



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**“Caracterización bioquímica del
DGC/UGC en músculo liso de vena de
cordón umbilical”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

CARLOS PALMA FLORES

**ASESORES: Dr. RAMÓN M. CORAL VÁZQUEZ
M. en C. ISRAEL RAMÍREZ SÁNCHEZ**



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.

A mis padres

Virginia Flores Gómez

Carlos Palma Ortiz

DEDICATORIAS

A mis padres:

Virginia Flores Gómez
Carlos Palma Ortiz

Por todo el amor y cariño que siempre me brindaron. Por darme principios que hicieron que no decayera en situaciones difíciles, por ayudarme a crecer como persona conservando siempre la humildad y sobre todo por hacer de mí alguien responsable, por inculcarme el principio de la perseverancia y del triunfo con tu ejemplo. Por estar siempre presentes cuando más los necesitaba, porque aunque nunca dije nada siempre estuviste ahí. Por que son unos padres ejemplares, un par de seres extraordinarios. Por que me enseñaron que la vida es una sola y hay que disfrutarla... trascender en ella. Por que gracias a su apoyo moral y económico pude culminar mis estudios de licenciatura, nunca escatimaron para apoyarme, por que batallaron y sufrieron igual que yo para llegar a una meta común, la culminación de mis estudios. Por que logre cumplir mi sueño a costa de los tuyos. Gracias papa, gracias mamá, por que a ustedes les debo mi existencia y lo que soy ahora, por que les debo mucho y no me alcanzaría la vida para pagarles.

A mis hermanos:

Gabriela Palma Flores
Eric Palma Flores

Por todo el apoyo que me has brindado, por que nunca dejaron de creer en mí. Por que aunque nunca te lo dije, tu compañía en esas noches de estudio hicieron de mí un ser más fuerte. Por que siempre estuvieron al tanto de mí de la manera más sabia. Te agradezco. Este triunfo es tuyo.

A Dios

Por que siempre me dio la guía para seguir adelante y no dejarme vencer, por que siempre me iluminó el camino hacia el bien, por darme la fuerza para salir de los problemas y sobre todo por que nunca perdí la confianza en mí, por que me dio lecciones de vida, por que hizo que aceptara que esta vida está llena de triunfos y fracasos y por ayudarme a salir de estos últimos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez, por aceptarme en su laboratorio y así darme la oportunidad de conocer de cerca la labor de los hombres de la ciencia. A el M. en C. Israel Ramírez Sánchez por enseñarme y dirigirme en la realización de este proyecto. A ambos por el apoyo y la amistad que encontré formando parte de su grupo de trabajó.

Al Dr. Guillermo M. Ceballos Reyes, por el apoyo brindado en la realización de este trabajo. Gracias por su comprensión y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A la comisión revisora integrada por: QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda, Dra. Sandra Días Barriaga Arceo, Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón y en especial a la Dra. Gilda Flores Rosales por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A Todos y a cada uno de mis compañeros... amigos de laboratorio, que permitieron dejarme llevar todo conocimiento posible.

A mi Facultad, por el conocimiento y formación que en sus instalaciones encontré. El espíritu universitario lo llevare siempre conmigo.

A Todos y a cada uno de mis amigos de la universidad (sin excluir alguno), que acompañaron a Carlos Palma Flores por este largo camino de la vida. ¡Muchas gracias!

“Cuantos hombres se precipitan hacia la luz, no para ver mejor sino para brillar”

Nietzsche

El desarrollo del trabajo experimental se realizó en el LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR de la unidad de Genética Humana del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI así como también en la SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional en colaboración con el Dr. Guillermo M. Ceballos Reyes.

Indice

	Página
Abreviaturas ----- ----	III
Relación de figuras ----- ----	V
Resumen ----- ----	VII
I Introducción ----- ----	1
1.1 Cardiomiopatía dilatada	1
1.2 Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina	2
1.2.1 Proteínas citoplasmáticas	3
1.2.2 El complejo distroglicano	4
1.2.3 El complejo sarcoglicano-sarcospan	5
1.3 Distribución del complejo sarcoglicano, utrofina y distrofina	7
1.4 Distrofina y las Distrofinopatías	9
1.5 El complejo SG-SPN y las Sarcoglicanopatías	10
1.6 El complejo SG-SPN y la cardiomiopatía dilatada en MLV	11
II Justificación ----- ---	15
III Objetivos ----- ---	16
IV Estrategia experimental ----- -----	17
V Materiales ----- ----	19
5.1 Material biológico	19
5.2 Material químico	19
5.3 Reactivos generales	20
VI Metodología ----- ---	21

6.1 Recolección de muestras de cordón umbilical	21
6.2 Obtención de células de ML de la vena del cordón umbilical (explante)	22
6.3 Proliferación de células de ML de la vena de cordón umbilical en cultivo	22
6.4 Extracción de PT a partir del cultivo celular del ML de vena de cordón umbilical	23
6.5 Inmunoprecipitación	23
6.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida	24
6.7 Corrimiento Electroforético	24
6.8 Tinción con azul de Coomassie	25
6.9 Inmunoelectrotransferencia	25
6.10 Tinción con rojo de Ponceau	26
6.11 Western Blot	26
VII Resultados y análisis -----	
----	28
7.1 Proliferación de células de ML de la vena de cordón umbilical	28
7.1.1 Cultivo celular	28
7.2 Análisis de la integridad proteica de los EPT en gel de poliacrilamida	29
7.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida	29
7.3 Análisis de la expresión de las proteínas pertenecientes a los posibles complejos DGC/UGC en células de ML de vena de cordón umbilical	31
7.3.1 Western Blot	31
7.4 Análisis de la interacción de las proteínas distrofina, utrofina y del C-SG con caveolina-1 en células de ML de vena de cordón umbilical	33
7.4.1 Inmunoprecipitación	33
VIII Discusión -----	
---	39

IX Perspectiva -----	47

X Conclusiones -----	49

XI Referencias -----	50

Abreviaturas

➤ α -SG	Alfa sarcoglicano
➤ β -SG	Beta sarcoglicano
➤ CAV-1	Caveolina-1
➤ C-DG	Complejo distroglicano
➤ CMD	Cardiomiopatía dilatada
➤ DEMEM	Dulbecco modified tagle medium
	Complejo de glicoproteínas asociadas a
➤ DGC	distrofina
➤ DG	Distroglicanos
➤ DIS	Distrofina
➤ DM	Distrofia muscular
➤ DMB	Distrofia muscular de Becker
➤ DMD	Distrofia Muscular de Duchén
➤ eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
➤ ϵ -SG	Epsilon sarcoglicano
➤ EPT	Extracto de proteínas totales
➤ FCE	Factor de crecimiento endotelial
➤ γ -SG	Gama sarcoglicano

➤ Grb-2	Growth factor receptor bound protein-2
➤ LGMD	Limb girdle muscular dystrophy
➤ MC	Músculo cardiaco
➤ ME	Músculo esquelético
➤ ML	Músculo liso
➤ MLV	Músculo liso vascular
➤ nNOS	Sintasa de oxido nítrico neuronal
➤ PM	Peso molecular
➤ PT	Proteína total
➤ SFB	Suero fetal bovino
➤ SG	Sarcoglicanos
➤ SG-SPN	Complejo sarcoglicano-sarcospan
➤ SPN	Sarcospan
➤ UTR	Utrofina
	Complejo de glicoproteínas asociadas a utrofina
➤ UGC	
➤ ζ-SG	Zeta sarcoglicano

Relación de

figuras

FIGURA 1. Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofin ----- -----	6
FIGURA 2. Distribución del complejo sarcoglicano en diferentes tejidos ----- -----	8
FIGURA 3. Participación de utrofina y distrofina como parte de posibles complejos de proteínas alternos ----- -----	13
FIGURA 4. Posibles formas alternativas de complejo propuestas en tejido de ML de vena de cordón umbilical ----- -----	14
FIGURA 5. Células de ML de vena de cordón umbilical en cultivo ----- -----	29
FIGURA 6. Patrón de corrimiento electroforetico de EPT de células de MLV ----- -----	30
FIGURA 7. Análisis de la expresión de las proteínas pertenecientes a los posibles complejos alternos DGC/UGC y caveolina-1 en células de ML de vena de cordón umbilical ----- -----	32

FIGURA 8. Análisis de la expresión de las proteínas pertenecientes a los los posibles complejos alternos DGC/UGC y caveolina-1 en células de ML de vena de cordón umbilical ----- -----	32
FIGURA 9. Inmunoprecipitación de la proteína caveolina-1 en células de ML de vena de cordón umbilical ----- -----	35
FIGURA 10. Inmunoprecipitación de la proteína caveolina-1 revelada con anticuerpos anti-distrofina en células de ML de vena de cordón umbilical ----- -----	35
FIGURA 11. Inmunoprecipitación de la proteína caveolina-1 revelada con anticuerpos anti-utrofina en células de ML de vena de cordón umbilical ----- -----	36
FIGURA 12. Inmunoprecipitación de la proteína caveolina-1 revelada con anticuerpos β -SG en células de ML de vena de cordón umbilical ----- -----	36
FIGURA 13. Inmunoprecipitación de la proteína caveolina-1 revelada con anticuerpos ϵ -SG en células de ML de vena de cordón umbilical ----- -----	37
FIGURA 14. Inmunoprecipitación de la proteína caveolina-1 revelada con anticuerpos δ -SG en células de ML de vena de cordón umbilical ----- -----	37
FIGURA 15. Composición del complejo UGC en células de ML de vena de cordón umbilical ----- -----	38
FIGURA 16. Complejo de glicoproteínas asociado a utrofina ----- -----	43
FIGURA 17. Complejos de proteínas asociados a utrofina o distrofina ----- -----	45

RESUMEN

El complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina es un grupo de proteínas transmembranales y citoplasmáticas asociadas íntimamente a distrofina en el sarcolema de fibras esqueléticas, lisas y cardíacas. Actualmente se conoce que este complejo está implicado en funciones de estabilidad celular durante los procesos de relajación y contracción muscular debido a su participación como componente estructural al generar una conexión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto intracelular. De acuerdo a las características bioquímicas que presentan estas proteínas, se ha demostrado que gran parte de los miembros de este complejo participan en procesos de transducción de señales. Diversos estudios sobre la composición del complejo, han determinado que el DGC está compuesto por la expresión de al menos 10 diferentes proteínas de entre las que destaca distrofina, sintrofinas, distrobrevinas, el complejo DG y el complejo SG-SPN. Gran parte de la importancia del estudio del complejo DGC se debe a que la ausencia de algunas proteínas que lo conforman resulta en la degeneración del tejido muscular y como consecuencia la aparición de DM. Se ha observado que alteraciones en el gen que codifica para distrofina ocasiona DM de Duchenne y DM de Becker, mientras que mutaciones en los genes que codifican para los sarcoglicanos particularmente en α -SG, β -SG, γ -SG y δ -SG se generan DM de cintura del tipo autosómico recesivas. Se sabe que la ausencia de cualquiera de estas proteínas desestabiliza el complejo SG generando la reducción o pérdida secundaria de los otros SG y de sarcospan. Adicionalmente se ha observado que en pacientes con DMD y DMB así como también en pacientes con DM de cintura desarrollan CMD. Modelos animales deficientes en distrofina, en β -SG y δ -SG, han demostrado que la presencia de la CMD asociada con la DM es ocasionada por la eliminación de estas proteínas en las células del MLV. Debido a que gran parte del estudio del complejo DGC en músculo liso vascular se ha enfocado en relacionar la estructura y composición del complejo SG-SPN en relación al desarrollo de la CMD y a la DM, es interesante conocer desde otro punto de vista la importancia que tiene la participación del complejo SG y del resto de las proteínas que estructuran el complejo DGC en la formación de complejos de proteínas alternos y su relación con la estructura de la membrana muscular. Reportes previos realizados mediante ensayos de doble inmunofluorescencia han mostrado que la expresión de las proteínas α -distrobrevina, β -distroglicano y ciertas proteínas del complejo SG como lo son β -SG, δ -SG y ϵ -SG forman complejos de proteínas asociados a

utrofina y/o distrofina y en algunos casos a la proteína caveolina-1 en tejido de músculo liso de vena de cordón umbilical. Esta aparente distribución determinada por ensayos de inmunofluorescencias no demuestra la interacción entre las proteínas que forman dichos complejos por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar la asociación entre algunas de estas proteínas y demostrar la existencia de alguna de las posibles formas de complejo DGC o UGC en cultivos celulares de ML de vena de cordón umbilical. Para confirmar la presencia de al menos uno de estos complejos alternos, en el presente trabajo se analizó mediante ensayos de Western blot e inmunoprecipitaciones la relación existente entre las proteínas ϵ -SG, β -SG, δ -SG, utrofina y distrofina con caveolina-1 en cultivos celulares de ML de vena de cordón umbilical. Mediante una serie de ensayos de Western blot, nuestros resultados muestran la expresión de las proteínas ϵ -SG, β -SG, δ -SG, utrofina, distrofina y caveolina-1 en las células de MLV cultivadas. Por su parte los ensayos de inmunoprecipitación muestran la presencia de un complejo UGC constituido por la expresión de las proteínas caveolina-1, utrofina, ϵ -SG, β -SG y δ -SG localizado aparentemente en la caveola. Por otra parte, en este mismo ensayo, la presencia de ϵ -SG, β -SG, δ -SG, utrofina y distrofina en el sobrenadante del inmunoprecipitado, así como la ausencia de caveolina-1 en esta misma fracción sugiere la participación de estas proteínas como parte de un complejo UGC/DGC independientemente de aquel descrito para la caveola. Debido a que sólo se caracterizó uno de los posibles complejos existentes en este modelo vascular, sería interesante en un futuro seguir con la caracterización de estos complejos ya que existe la posibilidad de encontrar complejos de proteínas DGC y UGC fuera y dentro de las caveolas como el que se ha descrito en este proyecto. Esto abre una perspectiva grande para el análisis del complejo DGC/UCG y comprender mejor la función de las proteínas que lo componen ya que la existencia de estas formas alternativas de complejo en relación con el desarrollo de la cardiomiopatía dilatada parece indicar que la presencia de estas formas alternativas de complejo intervienen en el buen mantenimiento de la morfología vascular

Capítulo 1

Introducción

1.1 Cardiomiopatía dilatada

La CMD es una enfermedad multifactorial considerada como un desorden primario del músculo cardíaco. Diversos estudios han determinado que esta enfermedad cardiovascular pueden ser heredada o adquirida (Towbin, 1998). Como característica distintiva de la CMD, se ha observado una dilatación de la cavidad ventricular izquierda o derecha, un incremento en el volumen y adelgazamiento de las paredes ventriculares (Fatkin y Graham, 2002). La permanente dilatación y adelgazamiento ventricular conlleva a un desajuste grave del ciclo sístole-diástole, lo que provoca la posterior insuficiencia cardíaca.

Adicionalmente y de manera importante se ha observado que en la CMD, la presencia de lesiones isquémicas en las arterias coronarias genera un desequilibrio entre el aporte y la demanda cardiaca de sangre oxigenada. Estudios recientes han determinado que el desarrollo de CMD puede ser causado por debilitamiento del citoesqueleto del cardiomiocito, así como del ML de las arterias coronarias (Cox, 1997). Se sabe que algunas de las proteínas involucradas en el debilitamiento del citoesqueleto que se piensa están relacionadas con el desarrollo de la CMD, son las proteínas que estructuran al complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina.

Alteraciones en las proteínas que conforman al DGC como lo es la proteína distrofina causan distrofia muscular de Duchen y Becker, ambas asociadas con el desarrollo de cardiomiopatía dilatada (Rando, 2001; Blake, 2002; Holt, 1995). Adicionalmente se ha visto que en pacientes con distrofia muscular de cintura ocasionada por alteraciones en α -SG, β -SG, γ -SG y δ -SG, que son proteínas pertenecientes al DGC se han encontrado asociadas con el desarrollo de CMD.

En el caso de δ -SG existen casos documentados de mutaciones esporádicas en donde se observa la herencia de la enfermedad cardiovascular (Cohn, 2001). En modelos murinos deficientes de β -SG o δ -SG se ha observado que el desarrollo de la CMD es provocado por la pérdida total del complejo SG-SPN en MLV.

1.2 Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina

El DGC es un complejo multimérico compuesto de proteínas periféricas e integrales de membrana, las cuales están estrechamente relacionadas con funciones de señalización y estabilidad de la célula muscular generada por el puente de unión formado entre el citoesqueleto y la matriz extracelular del músculo esquelético, liso y cardiaco (Fig.1) (Lapidos, 2004). La importancia de este complejo es evidente debido a que el defecto genético en algunas de las proteínas que lo conforman resulta en la degeneración del tejido muscular y como consecuencia la aparición de distrofia muscular (Liu, 1999).

De acuerdo a su ubicación celular las proteínas que componen el DGC se pueden organizar en: proteínas citoplasmáticas, dentro de las que destacan distrofina, distrobrevinas, sintrofinas y en

algunos casos las caveolinas así como la sintasa de óxido nítrico neuronal, por otro lado el complejo distroglicano, el cual está conformado por las subunidades α -DG que es una proteína extracelular y β -DG que es una proteína transmembranal; finalmente el complejo sarcoglicano-sarcospan, que está integrado por proteínas transmembranales conocidas como α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG, ϵ -SG, ζ -SG y sarcospan. Recientemente se ha destacado que la interacción entre las proteínas citoplasmáticas, el complejo DG y el complejo SG-SPN es importante para llevar a cabo funciones de estabilidad en las células musculares.

En algunas ocasiones distrofina es substituida en el complejo DGC por utrofina, una proteína de distribución ubicua homóloga a la distrofina (Khurana y Davies, 2003), en este caso el complejo se puede denominar complejo de proteínas asociadas a utrofina, por utrophin associated protein complex.

Un importante rol del complejo DGC/UGC en las células musculares, es la de proveer un soporte mecánico a la membrana celular durante los procesos de contracción y relajación muscular, ya que al igual que como sucede con la familia de las integrinas, estas proteínas forman un puente estructural entre los filamentos de actina del citoesqueleto y la proteína laminina-2 de la matriz extracelular (Ervasti y Campbell, 1993 y Vachon, 1997).

1.2.1 Proteínas citoplasmáticas

La distrofina con un peso molecular de 427 kDa (Ervasti y Campbell, 1993) es una proteína localizada en la cara interna de la membrana muscular, la cual tiene interacción con proteínas citoplasmáticas, así como con los SG y con β -DG (Blake, 2001). La estructura primaria de la distrofina está organizada en cuatro diferentes regiones: una región amino terminal con capacidad de unión a los filamentos de actina del citoesqueleto, una región central en forma de varilla, una región rica en cisteínas y una región carboxilo terminal, que en base a su secuencia de aminoácidos le confiere capacidad de enlace con diversas proteínas (Rybakova, 2000).

Por su parte, la utrofina de 397 kDa, posee las mismas cuatro regiones que componen la estructura primaria de la distrofina, sólo que con el dominio amino terminal más corto. La

estructura primaria de la región carboxilo terminal de estas dos proteínas, es tan similar que utrofina es capaz de enlazar muchas de las proteínas que componen el DGC (Tommasi, 2000). Adicionalmente, en la región súper enrollada del extremo carboxilo terminal de la distrofina o de la utrofina, se encuentran asociadas las proteínas α -distrobrevina y β -distrobrevina (Sadoulet-Puccio, 1997), las cuales poseen un PM de 78 y 59 kDa respectivamente (Peters, 1997 y Blake, 1998).

Por otro lado, en el citoplasma se encuentran las proteínas α 1-sintrofina, β 1-sintrofina y β 2-sintrofina las tres con un PM de 58 kDa (Rando, 2001). Estas proteínas se encuentran unidas a la porción carboxilo terminal de la distrofina, utrofina y/o a las distrobrevinas.

Localizada también en la región citoplasmática, se encuentra la enzima nNOS con un PM de 130 kDa, la cual esta encargada de modular diferentes vías de señalización intracelular a partir de la producción de óxido nítrico (Bredt, 1994). Se cree que esta proteína se une al DGC/UGC mediante la interacción entre su dominio homodimerico PDZ y la proteína α 1-sintrofina (Brenman, 1996) y/o caveolina-3 (Rando, 2001).

1.2.2 El complejo distroglicano

El complejo DG está conformado por dos proteínas glicosiladas: α -DG y β -DG, las cuales son producto de la expresión de un mismo gen, el cual da origen a un polipéptido precursor de 97 kDa, que al sufrir corte y glicosilación produce a ambos distroglicanos (Fig.1) (Ibraghimov, 1992).

β -DG es una proteína transmembranal de 43 kDa, la cual está enlazada directamente a la región carboxilo terminal de la proteína distrofina (Pearce, 1993), o de la utrofina (Suzuki, 1994) por medio de su porción intracelular. Por su parte α -DG una proteína altamente glicosilada con un PM de 156 kDa, está unida a la porción extracelular de β -DG, la cual establece unión con la matriz extracelular mediante su interacción con la proteína laminina α -2 (DalKilic, 2003).

Adicionalmente, se ha propuesto que β -DG esta implicado en procesos de señalización celular debido a su interacción con la proteína Grb-2, de la cual se conoce su importancia al participar en procesos de transducción (Oak, 2001 y Yang, 1995).

1.2.3 El complejo sarcoglicano-sarcospan

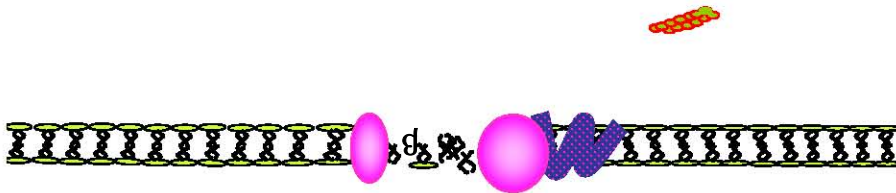
El complejo sarcoglicano está compuesto por un grupo de proteínas transmembranales conocidas como α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG, ε -SG, y ζ -SG, las cuales son proteínas glicosiladas con un PM de 50, 43, 35, 35, 45 y 45 kDa respectivamente (Fig.1) (Hack, 2000). Los genes de α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG, y ε -SG, están localizados en los loci 17q21, 4q12, 13q12, 5q33 y 7q21 respectivamente (Bonneman, 1995; Lim, 1995; Nigro, 1996; Noguchi, 1995 y Roberds, 1994), mientras que el gen de ζ -SG en el cromosoma 8 humano (Wheeler, 2002).

De acuerdo a sus características estructurales α -SG y ε -SG se clasifican como proteínas transmembranales tipo I debido a que su extremo amino terminal se localiza en la región extracelular, mientras que β -SG, γ -SG, δ -SG y ζ -SG se clasifican como proteínas transmembranales tipo II con el extremo amino terminal localizado en la región intracelular (Hack, 2000).

Todos los sarcoglicanos poseen un dominio citoplasmático corto el cual contiene sitios putativos de fosforilación, además de un dominio extracelular largo constituido por sitios potenciales de glicosilación (Campbell, 1995). En el caso β -SG, γ -SG y δ -SG se han encontrado grupos residuales de cisteínas (Matsumura, 1999) por lo cual se sugiere podrían actuar como moléculas receptoras para algún ligando extracelular; de manera general se ha propuesto la posible participación del complejo SG en procesos de transducción de señales (Chan, 1998).

Adyacente a los sarcoglicanos y embebida en la membrana celular, está localizada una proteína de 25 kDa llamada sarcospan, la cual contiene 4 dominios transmembranales y estructuralmente pertenece a la familia de proteínas tetraspan (Crosbie, 1997). Esta proteína en conjunto con los SG's constituye el complejo SG-SPN, el cual se cree, establece interacción

directa con la proteína distrofina (Vainzof, 1999) y de manera particular γ -SG y/o δ -SG's con β -DG (Chan, 1998 y Noguchi, 2000). Diversos estudios sobre el complejo SG han mostrado interacción con la región amino terminal de la proteína distrobrevina, sugiriendo con ésto una asociación múltiple entre distrofina, distrobrevinas, los DG y los SG's (Yoshida, 2000). Se cree que la participación del complejo SG-SPN como componente estructural del DGC/UGC es la de estabilizar la interacción entre la matriz extracelular y el citoesqueleto mediada por el C-DG (Hack, 2000).



Capítulo II

Justificación

Tomando como antecedente el trabajo de Ramírez y colaboradores en 2005, así como la aparente relación de la proteína caveolina-1 como posible miembro de estas formas alternativas de complejo, se decidió analizar la interacción que mantiene Caveolina-1 con los SG's y con utrofina o distrofina por medio de inmunoprecipitaciones y análisis en Western blot, con el objetivo de evidenciar si estas proteínas forman un complejo alterno DGC o UGC, así como también poner de manifiesto en todo caso, si la detección de cualquiera de estos complejos está relacionada con los micro dominios caveolares o en diferentes regiones, a partir de la inmunoprecipitación con la proteína caveolina-1 que es un componente esencial para la formación de las caveolas en cultivos celulares de ML de vena de cordón umbilical.

Capítulo III

Objetivos

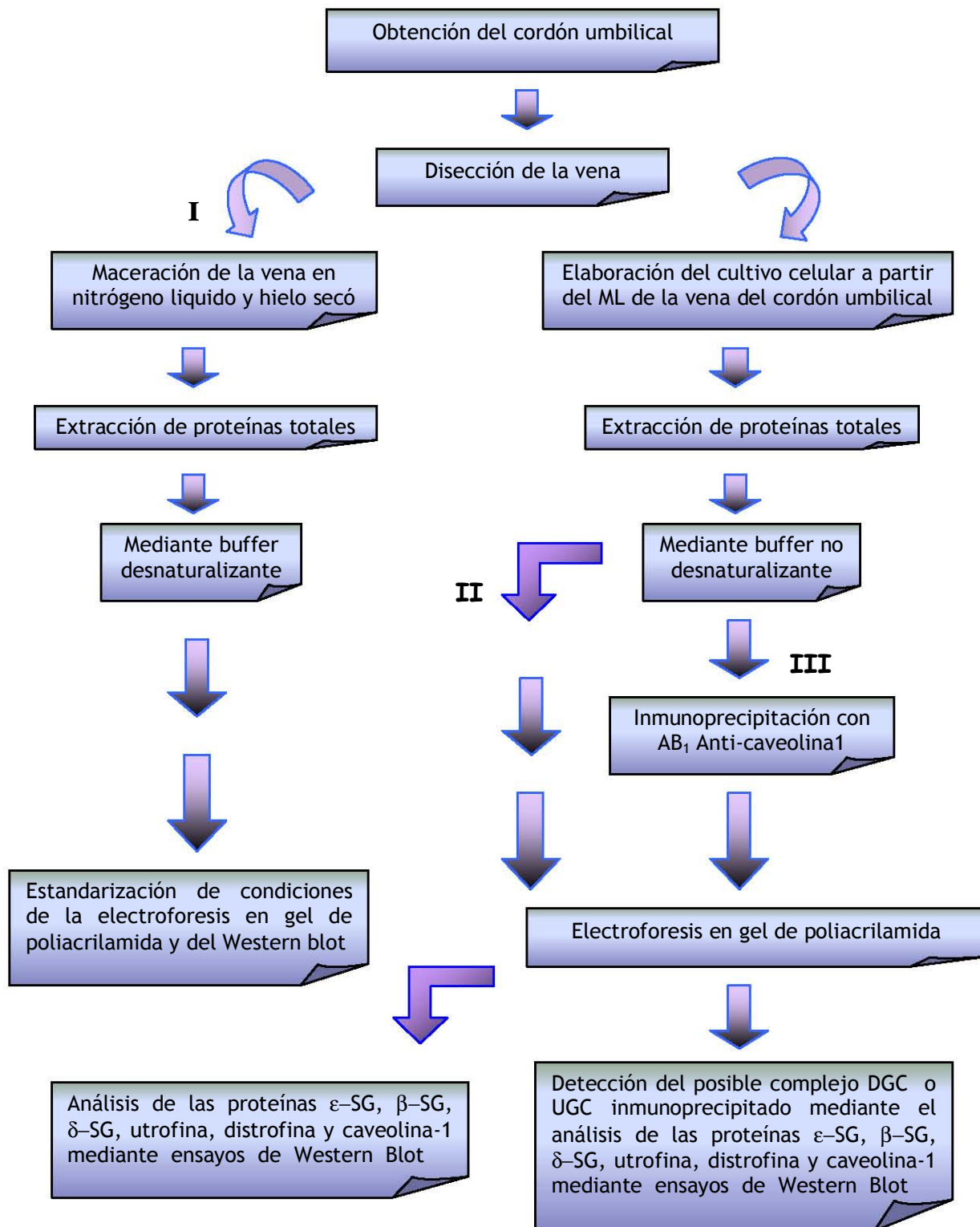
- Estandarizar la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot para el estudio de las proteínas del complejo DGC/UGC en tejido de ML de vena de cordón umbilical.
- Identificar algunas de las proteínas pertenecientes a los posibles complejos alternos por medio de ensayos de electroforesis y Western blot en cultivo celular de ML de vena de cordón umbilical.
- Determinar la posible existencia de un complejo DGC o UGC mediante ensayos de inmunoprecipitación a partir de la proteína caveolina-1 a través de su análisis en ensayos de electroforesis y Western blot en cultivos primarios de ML de vena de cordón umbilical.

Capítulo IV

Estrategia experimental

La estrategia experimental seguida en este trabajo se dividió en tres etapas. La primera de ellas (I) consistió en establecer las condiciones óptimas de la electroforesis en gel de poliacrilamida y del Western blot utilizando EPT del tejido de ML de vena del cordón umbilical. En la segunda (II) se analizó la expresión de las proteínas ϵ -SG, β -SG, δ -SG, utrofina, distrofina y caveolina-1 mediante ensayos de electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot usando EPT de células de ML vena del cordón umbilical en cultivo. En la última etapa (III) se realizó la detección del posible complejo mediante ensayos de inmunoprecipitación a partir del análisis de las proteínas ϵ -SG, β -SG, δ -SG, utrofina, distrofina y caveolina-1 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y western blot en los EPT provenientes del cultivo celular.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Capítulo V

Materiales

5.1 Material biológico

- Vena de Cordón umbilical

5.2 Material químico

- DEMEM (Gibco™-Invitrogen)
- Factor de crecimiento endotelial
- Hanks (Gibco™-Invitrogen)
- Heparina
- Inhibidores de proteasas (Minicomplete)
- Penicilina G
- Proteína G sepharosa 4B Fast Flow (SIGMA-Aldrich)
- Solución salina fisiológica
- Suero fetal bovino
- Tripsina-EDTA (Gibco BRL™)
- Anticuerpos Primarios: (Laboratorios Santa Cruz):
- Anti-cav-1 (H97), Anti-distrofina (H300), Anti-utrofina (utro H300) y Anti-ε-SG (C-17)
- Anticuerpos Primarios (Laboratorios Novocastra): Anti-β-SG (NCL-B-SARC) y Anti-δ-SG (NCL-d-SARC)
- Anticuerpos Secundarios (Laboratorios Santa Cruz): Burro-anti-conejo y Burro-anti-cabra.
- Anticuerpos Secundarios (Laboratorios Novocastra): Cabra-anti-ratón

5.3 Reactivos Generales

- Acrilamida (Bio-Rad)
- Agua bidestilada
- Agua desionizada
- Azul de bromofenol
- Azul de Coomassie
- Bisacrilamida (Bio-Rad)
- Beta mercaptoetanol (Bio-Rad)
- Diaminobencidina (Bio-Rad)
- Glicerol
- Glicina (Bio-Rad)
- K Cl
- K_2PO_4
- KH_2PO_4
- NaCl
- Na_2HPO_4
- Peróxido de hidrógeno
- Persulfato de amonio (Bio-Rad)
- Reactivo de Lowry (Bio-Rad)
- Rojo de Ponceau (Bio-Rad)
- SDS
- TEMED (Bio-Rad)
- Tris-HCl (Bio-Rad)
- Triton X-100
- Tween20

Capítulo VI

Metodología

6.1 Recolección de muestras de cordón umbilical

Las muestras de cordón umbilical fueron proporcionadas por el servicio de Ginecobstetricia de la Clínica 4 (Hospital Luís Castelazo Ayala) del IMSS con autorización y previa revisión de nuestro protocolo por el Comité de Educación Médica y evaluación ética del propio hospital Luís Castelazo Ayala a través de la colaboración con el M.C Israel Ramírez Sánchez de La Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

Una vez contactados con el personal de trabajo del servicio de Ginecobstetricia de la Clínica 4, los cordones de aproximadamente 10 cm de largo, se colocaron en un frasco estéril con solución salina fisiológica y transportados en hielo hasta el laboratorio. De inmediato se procedió a la disección de la vena del cordón umbilical con el objetivo de obtener fragmentos del músculo liso a partir de los cuales se generó el cultivo celular.

6.2 Obtención de células de ML de la vena del cordón umbilical (explante)

Una vez localizada la vena en el cordón umbilical, fue adicionada en su interior mediante el uso de una cánula y una jeringa solución de Hanks con el objetivo de eliminar la sangre retenida en el vaso, enseguida se adiciono una solución de tripsina al 0.25% mezclada con solución de Hanks dejándose incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el contenido del vaso fue desechado y el vaso lavado con solución de Hanks.

Después de realizar este procedimiento la vena fue disectada y cortada en fragmentos de aproximadamente 5 x 5mm los cuales fueron colocados en una placa de cultivo celular a manera de que la luz del vaso quedase adherida al fondo de la placa. Adherido el tejido, se dejó secar de 5 a 10 minutos y en seguida se adicionó 1ml de medio de cultivo celular para ML (DEMEM, 30% SFB, 1% FCE, 0.5% Heparina, 1% Penicilina G) dejándose incubar a 37°C por 4 semanas. Durante este tiempo la placa de cultivo celular fue monitoreada a través de microscopia óptica y el medio de cultivo celular para ML sustituido cada 7 días hasta observar más de un 50% de confluencia en la placa del cultivo celular

6.3 Proliferación de células de ML de la vena de cordón umbilical en cultivo

Transcurrido el tiempo de incubación el fragmento de tejido fue retirado y mediante el uso de una solución de tripsina al 0.25% las células adheridas a la placa fueron colectadas y sembradas varias veces con el fin de obtener una rápida proliferación celular. Una vez que las células alcanzaron aproximadamente entre el 90 y 95 % de confluencia en el cultivo celular las células fueron sometidas a un tratamiento con tripsina y EDTA durante 10 minutos.

Pasado el tiempo de incubación se adicionó SFB en una dilución 1:10 y posteriormente centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo las células fueron resuspendidas en medio de MLV y sembradas repetidas veces en botellas de 125 mm cambiando el medio cada 3 días y cada 7 días desprendidas de la superficie del cultivo celular sembrándolas de nuevo hasta obtener el equivalente a 20 millones de células de MLV. Este procedimiento

fue llevado a cabo durante el transcurso de la parte experimental con el fin de proliferar y mantener vivo el cultivo celular.

6.4 Extracción de PT a partir del cultivo celular de ML de vena de cordón umbilical

Obtenido el equivalente a 20 millones de células de MLV, éstas fueron lavadas con 1ml de PBS 1X (13.68 mM NaCl, 0.26mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 0.114 mM KH₂PO₄) e inmediatamente con la ayuda de un rizador y la adición del buffer de lisis no desnaturizante (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% Triton X-100 en PBS 1X) con inhibidores de proteasas las células fueron removidas y colectadas en un tubo eppendorf de 1 ml. Posteriormente esta suspensión celular fue incubada en hielo por 5 minutos y centrifugada a 10,000 rpm durante 5 min. a 4°C.

Realizada la extracción de proteína total, ésta fue cuantificada por medio del método Lowry con el Kit para cuantificación DC. A partir de una curva de calibración la concentración del extracto total fue obtenida y posteriormente dividida en concentraciones iguales para llevar a cabo los ensayos de inmunoprecipitación y de Western blot. Una vez realizada la cuantificación de proteína total ésta fue almacenada a -20°C hasta el momento de su uso.

6.5 Inmunoprecipitación

Para llevar a cabo este ensayo, se tomó una concentración de 1.5 µg de proteína total, la cual fue incubada con el anticuerpo primario anti-caveolina-1 en una concentración de 3µg de AB₁ por cada mg de proteína total durante 2 horas y con agitación constante a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación el sistema inmunoprecipitante (proteína G sepharosa), fue adicionado en una concentración de 20µg por cada ml de proteína total, dejándose incubar durante dos horas y con agitación constante a 4°C para inmunoprecipitar de esta manera el complejo formado entre la caveolina-1, el anticuerpo primario y el sistema inmunoprecipitante. Posteriormente, esta suspensión fue centrifugada 15 minutos a 12,000 rpm a 4°C para separar toda la caveolina-1 del resto de la proteína total.

El sobrenadante obtenido fue colectado y almacenado a -20°C para un análisis posterior mientras que el sedimento el cual contenía la proteína de interés unida al anticuerpo y a la proteína G, fue lavada 3 veces con 500μ de buffer de lisis celular no desnaturizante durante 15 minutos a 12,000 rpm a 4°C para eliminar las interacciones inespecíficas entre la proteína G y las inmunoglobulinas presentes en la suspensión celular. Una vez terminado el último lavado, el sedimento se resuspendió en buffer de carga Laemmli discontinuous buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% glicerol, 2% SDS, 5% beta-mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol) con la finalidad de romper los enlaces formados entre el anticuerpo primario, la proteína G y las interacciones formadas entre cada proteína. En estas condiciones las proteínas una vez desnaturizadas fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su uso.

6.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para identificar si alguno de los miembros del complejo SG así como utrofina o distrofina, estaban bioquímicamente unidos con la proteína caveolina-1, se realizó un corrimiento electroforetico en geles de poliacrilamida por medio del método SDS-PAGE (discontinuous Buffer System) descrito por Laemmli en 1970. Para llevar acabo la elusión de las proteínas totales, del inmunoprecipitado así como la elusión de las contenidas en el sobrenadante del inmunoprecipitado, se preparó un gel separador en gradiente del 2 al 12.5 % de Acr/Bis y otro a una concentración del 12.5% empleándose también un gel concentrador al 5% de Acr/Bis para cada uno de los geles.

Una vez montado el aparato de acuerdo a las instrucciones del fabricante, las placas del sistema fueron llenadas $\frac{3}{4}$ partes con la solución del gel concentrador a través de un formador de gradientes y una bomba peristáltica. Posteriormente después de llenar a $\frac{3}{4}$ partes las placas del sistema, se adiciono un volumen de 100μ de alcohol isobutílico con el objetivo de formar una superficie totalmente plana y uniforme entre el gel separador y la sucesiva adición del gel concentrador. Transcurrido un tiempo de 45 minutos, tiempo necesario para la polimerización del gel, el alcohol

isobutilico fue eliminado y en seguida fue adicionada la solución del gel concentrador al 5% de Acr/Bis para formar el gel concentrador en ambos geles.

6.7 Corrimiento Electroforético

Una vez obtenidas las fracciones que contenían las proteínas inmunoprecipitadas, el sobrenadante de las mismas y extractos de proteína total no inmunoprecipitados (control positivo), se procedió a llevar a cabo el corrimiento electroforético adicionando a cada fracción volúmenes iguales del amortiguador de carga Laemmli discontinuos buffer e inmediatamente, se incubaron durante 5 minutos a 95 °C y a -20 durante 5 minutos. Posteriormente las muestras tratadas con el buffer de carga fueron introducidas en los pozos correspondientes en conjunto con un marcador de PM (BioRad) en el gel del 2.5 al 12.5% así como en el gel al 12.5% y en seguida se procedió a efectuar la electroforesis aplicando un voltaje de 135 volts durante 5 minutos y posteriormente a 185 volts durante 60 minutos. El corrimiento electroforético fue llevado a cabo empleándose simultáneamente dos geles en las mismas condiciones a partir de los cuales se realizó la tinción con azul de Coomassie y la transferencia de las proteínas del gel a membranas de nitrocelulosa.

6.8 Tinción con azul de Coomassie

Terminado el tiempo de corrimiento electroforético, uno de los geles fue colocado en una solución de azul de Coomassie durante 25 minutos a temperatura ambiente y decolorados en agua bidestilada a 98 °C durante 15 minutos. Los geles desteñidos fueron observados con una lámpara de luz blanca en donde se vio el patrón de expresión de proteína total del MLV representado por una serie de bandas con diferente PM.

6.9 Inmunoelectrotransferencia

En este ensayo se utilizó el protocolo descrito por Towbin y colaboradores en 1979, empleando un sistema de transferencia en seco Trans-Blot® SD (BioRad Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell) en el cual la electrotransferencia fue realizada de la siguiente manera. Una vez terminado el tiempo de corrimiento electroforético, el

dispositivo fue desarmado colocando uno de los geles en la solución de azul de Coomassie como se ha descrito, mientras que el otro fue equilibrado en el buffer de transferencia (48mM Tris Base, 39mM Glicina, 20% metanol a pH 9.2) durante 15 minutos junto con la membrana de nitrocelulosa y dos papeles filtro.

Posteriormente se colocó dentro de la placa de electrotransferencia en el siguiente orden y de manera vertical, el papel filtro, la membrana de nitrocelulosa, el gel y un segundo papel filtro. En seguida la placa fue cerrada y el proceso de transferencia llevado a cabo durante 45 minutos aplicando una corriente de 12 volts a temperatura ambiente.

6.10 Tinción con rojo de Ponceau

Finalizado el tiempo de electrotransferencia, la cámara fue desmontada y la membrana de nitrocelulosa sumergida en una solución de rojo de Ponceau durante 5 minutos en agitación constante, posteriormente la membrana fue sumergida en agua desionizada una sola vez, hasta obtener la mejor definición de las bandas, las cuales corresponden al patrón de expresión característico del ML. Una vez que la membrana de nitrocelulosa estuvo seca, fue cortada en tiras de 3mm de ancho y almacenada en tubos con tapón de rosca hasta el momento de su uso.

6.11 Western blot

Para bloquear la señal de fondo, las membranas fueron incubadas durante 60 minutos a 37°C con solución bloqueadora, compuesta de amortiguador de sales de fosfato de sodio 0.5M, Tween20 0.05% v/v y 0.5% de leche Svelty. Transcurrido este tiempo las membranas se incubaron con el anticuerpo primario para β -SG que reconocen la región amino terminal de la proteína y δ -SG que reconoce la región amino terminal de la proteína, los cuales fueron utilizados a una dilución de 1:20 y 1:50 respectivamente con PBS 1X a 4°C toda la noche. Para los anticuerpos primarios anti ϵ -SG, anti-distrofina, anti-utrofina y anti caveolina-1 que reconoce la

región carboxilo terminal de la proteína, la dilución utilizada fue de 1:100 con PBS 1X durante 3 horas a 4°C.

Al término de este tiempo se lavaron las membranas tres veces con PBS-Tween20 1X durante 5 minutos e incubadas por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario a una dilución 1:1000. Para el caso de los anticuerpos primarios β -SG y δ -SG se utilizó un anticuerpo secundario IGg de ratón acoplado a peroxidasa, mientras que para el caso del anticuerpo primario ϵ -SG una anticuerpo secundario IgG de cabra acoplado a la misma enzima en una dilución de 1:1000 en PBS 1X a temperatura ambiente durante una hora. Para los anticuerpos anti utrofina, anti caveolina-1 y anti distrofina, la inmunoglobulina utilizada fue de conejo acoplada a peroxidasa, utilizándose una dilución de 1:1000 en PBS 1X bajo las mismas condiciones de incubación.

Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo secundario las membranas fueron lavadas tres veces como se mencionó anteriormente y fue añadido por cada membrana 500 μ l de una solución reveladora fresca conteniendo 0.05% (p/v) de diaminobencidina disuelta en PBS 1 X y 0.025% (v/v) de peróxido de hidrógeno previamente mezclados durante 10 minutos. Una vez observada la aparición de bandas correspondientes al conjunto de proteínas pertenecientes al complejo DGC/UGC, la solución fue desechada y las membranas lavadas con agua bidestilada por 10 minutos. Terminado el ensayo las bandas fueron escaneadas y comparadas con el patrón de referencia de PM.

Capítulo VII

Resultados y análisis

7.1 Proliferación de células de ML de la vena de cordón umbilical

7.1.1 Cultivo celular

Realizado el explante para obtener células de tejido de ML de vena del cordón umbilical, las células fueron propagadas diferentes veces hasta alcanzar entre el 90 y 95 % de confluencia y monitoreadas mediante microscopía óptica. La siguiente figura muestra la morfología celular del MLV, en la cual se puede observar la forma alargada y delgada de las células, que generalmente se ve en forma de huso.

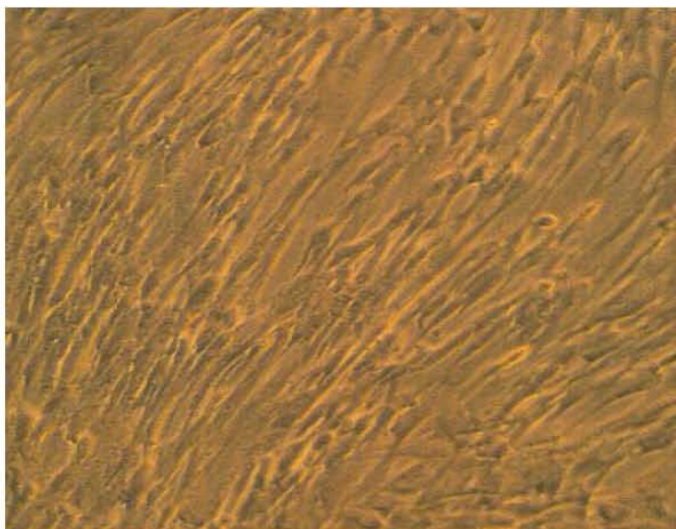


FIGURA 5. CÉLULAS DE ML DE VENA DE CORDÓN UMBILICAL EN CULTIVO. Imagen tomada por medio de microscopía confocal con objetivo a 20X.

7.2 Análisis de la integridad proteica de los EPT en gel de poliacrilamida

7.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para realizar la detección del producto de los genes de las proteínas β -SG, δ -SG, ϵ -SG utrofina, distrofina y caveolina-1 en células de ML de vena de cordón umbilical, fue necesario llevar a cabo la elusión de las proteínas en geles de poliacrilamida mediante el uso de buffer desnaturizante y no desnaturizante.

Realizado este procedimiento los resultados obtenidos muestran el corrimiento electroforético del EPT mediante la tinción con azul de Coomassie (Fig.6). La tinción de ambos geles en la figura 6 A y B muestra la integridad proteica representada por el bandeo a lo largo del gel en los diferentes EPT provenientes del MLV. Se puede observar que en ambos geles no hay degradación de proteínas ya que como se muestra en la imagen, las bandas correspondientes al EPT se ven definidas y no como un barrido, el cual es característico de la degradación.

Como se puede ver en la figura No 6 se muestra el patrón de corrimiento electroforético del MLV en geles de poliacrilamida hechos a una sola concentración para detectar las proteínas pertenecientes al complejo SG y en gradiente para la detección de las proteínas distrofina, utrofina y caveolina-1.

Debido a que los PM de las proteínas β -SG, δ -SG, ϵ -SG utrofina, distrofina y caveolina-1 son muy diferente, el patrón de corrimiento electroforético del EPT de MLV en la figura 6 (A) es más compacto ya que solamente se distribuyen proteínas con un PM no mayor a los 50 KDa, mientras que en la figura 6 (B) se distribuyen proteínas con un PM de diferente tamaño el cual abarca pesos moleculares de entre los 10 y 500 kDa.

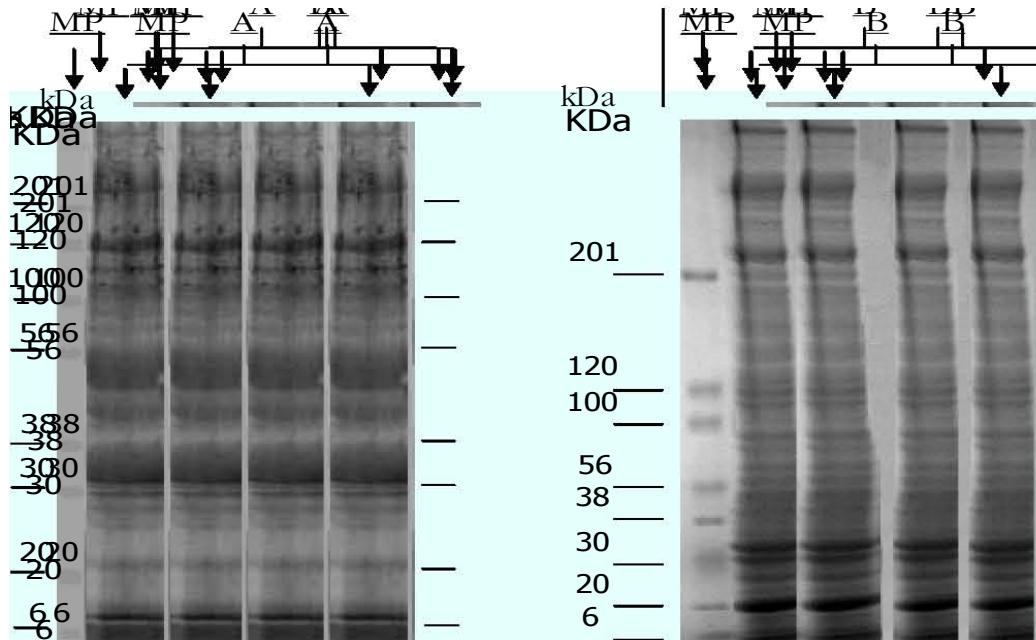


FIGURA 6. PATRÓN DE CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO DE EPT DE CÉLULAS DE MLV. Tinción con azul de Coomassie. Corrimiento en gel al 12.5 % de Acrilamida/Bisacrilamida (A); Corrimiento en gel con gradiente del 2 al 12.5 % de Archilamida/Bisacrilamida (B) y Marcador de peso molecular (MP)

7.3 Análisis de la expresión de las proteínas pertenecientes a los posibles complejos

DGC/UGC en células de ML de vena de cordón umbilical

7.3.1 Western Blot

Para llevar a cabo la detección exacta de cada miembro del complejo DGC/UGC en las membranas de nitrocelulosa, fue necesario el uso de anticuerpos específicos contra la región carboxilo terminal de las proteínas distrofina, utrofina y caveolina-1, así como anticuerpos específicos dirigidos hacia la misma región para las proteínas β -SG, δ -SG y ϵ -SG. Una vez realizado el ensayo como se puede observar en las figuras 7 y 8, se muestra la detección de estas seis proteínas a través de la reacción de coloración con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno utilizando como control negativo del western blot anticuerpos secundarios anti-conejo para el caso

de utrofina, distrofina y caveolina-1 mientras que para el caso de β -SG y δ -SG anti-ratón y para ϵ -SG anti-cabra.

La figura No 7 (membranas 2, 4 y 6), muestra que la detección de las proteínas citoplasmáticas representadas por las bandas localizadas en cada membrana, corresponde a las proteínas distrofina de 427 kDa, utrofina de 397 kDa y caveolina-1 de 21 kDa. De la misma manera en como se detecto la expresión de estas proteínas, para el caso del complejo SG, las bandas observadas en la figura No 8 (membranas 2, 4 y 6) representan la expresión de las proteínas β -SG, δ -SG y ϵ -SG con PM de 35 kDa, 45kDa y 50 kDa respectivamente. Como se puede observar en la figuras 7 y 8 las membranas 1, 3, 5 representan el control negativo para cada ensayo del Western blot. Para llevar acabo la obtención del control solamente fue adicionado el anticuerpo secundario correspondiente a cada proteína. Estos resultados muestran la especificidad del anticuerpo secundario y la veracidad de los resultados. Adicionalmente en la figura en la figura No 7 (membrana 2 *) se muestra la detección de una intensa banda con un PM entre los 100 y 120 kDa en conjunto con la expresión de la proteína utrofina.

Debido a que la expresión de utrofina en tejido muscular y no muscular además de expresarse como una proteína de 397 kDa también se expresa como isoforma, de entre las que destacan la proteína utrofina de 116 kDa (Up116) se sugiere que la presencia de esta proteína entre el marcador de 100 y 120 kDa posiblemente se deba a la participación de alguna de estas dos isoformas.

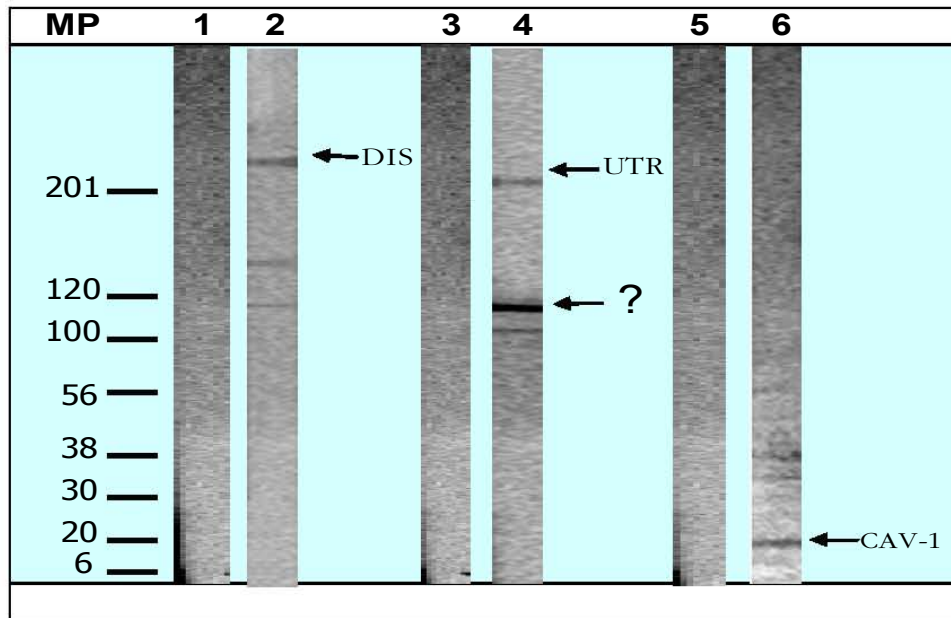


FIGURA 7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS PERTENECIENTES A LOS POSIBLES COMPLEJOS ALTERNOS DGC/UGC Y CAVEOLINA-1 EN CÉLULAS DE ML DE VENA DE CORDÓN UMBILICAL. Extractos de proteína total analizados mediante ensayos de Western blot. Membranas 1, 3 y 5 = control (-) WB; Membranas 2, 4 y 6 = Distrofina (DIS), Utrofina (UTR) y Caveolina-1 (CAV-1) respectivamente; MP= Marcador de peso molecular

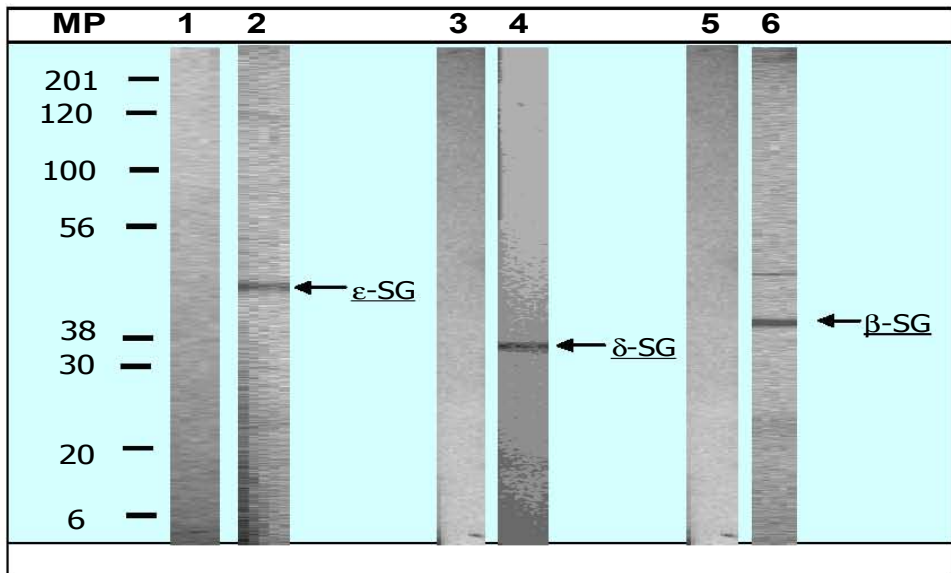


FIGURA 8. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS PERTENECIENTES A LOS POSIBLES COMPLEJOS ALTERNOS DGC/UGC EN CÉLULAS DE ML DE VENA DE CORDÓN UMBILICAL. Extractos de proteína total analizados mediante ensayos de Western blot. Membranas 1, 3 y 5 = control (-) WB; Membranas 2, 4 y 6 = Epsilon (e-SG), Delta (d-SG) y Beta (b-SG) respectivamente; MP= Marcador de peso molecular.

7.4 Análisis de la interacción de las proteínas distrofina, utrofina y del complejo SG con caveolina-1 en células de ML de vena de cordón umbilical

7.4.1 Inmunoprecipitación

Corroborada la expresión de las proteínas pertenecientes al complejo utrofina/distrofina en las células de MLV de cordón umbilical mediante ensayos de Western blot, se realizaron ensayos de coimmunoprecipitación en extractos de proteína total no desnaturalizados a partir de la proteína caveolina-1 utilizando como control negativo de la inmunoprecipitación EPT tratados con proteína G unida a sepharosa y sin anticuerpos policlonales (dato no mostrado), mientras que para el control positivo EPT sin inmunoprecipitar.

Para determinar si la proteína precipitada, se encontraba unida a distrofina, utrofina o al complejo SG, las proteínas contenidas en el sedimento y en el sobrenadante del EPT inmunoprecipitado así como las contenidas en EPT sin inmunoprecipitar, fueron eluidas e identificadas mediante ensayos de electroforesis y western blot como se muestra en el análisis de su expresión (Fig. 7 y 8).

El análisis del western blot en los EPT inmunoprecipitados muestran que caveolina-1 se encuentra formando un complejo al estar asociada al menos con las proteínas β -SG, δ -SG, ϵ -SG y la proteína utrofina localizado aparentemente en la caveola (Fig. 9-14 membrana 2). La detección de los mismos SG's, de utrofina y distrofina en el sobrenadante inmunoprecipitado sugieren la participación de estas proteínas como parte de algún complejo alterno independiente de aquel descrito para la caveola, ya que como se puede observar en el análisis de esta misma fracción la proteína caveolina-1 no es detectable (Fig. 9-14, membrana 4)

La presencia de la banda con un PM entre los 100 y 120 KDa detectada en el análisis de la expresión del complejo utrofina/distrofina y en el análisis de la interacción de las mismas, al ser detectada mediante el mismo anticuerpo anti-utrofina H300 dirigido contra la región carboxilo terminal de la proteína utrofina de 397 KDa, sugiere nuevamente la existencia de alguna isoforma perteneciente a la familia de esta proteína (Fig. 7 y 11 membrana 4).

Debido a que el anticuerpo primario dirigido hacia la región carboxilo terminal de utrofina de 397 KDa reconoce una secuencia específica de aminoácidos contenidos en extremo carboxilo terminal de esta proteína, es decir, de la banda con un PM entre los 100 y 120 KD, se sugiere que la isoforma correspondiente a ese peso es utrofina116, que al ser detectada en el sobrenadante del inmunoprecipitado y no así en el sedimento que contiene el complejo precipitado con caveolina-1, se cree pueda estar asociada en algún complejo diferente al que se forma con caveolina-1 (Fig.11 membrana 2 y 4).

Es importante mencionar que la aparente detección de esta proteína Up116 fue detectada en el sobrenadante inmunoprecipitado y en el EPT (control positivo) después de realizar repetidas veces el ensayo del Western blot, por lo que en conjunto con lo que reporta en diferentes artículos y lo que se presenta en estos resultados hace posible pensar de su expresión en este tejido (Fig. 11 membrana 4 y 6).

En contraste, distrofina homólogo autosómico de utrofina, la cual se expresa también en diferentes isoformas, no muestra interacción con caveolina-1 como lo es el caso de utrofina (Fig. 10 membrana 2). No obstante la detección de la misma en el sobrenadante inmunoprecipitado como ya se ha mencionado anteriormente, indica la posible interacción de distrofina en un diferente complejo al que estructura caveolina-1. (Fig. 10 membrana 4).

Las bandas observadas en conjunto con la detección de caveolina-1, distrofina y utrofina entre los 58 y 36 kDa (Fig. 9-11 membranas 1, 2, 3 y 4) corresponden a las cadenas pesadas del anticuerpo primario anti-cav-1 (H97) adicionado en la inmunoprecipitación. Debido a que el anticuerpo primario está hecho en conejo es posible detectarlo en las membranas mediante la adición del secundario, el cual está dirigido contra los anticuerpos de esa especie.

Para el caso de los sarcoglicanos las bandas entre los 58 y 36 kDa no son observadas en el Western blot ya que el secundario está dirigido contra anticuerpos primarios elaborados en ratón (Fig. 12-14 membranas 1, 2, 3 y 4).

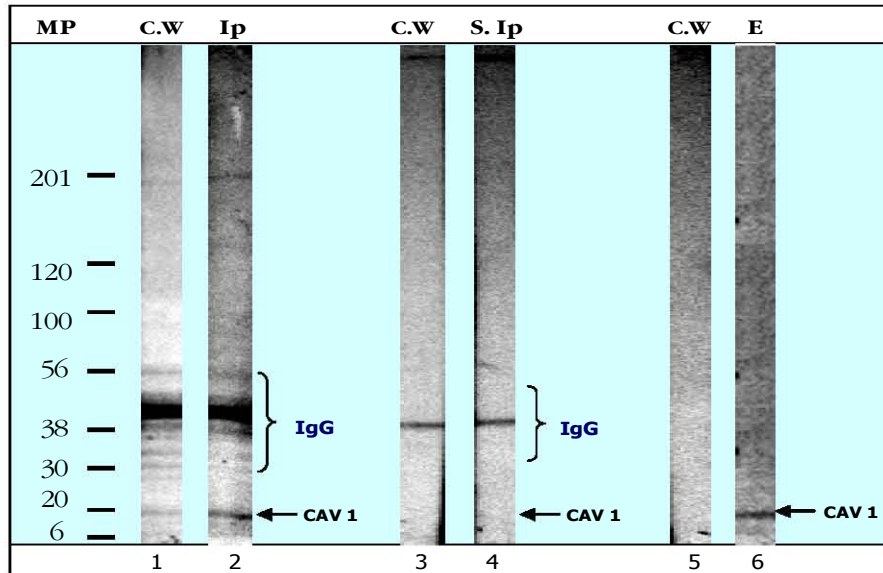


FIGURA 9. INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA PROTEÍNA CAVEOLINA-1 EN CÉLULAS DE ML DE VENA DE CORDÓN UMBILICAL. Inmunoprecipitación (Ip), Sobrenadante de la inmunoprecipitación (S.Ip) y extracto de proteína total (E). Las proteínas totales fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-CAV-1. El extracto de proteína total (E), la proteína inmunoprecipitada (Ip) y el sobrenadante de la inmunoprecipitación (S.Ip) fueron analizados mediante ensayos de Western blot usando anticuerpos policlonales dirigidos contra la región carboxilo terminal de la proteína caveolina-1, utilizando como control del Wester blot (W.B) anticuerpos Anti-IgG diseñados en conejo y acoplada a peroxidasa.

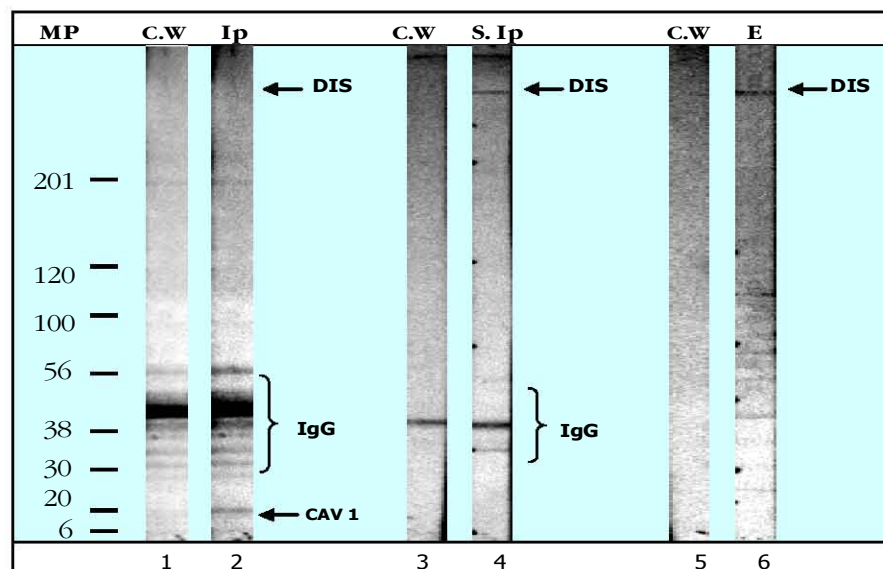


FIGURA 10. INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA PROTEÍNA CAVEOLINA-1 REVELADA CON ANTICUERPOS ANTI-DISTROFINA EN CÉLULAS DE ML DE VENA DE CORDÓN UMBILICAL Inmunoprecipitación (Ip), Sobrenadante de la inmunoprecipitación (S.Ip) y extracto de proteína total (E). Las proteínas totales

fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-CAV-1. El extracto de proteína total (E), las proteína coinmunoprecipitada (Ip) y el sobrenadante de la inmunoprecipitación (S.Ip) fueron analizados mediante ensayos de Western blot usando anticuerpos policlonales dirigidos contra la región carboxilo terminal de la proteína distrofina, usando como control negativo del Wester blot (W.B) anticuerpos secundarios Anti-IgG hechos en conejo y acoplados a peroxidasa.

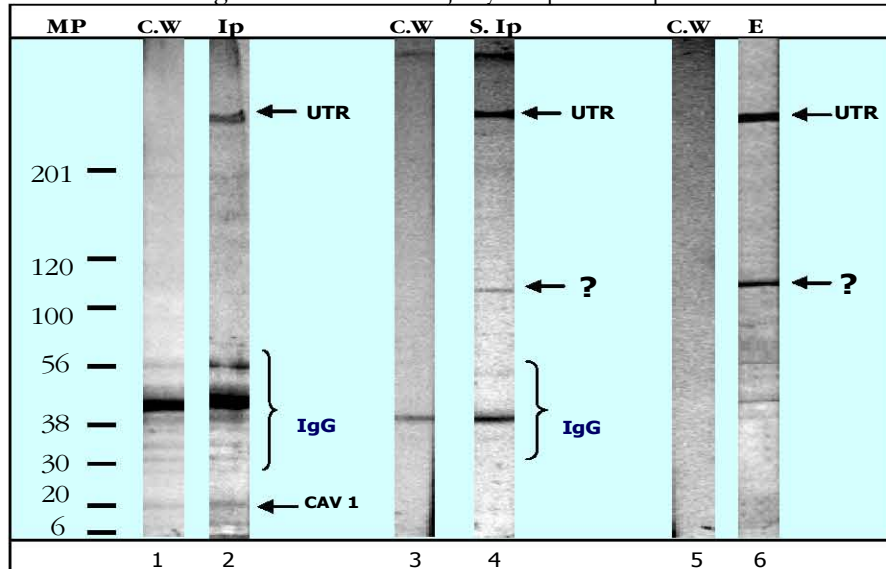


FIGURA 11. INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA PROTEÍNA CAVEOLINA-1 REVELADA CON ANTICUERPOS ANTI-UTROFINA EN CÉLULAS DE ML DE VENA DE CORDÓN UMBILICAL. Inmunoprecipitación (Ip), Sobrenadante de la inmunoprecipitación (S.Ip) y extracto de proteína total (E). Las proteínas totales fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-CAV-1. El extracto de proteína total (E), las proteína coinmunoprecipitada (Ip) y el sobrenadante de la inmunoprecipitación (S.Ip) fueron analizados mediante ensayos de Western blot usando anticuerpos policlonales dirigidos contra la región carboxilo terminal de la proteína utrofina, usando como control negativo del Wester blot (W.B) anticuerpos secundarios Anti-IgG hechos en cabra acoplados a peroxidasa.

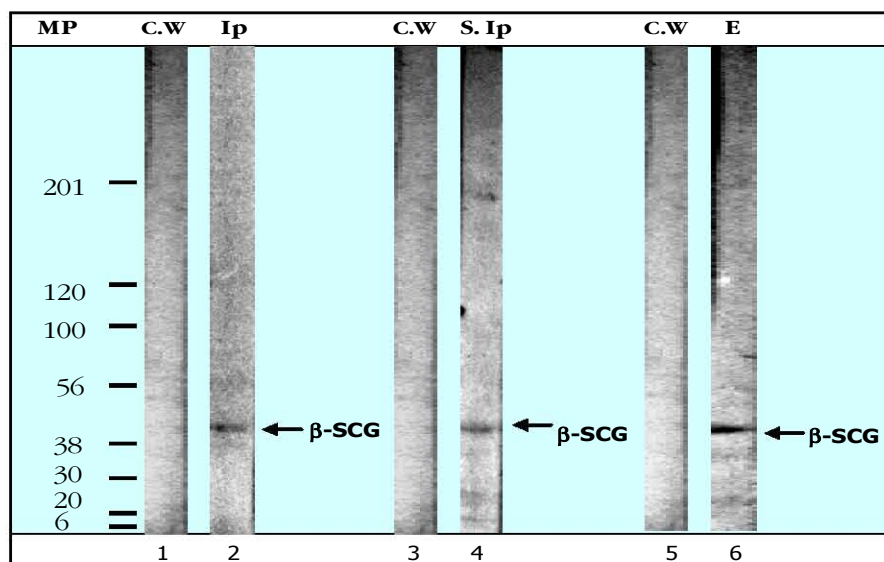


FIGURA 12. INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA PROTEÍNA CAVEOLINA-1 REVELADA CON ANTICUERPOS β -SG EN CÉLULAS DE ML DE VENA DE CORDÓN UMBILICAL Inmunoprecipitación (Ip), Sobrenadante de la inmunoprecipitación (S.Ip) y extracto de proteína total (E). Las proteínas totales fueron

inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-CAV-1. El extracto de proteína total (E), la proteína coimmunoprecipitada (Ip) y el sobrenadante de la inmunoprecipitación (S.Ip) fueron analizados mediante ensayos de Western blot usando anticuerpos policlonales dirigidos contra la región carboxilo terminal de ϵ -SG, usando como control negativo del Western blot (W.B) anticuerpos secundarios Anti-IgG hechos en ratón acoplados a peroxidasa.

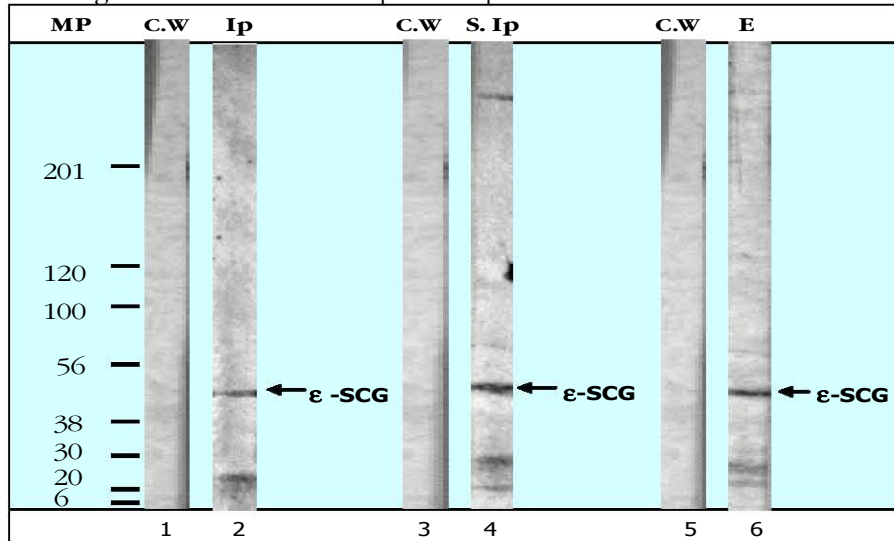


FIGURA 13. INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA PROTEÍNA CAVEOLINA-1 REVELADA CON ANTICUERPOS ϵ -SG EN CÉLULAS DE ML DE VENA DE CORDÓN UMBILICAL Inmunoprecipitación (Ip), Sobrenadante de la inmunoprecipitación (S.Ip) y extracto de proteína total (E). Las proteínas totales fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-CAV-1. El extracto de proteína total (E), la proteína coimmunoprecipitada (Ip) y el sobrenadante de la inmunoprecipitación (S.Ip) fueron analizados mediante ensayos de Western blot usando anticuerpos policlonales dirigidos contra la región carboxilo terminal de ϵ -SG, usando como control negativo del Western blot (W.B) anticuerpos secundarios Anti-IgG hechos en ratón acoplados a peroxidasa.

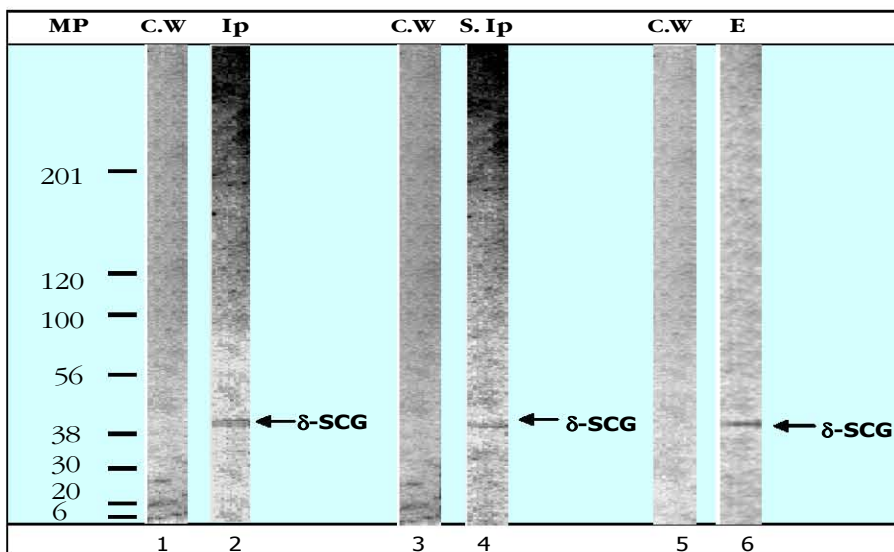


FIGURA 14. INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA PROTEÍNA CAVEOLINA-1 REVELADA CON ANTICUERPOS δ -SG EN CÉLULAS DE ML DE VENA DE CORDÓN UMBILICAL Inmunoprecipitación (Ip), Sobrenadante de la inmunoprecipitación (S.Ip) y extracto de proteína total (E). Las proteínas totales fueron inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-CAV-1. El extracto de proteína total (E), la proteína coimmunoprecipitada (Ip) y el sobrenadante de la inmunoprecipitación (S.Ip) fueron analizados

Capítulo VIII

Discusión

Gran parte de la importancia del estudio del complejo DGC/UGC se debe a que su ausencia como componente estructural en la membrana celular propicia el desarrollo de algunos tipos de DM y en ocasiones CMD. Modelos murinos deficientes de distrofina (mdx), γ -SG (McNally, 1998), β -SG (Durbeej, 2000) y δ -SG (Coral-Vázquez, 1999), han sugerido que el desarrollo de la CMD es provocada por la eliminación de estas proteínas en MLV. Esto podría significar que la integridad del complejo como componente estructural de la célula muscular proporciona a la membrana estabilidad y resistencia durante los procesos de relajación y contracción (Cohn, 2000), asimismo podría participar en procesos de transducción de señales (Rando, 2001).

Aunque en muchos estudios se ha demostrado que la composición del complejo SG-SPN, esta formado por las proteínas α -SG, β -SG, δ -SG, ϵ -SG y SPN, incluyendo como ultimo miembro a ζ -SG (Wheeler, 2002; Shiga, 2006) pocos son los estudios que han demostrado la presencia de estas proteínas

como parte de complejos alternos en tejido vascular, y aparentemente con funciones diferentes. En un estudio preliminar Rivier y colaboradores en 1997 mostraron la presencia de utrofina y distrofina en las venas y arterias de vasos de conejo. Esto permitió especular sobre la posible existencia de complejos de proteínas asociadas a distrofina o utrofina. Bajo esta perspectiva en nuestro grupo de trabajo analizamos mediante pruebas de inmunofluorescencia la expresión de diversas proteínas que se asocian a distrofina.

Esto nos permitió sugerir que en el MLV de la vena y arteria del cordón umbilical existen al menos dos complejos de proteínas, uno asociado a distrofina y otro a utrofina (Ramírez-Sánchez, 2005). Tomando como antecedente lo anterior, y que el trabajo de Ramírez-Sánchez y colaboradores en 2005, también sugiere la probable formación de complejos DGC/UGC asociados en algunos casos a caveolina-1, en el presente trabajo nos abocamos a determinar, por medio de ensayos de Western blot e inmunoprecipitaciones, la posible interacción bioquímica de Caveolina-1 con los SG's, con utrofina y/o distrofina en cultivos celulares de MLV de vena de cordón umbilical.

Los resultados de los ensayos de Western blot que aquí se presentan, muestran la expresión de algunos de los miembros del DGC/UGC: entre los que destacan algunas proteínas del complejo SG-SPN, como lo son las proteínas β -SG, δ -SG y ϵ -SG así como distrofina, utrofina y caveolina-1 en células de MLV de vena de cordón umbilical.

Adicionalmente experimentos de coimmunoprecipitación con el anticuerpo anti-caveolina-1 a partir de extractos de proteína total provenientes de dicho modelo celular, muestran la asociación de las proteínas β -SG, δ -SG, ϵ -SG, utrofina y caveolina-1 como parte de un complejo alterno localizado en la caveola. Por otra parte, la no asociación de distrofina con caveolina-1 sugiere que existe otro complejo DGC fuera de los dominios caveolares, este complejo podría ser similar al publicado en músculo estriado.

De la proteína caveolina-1 se conocía, hasta hace poco, su interacción con distrofina en ML de útero de mono (Hagiwara, 2002); sin embargo recientemente con el trabajo reportado por Ramírez-Sánchez y colaboradores en 2005, y con los resultados obtenidos en el presente estudio se ha postulado su

asociación con diferentes miembros del complejo utrofina/ distrofina en MLV, lo cual ha propuesto una estrecha relación y una posible función del complejo DGC dentro de la caveola (Ramírez-Sánchez 2005).

Diversos estudios han reportado la interacción del complejo DGC y de la proteína caveolina-3 en músculo estriado (Herrmann, 2000 y Minetti, 1998), sin embargo la participación de esta proteína o de sus isoformas (caveolina 1 y 2) en conjunto con las del complejo DGC en MLV ha sido poco estudiada. Aunque en algunos de estos reportes se ha manifestado el interés de conocer la participación del complejo DGC y su relación con caveolina-1 pocos son los estudios que han hondado en establecer dicha interacción.

Por otro lado es interesante mencionar que la asociación descrita en este proyecto mediada principalmente por caveolina-1 en MLV, muestra por primera vez un complejo UGC asociado a las caveolas formado por la unión de los SG's, utrofina y caveolina-1, el cual en lugar de estar conformado por la participación de distrofina como comúnmente se conoce esta formado por la interacción de su homólogo autosómico, la utrofina.

Hasta la fecha, no existen reportes que demuestren interacción entre caveolina-1 y utrofina en MLV, sin embargo, en el modelo vascular empleado en el presente estudio, se ha demostrado la interacción entre caveolina-1 y utrofina, por lo que sugerimos que esta asociación puede ser importante en la función de la caveola de MLV.

Se sabe que la expresión de las caveolinas es esencial para la formación de los microdominios caveolares, los cuales son pequeñas invaginaciones de la membrana celular, encargadas de realizar funciones de señalización, endocitosis y de transporte intracelular del colesterol, entre otras (Parton, 1996 y Anderson, 1998). En el caso de las caveolas de MLV, se sabe que la participación de caveolina-1 es muy importante en la regulación del tono vascular ya que modula diferentes moléculas de señalización encargadas de activar estos procesos.

Modelos murinos deficientes de caveolina-1 han demostrado que la participación de esta proteína es esencial para modular la actividad de la eNOS, la cual

es una molécula fundamental en la regulación del tono vascular (Drab, 2001 y Razani, 2001).

Recientemente en el reporte de Ramírez-Sánchez y colaboradores 2006 en células de endotelio, se ha puesto de manifiesto la interacción entre caveolina-1 y utrofina como parte de un complejo compuesto por caveolina-1, utrofina, ϵ -SG, β -DG, y eNOS, lo cual ha propuesto la participación de estas proteínas en procesos mecánicos de regulación del tono vascular mediante su interacción con la enzima eNOS. De manera que la participación de este complejo en el endotelio de cierto modo respalda nuestros resultados e indirectamente nos da un indicio de la posible importancia que tendría nuestro complejo en la caveola del MLV.

Modelos murinos deficientes de caveolina-1 o sobre expresados con esta proteína, han demostrado que la interacción entre una multitud de moléculas de señalización y caveolina-1 está enfocada en llevar a cabo procesos biológicos de regulación, como lo son la contracción muscular, la proliferación y diferenciación celular de MLV (Hardin, 2005). Aunque entre algunas de estas moléculas de señalización y las proteínas que conforman el complejo DGC/UGC no han reportado relación alguna con la proteína caveolina-1 en cuanto a lo que a función se refiere, es posible sugerir que la participación del complejo constituido por los SG`s, utrofina y caveolina-1 detectado en las células del ML de vena de cordón umbilical, esté aparentemente asociado con funciones mecanosensoras a través de una posible relación con eNOS, tal como lo sugiere Ramírez-Sánchez y colaboradores en 2006, en el endotelio.

Aunque en el presente trabajo no se ha demostrado relación alguna del complejo UGC-caveolina1 con la enzima eNOS o de sus isoformas en células del MLV, la estrecha relación que mantiene el endotelio con el MLV, así como la publicación de Hardin y colaboradores en 2005, en la que se describe la interacción de caveolina-1 como modulador de la actividad de la eNOS en MLV, hace posible pensar de la existencia de esta interacción y la subsiguiente función de una manera similar a lo que se describe en el endotelio.

Adicionalmente, se ha demostrado que la deficiencia de caveolina-1 en modelos murinos, suprime la expresión de las caveolas en ML, mientras que en ME estas

permanecen intactas. De manera contraria en modelos deficientes de caveolina-3 se ha demostrado la supresión de caveolas en ME y no así para ML. Esto sugiere que caveolina-1 es una proteína requerida para la formación de caveolas de ML y aunque caveolina-3 también se expresa en el mismo tejido, no compensa la formación de las caveolas debido a la función fisiológica de caveolina-1 en ML (Cohen, 2004). Esto significa que la proteína caveolina-1 no solo participa como una unidad dinámica, capaz de capturar e integrar señales a partir de un ambiente extracelular o a través de la respuesta a estímulos provenientes de ciertos procesos fisiológicos como son la contracción y relajación muscular, sino que también su participación como entidad estructural es importante para desencadenar una determinada vía de señalización celular

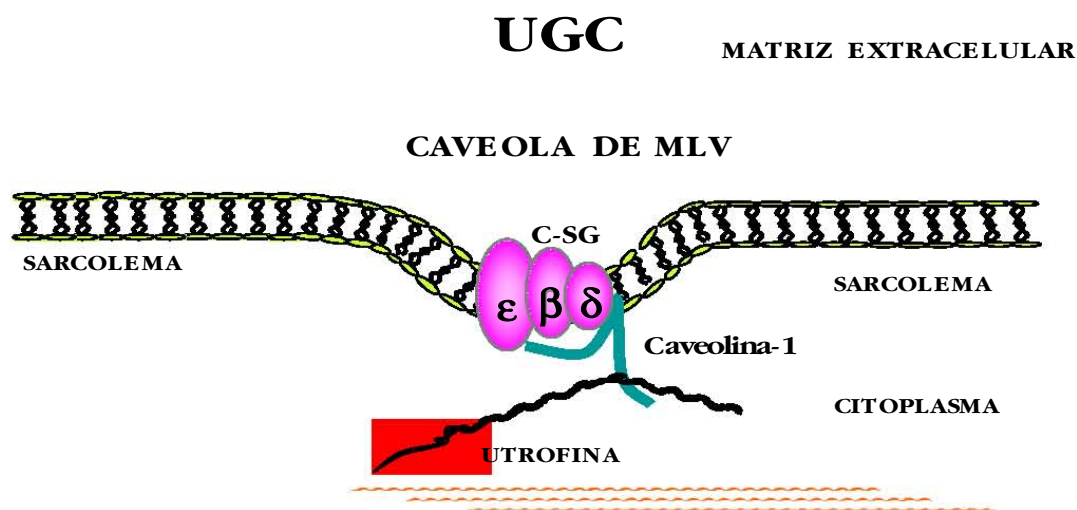


FIGURA 16. COMPLEJO DE GLICOPROTEINAS ASOCIADO A UTOFINA. Representación esquemática del complejo UGC-Caveolina-1 caracterizado por medio de inmunoprecipitaciones y ensayos de western blot propuesto en células de músculo liso de vena de cordón umbilical.

Un reporte que fundamenta la presencia de complejos alternos, es el realizado por Rivier y colaboradores en 1997 en el que se demuestra que a lo largo de las venas y arterias femorales de conejo existen formas alternativas de complejos de proteínas asociados a distrofina o utrofina. En este reporte se pone de manifiesto que la expresión de ambas proteínas es dependiente de la estructura y función de cada vaso, de tal manera

que en venas y arterias de calibre mayor en conjunto en arterias de calibre menor (encargadas del transporte activo de la sangre), se detecta la expresión de utrofina y distrofina, mientras que en venas de calibre menor (encargadas del transporte pasivo de la sangre) solamente se detecta la expresión de la proteína utrofina como parte de un complejo diferente al detectado con distrofina en los otros vasos estudiados.

Debido a que las venas y arterias de calibre mayor al igual que las arterias de calibre menor, tienen una participación muy activa en la presión sanguínea, así como propiedades contráctiles en comparación con venas de un calibre menor, se sugiere que las proteínas del complejo utrofina/ distrofina juegan un papel muy importante como estructuras que confieren resistencia y estabilidad celular (Rivier, 1997). Dado que nuestro modelo vascular tiene una función semejante a la que se reporta en el artículo de Rivier y colaboradores en 1997, es decir, que participa en el transporte pasivo de la sangre, es posible sugerir alguna función al complejo constituido por utrofina, los sarcoglicanos y caveolina1 en este importante proceso de los vasos.

Esto sugiere que la participación de utrofina como parte del complejo caracterizado por su interacción con caveolina-1 y los sarcoglicanos, en este modelo vascular además de participar posiblemente en procesos de modulación del tono vascular, quizá pueda tener una función similar a lo que sucede con las venas de calibre menor, es decir, una función menos mecánica dentro de los procesos de contráctiles de tal manera que su función este enfocada como ya se ha mencionado a procesos fisiológicos controlados a través de alguna vía de señalización celular.

Adicionalmente y de manera interesante la presencia de β -SG, δ -SG, ϵ -SG, utrofina y distrofina en el sobrenadante del inmunoprecipitado con el anti-caveolina-1, sugiere la participación de estas proteínas como parte de un complejo independiente a la caveola. La ausencia de caveolina-1 en esta misma fracción, en conjunto con el antecedente reportado por Ramírez-Sánchez y colaboradores en 2005 en donde se propone la existencia de complejos de proteínas alternativos asociados en algunos casos con caveolina-1 en tejido de MLV, respalda la idea en la que hemos propuesto la participación de estas proteínas (utrofina, distrofina y los

sarcoglicanos) como parte de un complejo alternativo, diferente al descrito por la inmunoprecipitación con caveolina-1.

Es importante destacar que la presencia de estos complejos tanto del que esta localizado dentro de la caveola y del aparente en regiones no caveolares respalda, en parte, la idea que se tiene de la participación del complejo utrofina/distrofina en la caveola.

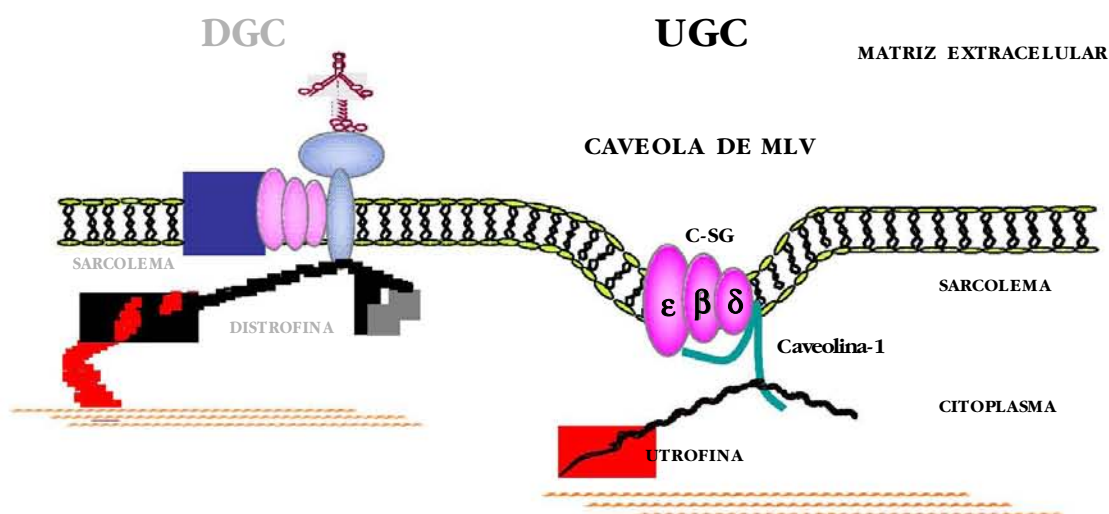


FIGURA 17. COMPLEJOS DE PROTEINAS ASOCIADOS A UTROFINA O DISTROFINA. Representación esquemática del complejo UGC-Caveolina-1 y del posible complejo DGC fuera de la caveola en células de ML de vena de cordón umbilical.

Finalmente en cuanto a la presencia de la banda con un PM entre los 100 y 120 KDa, detectada mediante el uso de anticuerpos específicos dirigidos contra la región carboxilo terminal de la proteína utrofina, la cual fue localizada en el sobrenadante del extracto inmunoprecipitado así como en el extracto de proteína total manifiesta la existencia de lo que podría ser una isoforma perteneciente a la familia utrofina.

Debido a que la proteína utrofina es codificada por pequeños y múltiples exones el transcrito procesado a partir de estos promotores, da origen a pequeñas y diversas isoformas carboxilo-terminal de esta proteína (Khurana, 2003), las cuales han sido detectadas en diferentes tejidos como lo son; el endotelio y las

uniones neuromusculares, por lo cual esto posible pensar de su expresión en MLV.

En parte, esto se puede ver respaldado con lo que se reporta en el artículo publicado por Rivier y colaboradores en 1997, en el que además de presentar diferentes localizaciones de las proteínas utrofina y distrofina como posibles formas alternativas de complejo, también muestra la existencia a lo largo de las venas y arterias femorales de conejo, la presencia de una banda de proteína con un PM mas bajo que el correspondiente a la proteína utrofina de 397 kDa, que al ser detectada mediante un anticuerpo policlonal dirigido contra la región carboxilo terminal de la proteína utrofina de 397 kDa, el cual contiene los últimos siete aminoácidos correspondientes a la secuencia final de la región carboxilo terminal de la proteína, sugieren que el producto detectado pertenece a esta familia.

Estudios de western blot en los que se han utilizado anticuerpos específicos dirigidos contra la región carboxilo terminal de la proteína utrofina, reportan que no solamente la presencia de la proteína utrofina con más alto PM es la que predomina pues frecuentemente en diversos estudios se han detectado proteínas con un PM más bajo (Nguyen, 1992).

En base a lo que reportan estos antecedentes es difícil descartar que la banda localizada entre los 100 y 120 Kda no sea un miembro perteneciente a la familia de isoformas de utrofina, sin embargo esto no indica con seguridad que lo sea pues antes que nada es necesario realizar experimentos de RT-PCR y llevar acabo un estudio mas detallado de esto.

Capítulo IX

Perspectiva

Finalmente con la caracterización del complejo UGC asociado a caveolina-1 en este modelo de MLV, se ha propuesto que la presencia de estas formas alternativas de complejos DGC o UGC por un lado están relacionadas con el buen funcionamiento fisiológico de la membrana celular al proveer un soporte mecánico durante los procesos de relajación y contracción muscular tal como se reporta en diversas publicaciones, mientras que por otro lado los complejos localizados en dominios caveolares están relacionados con la activación o inactivación de moléculas de señalización como lo es en el caso de la enzima eNOS, la cual se ha visto que es liberada del complejo UGC-caveolina-1 en el endotelio de la vena y arteria del cordón umbilical a partir de la estimulación por procesos mecánicos.

De tal forma, que se cree que la participación de este nuevo complejo UGC caveolina-1 descrito en células de ML de vena de cordón umbilical podría estar implicado en la activación de vías de señales por medio de estímulos mecánicos participando como un mecano sensor en la modulación de la regulación del tono vascular, partiendo de la supuesta relación entre este complejo UGC-caveolina-1 y la enzima eNOS en ML de vena de cordón umbilical.

Por otro lado estudios recientes reportan que la proteína filamina, asociada con caveolina-1 y con la molécula de señalización conocida como Rho, la cual interviene en los procesos de organización de actina del citoesqueleto, causa la reorganización de las estructuras caveolares (Stahlhut, 2000; Thomsen, 2002), con lo que se ha propuesto que dicha interacción implica que la red de filamentos de actina, al estar relacionada con la organización estructural de las caveolas (Kawabe, 2003), posiblemente mantenga alguna relación en cuanto a función con componentes del complejo UGC y la caveola, descritos en el presente trabajo, ya que como se sabe no solamente filamina es la única proteína que se une a los filamentos de F-actina, sino también utrofina y distrofina por lo que es posible pensar de una aparente relación con la formación u organización estructural de este micro dominio.

Es importante mencionar que todos estos antecedentes y la reciente información aportada en este proyecto nos abre un nuevo camino para el análisis del complejo DGC/UGC y así comprender mejor la función de las proteínas que lo componen ya que la existencia de estas formas alternativas de complejo en relación con la aparición de la CMD posiblemente estén asociadas con el factor que desencadena su desarrollo. Esto nos da la pauta para desarrollar un estudio mas completo con el fin de entender las diversas funciones y mecanismos que llevan acabo estos complejos para mantener en buen funcionamiento de la morfología vascular.

Capítulo X

Conclusiones

Se demostró en células de MLV de vena de cordón umbilical humano la expresión de algunos de los miembros del complejo DGC/UGC, entre los que destacan las proteínas β -SG, δ -SG, ϵ -SG, distrofina así como también utrofina y caveolina-1.

Se, demostró en células de MLV del cordón umbilical humano, la presencia de un complejo UGC constituido al menos por las proteínas β -SG, δ -SG, ϵ -SG, utrofina; el cual está asociado a la proteína de señalización caveolina-1.

Capítulo XI

Referencias

Anastasi, G., Cutroneo, G., Sidoti, A., Santero, G., D'Angelo, R., Rizzo, G., Rinaldi, C., Giacobbe, O., Bramante, P., Navarra, G., Amato, A y Favaloro, A, (2005). Sarcoglycan subcomplex in normal human smooth muscle: an immunohistochemical and molecular study. *Int. J. Mol. Med.* **16** :367–374.

Barnea, E., Zuk, D., Simantov, R., Nudel, U y Yaffe, D, (1990). Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron.* **5**:881-888.

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

Blake, D.J., Nawrotzki, R., Loh, NY., Gorecki, D.C y Davies, K, (1998). β -Distrobrevin, aber of the dystrophin- related protein family. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95**:241-246.

Blake, D., Weir, A., Newey, S y Davies, K, (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.* **82**: 291-329.

Bonnemann, C.G., Modi, R., Noguchi, S., Mizuno, Y., Yoshida, M., Gussoni, E., McNally, E.M., Duggan, D.J., Angelini, C y Hoffman, E.P, (1995). β -sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet.* **11**(3): 266- 273.

Brennan, J.E., Chao, D.S., Gree, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., Froehner, S.C y Bredt, D.S, (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the post-synaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*. **84**:757-767.

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

Chan, Y.M., Bonnemant, C.G., Lidov, H.G y Kunkel, L.M, (1998). Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture. *J. Cell. Biol.* **143**(7): 2033-2044.

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

Cohen, A.W., Hnasko, R., Schubert, W y Lisanti, M.P, (2004). Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev.* **84**:1341-1379.

Cohn, R.D y Campbell, K, (2000). Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve.* **23**: 1456-1471.

Cohn, R.D., Durbeej, M., Moore, S.A., Coral-Vazquez, R., Prouty, S y Campbell, K.P, (2000). Prevention of cardiomyopathy in mouse models lacking the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J. Clin. Invest.* **107**: R1-R7.

Coral-Vazquez, R., Cohn, R.D., Moore, S.A., Hill, J.A., Weiss, R.M., Davidson, R.L., Straub, V., Barresi, R., Bansal, D., Hrstka, R.F., Williamson, R y Campbell, K.P, (1999). Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell.* **99**:465-474.

Cox, J.F y Kunkel, L.M, (1997). Dystrophies and heart disease. *Curr. Opin. Cardiol.* **12**:329-343.

Crosbie, R.H., Heighmay, J., Venzke, D.P., Lee, J.C y Campbell, K.P, (1997). Sarcospan the 25kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J. Biol. Chem.* **272**: 31221-31224.

Dalkilic, I y Kunkel, M.L, (2003). Muscular Dystrophies: genes to pathogenesis. *Curr. Opin. in Genet. Develop.* **13**:231-238.

Duclos, F., Straub, V., Moore, S.A., Venzke, D.P., Hrstka, R.F., Crosbie, R.H., Durbeej, M., Lebakken, C.S., Ettinger, A.J., Van der Meulen, J., Holt, K.H., Lim, L.E., Sanes, J.R., Davidson, B.L., Faulkner, J.A., Williamson, R y Campbell, K.P, (1998). Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *J. Cell. Biol.* **142**:1461-1471.

- Durbeej, M., Cohn, R.D., Hrstka, F., Moore, S.A., Allamand, V., Davidson, B.L., Williamson, R.A y Campbell, K.P, (2000). Disruption of β -sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Mol. Cell. Biol.* **5**:141-151.
- Drab, M., Verkade, P y Elger, M, (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* **293**:2449-2452.
- Emery, E. H. A, (2002). The muscular dystrophies. *Lancet* **359**:687-695.
- Ervasti, J.M y Campbell, K.P, (1993). A role for the dystrophin glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell. Biol.* **122**:809-823.
- Ettinger, A.J., Feng G y Sanes, J.R, (1997). ϵ -Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J. Biol. Chem.* **272**:32534-32538.
- Fatkin, D y Graham, R.M, (2002). Molecular Mechanisms of Inherited Cardiomyopathies. *Physiol. Rev.* **82**:945-980.
- Fort, P., Estrada, F.J., Bordais, A., Mornet, D., Sahel, J.A., Picaud, S., Rosas-Vargas, H., Coral-Vázquez, R.M y Rendon, A, (2005). The sarcoglycan-sarcospan complex localization in mouse retina is independent from dystrophins. *Neuro. Res.* **53**:25-33.
- Hack, A.A., Groh, M y McMally, E.M, (2000). Sarcoglycans in Muscular Dystrophy. *Micros. Res. And Tech.* **48**: 167-180.
- Hagiwara, Y., Nishina, Y., Yorifuji, H y Kikuchi, T, (2002). Immunolocalization of caveolin-1 and caveolina-3 in Monkey skeletal, cardiac and uterine smooth muscles. *Cell. Struct. Func.* **27**:375-382.
- Hardin, D.C y Vallejo, J, (2005). Caveolins in vascular smooth muscle: Form organized function. *Card. Res.* **69**:808-815.
- Holt, K.H y Campbell, K.P, (1998). Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.* **273**:34667-34670.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J.M., Leveille, C.J., Slaughter, C.A., Sernett, S.W y Campbell, K.P, (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature.* **355**: 696-702.
- Imamura, M., Araishi, K., Noguchi, S y Ozawa, E, (2000). A sarcoglycan-dystroglycan complex anchors Dp116 and utrophin in the peripheral nervous system. *Hum. Mol. Genet.* **9**:3091-3100.

Kawabe, J., Okumura, S., Lee, M-C., Sadoshima, J y Ishikawa, Y, (2004). Translocation of caveolina regulates stretch-induced ERK activity in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **286**: H1845-H1852.

Klein, C., Brin, M.F., Kramer, P., Sena-Esteves, M., De Leon, D., Doheny, D., Breassman, S., Fahn, S., Breakefield, X.O y Ozelius, (1999). Association of a missense change in the D2 dopamine receptor with myoclonus dystonia. *L.J. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 5173-5176.

Lim, L.E., Duclos, F., Broux, O., Bourg, N., Sunada, Y., Allamand, V., Meyer, J., Richard, I., Moomaw, C y Slaughter, C, (1995). β -sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat. Genet.* **11**(3): 257-65.

Liu, L.A y Enguall, (1999). ϵ -Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **272**:38171-38176.

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

McNally, E.M., Pasos-Bueno, M.R., Bonnemann, C.G., Vainzof, M., De sa Moreira, E., Lidov, H.G., Othmane, K.B., Denton, P.H., Vance, J.M., Zatz y Kunkel, L.M, (1998). Mild and severe muscular dystrophy caused by a single γ -sarcoglycan mutation. *Am. J. Hum. Genet.* **59**:1040-1047.

Minetti, C., Stogia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., Masetti, E., Mazzocco, M., Egeo, A., Donati, MA., Volonte, D., Galbiati, F., Cordone, G., Bricarelli, F.D., Lisanti, M.P y Zara, F, (1998). Mutations in the caveolina-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.***18**:365-368.

Miura, P y Jasmin, B.J, (2006). Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: How close are we? *Trends. Mol. Med.* **12**(3):122-129.

Nguyen, T.M., Ellis, J.M., Love, D.R., Davies, K.E., Gatter, K.C., Dickson, G y Morris G.E, (1991). Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines. *J. Cell. Biol.* **115**:1695-1700.

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

Noguchi, S., McNally, E.M., Ben Otmane, K., Hagiwara, Y., Mizuno, Y., Yoshida, M., Yamamoto, H., Bonnemann, C.G., Gussoni, E., Denton, P.H., Kyriakides, T., Middleton, L., Hentati, F., Ben-Hamida, M., Nonaka, I., Vance, J.M., Kunkel, L.M y Ozawa, E, (1995). Mutation on the dystrophin-associated protein γ -sarcoglycan in chromosome 13 causes muscular dystrophy. *Science*. **270**:819-822.

Noguchi, S., Wakabayashi, E., Imamura, M., Yoshida, M y Ozawa, E, (2000). Formation of sarcoglycan complex with differentiation in cultured myocytes. *Eur. J. of Biochem*. **267**:540-648.

Oak, S.A., Russo, K., Petrucci, T.C y Jarrett, H.W, (2001). Mouse α 1-syntrophin binding to Grb2: further evidence of a role for syntrophin in cell signaling. *Biochem*. **40**:11270-11278.

Ohlendieck, K y Campbell, K.P, (1991). Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. *J. Cell Biol*. **115**:1685-1694.

Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E y Lisanti, M.P, (1998). Caveolins a family of Scaffolding proteins for organizing "preassembled signalling complex" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem*. **273**:5419-5422.

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

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

Pearce, M., Blake, D.J., Tinsley, J.M., Byth, B.C., Campbell, L., Monaco, A.P y Davies, K.E, (1993). The utrophin and dystrophin genes share similarities in genomic structure. *Hum. Mol. Genet*. **2**:1765-1772.

Peters, M.F., O'Brien, K.F., Sadoulet-Puccio, H.M., Kunkel, L.M., Adams, M.E y Froehner, S.C, (1997). β -Dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification, cloning, and protein associations. *J Biol. Chem*. **272**:31561-31569.

Pons, F., Robert, A., Fabrbrizio, E., Hugon, G.C., Valifano, J.C., Fehrentz, J.A., Martinez, J y Mornet, D, (1994). Utrophin localization in normal and dystrophin-deficient heart. *Circulation*. **90**:369-374.

Ramírez-Sánchez, I. (2003). Análisis de la expresión del complejo Sarcoglicano-Sarcospán en células de Músculo liso y Endotelio de la vena y arteria del cordón umbilical. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F.

Ramírez-Sánchez, I., Rosas-Vargas, H., Ceballos-Reyes, G., Salamanca, F y Coral-Vazquez, R, (2005). Expression analysis of the SG-SPN complex in the smooth muscle and endothelial cells of Human Umbilical Cord Vessels. *J. Vasc. Res.* **42**:1-7.

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

Razani, B., Engelman, J.A y Wang, X.B, (2001). Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular anomalies. *J. Biol. Chem.* **276**:38121-38138.

Rybakova, I.N., Patel, J.R y Ervasti, J.M, (2000). The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J. Cell. Biol.* **150**:1209- 1214.

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

Roberds, S.L., Leturcq, F., Allamand, V., Piccolo, F., Jeanpierre, M., Anderson, R.D., Lim, L.E., Lee, J.C., Tome, F.M., Romero, N.B., Fardeau, M., Beckmann, J.S., Kaplan, J y Campbell, K.P, (1994). Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell.* **78**(4): 625-33.

Sadoulet-Puccio, H.M., Rajala, M y Kunkel, L.M, (1997). Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:12413–12418.

Saunders-Pullman, R., Shriberg, J., Heiman, G., Raymond, D., Wendt, K., Kramer, P., Schilling, R.K., Kurlan., Klein, C., Ozelius, L.J., Risch, N.J y Bressman, S.B, (2002). Myoclonus dystonia: possible association with obsessive-compulsive disorder and alcohol dependence. *Neur.* **58**:242-245.

Shiga, K., Yoshioka, H., Matsumiya, T., Kimura, I., Takeda, S y Imamura, M, (2006). ζ -sarcoglycan is a functional homologue of γ -sarcoglycan in the formation of the sarcoglycan complex. *Exp. Cell. Res.* **312**: 2083-2092.

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

Smart, E.J., Graf, G.A., McNiven, M.A., Sessa, W.C., Engelman, J.A., Scherer, P.E., Okamoto, T y Lisanti, M.P, (1999). Caveolins, Liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* **19**:7289-7304.

Stahlhut, M y van Deurs, B, (2000). Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell.* **11**:325–337.

Straub, V., Ettinger, A.J., Durbeej, M., Venzke, D.P., Cutshall, S., Sanes, J y Campbell, K.P, (1999). ϵ -Sarcoglycan replaces α -sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J. Biol. Chem.* **274**:27989-27996.

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

Tomamasi, D.I., Vignano, A., Di Zenzo, G., Sudor, M., Cesareni, G y Dente, L, (2000). Contribution of the different modules in the utrophin carboxy terminal region to the formation and regulation of the DAP complex. *F.E.B.S. Lett.* **471**: 229-234.

Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M y van Deurs, B, (2002). Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol. Biol. Cell.* **13**: 238–250.

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

Vachon, P.H., Xu, H., Lui, L., Loechel, F., Hayashi, Y., Arahata, K., Reed, J.C., Wewer, U.M y Engvall, E, (1997). Integrins ($\alpha 7 \beta 1$) in muscle function and survival. Disrupted expression in mersin-deficient congenital muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* **100**:1870-1881.

Vainzof, M., Moreira, E.S., Ferraz, G., Pasos-Bueno, M.R., Marin, S.K y Zatz, M, (1999). Further evidence for the organization of the four sarcoglycan proteins within the dystrophin-glycoprotein complex. *Eur. J. Hum. Genet.* **7**:251-254.

Weir, A.P, (2002). A- and B-utrophin have different expression patterns and are differentially up-regulated in mdx muscle. *J. Biol. Chem.* **277**:45285–45290.

Wheeler, M.T., Zarnegar, S y McNally, E.M, (2002). γ -Sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Gen.* **18**:2147-2154.

Yang, B., Jung, D., Motto, D., Meyer, J., Koretzky, G y Campbell, K. P, (1995). SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J. Biol. Chem.* **270**:11711-11714.

Yoshida, M., Hama, H., Ishikawa-Sakurai, M., Imamura, M., Mizuno, Y., Araishi, K., Wakabayashi-Takai, E., Noguchi, S., Sasaoka, T y Ozawa, E, (2000). Biochemical

evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum. Mol. Genet.* **9**:1033-1040.