. Rosa y al Dr. Fernando, por su amistad.

Al Dr. Ramón.

De manera muy especial por ser una persona admirable y digna de seguir su ejemplo, por ser un excelente tutor y darme su apoyo incondicional y sobre todo por confiar en mí.

ÍNDICE

Índice de figuras y tablas	i
Glosario	ii
Resumen	iii
1. <i>INTRODUCCIÓN</i>	1
1.1 Generalidades de músculo esquelético	1
1.2 Descripción del DGC y sus componentes en músculo esquelético	2
a) Distrofina	3
b) Distrobrevinas y sintrofinas	5
c) Distroglicanos	7
d) Sarcoglicanos y sarcospan	9
e) Matriz extracelular	12
1.2 Promotor del gen <i>sgca</i> (alfa sarcoglicano)	13
1.3 Factores de transcripción, Sox E	15
a) Características del dominio HMG	17
1.4 Factor de transcripción Sox 9	18
2. <i>JUSTIFICACIÓN</i>	20
3. <i>OBJETIVOS</i>	21
3.1 Objetivo General	21
3.2 Objetivos particulares	21
4. <i>MATERIAL Y MÉTODOS</i>	22
4.1 Extracción de RNA total	22
4.2 cDNA	22
4.3 Extracción de DNA	23
4.4 Amplificación de la región promotora del gen <i>sgca</i> y Sox 9	23
a) Región promotora del gen <i>sgca</i>	24
b) Sox 9	25
4.5 Ligación y transformación	25
4.6 Obtención de DNA plasmídico (Miniprep)	27
4.7 Cultivo de células C2C12 y transfección	28

5. <i>RESULTADOS</i>	29
5.1 Extracción de RNA total a partir de un embrión de 16.5dpc	29
5.2 Amplificación del cDNA de Sox 9	29
5.3 Purificación, restricción y desfosforilación de pCDNA 3.1 N-Myc	30
5.4 Restricción y liberación del cDNA de Sox 9	30
5.5 Secuenciación del cDNA de Sox 9	32
5.6 Extracción de DNA de músculo esquelético de ratón adulto	32
5.7 Amplificación de la región promotora del gen <i>sgca</i> (α -SG)	33
5.8 Purificación restricción y desfosforilación de pGL3	33
5.9 Análisis de la orientación de la región promotora de α -SG	34
5.10 Restricción y liberación del inserto (α -SG)	35
5.11 Secuenciación de la región promotora (α -SG)	36
5.12 Transfección de la región promotora y de Sox 9 en la línea celular C2C12	36
6. <i>DISCUSIÓN</i>	38
7. <i>CONCLUSIÓN</i>	40
8. <i>ANEXO A</i>	41
9. <i>REFERENCIAS</i>	44
9.1 Referencias electrónicas	48

Índice de figuras y tablas

Figuras

Fig. 1. Estructura del músculo esquelético y detalle de una fibra muscular	1
Fig. 2. Dominios de unión presentes en el gen de distrofina	5
Fig. 3 Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina y sus principales componentes	13
Fig. 4. Regiones 5' terminal del gen α -SG	14
Fig. 5. Modelo de la interacción de la proteína Sox con su factor de unión	17
Fig. 6 Extracción de RNA (embrión 16.5 dpc)	29
Fig. 7 Reacciones de PCR para Sox 9	29
Fig. 8. Restricción de Sox 9	30
Fig. 9. PCR del miniprep de sox 9	31
Fig. 10. Doble restricción (xho/xba1) para el miniprep de sox 9	31
Fig. 11 Secuencia de Sox 9	32
Fig. 12. Extracción de DNA de músculo esquelético, de ratones adultos	32
Fig. 13 Amplificación de la región promotora del gen <i>sgca</i>	33
Fig. 14 Caracterización mediante PCR de colonias positivas a α -SG	34
Fig. 15. PCR a partir de miniprep para verificar la orientación del inserto	35
Fig. 16. PCR para liberar el inserto de α -SG	35
Fig. 17. Secuencia del promotor α -SG	36
Fig. 18. Mioblastos de la línea celular C2C12	36
Fig. 19. Miotubos de la línea celular C2C12	36
Fig. 20. Transfección de promotor de α -SG, en la línea celular C2C12	37
Fig. 21. Gráfica de la transfección del promotor B de α -SG, y transfección del promotor más el factor de transcripción.	37

Tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación y secuenciación	23
Tabla 2. Reacción de PCR (α -SG 1800bp) y condiciones de amplificación.	24
Tabla 3. Reacción de PCR (α -SG 3061bp) y condiciones de amplificación	24
Tabla 4. Reacción de PCR (Sox 9 1542bp) y condiciones de amplificación	25
Tabla 5. Reacción de ligación	25
Tabla 6. Reacción de transformación	26

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
a.a	Aminoácidos
bHLH	Basica helice asa helice
bp	Pares de bases
C2C12	Línea celular derivada de músculo (mouse myoblast cell line)
C-terminal	Carboxilo terminal
DEPC (agua)	Dietil pirocarbonato
DGC	Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dpc	Días post coito
DTT	dithiothreitol
ECM	Extracellular Matrix (Matriz extra celular)
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína verde fluorescente
HMG-box	Grupo de alta movilidad (High mobility group)
LGMD 2D	Limb girdle muscular dystrophy type 2D (Distrofia muscular de cintura)
LUC	Luciferasa
mdx	Distrofia muscular experimental
µg	Microgramos
µl	Microlitros
mM	Milimolar
MRFs	Factores de regulación miogénica
mRNA	RNA mensajero
MyoD	Determinación del gen de mioblastos numero uno
ng	Nanogramos
nNOS	Sintasa de óxido nítrico neural
N-terminal	Amino terminal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa Inversa
SG	Sarcoglicano
SG's	Sarcoglicanos
sgca	Gen murino que codifica para la subunidad alfa de los sarcoglicanos
SRY	Factor determinante de testículo
T.A	Temperatura ambiente
Vol.	Volumen

RESUMEN

El complejo sarcoglicano-sarcospan esta constituido por las proteínas transmembranales α , β , γ y δ , el cual a su vez forma parte del complejo de proteínas asociadas a distrofina. La deficiencia de α -SG causa distrofia muscular de cintura tipo 2D. En estudios previos, se reportaron 2 transcritos para el gen α -SG, cuya expresión es regulada por dos promotores independientes, uno localizado hacia 5' del exon 1 (promotor A) y otro hacia 5' del exon 2 (promotor B). En uno de estos estudios se observó que 1.5 Kb del promotor A tenía una muy baja actividad promotora durante la diferenciación de las células musculares. Sin embargo, no se tomaron en cuenta secuencias más hacia el extremo 5' del exon 1. En estas secuencias nosotros hemos observado la presencia de secuencias que podrían ser importantes para controlar la expresión del gen α -SG. Por otro lado, el promotor B contiene secuencias consenso para el factor de transcripción SOX 9.

El objetivo del presente trabajo fue clonar el factor de transcripción Sox 9, así como 3 Kpb de la región promotora del gen *sgca*. Para esto se realizó la extracción de RNA, a partir de embriones completos de 16.5 días post coito, para la posterior amplificación del factor de transcripción Sox 9. En el caso de la región promotora se realizó la extracción de DNA a partir de músculo esquelético de ratón. Posteriormente ambas secuencias se clonaron en los vectores pcDNA 3, en el caso de Sox 9 y en pGL3-Basic, en el caso del promotor. Por otro lado se sembraron células de la línea C2C12 (mioblastos murinos), en medio DMEM con suero fetal bovino al 10% para ser transfectadas con el promotor A α -SG y así como con Sox 9 y el promotor B α -SG.

A partir de las extracciones de RNA y de DNA, se obtuvieron las amplificaciones en el caso de Sox 9 (1500bp) y del promotor A (3061bp). En ambos casos se realizaron ensayos con enzimas de restricción para comprobar que el fragmento insertado en el vector fuese liberado y correspondiera con el tamaño esperado. Posteriormente se secuenciaron, con lo cual se comprobó que efectivamente se había clonado Sox 9 el cual se encontró en marco de lectura y sin mutaciones, lo mismo ocurrió en el caso del promotor. Una vez clonado se comprobó que efectivamente la región clonada tuviese efecto como promotor, lo cual se demostró al transfectarlo en la línea celular C2C12, puesto que se observó un notable incremento en su actividad conforme avanzaron los días de diferenciación. Por otra parte en la transfección de Sox 9 junto con el promotor B se observó que Sox 9 ejerce una regulación negativa sobre la actividad del promotor B, por lo anterior se sugiere que tiene efecto como regulador negativo sobre la actividad del promotor B de alfa sarcoglicano.

El conocimiento de los mecanismos por los cuales los genes sarcoglicanos son regulados transcripcionalmente en músculo esquelético nos permite entender mejor como es el proceso que participa en el desarrollo de la distrofia muscular.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades de músculo esquelético

La palabra músculo proviene del diminutivo latino *musculus*, *mus* (ratón) *culus* (pequeño), porque en el momento de la contracción, los romanos decían que parecía un pequeño ratón por la forma (<http://es.wikipedia.org>).

El músculo esquelético constituye el tejido más abundante del organismo y representa del 40 al 45% del peso corporal total (Hernández et al., 2004). Los músculos esqueléticos están formados por fibras musculares individuales que se contraen cuando son estimuladas por una neurona motora. Los extremos de los músculos esqueléticos se insertan en estructuras óseas mediante tendones constituidos por tejido conjuntivo muy resistente.

Las proteínas del tejido conjuntivo fibroso de los tendones rodean al músculo con una disposición irregular formando una vaina denominada epimisio (epi = por encima; my = músculo). El tejido conjuntivo procedente de esta cubierta externa se extiende hacia el interior del músculo y lo divide en columnas o fascículos. Así cada uno de estos fascículos está rodeado por su propia vaina o cubierta de tejido conjuntivo que se denomina perimisio (peri = alrededor de). La disección de un fascículo muscular bajo el microscopio revela que, a su vez, el fascículo está constituido por numerosas **fibras musculares** o miofibrillas. Cada fibra muscular está rodeada por una membrana celular denominada *sarcolema*, que aparece cubierta por una fina capa de tejido conjuntivo denominada endomisio. (Fig. 1)(Stuart, 2004).

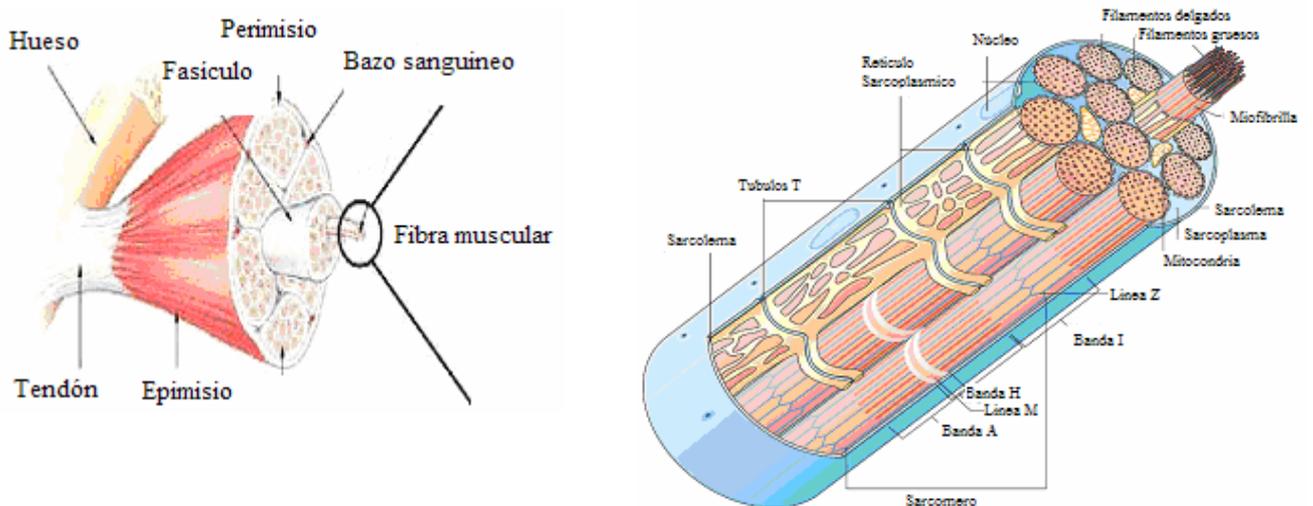


Fig.1. Estructura del músculo esquelético y detalle de una fibra muscular. Modificado de (<http://en.wikipedia.org> y Davies et al., 2006).

El Sarcolema es capaz de resistir los embates del proceso mecánico, lo cual es trascendental para el papel funcional del tejido.

Esta resistencia del sarcolema es conferida, además de la gran cantidad de tejido elástico presente, por proteínas de disposición definida, que se organizan e interaccionan entre si. Se han identificado algunas de estas proteínas a raíz de las alteraciones estructurales que ocurren a nivel de la membrana en un sin número de patologías musculares, tales proteínas en conjunto forman un complejo, denominado complejo distrofina-glicoproteína DGC (de sus siglas en inglés; “Dystrophin-glycoprotein complex”). (Davies, 2006). Este fue el primer complejo aislado de membranas de músculo esquelético (Daniel et al., 2003) y a su vez se compone por los complejos sarcoglicano, distroglicano y las sintrofinas, la función de dicho complejo radica en el establecimiento de un puente trans-membranal que contacta citoesqueleto y matriz extracelular confiriendo estabilidad al sarcolema (Hernández, 2004), del estrés generado durante la contracción muscular. La deficiencia de distrofina o de alguno de los componentes del complejo resulta en una variedad de distrofias musculares, las cuales se asocian con defectos en la integridad de la membrana sarcolemal (Rybakova et al., 2000).

1.2. Descripción del DGC (complejo distrofina-glicoproteína) y sus componentes en músculo esquelético.

El complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina, esta conformado por proteínas de membrana periféricas e integrales (Crosbie et al., 2000), el cual conecta la matriz extracelular con el citoesqueleto. La interrupción de esta unión, causada por mutaciones en distrofina o sarcoglicanos, causa inestabilidad sarcolemal, lo que hace susceptibles de necrosis a las fibras musculares, el principal evento en las distrofias musculares.

Las proteínas que comprenden el DGC, están organizadas estructuralmente en 3 distintos subcomplejos, de acuerdo a sus características bioquímicas (Ronald et al., 2000; Chan Yiu-mo et al., 1998): el complejo de proteínas del sarcoplasma (citoesqueleto); como, distrofina, α -distrobrevina y las sintrofinas (Ronald et al., 2000); proteínas periféricas intracelulares (Chan Yiu-mo et al., 1998); el segundo subcomplejo; proteínas del sarcolema; distroglicanos (subunidades α y β), nNOS, caveolina.

El tercer complejo consiste de un grupo de proteínas transmembranales llamadas sarcoglicanos (SG) α , β , γ , y δ y dos proteínas descubiertas recientemente, una de ellas llamada sarcoglicano ϵ que tiene una alta homología con el sarcoglicano α , y una proteína llamada sarcospán. Estas proteínas en su conjunto conforman el subcomplejo sarcoglicano-sarcospán (SG-SSPN) (Ronald et al., 2000; Koutarou et al., 2005).

a) Distrofina

Distrofina y el complejo de proteínas asociadas a distrofina protegen el sarcolema contra el estrés mecánico inducido por la contracción (Michihiro et al., 2005). La distrofina es una proteína del citoesqueleto que media la asociación de microfilamentos del citoplasma con el distroglicano, además proporciona la unión de actina, que funciona como base en el citoesqueleto y laminina en la matriz extracelular (Rybakova et al., 2000; Michihiro et al., 2005; Wehling et al., 2001), además, la desestabilización de la unión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular, causado por mutaciones en distrofina o los sarcoglicanos, propicia inestabilidad del sarcolema, lo que a su vez predispone a la fibra muscular a sufrir necrosis, el principal evento en la distrofia muscular (Ronald et al., 2000). (*Fig. 3*).

La proteína distrofina fué la primera estudiada y se demostró que mutaciones en el gen que codifica para esta proteína (el gen más grande del genoma), provocaban distrofia muscular de Duchene (Davies et al., 2006); una de las enfermedades hereditarias de la niñez, más prevalentes en el mundo (Wehling et al., 2001), la cual se hereda de manera recesiva ligada al cromosoma X (Yoshida et al., 2000) y dependiendo de la mutación también puede provocar distrofia muscular de Becker, la cual presenta un fenotipo menos grave (Davies et al., 2006).

En músculo esquelético, distrofina se encuentra asociada con un gran complejo oligomérico de proteínas que incluyen distroglicanos (α y β), sarcoglicanos (α , β , γ y δ), distrorevinas, sintrofinas ($\alpha 1$, $\beta 1$ y $\beta 2$) y sarcospan (Rybakova et al., 2000; Michihiro et al., 2005).

La distrofina es una proteína de 427kDa (Chan Yiu-mo et al., 1998) la cual está ausente o reducida en la distrofia muscular Duchenne/Becker, esta proteína está formada por cuatro dominios (Ronald et al., 2000): el dominio amino terminal, o también llamado de unión a actina, rod domain o domino central; el dominio rico en cisteínas, y el dominio carboxi-terminal o de unión a sintrofina (*Fig. 2*) (Crosbie et al., 1998; Betto et al., 1999); tres de los dominios presentan una alta homología con varias proteínas del citoesqueleto como α -actina y β -espectrina (Ervasti, 2006). El dominio amino terminal interactúa directamente con la F-actina, mientras que el dominio carboxi terminal se une a β -dístroglicano y éste último a $\alpha 2$ -laminina, completando la conexión estructural entre el citoesqueleto y la matriz extracelular (Ronald et al., 2000). La distrofina también se une a través del domino rico en cisteínas a α -dístrobrevina a través del domino carboxi-terminal (Davies et al., 2006). El dominio rico en cisteínas, representa al menos el 14% de la secuencia de la proteína completa. La distrofina se encuentra localizada adyacente a la cara citoplasmática de la membrana sarcolemal (Rybakova et al., 2000) y particularmente dentro de la red del citoesqueleto interaccionando con una serie de proteínas, en conjunto se denominan costameras (Ervasti, 2006). Las costameras transmiten la fuerza lateralmente a través de la membrana sarcolemal a la lámina basal (Rybakova et al., 2000).

Se sugiere que la distrofina es una proteína elástica y flexible y es por eso que protege a las células musculares del estrés causado por la fuerza creada durante la contracción muscular. Las fibras musculares carentes de distrofina son menos rígidas que las fibras normales (Davies et al., 2006).

La ausencia de distrofina en humanos y en ratón *mdx*, conduce a una desorganización de las costameras, fragilidad sarcolemal, debilidad muscular y necrosis (Ervasti, 2006). Estos datos sugieren que distrofina juega un papel importante en la organización y estabilidad de las costameras, posiblemente de manera directa al unirse a los filamentos de actina (Rybakova et al., 2000).

La fragilidad sarcolemal, debilidad muscular y la necrosis, se ven incrementadas por el estrés mecánico, inmovilización del músculo, etc. Estos hallazgos proveen la evidencia de que la distrofina estabiliza el sarcolema en contra de la fuerza mecánica experimentada durante la contracción-relajación del músculo (Ervasti, 2006; Yoshida et al., 2000).

En ausencia de distrofina también reduce considerablemente la expresión de la óxido nítrico sintetasa, en la membrana celular, lo cual sugiere que la deficiencia de óxido nítrico puede influenciar en la patología distrófica, debido a que el óxido nítrico puede funcionar como una molécula antiinflamatoria y crioprotectiva (Wehling et al., 2001).

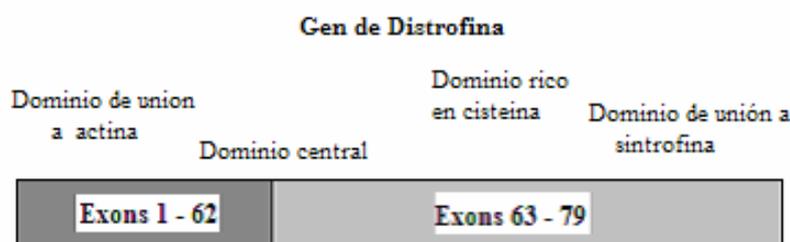


Fig. 2. Dominios de unión presentes en el gen de distrofina modificado de (Crosbie, 1998).

b) *Distrobrevinas y sintrofinas*

Las distrobrevinas son proteínas sarcoplásmicas (Andrew et al., 1996), asociadas a distrofina con un peso molecular de 88kDa, distrobrevina y sintrofina se unen directamente a secuencias dentro del dominio carboxi-terminal de la distrofina (Ervasti, 2006), Se piensa que tienen un papel en la señalización, sin embargo eso no está totalmente entendido (Davies et al., 2006).

Existen tres isoformas de sintrofinas, $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\beta 2$, las cuales son productos de diferentes genes. $\alpha 1$ -Sintrofina, es principalmente expresada en músculo estriado y cerebro, mientras que $\beta 1$ y $\beta 2$ sintrofinas, se encuentran de manera ubicua en tejidos de mamíferos (Oak et al., 2001).

Se piensa que las sintrofinas tienen funciones de modulador (adaptador) al unirse a proteínas celulares del DGC (Oak et al., 2001), al anclarse a los canales de iones y moléculas de señalización del complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina, por otra parte no se ha visto asociación de las sintrofinas con miopatía en ratones (Ervasti, 2006), por el contrario un ratón Knockout para α -distrobrevina produce un fenotipo de distrofia muscular y como deficiencia secundaria la pérdida de nNOS del sarcolema (Yoshida et al., 2000), lo que sugiere su importancia en el DGC (Ervasti, 2006).

Además se ha observado que la presencia del complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina es independiente de nNOS, la sintasa de óxido nítrico neural (nNOS) es desplazada del sarcolema al sarcoplasma donde continua la producción de óxido nítrico (Davies et al., 2006; Crosbie, 1998), en ausencia de α -distrobrevina y sintrofina, nNOS interactúa con α 1-sintrofina y β 1-sintrofina a través del dominio PDZ presente en estas proteínas (Davies et al., 2006; Oak et al., 2001). A pesar de que nNOS no es un componente integral del complejo, se encuentra unido a distrofina a través del dominio PDZ de sintrofina. Interesantemente se ha mostrado la unión de sintrofina a canales de sodio en músculo esquelético y cardíaco, sugiriendo que nNOS puede regular estos canales *in vivo* (Crosbie, 1998).

El óxido nítrico es una molécula altamente reactiva, potencialmente puede modificar lípidos, proteínas y DNA a través de una variedad de mecanismos, estas observaciones sugieren que los radicales libres producidos por la deslocalización de nNOS puede contribuir a la patología del músculo en un ratón *mdx*. Estudios previos han reportado que el óxido nítrico producido por nNOS, puede dar protección de los radicales libres, quizá la pérdida de esta función protectora es la base para el elevado estrés oxidativo en el músculo distrófico (Crosbie, 1998).

Las sintrofinas además se unen a calmodulina, estas proteínas poseen un dominio único llamado SU, el cual se une a Ca^{2+} -calmodulina, este dominio junto con otras secuencias en la región C-terminal se une a distrofina. La unión Ca^{2+} -calmodulina, inhibe la interacción sintrofina-distrofina (Oak et al., 2001).

Por otro lado α -distrobrevina se sabe que interactúa directamente con el complejo sarcoglicano, lo cual sugiere la posibilidad de miopatía debido a la desestabilización de la unión indirecta entre la distrofina y el complejo sarcoglicano, como consecuencia de la ausencia de α -distrobrevina (Ervasti, 2006).

Las sintrofinas son un grupo bioquímicamente heterogéneo de proteínas periféricas (Andrew et al., 1996) de al menos tres proteínas homólogas (Chan Yiu-mo et al., 1998), con un peso molecular de 58kDa (Andrew et al., 1996; Oak et al., 2001), se encuentran directamente asociadas a distrofina (Chan Yiu-mo et al., 1998). Se identificaron por primera vez en membranas pos-sinápticas de *Torpedo* (Oak et al., 2001). Dos proteínas sintrofinas $\alpha 1$ y $\beta 1$, se unen a una proteína de distrofina y se sugiere que, este complejo esta asociado con cinasas, canales de iones y varias proteínas de señalización (Davies et al., 2006).

Un ratón deficiente para sintrofina o nNOS no muestra fenotipo de distrofia muscular (Davies et al., 2006; Wehling et al., 2001). Sin embargo nNOS y α -sintrofina no se encontraron en el sarcolema en ausencia de distrofina, lo cual implica la capacidad de las sintrofinas de asociarse con el DGC, dependiendo únicamente de la interacción con distrofina (Davies et al., 2006). α -sintrofina, se encuentra asociado mediante el dominio PDZ presente en la región amino terminal de la molécula de señalización nNOS (Yoshida et al., 2000; Crosbie, 1998).

Las sintrofinas y α -distrobrevina son necesarias para la función normal del músculo, a pesar de no tener una función mecánica en unión con la distrofina, lo cual sugiere que estas proteínas podrían tener algún papel en la señalización. Estudios *in vitro* han demostrado que α -distrobrevina, puede asociarse con los sarcoglicanos (Davies et al., 2006).

c) Distroglicanos

Los distroglicanos forman un subcomplejo de glicoproteínas (Ervasti, 2006), generados a partir de un solo gen (DAG1) (Daniel et al., 2003), cuyo transcrita codifica para un polipéptido de 97kDa (Hernández, 2004).

Este polipéptido es procesado proteolíticamente en una subunidad extracelular de 156kDa y una subunidad con un dominio transmembranal de 43kDa, estas subunidades permanecen asociadas no covalentemente, basado en la extensa glicosilación de la subunidad de 156kDa, y la fuerte asociación de ambas proteínas con la distrofina, la subunidad de 156kDa, y la de 43kDa fueron llamadas α -dístroglicano y β -dístroglicano respectivamente (Ervasti, 2006). Los dístroglicanos son el componente central del DGC, una de sus funciones es contribuir como un receptor de ligando y una proteína de adhesión que ayuda a estabilizar el sarcolema en relación a la matriz extracelular (Daniel et al., 2003). La pérdida de los dístroglicanos es letal en un embrión de ratón (Ervasti, 2006).

La región carboxilo terminal de α -Dístroglicano se une a la región amino terminal de β -dístroglicano independientemente de la glicosilación (Daniel et al., 2003), a su vez β -dístroglicano se encuentra unido directamente a α -dístrobrevina. La presencia de glicocarbohidratos en α -dístroglicano es necesaria para la unión de proteínas de la matriz extracelular como laminina. El complejo dístroglicano esta asociado con el complejo sarcoglicano (Davies et al., 2006).

En el sarcolema de la fibra muscular β -dístroglicano se une intracelularmente a distrofina, la cual a su vez se une a la actina del citoesqueleto y extracelularmente a α -dístroglicano, el cual completa la unión del citoesqueleto a la lámina basal mediante la unión dependiente de calcio con una alta afinidad a las proteínas de la matriz extracelular.

La región carboxi-terminal de β -Dístroglicano contiene un motivo PPXY que puede interactuar con distrofina o caveolina 3 (Daniel et al., 2003).

Los dístroglicanos contienen cuatro sitios de glicosilación, tres están presentes en α -Dístroglicano y uno en β -Dístroglicano, después de un tratamiento exhaustivo con N-glicanasas no se observa ninguna alteración en su actividad como receptor para proteínas de la matriz extracelular, lo cual sugiere que los azúcares unidos al dístroglicano no son necesarios para la unión del ligando. A pesar del papel central de los dístroglicanos en el DGC, no se ha reportado mutaciones en estas proteínas, que ocasionen alguna patología en humanos (Daniel et al., 2003).

Oak y cols, han demostrado que α -Distroglicano, β -Distroglicano y sintrofinas se unen a Grb2, receptor del factor de crecimiento (Oak et al., 2001).

La subunidad α -Distroglicano, se une a caveolina 3, una proteína integral de la membrana de 21-24 kDa, la cual es una isoforma músculo-específica de la familia de las caveolinas y es el principal componente de las caveolas en el sarcolema, caveolina 3 se localiza en túbulos T, durante el desarrollo del músculo.

Otra función posible de caveolina 3 incluye la inhibición de la actividad enzimática de nNOS, interacciones con varias moléculas de señalización y también esta involucrada en la regulación del metabolismo energético (Davies et al., 2006). La deficiencia de caveolina 3, causa distrofia muscular (Yoshida et al., 2000).

d) Sarcoglicanos y sarcospan

Sarcoglicano-sarcospan es un complejo de glicoproteínas integrales de membrana que están asociadas con distrofina (Andrew et al., 2000). Este complejo de proteínas está conformado por genes que codifican para una subunidad de 50kDa, una de 43kDa y dos proteínas diferentes de 35kDa del DGC, las cuales fueron llamadas α , β , γ , y δ sarcoglicanos. La expresión de los genes α , β , γ , ó δ sarcoglicanos ocasiona las distrofias musculares de cintura (LGMD) tipo 2D, 2E, 2C y 2F respectivamente, también llamadas sarcoglicanopatías (Delgado-Olguín et al., 2004; Yoshida et al., 2000). Estas distrofias musculares son heredadas de forma autosómica recesiva (Yoshida et al., 2000).

Los sarcoglicanos son proteínas con un dominio transmembranal, se encuentran ensambladas en un complejo hetero-tetramérico, llamado complejo sarcoglicano (Ervasti, 2006; Kenji et al., 1999).

La ausencia de sarcoglicanos y sarcospan debido a una mutación nula en el gen *sgca* causa disociación del DGC y contribuye a una degeneración progresiva del músculo en LGMD 2D. Se propone que el complejo sarcoglicano-sarcospan es requisito para la asociación estable de α -distroglicano con el sarcolema (Franck et al., 2006).

Las subunidades de los sarcoglicanos son asociadas en pequeños complejos en vesículas que son llevadas a la membrana donde finalmente son ensambladas. Esto implica que la síntesis simultánea de todas las subunidades es un prerrequisito para la formación del complejo de SG y su estabilidad en la membrana (Wakabayashi-Takai et al., 2001).

El complejo sarcoglicano se expresa durante la diferenciación muscular y esta compuesto por los sarcoglicanos α , β , γ , δ , y sarcospan (Davies et al., 2006).

Además el complejo sarcoglicano parece reforzar la interacción de β -dístroglicano con α -dístroglicano y distrofina (Ervasti, 2006).

En dichos padecimientos, la deficiencia de algún SG ocasiona la disminución o pérdida del complejo como se ha demostrado mediante ensayos de inmunohistoquímica en pacientes, así como en ratones modificados genéticamente, deficientes en la expresión de los SG involucrados (Delgado, 2005).

Mediante análisis inmunohistoquímicos se ha observado que la pérdida de un sarcoglicano reduce considerablemente la presencia de los demás sarcoglicanos en la membrana (Kenji et al., 1999).

Análisis en la secuencia de β , γ y δ , revelan que poseen residuos de cisteína muy conservados, en sus dominios extracelulares, los cuales les confieren el potencial para formar puentes disulfuro (Chan Yiu-mo et al., 1998).

El gen α -SG se localiza en el cromosoma 17q21, los genes que codifican para β , γ y δ , se localizan en los cromosomas 4q12, 13q12 y 5q33-34, respectivamente, fueron descubiertos en LGMD 2E (β -SG), 2C (γ -SG) y 2F para δ -SG (Betto, 1999).

α -SG posee una secuencia consenso, para unión de nucleótidos en su dominio extracelular, la cual se reportó, actúa como ecto-ATPasa, sugiriendo que la pérdida de α -SG en las sarcoglicanopatías (LGMD 2C- 2F), puede elevar la concentración de ATP intracelular alrededor de las fibras musculares y resultar en una estimulación prolongada de los receptores P2X, lo cual provocaría una sobrecarga de calcio y como consecuencia la muerte de la célula muscular (Michihiro et al., 2005; Betto, 1999).

ϵ -SG es una proteína transmembranal de 50kDa, pertenece al complejo sarcoglicano expresado en menor proporción en músculo esquelético (ϵ , β , γ y δ) (Chan Yiu-mo et al., 1998). Michihiro y colaboradores demostraron que el incremento en la expresión de ϵ -SG en músculo esquelético de un ratón transgénico induce la regulación negativa de la proteína α -SG, sin cambios en el nivel de mRNA. Análisis de cardiomiocitos mostraron que la cantidad de proteína α -SG, en la membrana celular correlaciona indirectamente con la de la proteína ϵ -SG, esto sugiere que la cantidad de α -SG en músculo estriado es regulada por mecanismos post-transcripcionales (Michihiro et al., 2005).

ϵ -SG esta ampliamente expresado en una variedad de tejidos incluyendo músculo estriado, músculo liso, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículo, cerebro, etc, su secuencia es muy similar al gen músculo específico α -SG, la sobreexpresión de ϵ -SG, puede compensar la deficiencia de α -SG, remplazándolo estructural y funcionalmente, al formar el complejo formado por ϵ , β , γ , y δ (Michihiro et al., 2005).

El análisis de músculo estriado de animales deficientes en sarcoglicanos, ha mostrado que la pérdida del complejo sarcoglicano desestabiliza las interacciones entre α y β -dístroglicano y entre distrofina y β -dístroglicano.

Los SG's β y δ se expresan en tejidos musculares y no musculares, mientras que α y γ -SG se han detectado únicamente en tejido muscular estriado, aunque recientemente se ha reportado la expresión de la proteína γ -SG en músculo liso.

Así mismo, se ha detectado la expresión del mensajero α -SG en endotelio vascular de cordón umbilical, aunque no se ha confirmado la expresión de la proteína. Debido a estos hechos, α -SG es considerado como un gen de expresión músculo específica (Delgado, 2005).

Sarcospan es una proteína de 25kDa, componente del complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (Koutarou et al., 2005), con múltiples hélices que atraviesan el sarcolema, tiene 4 dominios transmembranales y pertenece a la superfamilia de las tetraspains (Crosbie et al., 2000), estas características de sarcospan la hacen única entre los otros miembros del DGC (Koutarou et al., 2005). Se piensa que sarcospan juega un papel importante en las interacciones mediante proteínas transmembranales.

En músculo esquelético de humano hay 2 transcritos (mRNA) para sarcospan, mientras que en músculo esquelético de ratón solo hay uno, lo cual sugiere diferencias en el splicing en RNA o en la regulación entre especies (Crosbie et al., 2000).

En un ratón deficiente en el gen *sgca* se tiene una reducción considerable de los otros SG's como γ , β y δ , así como de otros componentes del DGC tales como α 2-laminina y α -dystroglicano, de manera interesante sarcospan se encuentra ausente.

La pérdida de la expresión de sarcospan sugiere que esta proteína es un componente integral del complejo sarcoglicano (Franck et al., 2006). Interesantemente un ratón deficiente en sarcospan mantiene la expresión de todas las proteínas sarcoglicanos en el sarcolema y no desarrolla distrofia muscular (Ronald et al., 2000).

e) Matriz extracelular

La matriz extracelular (ECM) confiere las propiedades de elasticidad a las miofibrillas además de resistencia al sarcolema, esta involucrada en la diferenciación de tejido, reparación y regeneración.

La ECM esta compuesta por proteínas insolubles tales como colágeno, proteoglicanos, lamininas y fibronectinas. Entre las proteínas de la ECM el colágeno VI y la laminina han sido identificadas como causantes de distrofia muscular cuando los genes que codifican para estas proteínas tienen alguna mutación.

El colágeno VI es una proteína de adhesión celular que no se une directamente al DGC. El colágeno VI forma una red microfibrilar en la ECM.

α 2-Laminina, fue identificada como el primer ligando extracelular para α -dystroglicano (Ervasti, 2006). α 2-laminina también llamada merosina, forma el puente de unión entre el α -dystroglicano, sarcolema y lámina basal, además tiene un papel en la organización estructural de la membrana basal así como la unión de ésta con las células vecinas a través de receptores de superficie (Davies et al., 2006; Betto, 1999). Mutaciones en α 2-Laminina causan distrofia muscular congénita (Daniel et al., 2003).

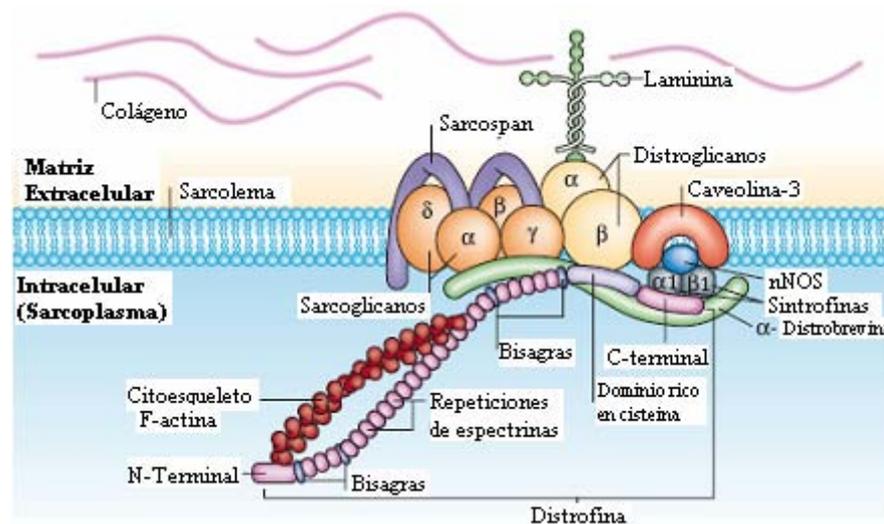


Fig. 3 Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina y sus principales componentes (Davies et al., 2006).

1.3 Promotor del gen *sgca* (α -sarcoglicano).

Un promotor puede entenderse como la secuencia continua de DNA suficiente para dirigir la correcta iniciación de la transcripción de un gen mediada por la RNA pol II. Estas secuencias suelen encontrarse cercanas al inicio de la transcripción, como elementos en cis, y participan en la regulación a nivel de secuencia nucleotídica.

Un punto crucial en la determinación de los patrones de expresión, está dado por los factores transcripcionales que reconocen secuencias nucleotídicas en el DNA, principalmente en las regiones promotoras de los genes, la interacción de estos factores con sus secuencias reguladoras, desencadena eventos que tendrán como resultado la activación o la represión de un gen o grupos de genes (Recillas et al., 2004).

El gen *sgca* en ratón y en humano presenta una alta homología en su secuencia a nivel de proteína. En músculo esquelético el nivel de mRNA es similar en ambos organismos (Franck et al., 2006).

La expresión del gen músculo específico α -SG aumenta durante la diferenciación miogénica, lo que sugiere que la regulación de su expresión se da a nivel transcripcional.

Los factores de regulación miogénica (MRFs), o miembros de la familia MyoD controlan el programa miogénico (Robert, 2000). Dicha familia se compone por MyoD, Myf5, miogenina y MRF4, estos factores forman parte de la súper familia de factores bHLH (Harley et al., 2004), que se caracterizan por poseer un domino básico y dos α -hélices separadas por una asa (Perry et al., 2000). El gen α -SG tiene un patrón de expresión músculo específico lo que sugiere que su promotor es regulado por la familia de factores MyoD.

En un estudio reportado con anterioridad, se aislaron y clonaron dos regiones de control transcripcional, localizadas en la región 5' de las secuencias codificantes de los genes α y γ -SG, en este estudio se identificaron 2 transcritos para el gen α -SG, cuya expresión es promovida por dos promotores independientes, uno localizado hacia 5' del exon 1 (asg1, promotor A) y otro hacia 5' del exon 2 (asg2, promotor B) (Fig. 4).

Por otra parte, se demostró que los promotores de ambos genes regulan positivamente la expresión de los reporteros GFP y luciferasa en forma progresiva conforme avanza el proceso de diferenciación de células musculares, lo que correlaciona con el aumento en la cantidad del transcrito del gen α -SG durante la diferenciación de una línea celular de músculo C2C12 (Delgado, 2005).

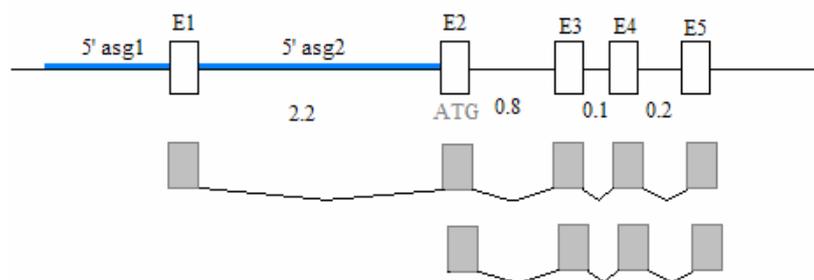


Fig. 4. Regiones 5' terminal del gen α -SG, correspondiente a los 2 transcritos con sus respectivos promotores, en un cuadrado se muestran los exones, con la línea negra se indican los intrones con sus respectivos tamaños en Kbs y en color azul se indica las regiones 5' flanqueantes para ambos transcritos, también se indica el inicio de la traducción (ATG) (Wakabayashi-Takai et al., 2001).

El nivel de expresión de muchos genes es regulado por factores de transcripción que se unen a secuencias reguladoras de DNA situadas río arriba del sitio en el cual es iniciada la transcripción (Orphanides et al., 2002).

Se han identificado 3 sitios consenso, mediante un análisis por computadora, para los factores de transcripción que pertenecen al subgrupo E de la familia de proteínas Sox en la región promotora (asg2), del gen *sgca* que codifica para el promotor de alfa sarcoglicano.

1.4 Factores de transcripción, Sox E

Un factor de transcripción se entiende como una proteína que participa en la iniciación de la transcripción del ADN, pero que no forma parte de la ARN polimerasa. Los factores de transcripción pueden ser activados o desactivados selectivamente por otras proteínas, a menudo como paso final de la cadena de transmisión de señales intracelulares. Los factores de transcripción son generalmente específicos de cada clase de genes, reconocen y se unen a secuencias determinadas cerca del sitio de iniciación de la transcripción (<http://es.wikipedia.org>).

Las proteínas Sox, constituyen una gran familia de factores de transcripción, aproximadamente 30 miembros, caracterizados por poseer un dominio de unión al DNA denominado grupo de alta movilidad o HMG-box (high mobility group), este dominio es altamente conservado y fue el primero identificado en mamíferos en el factor determinante de testículo (SRY) (Schmidt et al., 2003; Josephine et al., 2000), se encuentran distribuidas ampliamente en todo el reino animal (Wegner, 1999).

El nombre de Sox proviene del gen SRY relacionado al dominio HMG box. La familia de genes Sox puede ser dividida en ocho subfamilias o subgrupos, A-H, en base a la similitud de su secuencia comparada con la secuencia de aminoácidos del dominio HMG (Schmidt et al., 2003; Goslik et al., 2000; Clarkson et al., 2002). Uno de los grupos de proteínas mejor caracterizados es el subgrupo E, el cual incluye Sox 8, **Sox 9** y Sox 10 (Schmidt et al., 2003).

Los genes Sox son predominantemente expresados durante la embriogénesis y han sido implicados en muchos procesos del desarrollo y en enfermedades congénitas humanas.

El grupo E de genes Sox, posee varias regiones conservadas que pueden ser funcionalmente importantes. Dos regiones son particularmente conservadas una región hidrofóbica de 35 a.a en la región N-terminal de HMG-box y una región hidrofílica de 19 a.a en la región C-terminal de HMG-box. Estas regiones pueden proveer secuencias específicas de unión al DNA, o conferir propiedades de flexibilidad, con las cuales puede permitir la interacción específica con otros componentes de la maquinaria de transcripcional. Alternativamente pueden estar directamente involucrados en la unión proteína- proteína o asociados a cofactores (Goslik et al., 2000).

Yusuke y colaboradores sugirieron un modelo que explica la interacción de las proteínas Sox con el surco menor del DNA, el cual consiste en 3 etapas:

La primer etapa, en una situación *in vivo* donde el DNA se encuentra estructurado en cromatina, el dominio HMG de Sox no es suficiente para formar un complejo DNA-proteína estable en el sitio Sox, a pesar de que la unión del complejo es demostrable *in vitro*.

La segunda etapa la proteína Sox forma un complejo estable con el DNA blanco solo en presencia de su factor asociado, el cual interactúa con la proteína Sox y se une cercano al sitio blanco. La activación transcripcional o represión por la proteína Sox se logra solo en esta condición. La tercera etapa consiste en la unión del factor asociado a Sox, lo cual depende de dos condiciones, la primera la disponibilidad del sitio de unión para el factor así como la localización y orientación adecuadas, y la segunda la disponibilidad del factor en célula. En el caso particular de Sox 9 su factor asociado o potenciador es Col2a1, en células embrionarias (Yusuke et al., 2000) *Fig. 5*.

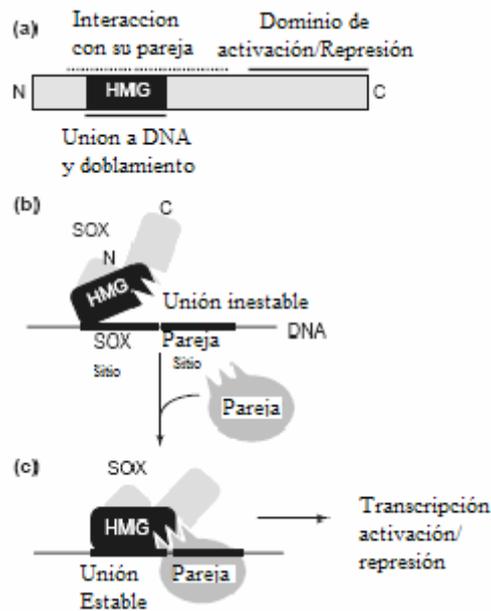


Fig. 5. Modelo de la interacción de la proteína Sox con su factor de unión (Yusuke et al., 2000).

a) Características del dominio HMG

Los genes Sox codifican para un grupo de proteínas que tienen un dominio de unión HMG y dominios adicionales, implicados en la regulación transcripcional, tres importantes características han sido establecidas para la alta conservación de los dominios HMG de las proteínas sox.

1. El dominio HMG en las proteínas Sox es altamente similar en cuanto a las propiedades de unión al DNA, reconociendo solo de 6-7 bp de DNA. Sin embargo una proteína sox individual parece interactuar selectivamente con un único repertorio de genes blanco.
2. Aunque el sitio blanco de un gen regulado por Sox, puede ser utilizado de manera similar por el autentico Sox y por otras proteínas Sox *in vitro*, sin embargo solamente la autentica proteína Sox puede regular ese gen *in vivo*.
3. La misma proteína Sox parece regular diferentes genes blanco dependiendo del tipo celular en el cual sea expresada.

Las proteínas Sox interactúan a través del dominio HMG el cual es una proteína de 79 a.a. en contraste con la mayoría de dominios de unión al DNA que tienen acceso al DNA a través del surco mayor, el dominio HMG es el único que interactúa con el surco menor de la doble hélice de DNA, y como consecuencia induce una dramática curvatura en la molécula del DNA.

Los genes que codifican para el dominio HMG tienen por lo menos el 50% de identidad en la secuencia de aminoácidos con SRY (Yusuke et al., 2000).

1.5 Factor de transcripción Sox 9

El gen que codifica para SOX 9 en humanos, se encuentra en el cromosoma 17q24.3-25.1, mientras que en el ratón se localiza en el cromosoma 11. En humano este gen codifica para una proteína de 509 a.a, el dominio HMG muestra 70% de homología en los a.a con respecto a HMG-box de SRY, El gen Sox 9 en ratón codifica para una proteína de 507 a.a. Las proteínas Sox se unen a la secuencia consenso AACAAAT, mutaciones en este gen en el caso de humanos causan sexo reverso y además severas malformaciones en el esqueleto, lo que origina un síndrome autosómico dominante conocido como displasia campomélica, el cual es un desorden caracterizado por la curvatura de los huesos largos (tibia, fémur), paladar hendido, malformaciones cardíacas, renales, retraso mental, etc. Los pacientes con displasia campomélica generalmente mueren por defectos respiratorios, este síndrome afecta 1 en 20 000 nacimientos (Vicent et al., 2003; Wegner, 1999).

Sox 9, es ampliamente expresado en el desarrollo del embrión, está involucrado en la esquelotogénesis, desarrollo del cerebro y determinación del sexo (Goslik et al., 2000). Sox 9, es un regulador clave en la condrogénesis y determinación del sexo (Josephine et al., 2000), se expresa en oligodendrocitos en la zona ventricular de la medula espinal en embriones de 10.5 a 16.5dpc (Stolt et al., 2005), juega un papel en corazón, riñón y desarrollo del cerebro, como lo demuestra el fenotipo de pacientes con displasia campomélica. Células carentes de Sox 9, no pueden formar condrocitos (Josephine et al., 2000).

El transcrito de Sox 9 y la proteína en ratón, fueron detectados de las células de Sertolli, ambas durante el desarrollo y el testículo adulto (Vicent et al., 2003).

Estudios de genes reporteros, ha mostrado dos regiones en el dominio carboxi-terminal de Sox 9 una rica en Pro, Glu y Ser y la otra rica en Pro, Gln y Ala las cuales se ha visto son necesarias para la función de tras-activación de esta proteína (Clarkson et al., 2002).

Por otra parte Sox 9 también se expresan en células C2C12 (línea celular derivada de músculo), se ha observado que su expresión es mayor en mioblastos que en miotubos. Sox 9 es regulado negativamente durante la diferenciación en la línea celular C2C12. Se sugiere que Sox 9 actúa como regulador negativo específico de la expresión de miogenina, probablemente mediante la represión de factores de transcripción miogénicos que pertenecen a la familia bHLH. Por otra parte la sobreexpresión de estos factores de transcripción (Sox 8 y 9) interrumpe la diferenciación de mioblastos en cultivo celular.

Se sugiere que estas proteínas actúan como represores de la diferenciación de músculo esquelético, ya que regulan de manera negativa la actividad del promotor de miogenina (miembro de los factores maestros determinantes de músculo MDFs) dependiente de MyoD. Debido a que dicho promotor no contiene sitios de reconocimiento para estos factores transcripcionales, se piensa que esta regulación se lleva a cabo por medio de la interacción de las proteínas Sox con MyoD o con la maquinaria basal de transcripción (Schmidt et al., 2003).

2. JUSTIFICACIÓN

La interacción de factores de transcripción (Sox 9) con secuencias reguladoras (promotor), desencadenan eventos que tienen como fin activar o reprimir un gen o grupo de genes, Sox 9 es regulado negativamente durante la diferenciación de la línea celular C2C12, lo que sugiere que este factor de transcripción actúa como regulador negativo durante la miogénesis, la región promotora del gen *sgca* posee tres sitios consenso de unión a Sox por otra parte la expresión del gen músculo específico α -SG aumenta durante la diferenciación miogénica lo que sugiere que la regulación de su expresión se da a nivel transcripcional, por lo tanto es importante elucidar la función de Sox 9 sobre la región promotora de α -SG, por lo cual es muy importante clonar tanto el factor de transcripción como la región promotora. El conocimiento de los mecanismos por los cuales los genes sarcoglicanos son regulados transcripcionalmente en músculo nos permite entender mejor como es el proceso que participa en el desarrollo de la distrofia muscular.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

◆ Clonar el factor de transcripción Sox 9 así como la región promotora del gen *sgca*, en los vectores pCDNA 3.1 y pGL3 respectivamente, con la finalidad de conocer su expresión en células C2C12.

3.2 Objetivos particulares.

◆ Clonar el cDNA de Sox 9, en el vector pCDNA 3.1, con la finalidad de ver su expresión sobre el promotor B de α -SG.

◆ Clonar la región de regulación transcripcional del gen α -SG, en el vector pGL3, con la finalidad de determinar su expresión, en células C2C12.

◆ Comprobar que la región clonada del gen *sgca* tenga efecto de promotor, durante el proceso de diferenciación de células de origen miogénico.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Extracción de RNA total

La extracción de RNA, se llevó a cabo a partir de embriones completos de 16.5dpc, mediante el método de extracción fenólica con TRIZOL. Una vez obtenidos los embriones a partir de la hembra, se colocaron en un mortero y se maceraron con nitrógeno líquido, por cada 100mg de tejido se agregó 1ml de Trizol (Reagent® Invitrogen™ Life Technologies), posteriormente se homogenizó en politrón, se centrifugó a 2500rpm 5', se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5ml, se agregó 200µl de cloroformo y se agitó por 15'', se incubó en hielo 5', después se centrifugó a 12000rpm 15' a 4°C, las fases se separaron después de centrifugar, se transfirió la fase acuosa (transparente) a otro tubo y se precipitó el RNA con 1Vol. de isopropanol, se incubó a 4°C por 15'. Posteriormente se centrifugó a 12000rpm 15' a 4°C, se extrajo el sobrenadante con micropipeta, y se lavo el RNA, 2 veces con etanol al 70%, se centrifugó 12000rpm 5' a 4°C, en cada lavado, después se dejó secar la pastilla y se resuspendió el RNA en 20-50µl de agua DEPC, se reservaron 5µl para ver en gel y cuantificar, el resto se precipitó con 0.1 Vol. de acetato de potasio 2M pH= 5.0 y 2 volúmenes de etanol absoluto y se almaceno a -70°C. Es conveniente cambiar de guantes varias veces y para preparar todos los reactivos se utiliza agua DEPC estéril.

4.2 cDNA

A partir del RNA obtenido se preparó el cDNA, para lo cual se descongeló el RNA en hielo, se tomó una alícuota equivalente a 2-3µg, se centrifugó a 12000rpm 15', se retiró el sobrenadante en caso de que hubiera, se lavo con 500-1000µl de etanol al 70% centrifugando a 12000rpm 10' en cada lavado y retirando el sobrenadante, se resuspendió en 5µl por cada 2-3µg en agua DEPC. Para realizar el cDNA se prepararon 2 tubos el tubo 1 contenía 5µl del RNA lavado, 0.5µl de random primers y 12µl de agua este tubo se llevó a 72°C por 3' en el termociclador, se sacó a los 3 minutos se puso en hielo y se agregó el contenido del tubo 2 (4µl de buffer 5x para RT, 1µl enzima transcriptasa reversa (RT), 10mmolar dNTP's, 0.1M dTT's), posteriormente se volvió a colocar en el termociclador 1 ciclo a 37°C por 60', un ciclo a 94°C por 6' y finalmente 4°C ∞.

4.3 Extracción de DNA

Se obtuvo a partir de músculo esquelético de ratones adultos, mediante el método de sales hipertónicas, para lo cual se maceró el músculo en un mortero con nitrógeno líquido y por cada 50-100mg de tejido se agregó 180µl de NaCl 5mM, se resuspendió y se agregó 95µl de SDS al 10%, se agitó vigorosamente, posteriormente se centrifugó 1500rpm por 1' se recuperó el sobrenadante y se repitió la operación, después se agregó 615.9µl de NaCl saturado, se recuperó el sobrenadante, se pasó a otro tubo y se centrifugó 10' a 14000rpm (se repitió 2 veces), posteriormente se recuperó el sobrenadante y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto, se incubó 5 minutos a T.A, después se lavó el precipitado 2-3 veces con etanol al 70% centrifugando cada vez 3-5' a 1500rpm, finalmente se resuspendió la pastilla en 50-100µl de agua estéril.

4.4 Amplificación de la región promotora del gen *sgca* y *Sox 9*

Se diseñaron distintos oligonucleótidos con el fin de amplificar, la región correspondiente tanto al promotor como al factor de transcripción, así como para la secuenciación de ambos, en base a las secuencias que se encuentran en el anexo A. Las secuencias de los oligonucleótidos (5' – 3') utilizados son las siguientes:

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación y secuenciación.

<i>Oligonucleótidos para amplificación del promotor α-SG</i>	
Pa1Fwd	TACTGGAGTGCTGACAGATGAC
PaFwd	TCCAACCATACTCTACAGAAG
PaRvs	GATATCAAGGTGATCTGGGCAC
<i>Oligonucleótidos para secuenciar el promotor α-SG</i>	
α -SGF1	AGCTCTTCCACTCGCCATCAG
α -SGR1	CACCCACATCTTTCTCCCTCC
α -SGF2	GGGGGATGCTATTTGTGATGG
α -SGR2	GCTTTCCAGGTGGCACAGTTC
α -SGF3	GAGAGGAAGAGATTGGCCAGG
α -SGR3	GAATCCCGCTAAGTGTGGCAT
α -SGF4	GTACACCACCACACCTAGCTC

<i>Oligonucleótidos para amplificación de Sox 9</i>	
Sox9Fwd	CCGGGCTCGCGTATGAATCT
Sox9Rvs	CTCTTCTCAGGGTCTGGTGA
<i>Oligonucleótidos para secuenciar Sox 9</i>	
S9F1	AAGACTCTGGGCAAGCTCTGG
S9F2	CAAGCTGGCAAAGTTGATCTG

a) Región promotora del gen sgca

En el caso de la región promotora del gen *sgca*, se utilizaron dos oligos forward Pa1Fwd, con el cual se obtuvo la región que se clono y PaFwd, para realizar algunas pruebas; con el primero se tuvo un fragmento de 3061bp (la región del promotor), con el segundo se obtiene un fragmento de 1800bp, los reactivos empleados en la reacciones de PCR fueron los siguientes:

Tabla 2. Reacción de PCR (α -SG 1800bp) y condiciones de amplificación.

<i>PCR para α-SG (1800bp)</i>	<i>IRxn.</i>	<i>Condiciones de amplificación</i>		
dNTP's	0.5 μ l			
Taq plat.	0.2 μ l	94°C	4'	
MgCl ₂	1.5 μ l	94°C	1'	} 30 ciclos
Buffer 10x	2.5 μ l	62°C	35''	
Pa Fwd	0.5 μ l	72°C	3'	
Pa Rvs	0.5 μ l	72°C	7'	
DNA	\leq 250ng	4°C	∞	
H ₂ O	cbp..25 μ l			

Tabla 3. Reacción de PCR (α -SG 3061bp) y condiciones de amplificación

<i>PCR para α-SG (3061bp)</i>	<i>1 Rxn 50μl</i>	<i>Condiciones de amplificación</i>	
Mix 1		1. 94°C	2min.
dNTP's	2.5 μ l	2. 94°C	10 seg.
Pa 1Fwd	1 μ l	3. 62°C	30seg
Pa Rvs	1 μ l	4. 68°C	3' 30''
DNA	\leq 250ng	5. Goto 2 Rep. 9	
H ₂ O	cbp ...25 μ l	6. 94°C	10seg
Mix 2		7. 62°C	30seg
Buffer 10x	5 μ l	8. 68°C	3' 30''
Taq. Exp.	0.75 μ l	+ 0.0°C + 0.20	R =3.0°/s + 0.0°/s
MgCl ₂	0.75 μ l	9. Goto 6 Rep. 19	
H ₂ O	cbp...25 μ l	10. 68°C	7min
Mix 1 + Mix 2		4°C	∞

Sox 9

En el caso del factor de transcripción el tamaño del fragmento amplificado fue de 1542bp, los reactivos utilizados fueron los siguientes:

Tabla 4. Reacción de PCR (Sox 9 1542bp) y condiciones de amplificación

<i>PCR para Sox 9 (1542bp)</i>	<i>IRxn.</i>	<i>Condiciones de amplificación</i>		
dNTP's	0.5µl	95°C	5min	
Go Taq.	0.2µl	95°C	45''	} 35 ciclos
MgCl ₂	1.5µl	59°C	40''	
Buffer 10x	2.5µl	72°C	1'30	
Sox9Fwd	1µl	72°C	7'	
Sox9Rvs	1µl	4°C	∞	
DNA	≤ 250ng			
H ₂ O	cbp25µl			

Después de tener el fragmento amplificado y purificado de Sox 9, así como del promotor, se purificó el plásmido utilizado. En el caso de Sox 9 el vector fue pCDNA 3.1N-myc y en el caso de α -SG fue pGL3, ambos se purificaron y cuantificaron espectrofotométricamente, posteriormente se realizó la desfosforilación, para lo cual se colocó 5µg de plásmido, 1µl de fosfatasa alcalina mas 4µl de Buffer 3, y se incubó por 30' a 37°C, posteriormente se agregó 1µl de fosfatasa alcalina mas 6µl de Buffer 3 y se volvió a incubar media hora mas, el mismo procedimiento se realizó para los 2 vectores por separado.

Una vez que se tuvieron tanto los insertos purificados como los vectores desfosforilados y purificados, se realizó la digestión enzimática para el promotor con Kpn1 y en el caso de Sox 9 con Xho1 y Xba1, una vez restringidos se realizó la reacción de ligación, como se indica a continuación.

4.4 Reacción de ligación y transformación.

$$(50\text{ng vector} * \text{pb inserto/ pb vector}) * (3\text{inserto}/1\text{vector}) = \text{ng de inserto}$$

Tabla 5. Reacción de ligación.

(inserto a clonar puro)		control de ligación (CL)
Vector	50ng	50ng
Inserto	ng de inserto	-----
Buffer 2 (1x)	cpb...10µl	10µl
Buffer 1	10µl	10µl
Ligasa T4	1µl	1µl
Total	21µl	21µl

Nota: El tamaño del pGL3 es de 4818bp (en este caso la relación inserto vector se aumentó 6:1), el tamaño de pCDNA3.1 N-Myc es de 5400bp y la relación inserto vector fue de 3:1.

Se dejó la reacción de ligación 10 min. a T.A, se descongelaron las células competentes (cel. Comp.) en hielo, posteriormente en una zona estéril se prepararon 5 tubos como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 6. Reacción de transformación

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
Inserto	CL	CT	CR	CN
50µl Cel. Comp.	50µl Cel. Comp.	50µl Cel. Comp.	50µl Cel. Comp.	50µl Cel. Comp.
+	+	+	+	
21µl inserto (ligado)	21µl CL	0.5µl de plásmido probado.	50ng vector	

Donde: CL= control de ligación, CT= control de transformación, CR= control de restricción, CN= control negativo.

Los 5 tubos se dejaron 20' en hielo, y posteriormente se les dió un choque térmico colocándolos a 42°C de 45 a 50'', después nuevamente 2' en hielo, en un zona estéril se les agregó 950µl de medio de cultivo LB sin antibiótico, posteriormente se dejaron en incubación hora y media a 37°C, pasado ese tiempo se plaqueo en cajas petri con LB más ampicilina (200µl por caja), finalmente se incubó a 37°C toda la noche con lo cual se obtuvieron clonas positivas, las cuales fueron probadas por PCR y restricción, como se indicó previamente (en la amplificación).

A partir de las clonas que resultaron positivas para Sox 9 por una parte y para el promotor por otro lado, se extrajo el plásmido que contenía el inserto, mediante una técnica llamada miniprep.

4.5 Obtención de DNA plasmídico (Miniprep)

Se preparó un cultivo de 4ml de LB + ampicilina (0.1 mg/ml) toda la noche a 37°C, a partir del cual se uso 1 ml para guardar un stock con glicerol a -80°C (ESTÉRIL), se colocó 1.5ml del cultivo en eppendorf (2), se centrifugó a 3000rpm por 5' a 4°C, después se removió el medio por aspiración, dejando el pellet bacteriano tan seco como fue posible, posteriormente se procedió a la lisis, para lo cual se resuspendió el pellet en 100µl de solución I (ver Anexo A) enfriada en hielo con vortex riguroso (completamente dispersado), se agregó 200µl de solución II (Anexo A) preparada al momento, se mezcló invirtiendo el tubo 5 veces. "NO VORTEX" se puso el tubo en hielo. Después de agregó 150µl de solución III, enfriada en hielo, se mezcló para dispersar la solución III a través del lisado viscoso bacteriano, se colocó el tubo en hielo de 3 a 5 minutos, se centrifugó a 12000 rpm por 5' a 4°C y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Se agregó 1 Vol. igual de fenol: cloroformo (\approx 400µl), se mezcló por vortex y centrifugó a 12 000rpm por 2' a 4°C y nuevamente de transfirió el sobrenadante a otro tubo, posteriormente se precipitó el DNA con 2 Vol. de etanol absoluto a temperatura ambiente (\approx 800µl) y se mezcló por vortex, dejando la mezcla por 2' a T.A. Se centrifugó a 12000 por 5' a 4°C, se removió el sobrenadante por aspiración y se colocó el tubo en posición invertida en una toalla, finalmente se lavó con 1ml de etanol al 70% a 4°C y se resuspendió en 50µl de H₂O de ampolla, se agregó 1µl de RNAsa 10min, a 37°C y se almacenó a -20°C.

A partir del miniprep, se realiza PCR y restricción para ambos insertos para observar la liberación del inserto (como se describió previamente) con lo cual se asegura que las bacterias contienen el plásmido, el cual a su vez posee el inserto. Posteriormente se realizó la secuenciación, colocando 60ng del plásmido que contiene el inserto (miniprep), 0.5 primer, 2 μ l de Byg dye, 0.5 μ l de H₂O, las condiciones de secuenciación fueron 1 ciclo 96°C 1', 35 ciclos 94°C 20'', 50°C 20'' y 60°C 4', finalmente 4°C ∞ .

4.6 Cultivo de células C2C12 y transfección.

Se sembraron aproximadamente 80,000 células de la línea C2C12 (mioblastos murinos) en pozos de 2.5 cm de diámetro, bajo condiciones de crecimiento (atmósfera húmeda a 37°C y 5.0% CO₂) en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10.0%. Después de 24 horas en medio de crecimiento, las células a un 40% de confluencia fueron transfectadas con promotor A α -SG y también Sox 9 + promotor B α -SG por separado y 100 ng del vector pRL/CMV que contiene a la luciferasa de *Renilla reniformis* como gen reportero para la normalización de los datos. A las 24 horas post-transfección, los mioblastos se cosecharon y lisaron con buffer de lisis pasiva (Promega).

Para establecer la funcionalidad de los sitios de reconocimiento Sox en el promotor de *sgca* se determinó la actividad de luciferasa mediante un sistema de ensayo dual de luciferasa en un luminómetro que consiste en una primera lectura de la actividad luminiscente específica generada por la construcción blanco, seguida de una degradación de la luciferasa responsable de esta luminiscencia (luciferasa *Photinus pyralis*) y una segunda lectura de la actividad luminiscente normalizante generada por el vector pRL/CMV. Las réplicas fueron inducidas a diferenciación al sustituir el medio de crecimiento por medio de diferenciación (DMEM suplementado con suero de caballo al 1.0%). La actividad de luciferasa fue evaluada en miotubos después de 4 días.

5. RESULTADOS

5.1 Extracción de RNA total a partir de un embrión de 16.5dpc.

Para Sox 9, se extrajo el RNA a partir de un embrión de 16.5dpc, mediante el método de trizol, y se corrió en un gel de agarosa al 1%, para ver la integridad del mismo. Después se procedió a cuantificarlo en el espectro, para realizar el cDNA, necesario para amplificar el factor de transcripción (*Fig. 6*).

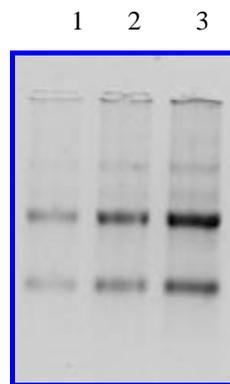


Fig. 6 Extracción de RNA, a partir de un embrión de 16.5dpc, se cargo 0.2µg (1), 0.5µg (2) y 1µg (3) respectivamente.

5.2 Amplificación del cDNA de Sox 9

A partir del cDNA se amplificó el mRNA, correspondiente al factor de transcripción Sox 9, con los primers citados en materiales y métodos, el tamaño del fragmento es de 1542bp, (*Fig. 7*). Es importante mencionar que previo a esta amplificación se realizó una prueba para comprobar que el cDNA estuviera bien sintetizado, para lo cual se utilizaron otros oligos que amplifican un fragmento de 532bp así como GAPDH (275bp) y un control negativo (dato no mostrado).

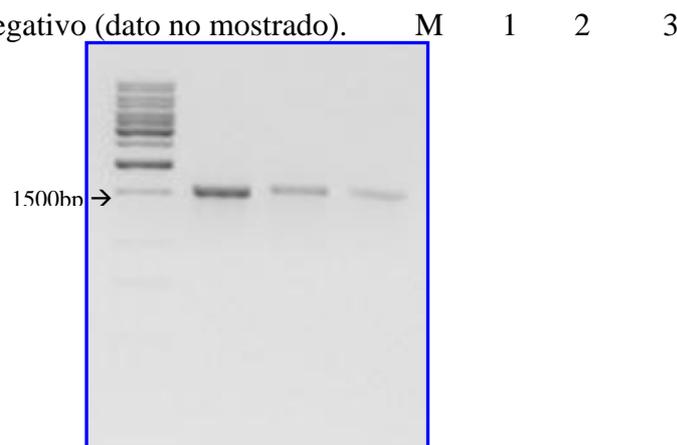


Fig. 7 Reacciones de PCR para Sox 9, en gel de agarosa al 1% (M) marcador de 1Kb, (1,2,3) PCR de Sox9.

5.3 Purificación, restricción y desfosforilación de pCDNA 3.1 N-Myc

Una vez que se obtuvieron suficientes amplificaciones para Sox 9, se purificaron y se realizó la digestión enzimática con Xho1 y Xba1, así mismo se realizó al mismo tiempo la digestión del plásmido pCDNA 3.1 N-Myc el cual tiene un tamaño de 5400bp. (Fig. 8).

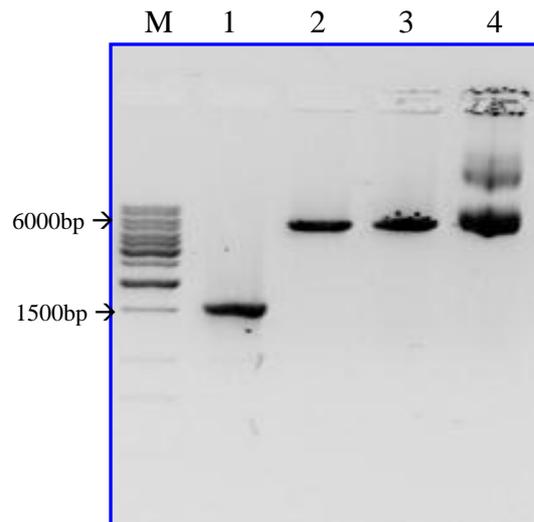


Fig. 8. Restricción de Sox 9; (M) marcador p.m (1Kb), (1) Sox 9 restringido con Xho1/Xba1, (2y3) restricción de pCDNA con Xho1/Xba1, (4) plásmido sin cortar.

5.4 Restricción y liberación del inserto (Sox 9)

Después de la restricción se purificó el inserto (Sox 9) y el vector (pCDNA 3.1 N-Myc), posteriormente se realizó la desfosforilación del vector y purificación; se cuantificaron fotométricamente así como con un marcador de masa, una vez obtenidas las concentraciones se procedió a la ligación y posteriormente a la transformación en *E. coli*.

A las 24 horas se obtuvieron 5 colonias las cuales fueron probadas por PCR, obteniendo amplificación del fragmento en todas, por lo cual se procedió a realizar el miniprep y a partir del cual se realizó nuevamente PCR. De las 5 colonias que se obtuvieron solo 4 amplificaron. Sin embargo, 3 presentaron bandas inespecíficas, como lo muestra la (Fig. 9).

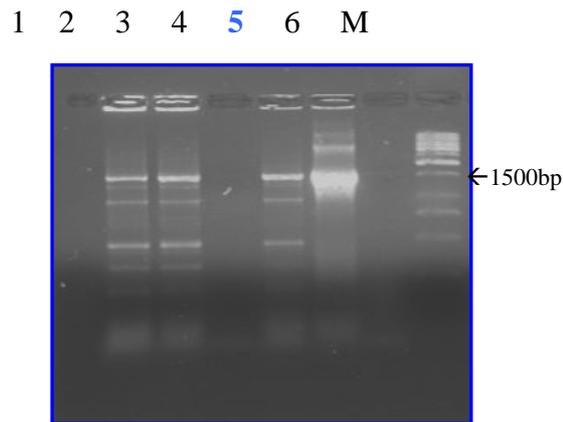


Fig. 9. PCR del miniprep de sox 9, clonas 1, 2, 3, 4, 5, (6) control negativo y (M) marcador 1Kb. (solo la clona 3 no amplificó, 1, 2 y 4 tienen bandas inespecíficas).

En base a los resultados anteriores, a partir del miniprep se realizó una doble restricción para liberar el inserto (Sox9) del vector que lo contenía se realizó este proceso para todas las clonas excepto para la 3 puesto que no amplificó, el resultado se muestra en la *Fig. 10*, lo cual demuestra que sólo una de las clonas liberó el inserto (clona 5), y las demás, solo contenían el plásmido sin inserto.

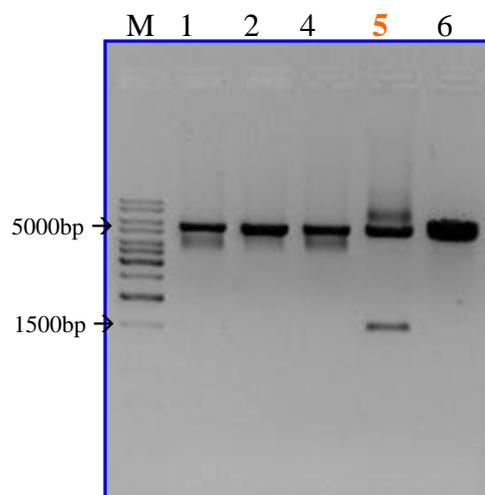


Fig. 10. Doble restricción (xho/xba1) para el miniprep de sox 9 solo la clona 5 liberó el inserto, (M) marcador 1Kb, Clonas de Sox 9, 1, 2, 4 y 5, el vector restringido con Xho1/Xba1.

5.5 Secuenciación del cDNA de Sox 9

Una vez que se observó la liberación del inserto el cual corresponde al tamaño esperado, se secuenció con lo cual se comprobó que efectivamente se había clonado el cDNA que corresponde al factor de transcripción y se corroboró estuviera en marco de lectura y además no tuvo ninguna mutación. En la *Fig. 11* se muestra una parte de la secuencia.

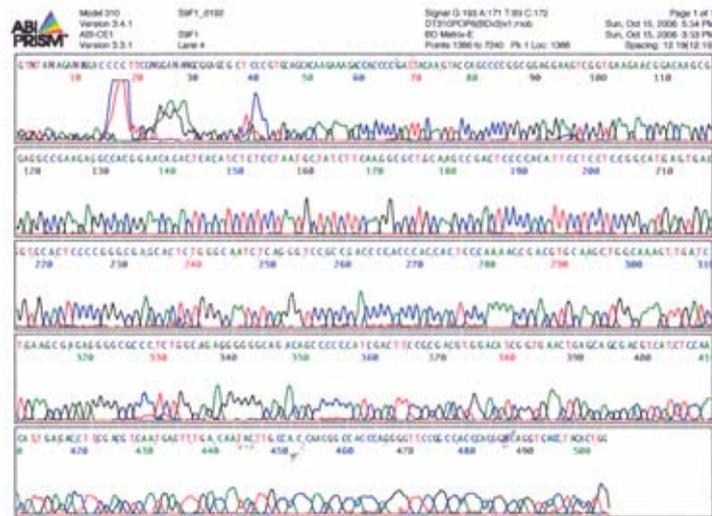


Fig. 11 Secuencia de Sox 9

5.6 Extracción de DNA de músculo esquelético de ratón adulto

En el caso del promotor α -SG, se realizó la extracción del DNA, a partir de músculo esquelético de ratones adultos (*Fig. 12*).

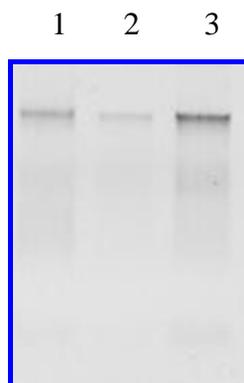


Fig. 12. Extracción de DNA de músculo esquelético, de ratones adultos (3 extracciones)

5.7 Amplificación de la región promotora del gen *sgca* (α -SG)

A partir de la extracción de DNA, se realizó la amplificación de la región promotora, utilizando los primers Pa1Fwd y Pa1Rvs, los cuales amplifican 3061pb. (Fig. 13).

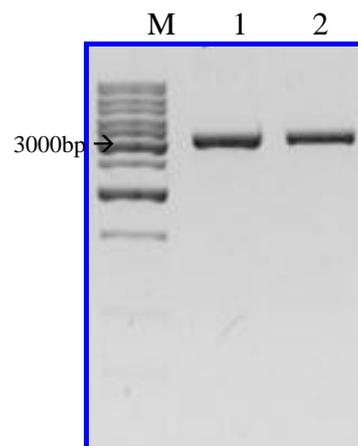


Fig. 13 Amplificación de la región promotora del gen *sgca* , en gel de agarosa al 1% (M) marcador de 1Kb, 1 y 2 PCR de α -SG.

5.8 Purificación restricción y desfosforilación de *pGL3*.

Una vez amplificado el promotor se purificó y se llevó a cabo la digestión enzimática con *Kpn1* lo mismo se realizó para el vector (*pGL3*). Después de la restricción se purificarón tanto el inserto (α -SG) como el vector (*pGL3*), y posteriormente se realizó la desfosforilación del vector.

Una vez desfosforilado el vector se volvió a purificar, y tanto el inserto como el vector se cuantificaron en el espectro y además con un marcador de masa, una vez que se tuvieron las concentraciones se procedió a la ligación, y posteriormente a la transformación en *E. coli*, a las 24 horas se obtuvieron muchas colonias de las cuales fueron seleccionadas al azar 12 colonias aisladas.

5.9 Análisis de la orientación de la región promotora de α -SG

Las colonias aisladas fueron probadas por PCR, sin embargo, debido a que se utilizó solo una enzima de restricción se tiene el 50% de probabilidad de que el inserto se una en sentido 5'-3' y el otro 50% de probabilidad de que se una en la posición invertida (3'-5'), por lo cual se amplificó utilizando el oligo reverso del vector con PaFwd, lo cual nos da un tamaño aprox. de 1800bp, las colonias que se amplificaron bajo esas condiciones se encontraron de 5'-3', mientras que las que no amplificaron tenían el inserto en posición invertida.

De las 12 colonias solo la colonia 1 no amplificó, lo cual nos indicó que se encontraba en sentido inverso a la transcripción (dato no mostrado), las colonias 2, 3, 4, 5,6, 9,10, 11, 12 amplificaron, sin embargo se observa que no todas tuvieron la misma eficiencia, en el caso de la colonia 6 se observó muy marcada la amplificación (*Fig. 14*).

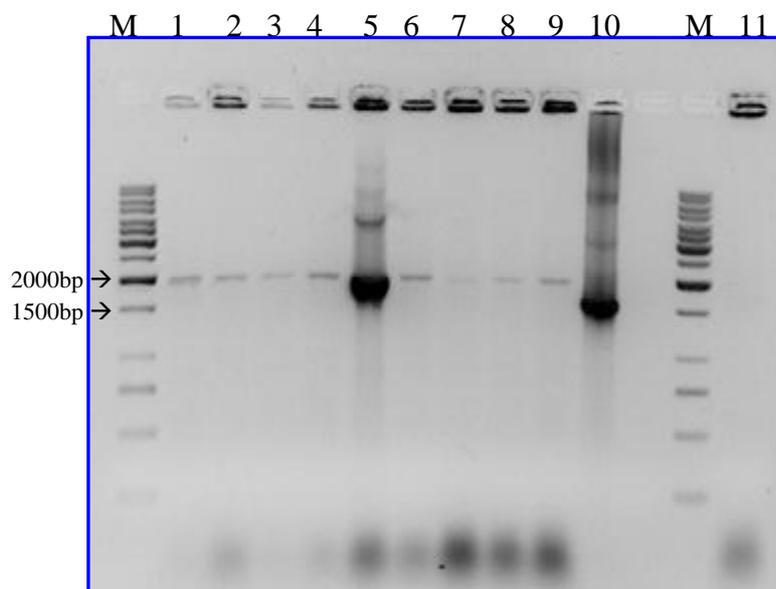


Fig. 14. Caracterización mediante PCR de colonias positivas a α -SG; (M) marcador p.m 1Kb, (1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) colonias 2, 3, 4, 5, 6, 9,10, 11, 12, (10) control positivo (1522bp), (11) control negativo, se utilizaron pa Fwd y glp2 (reverso del vector), para amplificar.

En base a estos resultados se tomaron las colonias 2, 3, 5, 6 y 9 para realizar el miniprep, a partir del miniprep se realizó PCR, de todas las colonias solo la clona 6 amplificó indicando que tiene el inserto en posición 5'-3' (*Fig. 15*).

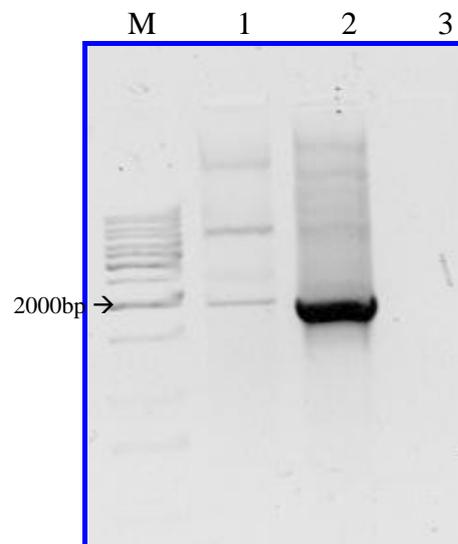


Fig. 15. PCR a partir de miniprep para verificar la orientación del inserto; (M) marcador p.m, (1) miniprep clona 2, (2) mini de clona 6, (3) control negativo se utilizaron los oligos paFwd y Glp2, la clona 6 tiene el sentido de 5'a 3'.

5.10 Restricción y liberación del inserto (α -SG)

A partir del miniprep se realizó PCR, para verificar que el plásmido tuviera el inserto y además estuviera en la orientación correcta. Posteriormente se realizó la restricción con Kpn1, para liberar el inserto (α -SG), del vector, el cual solo fue liberado por la clona 6. (*Fig. 16*).

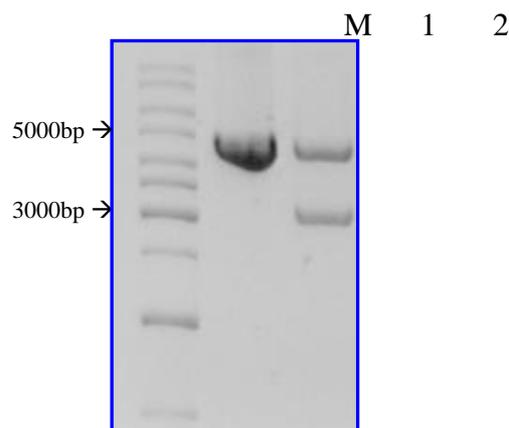


Fig. 16. PCR para liberar el inserto de α -SG; (M) marcador p.m 1Kb, (1), clona 2 de α -SG (no libero el inserto), (2) clona 6 de α -SG (libero el inserto).

5.11 Secuenciación de la región promotora (α -SG)

Una vez que se observó la liberación del inserto el cual corresponde al tamaño esperado(3061bp), se secuenció, con lo cual se comprobó que efectivamente se había clonado la región promotora del gen *sgca* que corresponde promotor α -SG (Fig. 17).

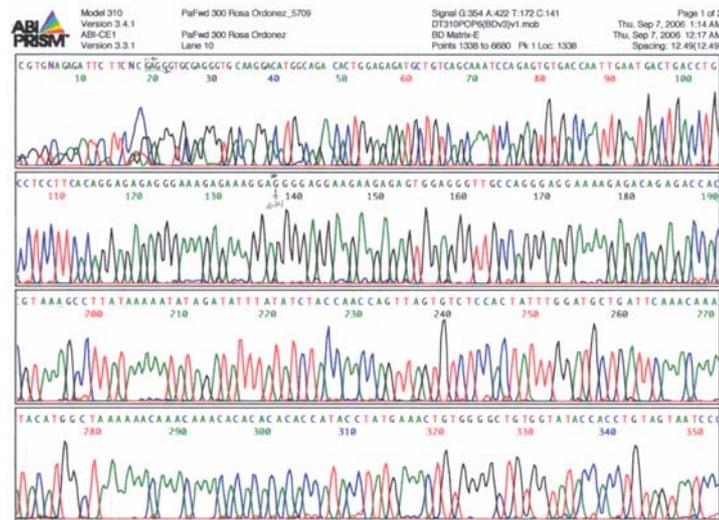


Fig. 17. Secuencia del promotor α -SG.

5.12 Transfección de la región promotora y de Sox 9 en la línea celular C2C12.

Una vez clonados tanto el factor de transcripción como la región promotora, el siguiente experimento fue verificar que la región clonada tuviera efecto como promotor y ver la acción del factor de transcripción sobre un promotor previamente clonado (*asg2*), para lo cual, primeramente se sembraron mioblastos de una línea celular C2C12 hasta 40% de confluencia, posteriormente se indujo la diferenciación a miotubos (Figs. 18 y 19). Después se realizó la transfección del promotor en etapa de mioblastos y se siguió la expresión de este promotor mediante el ensayo de luciferasa, por 10 días comprobando que efectivamente tiene actividad como promotor, lo cual lo demuestra la

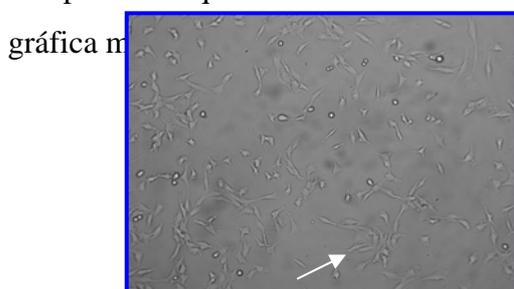


Fig. 18. Mioblastos de la línea celular C2C12

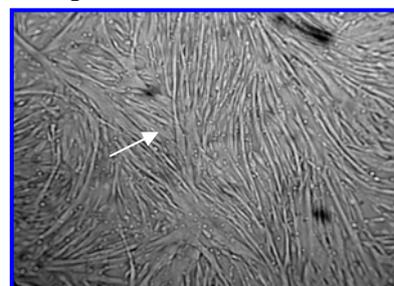


Fig 19. Miotubos de la línea celular C2C12

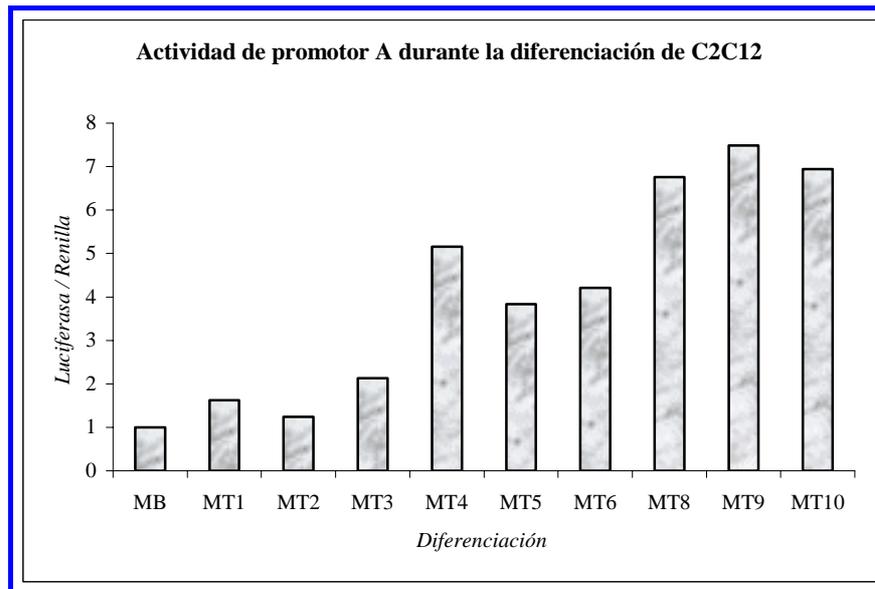


Fig. 20. Transfección de promotor de α -SG, en la línea celular C2C12, MB= mioblastos, MT= miotubos.

Por otra parte se transfectó Sox 9 junto con asg2, y se observó que reprime la expresión de este promotor, por lo cual se puede sugerir que actúa como regulador negativo de la expresión en mioblastos sin embargo es necesario realizar más pruebas (Fig. 21).

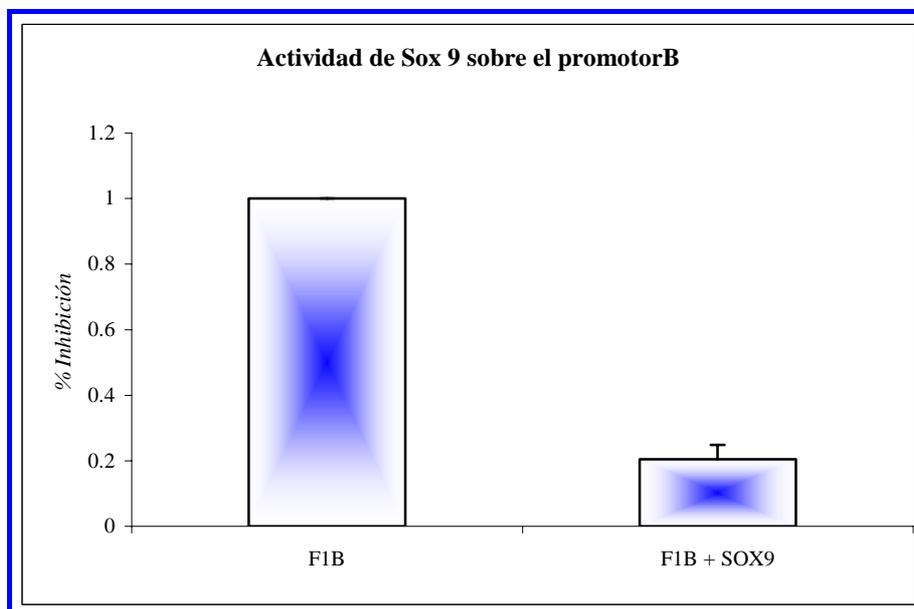


Fig. 21. Gráfica de la transfección del promotor B de α -SG, y transfección del promotor más el factor de transcripción, en la cual se muestra que reprime la expresión de este promotor. F1B = promotor B de α -SG, Sox 9 + F1B = transfección de ambos.

6. DISCUSIÓN

Los sarcoglicanos son un grupo de cuatro proteínas transmembranales los cuales forman parte del complejo de proteínas asociadas a distrofina, las mutaciones en los sarcoglicanos son responsables de cuatro formas de distrofia muscular de cintura (Chan Yiu-mo et al., 1998). α -SG es un componente del complejo sarcoglicano-sarcospan, mutaciones en el gen α -Sarcoglicano, se ha demostrado causa distrofia muscular de cintura tipo 2D (LGMD 2D) (Yoshida et al., 2000; Delgado-Olguín et al., 2004; Betto, 1999).

El conocimiento de los mecanismos por los cuales los genes sarcoglicanos son regulados transcripcionalmente en músculo nos permite entender mejor como es el proceso que participa en el desarrollo de la distrofia muscular (Delgado-Olguín et al., 2006).

En estudios previos, se reportan 2 transcritos para el gen α -SG, cuya expresión es promovida por dos promotores independientes, uno localizado hacia 5' del exón 1 (asg1, promotor A) y otro hacia 5' del exón 2 (asg2, promotor B) (Delgado, 2005), En uno de estos estudios se observó que 1.5 Kb del promotor A presento una muy baja actividad promotora durante la diferenciación de las células musculares. Sin embargo, no se tomaron en cuenta secuencias más hacia el extremo 5' del exón 1. En base a un análisis por computadora se ha observado la presencia de secuencias que podrían ser importantes para controlar la expresión del gen α -SG, es por ello que se clonaron 3 kb aprox. del mismo promotor debido a que el análisis de la secuencia demuestra que rio arriba de 1.5kb se encuentran secuencias consenso para factores de regulación miogénica, lo cual sugiere que en la regulación de este promotor intervienen los factores de regulación miogénica, por lo cual lo primero que se realizó fue la extracción de DNA (*Fig. 12*) a partir de músculo esquelético de ratón adulto, puesto que el gen α -SG, se expresa durante la etapa embriogénica y continua su expresión en la etapa adulta.

En base a los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia que se muestra en el anexo A, se amplificó la región correspondiente a 3061 bp (*Fig. 13*), posteriormente se realizó la transformación en bacterias *E. coli*, el inserto se clonó en el vector PGL3 ya que este vector posee el gen reportero luciferasa (LUC), el cual nos permitió realizar posteriormente ensayos de transfección para poder observar como es el comportamiento de este promotor en células C2C12.

Para comprobar que la región amplificada realmente correspondiera a la región del promotor se realizaron restricciones para liberar el inserto y la secuenciación de la región clonada, con lo cual se verificó que efectivamente se clonó α -SG, sin embargo es necesario comprobar que tiene actividad como promotor por lo cual se transfectó en células C2C12, una línea celular muy utilizada para estudiar procesos miogénicos, como se puede observar en la gráfica 20, donde conforme pasan los días de diferenciación hay un incremento en la actividad del promotor en la línea celular lo cual nos demuestra que efectivamente tiene actividad como promotor.

Los factores de transcripción reconocen secuencias nucleotídicas en el DNA principalmente en las regiones promotoras de un gen, para poder ver el efecto de estos factores sobre su secuencia blanco fue necesario clonarlo, en el trabajo se realizó la clonación del cDNA de Sox 9, por lo cual lo primero fue la extracción de RNA de embriones de 16.5 dpc, es necesario a esa edad puesto que en general las proteínas Sox solo se expresan en ciertos estadios de diferenciación, en particular Sox 9 se ha reportado su expresión en embriones de 10.5 –16.5 dpc, una vez que se obtuvo el cDNA, se procedió a la amplificación del factor con los oligos citados en materiales y métodos, el tamaño obtenido fue de aprox. 1500 bp, lo cual era lo esperado. Sin embargo, al igual que en el caso del promotor para comprobar que realmente se clonó lo esperado, se encontrara en marco de lectura y no presentase ninguna mutación, se procedió a realizar dobles restricciones puesto que en este caso dos enzimas flanquean el sitio donde se insertó Sox 9, una vez observada la liberación del inserto se procedió a secuenciar, con lo cual, se comprobó que efectivamente se trataba del factor de transcripción y el cuál no presentó ninguna mutación.

Por otro lado el otro transcrito reportado para el gen α -SG (asg2, promotor B), ya ha sido clonado y caracterizado por lo cual se decidió realizar la transfección de Sox 9 junto con este promotor, además se sabe que posee 3 sitios consenso para Sox, en estudios previos se demostró que al parecer ejerce una regulación negativa sobre este promotor, al realizar los ensayos correspondientes se observó que efectivamente reprime la expresión del promotor B, lo cual sugiere que Sox 9 tiene efecto como regulador negativo en mioblastos de la línea celular C2C12 al ser transfectado junto con el promotor B.

CONCLUSIONES

- ✓ Se logró la clonación de la región promotora del gen *sgca* y se demostró mediante el ensayo dual de luciferaza que efectivamente tiene actividad como promotor.
- ✓ Así mismo se obtuvo la clonación del factor de transcripción Sox 9, comprobándose además que tiene efecto como regulador negativo sobre la expresión del promotor B de alfa sarcoglicano.
- ✓ Los resultados indican que con este sistema se abre la posibilidad de continuar con el estudio de diferentes factores de transcripción sobre los promotores A y B de alfa sarcoglicano.

8. ANEXO A

Sox 9 (mRNA 5'– 3')

```

1 ccacgcgtcc ggagcgtgc tcggaactgc ctggaaactt ctgtgggagc gacaacttta
61 ccagtttcag tccaggaact tttctttgca agagagacga ggtgcaagtg gccccggttt
121 cgttctctgt tttccctccc tctcctccg ctccgactcg ctttccccgg gtttagagcc
181 ggcagctgag acccgcacc cagcgcctct gctaagtgcc cgccgccgca gcccggtgac
241 gcgccaacct ccccgggagc cgttcgctcg gcgtccgcgt ccgggcagct gagggaagag
301 gagccccagc cgccgcggct tctcgccttt cccggccacc cgccccctgc cccgggctcg
361 cgtatgaaatc tcctggacc cttcatgaag atgaccgacg agcaggagaa gggcctgtct
421 ggcgccccca gcccaccat gtcggaggac tcggctggtt cgccctgtcc ctcgggctcc
481 ggctcggaca cggagaacac ccggccccag gagaacacct tccccagggg cgagccggat
541 ctgaagaagg agagcgagga agataagttc cccgtgtgca tccgcgaggc ggtcagccag
601 gtgctgaagg gctacgactg gacgctggtg ccatgccccg tgcgcgtcaa cggctccagc
661 aagaacaagc cacacgtcaa gcgacccatg aacgcettca tgggtgtggc gcaggctgcg
721 cgcaggaagc tggcagacca gtaccgcgat ctgcacaacg cggagctcag caagactctg
781 ggcaagctct ggaggctgct gaacgagagc gagaagagac cttcgtgga ggaggcggag
841 cggctgcgcy tgcagcaca gaaagaccac cccgattaca agtaccagcc ccggcggag
901 aagtcggtga agaacggaca agcggaggcc gaagaggcca cggaacagac tcacatctct
961 cctaagtcta tcttcaagcc gctgcaagcc gactccccac attcctcctc cggcatgagt
1021 gaggtgcact ccccgggcga gcaactctgg caatctcagg gtccgcccgc cccaccacc
1081 actcccaaaa ccgacgtgca agctggcaaa gttgatctga agcagagagg gcgcccctctg
1141 gcagaggggg gcagacagcc ccccatcgac ttccgcgacg tggacatcgg tgaactgagc
1201 agcgacgtca tctccaacat tgagaccttc gacgtcaatg agtttgacca atacttgcca
1261 cccaacggcc acccaggggt tccggccacc cacggccagg tcacctacac tggcagttac
1321 ggcacagca gcaccgcacc caccctgcy accgcccggc acgtgtggat gtcgaagcag
1381 caggcgcgc cccctcctcc gcagcagcct ccgaggccc cgcaagcccc acaggcgcct
1441 ccgacagcgc aagcaccccc gcagcagccg caggcaccac agcagcagca ggcacacacg
1501 ctaccacgc tgagcagcga gccaggccag tcccagcgaa cgcacatcaa gacggagcag
1561 ctgagcccca gccactacag cgagcagcag cagcactccc cgcaacagat ctctacagc
1621 cccttcaacc ttctcacta cagcccctcc tacccgccc tacccgctc gaatacagc
1681 tacgctgacc atcagaactc cggtcctac tacagtacg cagccggcca gggctcaggg
1741 ctctactcca ctttactta catgaacccc gcgcagcgcc ccatgtacac ccccatcgct
1801 gacacctccg ggtcccttc catcccgcag acccacagcc cgcagcactg ggaacaacca
1861 gtctacacac agctcaccag accctgagaa gagaaaagct atggtagac agctgatctt
1921 tttttttttt tttttaaaga agaaaagaaa gaaacgaaa gaaaagctg aagaaatcaa
1981 gaaccaattg aaattccttt ggacactttt tttttgtct atcgtaatt ttaaagaca
2041 tgtaaaggaa ggtaacgatt gctgggattc caggagagag actttaagac tttgtctgag
2101 ctcatgacaa catattgcaa atggccgggc cactcgtggc cagacggaca gcactcctgg
2161 ccagatggac ccaccagtat cagcgaggag gggcttgtct cttcagagt taacatggag
2221 gacgattgga gaatctccct gcctgtttg actttgtaat tattttttag ccgtaattaa
2281 agaaaaaaaa agtcctctgt gaggaatatt ctctatttta aatacttta gtatgtactg
2341 tgtatgactc attaccattt tgaggggatt tatacatatt ttagataaaa aaagttaaat
2401 gctcttattt ttccaacagc ttaactactc ctagtccaag agtgtccctt agccttctt
2461 gcaaccagag tatttttgta cagatttgct ttctcctaaa caaacaacaa aaaacaaaa
2521 caaaaaaaaa aaaaaa

```

Promotor A de alfa sarcoglicano. (5' a 3').

1 TACTGGAGTG CTGACAGATG ACAGGTGGGT GAGGAAACTA ATTATTATTT CTAACCACCT
61 ACCCCCTACA GGGAGTCCTT CTCCCTGTTT TTTTTTTTTTA AAAAAAAAAA AAGTAAATTT
121 TCTGGATAGG GAAATGGACG ACATGCGCGA TAGGCTTGTG GCCCTTAAGT GTCCCTCCTGT
181 GTCGCTCGGC TAACAGCGGG GTCTAGCACG CATGCCCTTT GGTCATACTT TCCCAGCCTG
241 GAAGTGGGCG CTGCGCAGGC CTCGCTCCTC CCAGCTCTTC CACTCGCCAT CAGCCCCGTT
301 GTTGCGCAAG CGCAGGGACG GCTGGAGCCT GTGAAGGCGC CCTCTCGTGG TGGACTGACC
361 CAGTTGCACT CTTTGTGTGT GCTCTGGGGG CGGGGAAGAG GAGGGAGAAA GATGTGGGTG
421 GAGTTTGGGA GGCAGGAGCC AGAATCAGAT CACAATGATG AGAAAGCCGT TCCTTTGTCC
481 CTGACAAAAG CGCATAATAT GCGTTTCGGA TG TAGATGAA GAAATATGCC CCTTAGAGAT
541 CAAGAGGGAG ACTAGAAGAG AATGAGACTG TAGAGAGACG ATGTTTTTCAT TCAGGCATGA
601 TGCATTCAAT CATTCAATCA TTCATTCAAT ATTCTCTGGG GTGGACAGAT GGGATAGGAA
661 GCTGGTCGCC TAATGAGGAG GGCAATGAGG AAAAAGCCCC TGCTAGCAAA GAGTGGCGGG
721 GGCAGGGGGA GGGGAGCAGA GGGGAAGCCC CAATTGAGCT TGCTAGGATA AACAGCTAC
781 CTGACCCATT CCTGACTACT TGCTCTGACT GATGAGGACT AAATAAATAA AGAATTAATA
841 GTGGACACC CTGAACACCA GGGGGATGC TATTTGTGAT GGATCGAAGC AATCACATAT
901 GTTTAAACCG TAAAGTAATG CTTATATTAC TAACAAAAAC AAAGATGCTA ATTGTCACA
961 GTTTGGAGGA TGCTGGGAAA TCAACCCGTT ATTTTGAAAC CGGTGTATTT AGATATGGAA
1021 AGAATTGAGC ATTTACACCC TTTCCTATAT GAACTGTGCC ACCTGGAAAAG CAAATTATGA
1081 GGGCAATTTT TCTGTCTGGC TGTATTCCAA CTGCTGAGAG AGAGTGGCAG AATTTGAGTA
1141 TCACCATTTT GCAAGGCAGA ATGGCAAAAA CTGTAAAGAC TGACTGTACA CACTGCGCCT
1201 CCAGATAAAG AGCCTATCCC CAACTATAAA GTGGGCTTGC AGAAGAAGGA ACCTAAATAC
1261 GGCCAATCT CTAGATCCAA CCATACTCTA CAGAAGATAG CGGTGTCCAG AGAATTCAT
1321 TCGAGGAGGG TGCGAGGGTG ACAAGGACAT GGCAGAACAC TGGAGAGATG CTGT CAGCAA
1381 ATCCAGAGTG TGACCAATTG AATGACTGAC CTGCCCTCCT CACAGGAGAG AGGGAAAGAG
1441 AAAGGAGGGG AGGAAGAAGA GAGTGGAGGG TTGCCAGGGA GGAAAAGAGA CAGAGACCAC
1501 GTAAAGCCTT ATAAAAATAT AGATATTTAT ATCTACCAAC CAGTTAGTGT CTCCACTATT
1561 TGGATGCTGA TTCAAACAAA TACATGGCTA AAAAACAAAAC AAACACACAC ACACCATACC
1621 TATGAAACTG TGGGGCTGTG GTATACCACC TGTAGTAATC CCATTACTGA GACTGAGGCA
1681 AGAGGACCCT GAGTATCAAA CCAGCAAGAG CTACATAGTT AGACCTGTCT CAAAGAGAAA
1741 AAAGAAAAGCA AAAGACACTG AAAAATTAGG CAAATACCAA GGCATGAGCC CACAGTCCCA
1801 GGTATTTGGG AAGCTGAGGC AGAAGAGTCC CTTAAACCCA AGAGTTCAAG GTTAATGTGG
1861 GTGTCATAAG GCCCAGTGTG TCACAGAATG AAGAAAGATG GAATTTACAA GAGACTGGAA
1921 ATCAACAGAG GGAAGCTTGA TAATTGATAA TCCCTCAAGA TTATGTGTAA AGAGAAAGAG
1981 TCCTTCTCTT TAAAAGATAT GCACTGAGAG ACTGACAGAT GAAATTAAT GGGAGACAGA
2041 ATCTGGAAAA AGAGAGAGAG GAAGGATTG GCCAGGAGCT GATAATTGTT GAAGCCGAGT
2101 AATAGATTTA TAAGGCTCAT TTATTATTCT GTGCATGTTA AAACATTTTT TTTTCATTTA
2161 GTGTATATAT AGGTGTGAGT GTATGCCACA CTTAGCGGGA TTCCCCAGAG CTGGAGTTAC
2221 AGGTGAGTGT GAGCTGCCTG TGTGTGCTGG GAACTGACCT CTGGAAGGAC ATCAAGTGCT
2281 CCCAACTTCT GAGGCCTCTC TCCACCCTCC CTTTTGAAAC AGGGTCTCAG TATGCAGCTC
2341 TGACTGGCCT TGAACCTGCA GAGATCTGCC TGCCTTTGCC TCCTTTGTGC TGGGACTAGA
2401 GTACACCACC ACACCTAGCT CTACTTTTCT AAAACAAGG CAAAACAAAAC AGAATAAAT
2461 AAAA ACTTCC TGAATGGGGG CTGGAGAGAT GGCTCAGCGG TTAAGAGCAC TGACTGCTGC
2521 TATTCCAGAG GTCCTGAGTT CAAAACCTGC CTCACAACCA TCTGTAATGA CATCTGATGC
2581 CCTCTTCTGG TATGTCTGAA GACAGCTACA GTGTACTTAT ATATAATAAA TAAATCTAAA
2641 ACAACAAAAA ACAAAAAAAC ACCACCAACA AAAAAATCTT CCTGAACAAA AAAC TTAAGG
2701 ACTCTGAGAC ACCTTTCCAG TCCCTAAGCC CCAAAGCCCT GAAGTTTCTT GGTGACCTGG
2761 GAGCTCTGTG GGGTCTCCAG TAGATTCCCTG GCATGATCTC TGACTCTCCT GAACTGGGAG
2821 TGCTCTTGGG AAAGATCAGA AGAGAAATAT GGTATAGCT TTTCCATTGA GGGAGGCCGG
2881 CCTTTGTGGA CCTTTGTGTT TTGTGAGTAG GTAACACTGG GACACACTTT GCCTTAACAC
2941 AGCCAAGAGT GTGATCTAAG GATACAAAA ATAGCAGGAA GGCAACAGGG GAGGGTGTCA
3001 CACCGGAGGC TCAGGGGCAG GGTAGGGACA TCTGCTAACT TTGCACCTG CGAGTGCCTT
3061 CTA CTCTTGC TCTGCCCTA AACCCTTCT CTCGATCCTC CATCTCAGAG AAGGCAGGAG
3121 ATATCAAGGT GATCTGGGCA CA

Preparación de soluciones para miniprep.

Solución I.

- 50mM glucosa
- 25mM Tris.Cl pH 8.0 ajustar con HCl
- 10mM EDTA pH 8.0
- Preparar 100ml
- Esterilizar en autoclave.

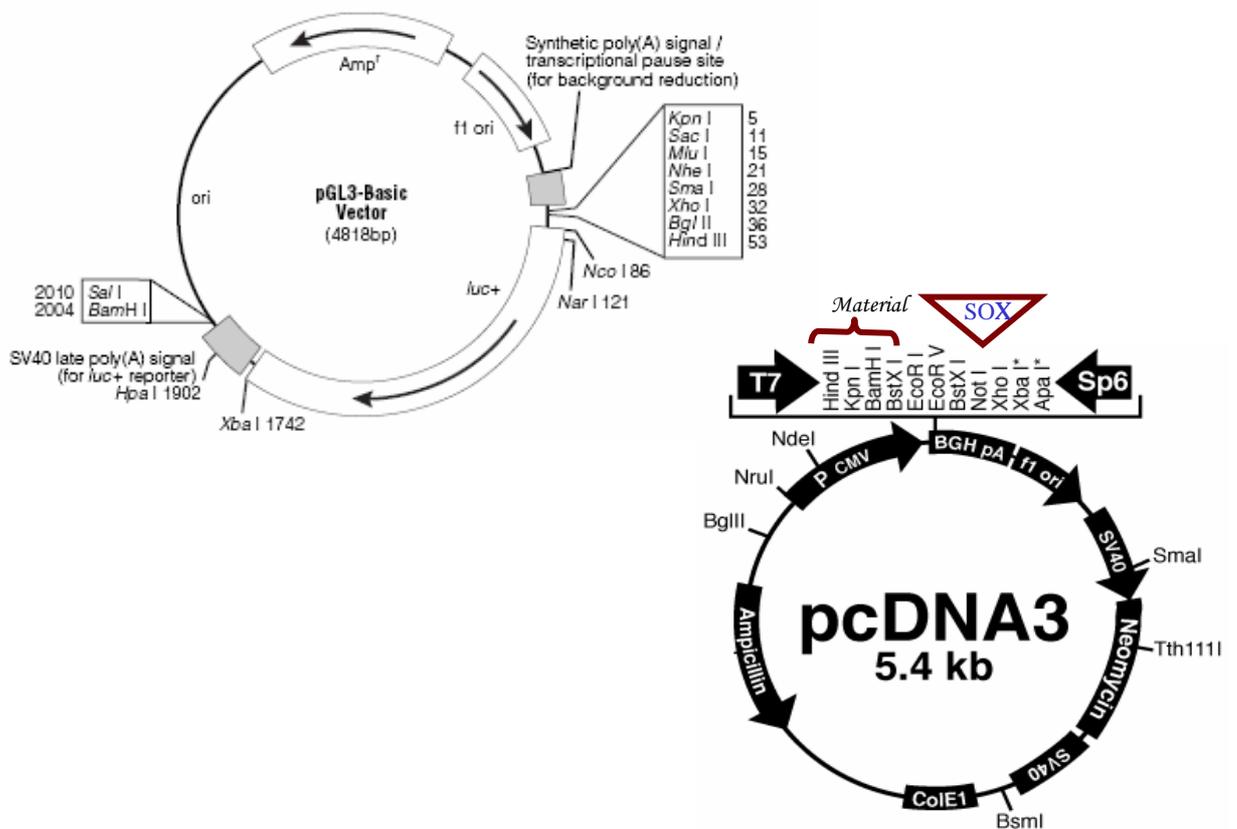
Solución II

- 0.2N NaOH (Stock 10N)
- 1% SDS (Stock 10%)
- Preparar en el momento.

Solución III

- 5M Acetato de potasio 60ml
- Ácido acético glacial 11.5ml
- H₂O 28.5 ml

Vectores utilizados en la clonación del cDNA de Sox 9 y la región promotora del gen sgca.



ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
a.a	Aminoácidos
bHLH	Basica helice asa helice
bp	Pares de bases
C2C12	Línea celular derivada de músculo (mouse myoblast cell line)
C-terminal	Carboxilo terminal
DEPC (agua)	Dietil pirocarbonato
DGC	Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dpc	Días post coito
DTT	dithiothreitol
ECM	Extracellular Matrix (Matriz extra celular)
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína verde fluorescente
HMG-box	Grupo de alta movilidad (High mobility group)
LGMD 2D	Limb girdle muscular dystrophy type 2D (Distrofia muscular de cintura)
LUC	Luciferasa
mdx	Distrofia muscular experimental
µg	Microgramos
µl	Microlitros
mM	Milimolar
MRFs	Factores de regulación miogénica
mRNA	RNA mensajero
MyoD	Determinación del gen de mioblastos numero uno
ng	Nanogramos
nNOS	Sintasa de óxido nítrico neural
N-terminal	Amino terminal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa Inversa
SG	Sarcoglicano
SG's	Sarcoglicanos
sgca	Gen murino que codifica para la subunidad alfa de los sarcoglicanos
SRY	Factor determinante de testículo
T.A	Temperatura ambiente
Vol.	Volumen

9. REFERENCIAS

Andrew A. Hack, et al, 2000, *Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex*, Journal of Cell Science, pp. 2535-2544.

Andrew H. Ahn, et al, 1996, *The three Human Syntrophin Genes Are Expressed in Diverse Tissues, Have Distinct Chromosomal Locations, and Each Bind to Dystrophin and its Relatives*, The journal of biological chemistry, **Vol. 271**, (5), pp. 2724- 2730.

Betto Romeo, 1999, *Ecto-ATPase Activity of α -Sarcoglycan (Adhalin)*, The journal of Biological Chemistry, **Vol. 274**, (12), pp. 7907-7912.

Chan Yiu-mo, et al, 1998, *Molecular Organization of Sarcoglycan Complex in Mouse Myotubes in Culture*, The journal of Cell Biology, **Vol. 143**, (7), pp. 2033-2044.

Clarkson Michael J, et al, 2002, *Sex with two SOX on: SRY and SOX9 in testis development*, Trends in Endocrinology & metabolism, **Vol. 13**, (3). pp. 106-111.

Crosbie Rachelle H., et al, 2000, *Molecular and genetic characterization of sarcospan: insights into sarcoglycan-sarcospan interactions*, Human Molecular Genetics, **Vol. 9**, (13) pp. 2019-2027.

Crosbie Rachelle H, 1998, *mdx muscle pathology is independent of nNOS perturbation*, Human Molecular Genetics, **Vol. 7**, (5), pp. 823-829.

Daniel E, et al, 2003, *Dystrophin-Glycoprotein Complex: Post-translational Processing and Dystroglycan Function*, The journal of Biological Chemistry, **Vol. 278**, (18), pp. 15457-15460.

Davies KE, et al, 2006, *Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players*, Nat Rev Mol Cell Biol, **Vol.7**, (10), pp.762-73.

Delgado Olguín Paul Demian, 2005, Tesis doctoral, *Caracterización de la región promotora del gen sarcoglicano α* , pp 8-60.

Delgado-Olguín Paul, et al, 2004, *NF1-C2 negatively regulates α -sarcoglycan promoter activity in C2C12 myoblast*, BBA, 2004, pp. 1032-1039.

Delgado-Olguín Paul, et al, 2006, *Partial characterization of the mouse α -sarcoglycan promoter and its responsiveness to MyoD*, BBA, pp. 240-246.

Ervasti James M, 2006, *Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy*, BBA, pp. 1-10.

Franck Duclos, et al, 2006, *Progressive Muscular Dystrophy in α -Sarcoglycan-deficient Mice*, The journal of Cell Biology, **Vol. 142**, (6), pp. 1461-1471.

Goslik E. Schepers, et al, 2000, *Cloning and characterization of the Sry-related transcription factor gen Sox8*, Nucleic Acids Research, **Vol. 28**, (6), pp. 1473- 1480.

Harley E. A. Bicas, et al, 2004, *Miogenic satellite cells*, Arq Bras Oftalmol, **Vol. 67**, (4), pp. 681-687.

Hernández Stengele, G, 2004, Tesis licenciatura, *Identificación de transcritos del subcomplejo sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN) y localización de la proteína sarcospan en el tejido adiposo parametrial de rata.*, UDLA, pp. 1-70.

Josephine Bowles, et al, 2000, *Phylogeny of the Sox family of Developmental Transcription Factors Based on Sequence and Structural Indicators*, Developmental Biology Academic Press, **Vol. 227**, pp. 239-255.

Kenji Araishi, et al, 1999, *Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in β -sarcoglycan-deficient mice*, Human Molecular Genetics, **Vol. 8**, (9), pp. 1589-1598.

Koutarou Hayashi, et al, 2005, *Sarcospan: Ultrastructural localization and its relation to the sarcoglycan subcomplex*, micron, pp. 591-596.

Michihiro Imamura, et al, 2005, *ϵ -Sarcoglycan compensates for lack of α -sarcoglycan in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy*, Human Molecular Genetics, **Vol. 14**, (6), pp. 775-783.

Oak Shilpa A, et al, 2001, *Mouse α 1-syntrophin Binding to Grb2: Further Evidence of a Role for Syntrophin in Cell Signaling*, Biochemistry, **Vol. 40**, pp. 11270-11278.

Orphanides George, et al, 2002, *A Unified Theory of Gene Expression*, Cell Press, **Vol. 108**, pp. 439-451.

Perry Robert L. S, et al, 2000, *Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation*, Frontiers in Bioscience, pp. 750-767.

Recillas Targa Félix, et al, 2004, *Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica*, UNAM, México, pp. 173-200.

Robert L.S Perry, et al, 2000, *Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation*, frontiers in Bioscience, **Vol. 5**, pp. 750-767.

Ronald D. Cohn, et al, 2000, *Molecular Basis Of Muscular Dystrophies*, Muscle Nerve, Iowa City, USA, pp. 1456- 1471.

Rybakova Inna N, et al, 2000, *The Dystrophin Complex Forms a Mechanically Strong Link Between the Sarcolemma and Costameric Actin*, The journal of Cell Biology, **Vol. 150**, (5), pp. 1209-1214.

Schmidt K, et al, 2003, *Sox8 is a Specific marker for muscle satellite cells and inhibits myogenesis*. The journal of Biological Chemistry, **Vol. 278**, (32), pp. 29769-2775.

Stolt Claus C, et al, 2005, *Impact of transcription factor Sox 8 on oligodendrocyte specification in the mouse embryonic spinal cord*, BBA, pp. 309-317.

Stuart Ira Fox, 2004, *Fisiología Humana*, 7ª edición, McGrawHill, España.

Vicent R. Harley, et al, 2003, *The Molecular Action and Regulation of the Testis-Determining Factors, SRY (Sex-Determining Region on the Y Chromosome) and SOX 9 [SRY-Related High-Mobility Group (HMG)Box 9]*, Endocrine society, **Vol. 24**, (4), pp. 466-487.

Wakabayashi-Takai E., et al, 2001, *Identification of myogenesis- dependent transcriptional enhancers in promoter region of mouse α -sarcoglycan gene*. Eur. J. Biochem, pp. 948-957.

Wegner Michael, 1999, *From head to toes: the multiple facets of Sox proteins*, Nucleic Acids Research, **Vol. 27**, (6), pp. 1409-1420.

Wehling Michelle, et al, 2001, *A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice*, The journal of Cell Biology, **Vol. 155**, (1), pp. 123-131.

Yoshida Mikiharu, et al, 2000, *Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy*, Human Molecular Genetics, **Vol. 9**, (7), pp. 1033-1040.

Yusuke Kamachi, et al, 2000, *Pairing Sox Off with partners in the regulation of embryonic development*, BBA, **Vol. 16**, (4), pp. 182-187

Referencias electrónicas.

Mediawiki, URL <http://es.wikipedia.org/wiki/M%C3%BAsculo>

Mediawiki, URL http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Skeletal_muscle.jpg