

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN SEMI-CUANTITATIVA DE LOS NIVELES DE
UTROFINA / DISTROFINA Y CAVEOLINA-1 EN MÚSCULO LISO DE VENA
Y ARTERIA DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

VIRIDIANA MARGARITA BLAS ZAMORA



MÉXICO, D.F.

2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof. Mireya Rodríguez Penagos
Vocal	Prof. Samuel Canizales Quinteros
Secretario	Prof. Ramón Mauricio Coral Vázquez
1er sup.	Prof. Euclides Avila Chávez
2do sup.	Prof. Vanessa Rebeca Maya Ampudia

El presente trabajo fue desarrollado en la División de Medicina Genómica del Centro Médico Nacional “20 de noviembre” del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.

Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez

ASESOR

Q.F.B. Carlos Palma Flores

SUPERVISOR TÉCNICO

Viridiana Margarita Blas Zamora

SUSTENTANTE

DEDICATORIA

A mis padres, María Antonieta Zamora Olmos y Agustín Blas Macedo...mi origen, mi ejemplo de lucha y la inspiración diaria para seguir con fuerza tras mis sueños, por la libertad, el sacrificio y la dedicación. Mis eternos guerreros. Gracias por estar siempre de forma incondicional.

A mis hermanos Marisol y Norberto, por siempre apoyarme y ser un pilar fuerte para continuar con las decisiones y eventos difíciles en mi vida, ahora se que nada es casual, los admiro mucho.

A Juan José Guerrero...gracias por ser parte integral en mi vida, por caminar conmigo y seguir construyendo ese futuro que tanto deseamos. El tiempo es justo y preciso, las murallas débiles y los escalones infinitos.

A mis hermanas y hermanos adoptivos, que indirecta o directamente han estado ahí con una palabra justa, un consejo necesario y una espada empuñada para defender la libertad, la igualdad y la fraternidad de esta nación que tanto amamos.

A mis amigos, que están o dejaron de estarlo, pero que sembraron cosas hermosas que han ido floreciendo y que a cada paso me acuerdo de ustedes, pues en algunas ocasiones tengo presentes sus aromas. En especial a ti Adrian, que nunca dejaste de apoyarme en lo más difícil de este proceso.

A mis profesores de la Facultad de Química, grandes pilares y justas conciencias que han iluminado con gran luz mi camino y el de muchos otros que han podido generar un cambio.

Lo que hace al desierto tan bello es que esconde un pozo en algún lado... se trate de la casa, de las estrellas o del desierto, lo que produce su belleza es invisible.

Antoine de Saint Exupery

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez, por permitirme desarrollar el presente trabajo en su grupo de investigación, mi eterna admiración a su trayectoria profesional y completo agradecimiento por todo el apoyo, la confianza y ayuda brindada. Siempre una luz en medio de la oscuridad.

Al cDr. Carlos Palma Flores, por enseñarme y permanecer cerca durante el tiempo que desarrollamos este proyecto. Aunque muchas condiciones no fueron favorables, aprecio de verdad el amigo que en ti encontré y que con admiración he visto crecer en el difícil camino que es la investigación. Gracias por la entrega.

A mis compañeros del laboratorio, quienes siempre tenían un comentario atinado para ayudarme a continuar.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	9
RELACIÓN DE FIGURAS	11
RELACIÓN DE TABLAS	12
RESUMEN	13
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	
1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A DISTROFINA /UTROFINA (DAPC/UAPC).....	14
CAPÍTULO 2	
2.1. DISTROFINA	18
2.1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA DISTROFINA.....	18
2.1.1.1. EL GEN DE LA DISTROFINA.....	19
2.1.1.2. ESTRUCTURA DE LA DISTROFINA.....	22
2.1.1.3. PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA DISTROFINA.....	23
2.1.1.3.1. DISTROGLICANOS (DG).....	24
2.1.1.3.2. DISTROBREVINAS Y SINTROFINAS.....	26
2.1.1.3.3. COMPLEJO SARCOGLICANO-SARCOSPAN (SG-SSPN).....	27
2.1.2. FUNCIÓN DE LA DISTROFINA.....	29
2.1.3. DISTRIBUCIÓN Y EXPRESIÓN CELULAR DE LA DISTROFINA.....	30
2.1.3.1. TEJIDOS MUSCULARES.....	30
2.1.3.2. TEJIDOS NO-MUSCULARES.....	30
2.1.4. PRESENCIA DE LA DISTROFINA EN MICRO-DOMINIOS LIPÍDICOS.....	31

2.2. UTROFINA

2.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA UTROFINA.....	32
2.2.1.1. EL GEN DE LA UTROFINA.....	32
2.2.1.2. ESTRUCTURA DE LA UTROFINA.....	33
2.2.1.3. PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA UTROFINA.....	34
2.2.2. FUNCIÓN DE LA UTROFINA.....	34
2.2.3. DISTRIBUCIÓN Y EXPRESIÓN CELULAR DE LA UTROFINA.....	34
2.2.3.1. TEJIDOS MUSCULARES.....	35
2.2.3.2. TEJIDOS NO-MUSCULARES.....	35
2.2.4. PRESENCIA DE LA UTROFINA EN MICRO-DOMINIOS LIPÍDICOS.....	36

2.3. CAVEOLINA-1.....37

2.3.1. CARACTERÍSTICAS DE LA CAVEOLINA-1.....	37
2.3.1.1. EL GEN DE LA CAVEOLINA-1.....	38
2.3.1.2. ESTRUCTURA DE LA CAVEOLINA-1.....	38
2.3.1.3. PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA CAVEOLINA-1.....	39
2.3.2. FUNCIÓN DE LA CAVEOLINA-1.....	40
2.3.3. DISTRIBUCIÓN Y EXPRESIÓN CELULAR DE LA CAVEOLINA-1.....	42
2.3.3.1. TEJIDOS MUSCULARES.....	42
2.3.3.2. TEJIDOS NO-MUSCULARES.....	42
2.3.4. PRESENCIA DE LA CAVEOLINA-1 EN MICRO-DOMINIOS LIPÍDICOS.....	42

CAPÍTULO 3

3.1. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA DISTROFINA Y LA UTROFINA.....	44
3.1.1. DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE.....	48
3.1.2. DISTROFIA MUSCULAR DE BECKER.....	48
3.1.3. CARDIOMIOPATÍA DILATADA.....	49

CAPÍTULO 4	
4.1. ESTUDIO DEL DAPC/UAPC EN MÚSCULO LISO VASCULAR.....	50
CAPÍTULO 5	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	53
CAPÍTULO 6	
HIPÓTESIS.....	54
CAPÍTULO 7	
OBJETIVOS	
7.1. OBJETIVO GENERAL.....	55
7.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	55
CAPÍTULO 8	
MATERIAL	
8.1. MATERIAL BIOLÓGICO	
8.1.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO.....	56
8.1.2. ANTICUERPOS.....	56
CAPÍTULO 9	
METODOLOGÍA	
9.1. DISECCIÓN DE VENA Y ARTERIA DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO.....	57
9.2. ELIMINACIÓN DEL ENDOTELIO.....	57
9.3. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE MÚSCULO LISO VASCULAR DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO (VENA Y ARTERIA).....	57
9.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS (MÉTODO DE BRADFORD).....	59

9.5. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) CON TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA Y PVDF (SISTEMA HÚMEDO Y SEMI-SECO).....	59
9.6. CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR ENSAYOS DE WESTERN BLOT.....	61
9.7. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR DENSITOMETRÍA.....	63

CAPÍTULO 10

RESULTADOS

10.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE PROTEÍNA TOTAL.....	64
10.2. CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN SEMI-CUANTITATIVA DEL DAPC / UAPC...66	
10.3. LA UTROFINA Y LA DISTROFINA SE EXPRESAN EN MAYOR PROPORCIÓN EN LAS ARTERIAS QUE EN LA VENA DEL CORDÓN UMBILICAL HUMANO MIENTRAS QUE CAV-1 SE EXPRESA EN PROPROCIONES SEMEJANTES EN AMBOS TEJIDOS.....	73
10.4. LA α -ACTINA Y EL ϵ -SARCOGLICANO SE EXPRESAN EN CANTIDADES SEMEJANTES EN LA VENA Y EN LAS ARTERIAS DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO...75	

CAPÍTULO 11

DISCUSIÓN	77
------------------------	----

CAPÍTULO 12

CONCLUSIONES	82
---------------------------	----

CAPÍTULO 13

REFERENCIAS	83
--------------------------	----

CAPÍTULO 14

ANEXO	92
--------------------	----

ABREVIATURAS.

aa	Aminoácidos.
Cav-1	Caveolina 1.
CBD	Dominio de unión a caveolina.
CMD	Cardiomiopatía dilatada.
cDNA	DNA complementario.
CMLV	Células de músculo liso vascular.
CSD	Dominio de anclaje a caveolina.
DAPC	Complejo de proteínas asociado a distrofina.
DGC	Complejo distroglicano.
DM	Distrofia Muscular.
DMB	Distrofia Muscular de Becker.
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne.
DRP2	Proteína relacionada a la distrofina.
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial.
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G.
Grb2	Proteína 2 de unión al receptor de factores de crecimiento.
h	hora.
kb	Kilobase.
kD	Kilodalton.
LGMD	Distrofias musculares de cintura.
µg	microgramos.
µL	microlitros.
mA	mili-Amperes.
mL	mililitros.
MB	Megabases.
Min	Minuto.
MLV	Músculo liso vascular.
MLVU	Músculo liso de la vena de cordón umbilical humano.
<i>mdx</i>	Ratones deficientes en distrofina.
nNOS	Sintasa de óxido nítrico neuronal.
rpm	Revoluciones por minuto.

PH	Dominios parecidos a plectrina.
PRD	Proteína relacionada a distrofina.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
SG	Sarcoglicano.
SSPN	Sarcospan.
UAPC	Complejo de proteínas asociado a utrofina.
V	Volts.
VINC	Ventrículo izquierdo no compactado.
VPI	Proteína integral de membrana vesicular.
v-src	Virus del sarcoma de Rous.
XLDCM	Cardiomiopatía dilatada ligada al cromosoma X.

RELACIÓN DE FIGURAS.

- Figura 1.** Esquema general del DAPC/ UAPC.
- Figura 2.** Gen de distrofina y proteínas que codifica.
- Figura 3.** Estructura de la distrofina.
- Figura 4.** Modelo de las interacciones de α -dístroglicano en la membrana plasmática de las células musculares.
- Figura 5.** Asociación de distrobrevinas y sintrofinas con distrofina.
- Figura 6.** Complejo sarcoglicano.
- Figura 7.** Genes de la utrofina y proteínas que codifican.
- Figura 8.** Representación esquemática de la estructura y función de los dominios de la Cav-1.
- Figura 9.** Relación entre la caveolina-1 y DAPC asociado con el receptor acoplado a proteínas G que median la señalización intracelular en músculo liso vascular.
- Figura 10.** Dominios caveolares y su relación a la caveolina.
- Figura 11.** La utrofina y la distrofina son similares en tamaño y poseen arquitectura modular comparable.
- Figura 12.** Muestra biológica.
- Figura 13.** Cordón umbilical humano- vista frontal.
- Figura 14.** Cordón umbilical humano.
- Figura 15.** Patrón de proteínas en geles de poliacrilamida al 8%.
- Figura 16.** Patrón de proteínas en geles de gradiente de poliacrilamida.
- Figura 17.** Identificación de las proteínas utrofina, distrofina y caveolina-1 en músculo liso vascular de vena/arteria de cordón umbilical humano.
- Figura 18.** Identificación de las proteínas que componen el complejo de proteínas asociadas a distrofina / utrofina en el músculo liso vascular de vena/arteria de cordón umbilical humano.
- Figura 19.** La utrofina y la distrofina se expresan en mayor proporción en las arterias que en la vena del cordón umbilical humano.
- Figura 20.** La α -actina y ϵ -sarcoglicano se expresan en cantidades semejantes en la vena y las arterias de cordón umbilical humano.

RELACIÓN DE TABLAS.

- Tabla 1.** Distribución en diferentes tipos musculares de los elementos del DAPC.
- Tabla 2.** Distribución de las isoformas de la distrofina en células y tejidos.
- Tabla 3.** Distribución de isoformas de la utrofina en células y tejidos.
- Tabla 4.** Diferencias entre la distrofina y la utrofina.
- Tabla 5.** Curva de BSA.
- Tabla 6.** Ejemplo de una matriz de estandarización de anticuerpos para ensayo de Western Blot.
- Tabla 7.** Datos densitométricos. Cantidades relativas de proteína normalizadas con el control interno (GAPDH).
- Tabla 8.** Datos densitométricos. Cantidades relativas de proteína normalizadas con el control interno (GAPDH).

RESUMEN.

El complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina /utrofina (DAPC/UAPC) se encuentra conformado por un grupo de proteínas asociadas a la distrofina/utrofina, las cuales son las proteínas centrales de donde los complejos adquieren su nombre. Esta asociación tiene lugar en el sarcolema del músculo esquelético, liso y cardiaco. El DAPC/UAPC está constituido por la expresión de al menos 10 proteínas diferentes. Gran parte de la importancia del estudio del DAPC/UAPC 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 distrofia muscular (DM). Se ha observado que alteraciones en el gen que codifica para la distrofina ocasiona la aparición de DM de Duchenne/Becker; mientras que, mutaciones de tipo autosómicas recesivas en los genes que codifican para algunos sarcoglicanos (SG) causan DM de cintura. Los modelos animales y pacientes deficientes de la distrofina y de los β -SG y δ -SG, han demostrado que la presencia de la cardiomiopatía dilatada (CMD) está asociada con la DM.

Estudios previos de nuestro grupo de trabajo, junto con otros estudios, han puesto de manifiesto que en el músculo liso vascular de la vena y arteria del cordón umbilical existen distintas proteínas pertenecientes al DAPC/UAPC y al parecer con distintos niveles de expresión de las mismas. Sin embargo, no se han estudiado a detalle los niveles y por ende las cantidades que se encuentran de estas proteínas en ambos tejidos. Por tal motivo, el presente estudio se enfocó a determinar de manera semi-cuantitativa las cantidades de las distintas proteínas asociadas a estos complejos en el músculo liso de la vena y la arteria del cordón umbilical utilizando la técnica de Western Blot evaluados a través de análisis densitométricos. A partir de estos estudios se observó que las proteínas utrofina y distrofina se presentaron en mayor cantidad en el músculo liso de la arteria en comparación con lo observado en el músculo liso de la vena. Por otra parte, las otras proteínas analizadas (ϵ -sarcoglicano, β -sarcoglicano y caveolina-1) no mostraron una diferencia significativa en sus cantidades cuando se compararon los músculos lisos de ambos vasos. Todo esto podría estar asociado a las distintas funciones que desempeña cada vaso y abre una nueva perspectiva para el análisis de estos complejos alternativos en el músculo liso vascular.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN.

1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADO A DISTROFINA /UTROFINA (DAPC/UAPC).

El complejo de proteínas asociado a distrofina (DAPC) fue inicialmente descrito en músculo estriado, no obstante, hoy en día se ha confirmado su presencia en otros tipos celulares como músculo liso vascular y no vascular; así como en tejidos no vasculares¹.

Este complejo está conformado por múltiples unidades que comprenden tanto proteínas periféricas como proteínas integrales de membrana, las cuales sirven como un puente de unión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular. Este conjunto de proteínas, asociadas entre sí, puede dividirse de forma general en subgrupos de proteínas de acuerdo a su ubicación celular. En la matriz extracelular, el primer grupo lo integran las proteínas laminina $\alpha 2$, agrina y perlecano, en la región transmembranal, el segundo grupo se encuentra formado principalmente por dos subcomplejos conocidos como complejo distroglicano (CDG) [subunidades α y β] y el complejo sarcoglicano-sarcospan (CSG-SSPN) [subunidades α , β , γ y δ]. Finalmente, en la parte intracelular se encuentran proteínas citoplasmáticas (distrofina, distrobrevinas y sintrofinas) y en algunos casos, a éste puede asociarse la sintasa de óxido nítrico², tal como se muestra en la figura 1. La interacción del complejo de proteínas asociado a distrofina/utrofina (DAPC/UAPC) con el medio intra y extracelular establece la transducción bioquímica de señales al interior de la célula además de proporcionar una unión mecanosensitiva entre dichos medios, lo que le provee estabilidad a la célula durante los procesos de estrés mecánico³.

En algunos tejidos y bajo ciertas condiciones, la distrofina es sustituida por su homólogo autosómico conocido como utrofina, lo que da lugar al complejo de proteínas asociado a utrofina (UAPC)⁴.

La utrofina por su parte, cuenta con una distribución ubicua, lo que significa que además de encontrarse en músculo estriado (unión neuromuscular predominantemente) también se encuentra presente en músculo liso y en tejidos no musculares (endotelio y sistema nervioso)⁵.

Por otro lado, la distrofina es un elemento de la submembrana del citoesqueleto, lo que mantiene el plegamiento normal de la superficie que provee de un reforzamiento mecánico al sarcolema, protegiendo a la membrana en contra del estrés producido durante la contracción muscular. Se expresa primordialmente en los músculos esquelético y cardíaco, aunque también se ha reportado su presencia en cerebro y otros tipos celulares.⁶

Asimismo, se ha reportado que mutaciones en la distrofina ocasionan las distrofias musculares de Duchenne/Becker, mientras que mutaciones en los sarcoglicanos α -SG, β -SG, γ -SG y δ -SG; dan origen a las distrofias musculares de cintura. Particularmente, en el caso del sarcoglicano δ -SG se ha visto que el desarrollo de la distrofia muscular (DM) se asocia a un tipo cardiomiopatía dilatada (CMD), la cual es generada por un defecto primario en el complejo SG-SPN del músculo liso vascular⁷.

La disrupción de ambos complejos se genera por la deficiencia o ausencia de alguno de sus componentes, lo que desestabiliza el puente de unión existente entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, dando lugar a eventos de degeneración muscular conocidos como distrofias musculares (DM) que se han relacionado con la aparición de cardiomiopatía dilatada⁸.

En el caso del músculo liso vascular, en modelos animales se ha determinado que la expresión de utrofina y distrofina varía de acuerdo al tipo de vaso, cuyo análisis ha dado luz sobre la función específica de estas dos proteínas homólogas. En este contexto, el papel de la distrofina se ha relacionado con funciones de tipo mecánico, es decir, en la contracción del tejido muscular, mientras que a la utrofina se le ha considerado como una proteína de tipo estructural, esencial para la correcta formación de los vasos⁹.

En modelos murinos, la distrofina se ha visto localizada en las capas del músculo liso vascular de pulmón, órganos digestivos y en la uretra de ratones sanos. No obstante,

experimentos en modelo de ratón de distrofia muscular (ratones mdx), la distrofina se encuentra ausente en estos órganos así como en la túnica media de los vasos, en las terminales de algunos nervios y en las membranas extra-conjuncionales, mientras que la utrofina se ha visto presente en regiones sinápticas de las fibras de músculo esquelético y expresada extra sinápticamente en modelo de ratón de distrofia muscular (ratones mdx) donde se ha propuesto que compensa la ausencia de la distrofina¹⁰.

Con base en los antecedentes mencionados, es claro que la participación de la distrofina y la utrofina como componentes estructurales de estos complejos difiere en la cantidad en que son expresadas y su localización en los tejidos, lo cual refleja que ambas proteínas son requeridas en diferentes cantidades y dada la diferencia funcional de las arterias y venas, es posible establecer que ambas proteínas no solo funcionen como un componente estructural o de resistencia mecánica, sino que también puedan estar implicadas en rutas de señalización bioquímica al interior de la célula¹¹.

A partir de estos datos, estudios previos de Coral y colaboradores, mediante ensayos de inmunofluorescencia, mostraron la presencia de la utrofina y la distrofina en músculo liso de la vena de cordón umbilical humano (MLVU) ¹⁰. No obstante, este tipo de ensayos no muestran los niveles de dichas proteínas presentes en los tejidos mencionados. Por otra parte, la presencia de CMD en pacientes con mutaciones en β , γ y δ -SG, pone de manifiesto la relevancia de definir la presencia y expresión de la utrofina y la distrofina en el músculo liso vascular humano (MLV). Asimismo resulta importante este análisis, ya que podría explicar el papel de estas proteínas en los tejidos vasculares de las venas y arterias de los seres humanos, además de que durante el desarrollo de la CMD se podrían utilizar como puntos clave de estudio en este padecimiento. Esto abre una perspectiva para comprender mejor el papel del complejo de proteínas asociadas a la distrofina/utrofina.

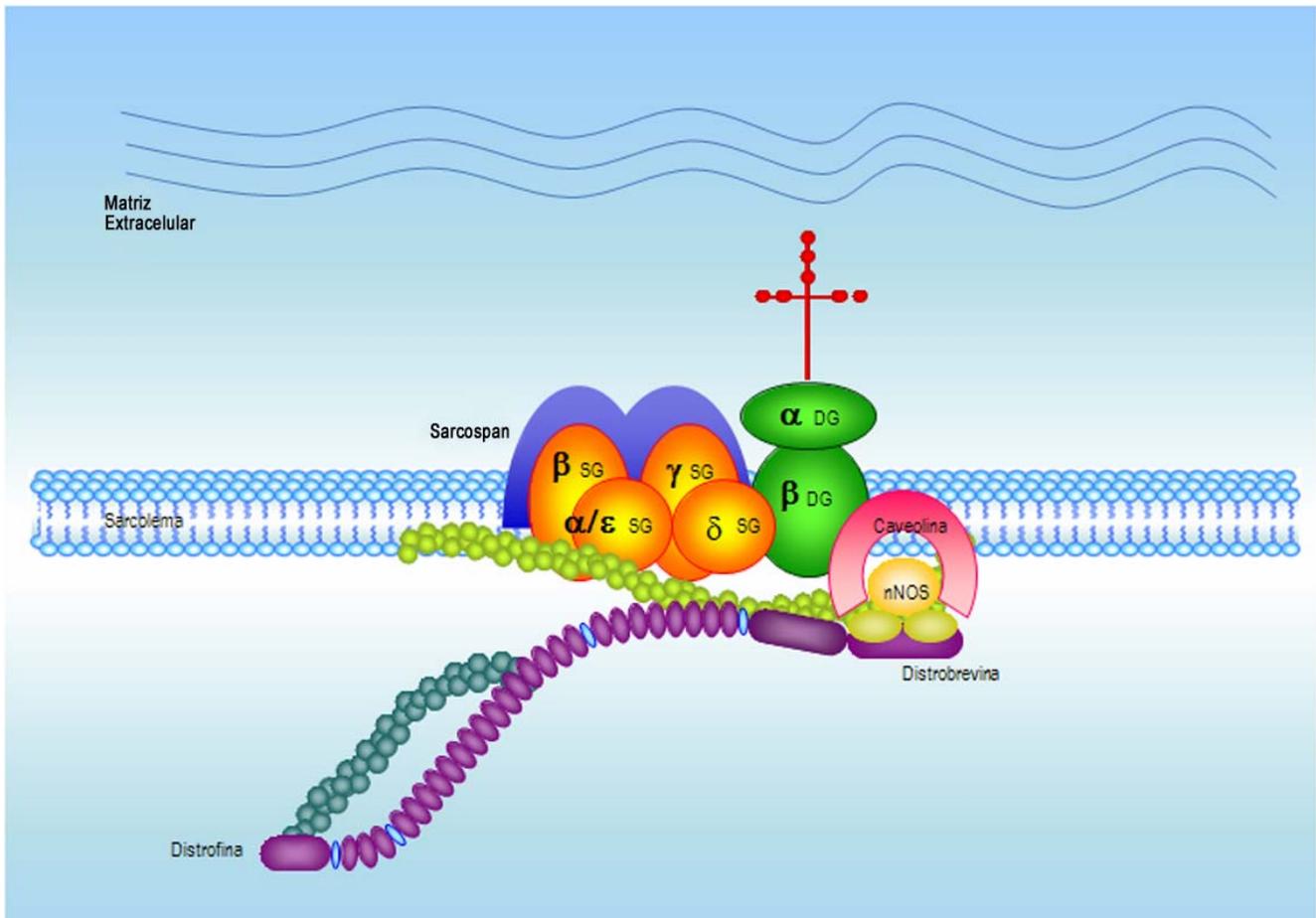


Figura 1. Esquema general del DAPC/ UAPC. En la figura se muestran las proteínas que conforman el complejo de proteínas asociadas a la distrofina (diseño creado por Coral y colaboradores).

CAPÍTULO 2

2.1. DISTROFINA.

La identificación de la distrofina y la consecuente caracterización del complejo de proteínas asociadas a ella con sus componentes periféricos e integrales en músculo esquelético, fue tan solo el primer paso para esclarecer la patogénesis molecular de la distrofia muscular¹¹.

La clonación del gen de la distrofina, el responsable de la DMD, ha conllevado a la elaboración de cientos de trabajos que han elucidado el papel de esta proteína en las distrofias musculares. A través de nuevas investigaciones, se ha comprendido que la distrofina no solo posee funciones estructurales y mecánicas, sino que también se encuentra implicada en procesos de señalización, los cuales son cruciales para el correcto funcionamiento del músculo¹².

2.1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA DISTROFINA.

La distrofina es una proteína producto de un gen localizado en el locus Xp21, dicha proteína se encuentra expresada en la cara citoplasmática de la membrana plasmática de las células musculares. Esta proteína tiene una masa aproximada de 427 kD (determinado por ensayos de Western Blot) y se expresa en la periferia de las fibras normales del músculo esquelético (de acuerdo con ensayos inmunocitoquímicos). Se sabe que este gen se muestra afectado en la distrofia muscular de Duchenne (DMD). Sin embargo, la distrofina también ha sido detectada en la cara interna de la membrana plasmática de todos los tejidos musculares normales de tipo: estriado, visceral y vascular liso. No obstante, se ha supuesto la existencia de las distrofinas específicas de músculo liso, las cuales difieren de las formas encontradas en músculo esquelético relacionadas a pequeñas diferencias detectadas en la migración electroforética. Esta especificidad del músculo fue posteriormente sustentada por la detección de diferencias en las regiones 3' no traducidas de los transcritos de la distrofina en preparados de músculo esquelético y liso. Para el caso de músculo liso, se ha demostrado que se producen dos transcritos diferentes como resultado del splicing alternativo del gen de la distrofina¹³.

Una reducción en la expresión de la distrofina induce a grandes alternaciones en las células musculares. Observaciones clínicas han establecido que las células de origen visceral y muscular liso pueden ser afectadas durante la distrofia muscular de Duchenne¹⁴.

2.1.1.1. EL GEN DE LA DISTROFINA.

El gen de la distrofina comprende 2.4 Mb del cromosoma humano locus Xp21 (Figura 2). Hasta la fecha se han descrito siete promotores, cada una con un primer exón único. Estos siete promotores controlan la expresión de los transcritos y de acuerdo a su naturaleza, han sido divididos en dos grupos: tres promotores externos y cuatro promotores internos. Los tres promotores externos han sido nombrados de acuerdo al aumento de su expresión en determinados tejidos, correspondiendo estos a:

Promotor C: expresado en las neuronas corticales y región del hipocampo en cerebro.

Promotor P: expresado en células de Purkinje del cerebelo e incluso músculo esquelético.

Promotor M: expresado en músculo y miocardio.

No obstante, algunas formas truncas de la distrofina en el extremo amino terminal son generadas por el uso de promotores internos específicos de cada tejido. Los promotores internos conllevan a la expresión de mRNAs que codifican pequeños productos de la distrofina con una distribución definida sobre el tejido. Han sido identificados 4 promotores internos principales, nombrados de acuerdo a la masa de la proteína a la cual codifican y al tipo de tejido donde se expresan, siendo estos denominados como:

1. Promotor Dp 260: expresado en retina.

2. Promotor Dp140: expresado en células glia.

3. Promotor Dp116: expresado en cerebro fetal y células de Schwann.

4. Promotor Dp71: expresado en tejidos extramusculares, como: pulmones, hígado, riñón, y cerebro.

Por otra parte, el gen de la distrofina, contiene 79 exones adicionales que codifican para la proteína.¹⁵ El gran tamaño del gen que codifica a la distrofina contribuye significativamente

a la alta tasa de mutaciones espontáneas, ya que los 79 exones que codifican a cDNA (es la copia de un mRNA en DNA) en un marco de 14-Kb, corresponden tan solo al 0,5% del gen¹⁵.

El tipo de mutaciones descritas para el gen de la distrofina incluyen: deleciones, mutaciones sin sentido, mutaciones por cambio de sentido, inserción o duplicación. Cuando una de estas mutaciones rompe el marco de lectura de los aminoácidos, el defecto de la distrofina resulta en un fenotipo de DMD severa. Por otro lado, las mutaciones que mantienen el marco de lectura producen formas truncadas y funcionales de la proteína, condición que deriva en una forma benigna de la distrofia, conocida como Distrofia Muscular de Becker (DMB). Cerca del 90% de los casos de fenotipos de distrofia muscular de Duchenne (DMD) y Distrofia Muscular de Becker (DMB) pueden ser explicados por mutaciones con corrimiento en el marco de lectura (Frameshift).¹⁶

Sin embargo, las mutaciones que preferentemente afectan la expresión del mRNA de la distrofina en músculo cardíaco pero no esquelético, otorgan una explicación del por qué puede originarse la aparición de la cardiomiopatía, sin involucrar necesariamente al músculo esquelético, como se ha visto en la cardiomiopatía dilatada ligada al cromosoma "X" (XLDCM).¹⁶

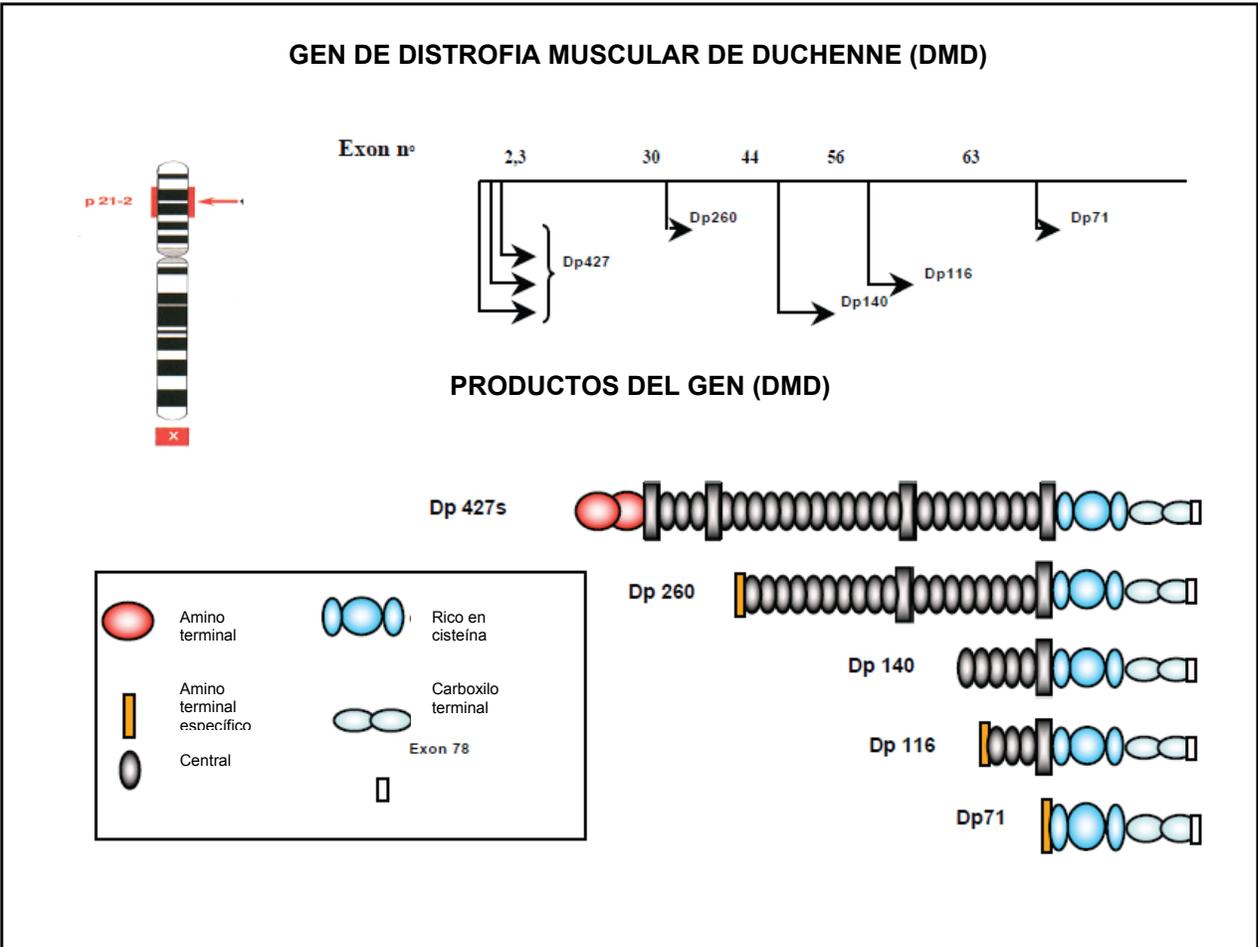


Figura 2. Gen de la distrofina y proteínas que codifica. En la parte superior se muestran los exones. Las proteínas resultantes derivan de diferentes promotores internos, se muestran sus dominios principales: amino terminal (rojo), amino terminal específico (amarillo), rod domain (negro), carboxilo terminal (azul claro), dominio rico en cisteína (azul fuerte).

2.1.1.2. ESTRUCTURA DE LA DISTROFINA.

La distrofina posee cuatro dominios funcionales o regiones específicas:

1. El extremo amino terminal de la distrofina contiene un **dominio de unión a actina** parecido a la calponina, el cual es homólogo a otro dominio de unión a las proteínas tipo actina, tales como beta espectrinas y alfa actininas. El dominio ubicado en el extremo amino terminal de unión a actina es responsable de anclar a la distrofina al citoesqueleto y a los filamentos de γ -actina. Este dominio está conformado por 240 aminoácidos (Figura 3).
2. El dominio central de la distrofina, denominado **rod domain**, consiste de 24 repeticiones parecidas a espectrina. Como en otras repeticiones parecidas a espectrina, tres hélices alineadas se unen para formar cada unidad de repetición y proveer rigidez estructural. Se cree que la flexibilidad del dominio es derivada de rupturas en el patrón de repeticiones parecidas a espectrina en cuatro regiones de tipo bisagra. Dentro de la región del rod domain, las repeticiones parecidas a espectrina de la 11 a la 17, constituyen un segundo sitio de unión a γ -actina, y este sitio difiere considerablemente en la utrofina (Figura 3).
3. Hacia el carboxilo terminal, existe una **región rica en cisteína** que interacciona con una porción intracelular de la proteína transmembranal β -dístroglicano, la cual ancla la distrofina al sarcolema (Figura 3).
4. Finalmente, el dominio carboxilo terminal es de tipo α -hélice y media la interacción de la distrofina con las sintrofinas¹⁷(Figura 3).

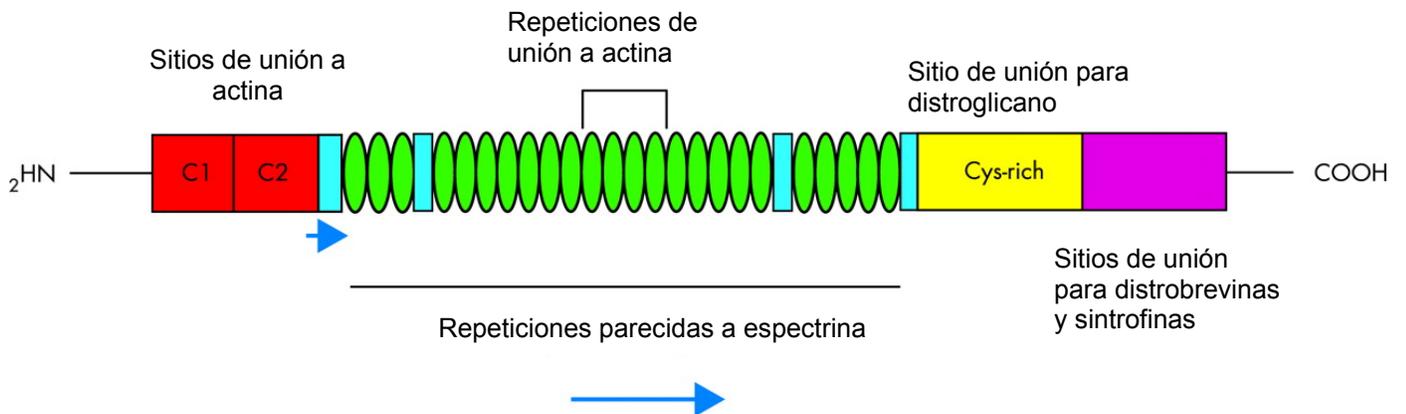


Figura 3. Estructura de la distrofina. En la imagen se muestra los diferentes dominios conformacionales de la distrofina. En rojo se encuentra señalado el dominio amino terminal e identificados como C1 y C2 los sitios de unión a actina. En color verde se muestra el dominio Rod Domain conformado por 24 repeticiones parecidas a espectrina. Hacia el carboxilo terminal, en color amarillo, se señala la región rica en cisteína, la cual es un sitio de unión a β -distroglicano. Por último, se muestra en color morado el dominio carboxilo terminal, el cual es un sitio de unión a sintrofinas y distrobrevinas.

2.1.1.3. PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA DISTROFINA.

El complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DAPC) conforma una parte importante en la aparición de las distrofias musculares debido a que mutaciones en los genes que codifican para las proteínas constituyentes del complejo, resultan en diferentes grupos de desórdenes degenerativos del músculo que afectan tanto a niños como adultos. Un ejemplo de lo anterior son, tan solo, las mutaciones en los genes que codifican a la distrofina o a los sarcoglicanos, que causan que las miofibras y los cardiocitos se vuelvan susceptibles a la contracción muscular¹⁸.

El DAPC está conformado por múltiples proteínas que interaccionan entre sí y que se encuentran estrechamente relacionadas a la distrofina, siendo la distrofina la proteína central¹⁸.

El DAPC se puede dividir en tres grandes grupos:

- ✓ Distroglicanos
- ✓ Distrobrevinas y sintrofinas
- ✓ Complejo sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN)

Sin embargo, los miembros del DAPC pueden o no encontrarse expresados, dependiendo del tipo muscular (músculo esquelético, músculo cardíaco o músculo vascular liso). Dicha distribución se muestra en la Tabla 1.

2.1.1.3.1. DISTROGLICANOS (DG).

Los DGs se encuentran codificados en un solo gen que da origen a una proteína precursora que rápidamente es dividida para generar dos subunidades conocidas como α -distroglicano y β -distroglicano. Los DGs se encuentran expresados en: músculo esquelético, músculo cardíaco, epitelio de la piel y en los sistemas nervioso central y periférico¹⁹. Sin embargo, las modificaciones postranscripcionales difieren de acuerdo con el tipo de célula y tejido¹⁹.

El α -distroglicano es una proteína altamente glicosilada con una masa aproximada de 72 kD, el cual aparece en ensayos de Western Blot con un tamaño de 156 kD en músculo esquelético, 140 kD en músculo cardíaco y 120 kD en cerebro. El α -distroglicano se une a un número de moléculas extracelulares como: laminina, agrina, perlecano, neurexina y biglicano (Figura 4). Los análisis de la secuencia primaria y la microscopía electrónica han revelado que el α -DG tiene forma de “mancuerna” en la cual dos dominios globulares, dominios carboxilo y amino terminal, son conectados por una región elongada, altamente glicosilada, parecida a mucina; rica en prolinas, serinas y treoninas. El α -DG interacciona de forma no-covalente con el β -DG (Figura 4). El epítipo de unión de α -DG fue mapeado en una región altamente conservada de 36 aminoácidos ubicada dentro del dominio carboxilo terminal^{20,21}.

El dominio citoplasmático de β -DG contiene muchos residuos de prolina, los cuales representan sitios preferenciales de interacción proteína-proteína. El β -DG interacciona con diferentes proteínas citoplasmáticas tales como: la distrofina, proteínas parecidas a las distrofina, rapsina, caveolina-3 y Grb2. Asimismo, el β -DG también se une a proteínas

transmembranales tales como los sarcoglicanos. Muchas evidencias han sugerido que los DGs se encuentran involucrados en la transducción de señales, como es la presencia de motivos de unión SH2 y SH3 dentro del dominio citoplasmático de β -DG.

Los DGs forman una unión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular, misma que es crucial para la estabilidad de la membrana plasmática (Figura 4).

Dentro de la célula muscular, el β -distroglicano se une directamente al carboxilo terminal de la distrofina el cual a su vez se une a caveolina-3 y a la proteína adaptadora Grb2, mientras que el α -distroglicano une al β -distroglicano con las proteínas de la matriz extracelular²².

Por otra parte, se sabe que mutaciones en el gen que codifica para estas proteínas, se traducen clínicamente en: distrofia muscular, funciones anormales del sistema nervioso central y periférico y en cardiomiopatías. Con los desórdenes anteriormente mencionados se ha encontrado en común que su origen se debe a procedimientos aberrantes descritos para el α -distroglicano²³.

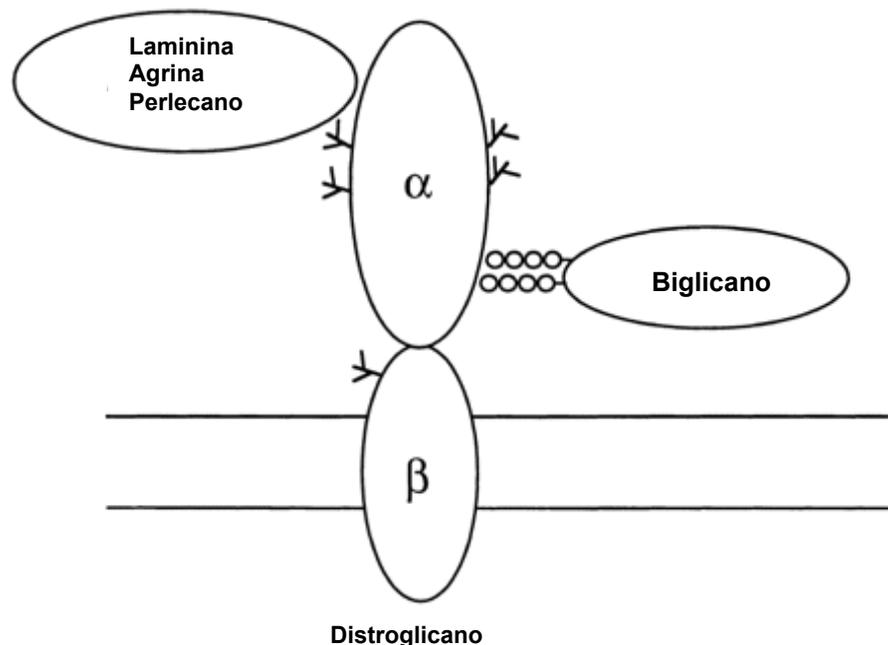


Figura 4. Modelo de las interacciones de α -distroglicano en la membrana plasmática de las células musculares. El α -distroglicano une su dominio G a las proteínas agrina, laminina y perlecano de manera que requiere de la glicosilación de la tercera parte de las moléculas que es parecida a mucina. El biglicano se une al α -distroglicano por medio de sus cadenas de sulfato de condroitina²⁵.

2.1.1.3.2. DISTROBREVINAS Y SINTROFINAS.

Las distrobrevinas y las sintrofinas son componentes citosólicos del DAPC. Las distrobrevinas son proteínas con una masa de 87-94 kD y parálogas a las distrofinas, condición debida a la homología estructural del dominio carboxilo terminal de los productos del gen de la distrofina y a la interacción de proteínas asociadas a la distrofina gracias a la unión directa del dominio carboxilo terminal de la distrofina con motivos hélice-giro-hélice²⁴.

Las α - y β - distrobrevinas son codificadas por dos genes autonómicos separados. La α -distrobrevina se encuentra expresada en músculo esquelético, corazón, pulmón y cerebro. Esta proteína comparte una homología significativa con la región rica en cisteína y el dominio carboxilo terminal de la distrofina, sin embargo, la α - distrobrevina carece del sitio de unión a actina. Se han descrito en músculo esquelético tres isoformas de α - distrobrevina derivadas de *splicing* alternativo. La α - distrobrevina posee motivos de interacción importante, como lo son: mano EF de unión a Ca^{2+} , dominio ZZ conformado por dedos de zinc, dominio hélice-giro-hélice, y un dominio que es sustrato de la tirocina cinasa. El dominio hélice-giro-hélice interacciona directamente con la distrofina, este dominio contiene, asimismo, un sitio de unión a sintrofinas²⁴.

Se ha observado que en ratones knock-out carentes de α - distrobrevina, de igual forma, se manifiesta la ausencia total de la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) en el sarcolema a pesar de la presencia de otros componentes del complejo. La nNOS es responsable de incrementar los niveles de GMP cíclico que reducen la vasoconstricción de músculo liso²⁴. En humanos se ha correlacionado las mutaciones de α - distrobrevina a la aparición de ventrículo izquierdo no compactado (VINC) y a la cardiomiopatía presente en enfermedades cardíacas congénitas²⁴.

No obstante, la β - distrobrevina se encuentra exclusivamente expresada en tejidos no musculares, especialmente en hígado, riñón y cerebro. Comparte homología estructural con la α - distrobrevina. Se ha reportado en ensayos hechos con ratones deficientes de esta proteína, que a pesar de que la β - distrobrevina es requerida para la localización de la isoforma Dp71 en la membrana así como de las sintrofinas en riñón e hígado, su presencia no resulta crucial para el funcionamiento normal del tejido²⁵ (Figura 5).

Por otra parte, las sintrofinas poseen una masa de 58 kD. Estas proteínas interaccionan directamente con el carboxilo terminal de todas las isoformas de la distrofina. Se han descrito tres isoformas de sintrofinas, las cuales contienen dos dominios homólogos a plectrina: un dominio PH1 el cual posee un dominio interno PDZ, y un dominio PH2²⁶.

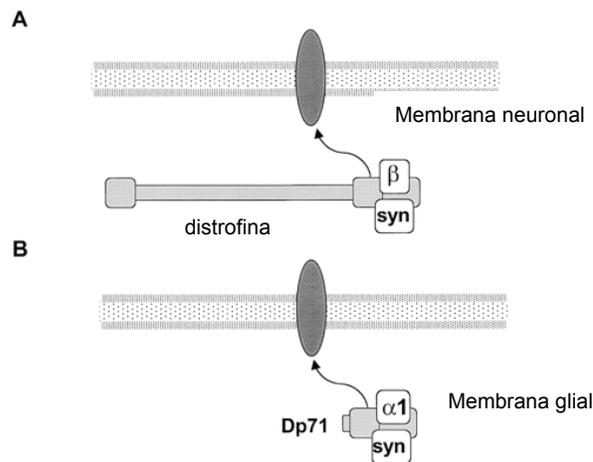


Figura 5. Asociación de distrobrevinas y sintrofinas con distrofina. En A se muestra su interacción en neuronas y en B en células gliales.

2.1.1.3.3. COMPLEJO SARCOGLICANO-SARCOSPAN (SG-SSPN).

El subcomplejo muscular sarcoglicano se encuentra conformado por cuatro glicoproteínas transmembranales conocidas como: α - β - γ - y δ - sarcoglicanos (Figura 6), las cuales forman un complejo heterotetramérico al asociarse con los distroglicanos y con un miembro de la familia de proteínas tetraspan llamado sarcospan. Algunos reportes han sugerido que este complejo tiene una expresión selectiva en músculos y nervios periféricos. Sin embargo, estudios recientes han revelado la presencia de nuevos miembros de la familia de sarcoglicanos en cerebro, conocidos como ϵ - ζ - sarcoglicanos (Figura 6). Por lo anterior, se puede deducir que son dos los genes que dan origen a la familia de sarcoglicanos, los cuales poseen estructuras intron-exon idénticas dando como resultado proteínas parecidas en un 60%. Su homología se encuentra principalmente en los residuos conservados de cisteína que se encuentran en el extremo carboxilo terminal. En músculo esquelético y cardiaco, el complejo sarcoglicano se encuentra conformado por los α - , β - y γ -sarcoglicanos, mientras

que en músculo liso, este se encuentra conformado por la ϵ -, β -, δ - y ζ - sarcoglicanos²⁷ (Tabla 1).

No obstante, se ha reportado en modelos de ratones knock-out deficientes de δ - sarcoglicano y de γ - sarcoglicano, que sin la presencia del δ - sarcoglicano no puede llevarse a cabo el ensamblaje de los sarcoglicanos al retículo endoplásmático. Sin embargo, ante la ausencia de γ -sarcoglicano, puede detectarse el ensamblaje del resto de los sarcoglicanos, sin embargo, este efecto se ve altamente reducido²⁷.

Se sabe que la presencia de mutaciones en los γ - y δ - sarcoglicanos pueden generar distrofias musculares asociadas con cardiomiopatías. En contraste con lo anterior, se ha reportado la presencia de mutaciones en el δ - sarcoglicano en pacientes con CMD sin enfermedades musculares asociadas²⁷.

En biopsias de pacientes con DMD, la localización de este complejo en la membrana se encuentra severamente reducido o ausente. Además, se ha observado un fenotipo similar a la DMD en pacientes con sarcoglicopatías, donde la distrofina y los distroglicanos se encuentran integros, lo que mantiene la comunicación del sarcolema con la matriz extracelular. Lo anterior indica que el papel del complejo SSG-SSP es independiente de la integridad física de la célula muscular²⁷.

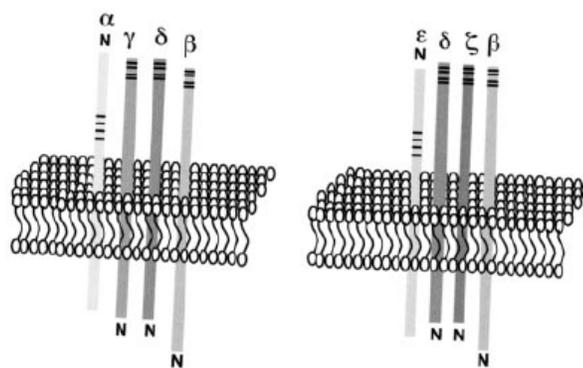


Figura 6. Complejo sarcoglicano. α -, ζ -, y ϵ - son proteínas membranales tipo I con una secuencia hidrofóbica en el amino terminal. β -, γ - y ζ - sarcoglicanos son proteínas membranales tipo II.¹⁵

Tabla 1. Distribución en diferentes tipos musculares de los elementos del DAPC.

PROTEÍNA	MÚSCULO ESQUELÉTICO	MÚSCULO CARDIACO	MÚSCULO VASCULAR LISO
distrofina	+	+	+
α - sarcoglicano	+	+	-
β - sarcoglicano	+	+	+
δ - sarcoglicano	+	+	+
γ - sarcoglicano	+	+	-
ϵ - sarcoglicano	+	+	+
distroglicanos	+	+	+
sarcospan	+	+	+
sintrofinas (α - β)	+	+	?
distrobrevinas (α - β)	+	+	?
caveolina-3	+	+	-
nNOS	+	+/-	+
caveolina-1	+	+	+

2.1.2. FUNCIÓN DE LA DISTROFINA.

A pesar de años de estudio, la función de la distrofina no ha sido del todo entendida. Sin embargo, diferentes grupos de investigación han encontrado que la distrofina desempeña diferentes funciones en tejidos musculares y no musculares. Para el caso particular del tejido muscular, se ha demostrado que esta proteína confiere estabilidad estructural al tejido mediante la unión flexible y elástica que mantiene entre la actina cortical y la matriz extracelular por medio de interacciones con el complejo de proteínas asociadas a la misma. En términos generales, la distrofina, al ser un elemento de la submembrana del citoesqueleto, mantiene la estructura normal de la misma, proporcionando un reforzamiento mecánico al sarcolema, lo que protege a la membrana en contra del estrés producido durante la contracción muscular²⁸.

Sin embargo, la distrofina posee otras funciones más allá de la descrita sobre mantener la unión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular. La pérdida secundaria del DAPC ocurre

en los músculos deficientes de la distrofina. No obstante, y bajo ciertas circunstancias, es posible disociar la interrupción del complejo con la pérdida de esta proteína. Se ha observado en ratones transgénicos que no poseen la forma completa de la distrofina pero que expresan el dominio carboxilo terminal de la misma en músculo, que esta condición es capaz de mantener la unión del DAPC en el sarcolema, sin embargo, se desarrolla distrofia muscular. Asimismo, la pérdida de alguno de los componentes del DAPC ante la presencia de una unión normal entre el citoesqueleto y la matriz extracelular mantenida por la distrofina, puede dar origen a un tipo de distrofia muscular. Por ejemplo, aun cuando no se hayan descrito mutaciones en el gen de α -distrobrevina, los modelos de ratón knock-out deficientes de la proteína pueden desarrollar patologías musculares aun cuando la unión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular permanezca intacta. Lo anterior puede ser atribuible a la pérdida de moléculas de señalización. Observaciones como estas establecen que la deficiencia de la distrofina puede ser causada tanto por la pérdida directa de las funciones citoesqueléticas así como por la pérdida secundaria de los componentes de la DAPC, lo que pudiera estar indicando que la distrofina, en conjunto con el complejo de proteínas asociadas a ella, participa en procesos de señalización que promueven la correcta función muscular²⁸.

2.1.3. DISTRIBUCIÓN Y EXPRESIÓN CELULAR DE LA DISTROFINA.

La distrofina, y sus diversas isoformas, se encuentran expresadas tanto en tejidos musculares como no musculares.

2.1.3.1. TEJIDOS MUSCULARES.

Distintos grupos de investigación han reportado que la distrofina se encuentra expresada en: músculo esquelético, cardíaco y liso. (Ver tabla 2).

2.1.3.2. TEJIDOS NO-MUSCULARES.

La expresión de la distrofina no se encuentra limitada a los tejidos musculares. También se ha descrito la expresión de las diversas isoformas de la distrofina en: células linfocíticas, cerebro, células de Purkinje, retina, riñón, hígado, sistema nervioso central, cerebelo y células de Schwann (Ver tabla 2).

Tabla 2. Distribución de las isoformas de la distrofina en células y tejidos.

Nombre	sinonimia	sinonimia	Longitud de la proteína (kD)	amino ácidos	mRNA pb	Promotor localizado en	Expresión
Dp427l	distrofina linfocítica	L-distrofina	427	3,562	13,764	5' Dp427c	* Linfoblastoide
Dp427c	distrofina cortical	C-distrofina	427	3,677	14,069	5' Dp427m	* Cerebro
Dp427m	distrofina muscular	M-distrofina	427	3,685	13,993	5' del gen	* Músculo
Dp427p	distrofina de células de Purkinje	P-distrofina	427	3,681	14,000	3' Dp427m	* Células de Purkinje
	distrofina fetal	distrofina-del C					
Dp260	distrofina de retina	R-distrofina	260	2,344	9,773	intron 29	* Retina
	Dp260-1	R-1					* Retina
	Dp260-2	R-2		2,341	9,916		* Retina
Dp140	Dp140a		140	1,225	7,410	intron 44	* Riñón
	Dp140b			1,243	7,378		* Sistema nervioso central
	Dp140ab			1,230	7,339		* Riñón
	Dp140c			1,115	7,050		* Cerebelo
	Dp140bc			1,133	7,048		* Cerebelo
Dp116	apo-distrofina 2	S-distrofina	116	956	5,623	intron 55	* Riñón
Dp71	apo-distrofina 1	De hígado o G-distrofina	71 (70.4)	617	4,623	intron 62	* Células de Schwann
	Dp71b		72.2	635	4,591		* Ubicua
	Dp71a		68.9	604	4,584		* Ubicua
	Dp71ab		70.8	622	4,552		* Ubicua
Dp40	apo-distrofina 3		40	340	220	intron 62	* Ubicua

2.1.4. PRESENCIA DE LA DISTROFINA EN MICRO-DOMINIOS LIPÍDICOS.

Las balsas lipídicas son microdominios en la membrana celular que se encuentran enriquecidos en colesterol y glicoesfingolípidos. Estas balsas han sido implicadas en procesos tan diversos como lo son: la transducción de señales, la endocitosis y el tráfico de colesterol. Las evidencias recientes han sugerido que esta variedad de funcionalidad está asociada con la diversidad en la composición de las balsas lipídicas. Las balsas en las células tienen una apariencia heterogénea de acuerdo con su contenido lipídico y proteico³¹.

La distribución de caveolina-1 (Cav-1) y de la distrofina se traslapa en la membrana de las células contráctiles del músculo liso. Se ha propuesto que la asociación de cav-1 con el DAPC y la actina del citoesqueleto también podrían mediar y estabilizar la única compartimentación ordenada de los arreglos funcionales de la membrana plasmática de las caveolas en las células de músculo liso contráctiles³².

2.2. UTROFINA.

En 1989, fue identificado un parálogo de la distrofina en el cromosoma 6 humano. Este gen relacionado con la distrofina fue posteriormente nombrado como la utrofina, ya que, a diferencia de la distrofina, la utrofina posee una expresión ubicua en los tejidos. Este hallazgo generó gran interés en la comunidad científica pues daba la posibilidad del uso de esta proteína para el tratamiento de pacientes con DMD³³.

2.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA UTROFINA.

La utrofina es ligeramente menor en tamaño que la distrofina, con un mRNA de 13Kb que dan lugar a una proteína de 3,433 aa, equivalente a una masa de 395 kD. La estructura primaria de utrofina es similar a la distrofina, particularmente en el amino y carboxilo terminal que se unen a otras proteínas. Sin embargo, carece de la actividad de unión a actina asociada con el dominio rod domain encontrado en la distrofina y el amino terminal de utrofina posee una ligera extensión³⁴.

2.2.1.1. EL GEN DE LA UTROFINA.

El gen de utrofina se localiza en el cromosoma humano 6q24 y en ratón en el cromosoma 10. Este gen de 900 kb codifica un transcrito de 13 kb de 74 exones, en el caso de los humanos (Figura 7).

Como el gen de la distrofina, el gen de utrofina alberga promotores específicos para ciertos tejidos. La transcripción completa de Utofina (Up395) es conducida por dos promotores independientes conocidos como Utrn-A y Utrn-B. Los promotores Utrn-A y Utrn-B se coactivan en diferentes tejidos pero son regulados de forma independiente.

El gen de utrofina posee promotores internos que dan como resultado productos cortos de proteínas, los cuales son modulados por *splicing* alternativo³⁵.

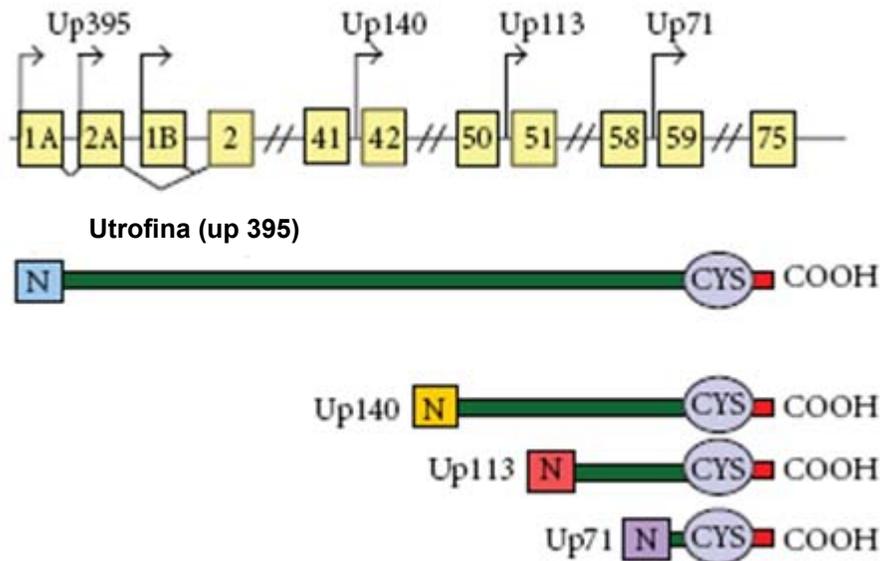


Figura 7. Genes de la utrofina y proteínas que codifican. En la parte superior se muestran los exones (cajas amarillas) y los intrones (líneas negras). Las proteínas resultantes derivan de diferentes promotores internos (se muestran debajo de su gen correspondiente). Los dominios principales se encuentran representados (amino terminal, carboxilo terminal, dominio rod domain y dominio rico en cisteína).



2.2.1.2. ESTRUCTURA DE LA UTROFINA.

El dominio amino terminal engloba los primeros 25 aminoácidos y se une a la F-actina con afinidad similar como sucede con la distrofina, aunque de mayor tamaño y con mayor efectividad que el dominio de unión a actina de la distrofina, su estructura también es comparable con la de espectrina y a la de alfa-actina. Por otra parte, el proceso de unión a actina se encuentra regulado por calcio y calmodulina. Junto con el dominio rico en cisteína y el dominio carboxilo terminal, esta región comparte una identidad del 80% con el dominio equivalente de la distrofina.

El dominio *rod domain* es la región menos conservada entre las dos proteínas (35%)³⁶ la cual consiste de 22 repeticiones similares a espectrina en utrofina contra 24 repeticiones del mismo tipo presentes en la distrofina y regiones en bisagra ricas en prolina³⁷.

El dominio carboxilo terminal es muy similar al de la distrofina, con sitios de unión para los diferentes miembros del DAPC, β -dístroglicano, α -dístrobrevinas y sintrofinas^{3,36}.

2.2.1.3. PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA UTROFINA.

A pesar de la similitud de utrofina con la distrofina, la utrofina posee propiedades únicas que sugieren que la asociación de Utofina con el complejo de proteínas es distinta en algunos tejidos, a la asociación que lleva a cabo la distrofina, mientras que las α 1-and β 1-sintrofinas se asocian con la distrofina, las β 1-and β 2- sintrofinas se asocian preferentemente con utrofina³⁸.

2.2.2. FUNCIÓN DE LA UTROFINA.

Las utrofinas no han sido directamente implicadas en ninguna enfermedad genética conocida. No obstante, estas proteínas han mostrado patrones específicos de expresión en una gran variedad de tejidos y pérdida de la función en modelos murinos, lo que sugiere su papel selectivo en las funciones celulares.

En músculos adultos, la utrofina se acumula en las uniones neuromusculares y en las uniones miotendinosas³⁹.

En las uniones miotendinosas, la utrofina contribuye al mantenimiento de la membrana postsináptica y al reclutamiento de los receptores de acetilcolina por la interacción con los subcomplejos de proteínas sub-neuronales; estos incluyen a F-actina, algunas de las proteínas del DAPC (dístroglicanos, dístrobrevinas, sintrofinas y sarcoglicanos)³⁹ y a las proteínas asociadas a sinapsis (rapsina y agrina)⁴⁰.

2.2.3. DISTRIBUCIÓN Y EXPRESIÓN CELULAR DE UTROFINA.

La proteína Utrn-A es la principal isoforma de utrofina presente en músculos esqueléticos adultos, enriquecida en las crestas de los pliegues de las membranas postsinápticas en asociación con los receptores acetilcolina (AChR) en las conjunciones neuromusculares. En contraste, la proteína Utrn-B es la principal isoforma de utrofina presente en el músculo vascular endotelial.

La distrofina y la utrofina presentan diferente distribución subcelular en músculo estriado adulto. No obstante, la aparición de utrofina ocurre antes de la de la distrofina al desarrollar y regenerar los músculos, donde se le ha detectado a lo largo del sarcolema.

En el nacimiento y/o en músculos maduros, la utrofina es reemplazada por la distrofina a lo largo del sarcolema y su presencia permanece restringida a las conjunciones neuromusculares y vasculares. Por esta razón, se le ha considerado a la utrofina como un homólogo fetal de la distrofina en el desarrollo de tejidos musculares, sugiriendo que ambas proteínas comparten funciones comunes en la estructura muscular y/o fisiológica⁴¹.

2.2.3.1. TEJIDOS MUSCULARES.

Al igual que la distrofina, las diferentes isoformas de la utrofina se han encontrado descritas en diferentes tejidos musculares (Ver tabla 3).

2.2.3.2. TEJIDOS NO-MUSCULARES.

Las isoformas completas de utrofina se han detectado, asimismo, en tejidos no musculares, tal como ocurre en el sistema nervioso central, nervios periféricos, testículos, riñones, bazo, hígado, plaquetas y en arterias y venas pequeñas. También se expresan en vasos sanguíneos y en las neuronas de cerebro adulto, así como en las células gliales de Muller en retina. En las neuronas, la utrofina se localiza a lo largo de la membrana somática y dendrítica ⁴² (Ver tabla 3).

Tabla 3. Distribución de isoformas de la utrofina en células y tejidos.

Nombre	sinonimia	Longitud de la proteína kD	mRNA kb	Promotor localizado en	Expresión
Up113	Utrofina-G	113	5.5	Intron 56	* Cerebro * Testículos * Riñones * Sensores ganglionares
Up 140	Up140	140	6.75	Intron 41	* Pulmón * Músculo * Riñones * Timo * Hígado * Testículos * Cerebro
Up 71	Up71	71	4	Intron 58	* Pulmón * Músculo * Riñones * Timo * Hígado * Cerebro * Nervios periféricos
Utrofina-N terminal	Utrofina-N	62	3.7		* Células gliales C6
Up90	Up90	90			* Testículo * Bazo * Hígado
Up97	Up97	97			* Testículo
Up 109	Up109	109		Intron 55	* Dermis de pie * Mano fetal
Up103	Up103	103			* Testículos
Up120	Up120	120			* Riñones

2.2.4. PRESENCIA DE LA UTROFINA EN MICRO-DOMINIOS LIPÍDICOS.

Hoy en día, el estudio de la utrofina en micro-dominios lipídicos es escaso y no existe suficiente evidencia científica de su presencia en los mismos más allá de las hipótesis citadas en relación la sustitución que pudiera llevar a cabo ante la ausencia de la distrofina⁴³.

2.3. CAVEOLINA-1.

La Cav-1 fue identificada por primera vez como el sustrato tipo tirosina fosforilado principal del v-src en fibroblastos aviares transformados, la caveolina-1 se localiza en la superficie estriada interna de las invaginaciones de 50-100 nm de la membrana plasmática, denominadas caveolas. Esta proteína fue identificada de manera independiente como VIP-21, un componente integral de la membrana de la red trans-Golgi que deriva en vesículas. El análisis del patrón de expresión de esta proteína ha revelado que Cav-1 se encuentra en diversos tipos celulares, incluyendo los adipocitos, fibroblastos, células endoteliales, células de músculo liso, y en células del epitelio mamario. Hoy en día es claro que la mayoría de las caveolas requieren de Cav-1 para su correcta formación, lo que indica que esta proteína posee funciones de carácter estructural⁴⁷.

2.3.1. CARACTERÍSTICAS DE CAVEOLINA-1.

Se cree que las caveolas están presentes en casi todos los tipos celulares, pero son más abundantes en las células diferenciadas, incluyendo a los adipocitos, células endoteliales, neumocitos tipo I y células del músculo esquelético⁴⁸.

Evidencias *in vitro* e *in vivo* recientes sugieren que las caveolas contribuyen a los mecanismos que modulan la actividad contráctil y proliferativa de las células de músculo liso.

La caveolina-1 ha sido implicada como un regulador de un diverso número de vías de señalización intracelulares. Se ha reportado que cuando las caveolas son purificadas, generalmente se encuentran enriquecidas por lípidos específicos (colesterol y glicoesfingolípidos) junto con un gran número de moléculas de señalización modificadoras de lípidos como son: H-ras, c-src, cinasas-src, eNOS, activador del plasminógeno y proteínas G heterotriméricas. Adicionalmente, un número de receptores asociados a la membrana, incluyendo algunos que se acoplan a las proteínas G o poseen actividad intrínseca de tirosina-cinasa, se localizan cerca de las caveolas, o bien, son internalizadas por las mismas⁴⁹.

Las caveolas juegan un papel importante en el secuestro de moléculas de señalización inactivas, y en la disminución de la actividad de los receptores. Alternativamente, las

caveolas proporcionan un ambiente para la activación regulada de estas moléculas lo que explica la comunicación entre las diferentes vías de señalización⁴⁸.

2.3.1.1. EL GEN DE CAVEOLINA-1.

El gen de Cav-1 se localiza en el cromosoma 7 (locus 7q31.1). Este gen incluye tres exones (30 pb, 165 pb y 342 pb) y 2 intrones (1.5 kb y 32 kb) 47. La expresión del gen de Cav-1 se encuentra directamente regulada por la cascada p42/44 MAPK^{49,59}.

La alteración de la expresión de caveolina-1 involucra un número importante de enfermedades humanas, incluyendo cáncer, diabetes, Alzheimer y distrofia muscular⁴⁹.

2.3.1.2. ESTRUCTURA DE LA CAVEOLINA-1.

La Cav-1 es una proteína de 22 kD que se integra al sarcolema por medio de la asociación de dos dominios a la membrana (MADS) de tal forma que ambos extremos, amino y carboxilo terminal, se mantienen en el interior de la célula (Figura 8)⁵⁰.

La región intracelular amino terminal de la Cav-1 alberga un dominio de anclaje (CSD) de 20 aminoácidos (residuos 82-101), el cual tiene afinidad con las células de señalización por medio de una región conservada denominada como dominio de unión a la caveolina (CBD)⁵¹ (Figura 8).

El CSD proporciona los medios para que la Cav-1 co-segregue a las proteínas de señalización y regule la comunicación entre diferentes vías de señalización⁵²

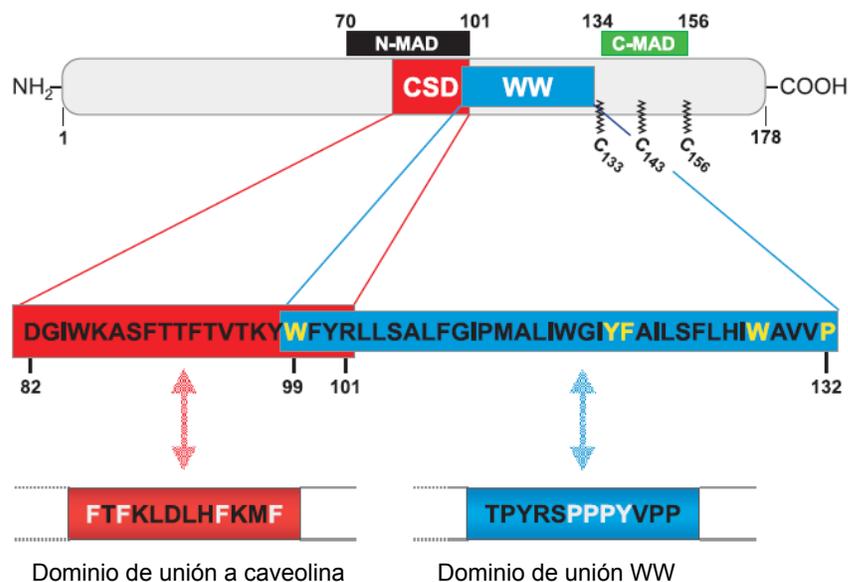


Figura 8. Representación esquemática de la estructura y función de los dominios de la Cav-1.
 La caveolina-1 es una proteína de 22 kD compuesta por 178 aminoácidos ⁵⁹.

2.3.1.3. PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA CAVEOLINA-1.

Para el mejor entendimiento del papel de la caveolina-1 (Cav-1), es importante destear su ubicación en la membrana de las células musculares del tejido vascular liso, así como entender su relación con el DAPC / UAPC. Por un lado, La Cav-1 se ancla al citoplasma por medio de las regiones C-MAS y N-MAD (Figura 8 y 9). Los dominios WW tanto de Cav-1 como de la distrofina tienen afinidad a los dominios WW del β -dístroglicano, regiones que favorecen las uniones entre dichas proteínas (Figura 9). Por otra parte, la distrofina funciona como una unión entre el DAPC / UAPC y los filamentos de F-actina del citoesqueleto. Además, el DAPC / UAPC se estabiliza por otras subunidades transmembranales, las cuales incluyen al SGC (β -, δ -, ϵ -, y ζ - sarcoglicanos y al sarcospan) en músculo liso vascular. El DAPC / UAPC también se une a la lámina basal circundante por la unión del α -dístroglicano con las lamininas -1 y -2. El dominio de anclaje de Cav-1 (CSD) traslapa la región N-MAD y sirve como punto de andamiaje para las proteínas efectoras de señalización tal como lo son: subunidades Ga, isoenzimas PKC y RhoA, que poseen un dominio de unión a caveolina. Aparte de que las subunidades Gaq intercambian al GDP por GTP, también se les ha asociado a una fosfolipasa llamada C-b1 (PLCb1), la cual cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5- bifosfato (PIP2) para producir los mensajeros diacilglicerol (DAG) y

inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). El IP₃ se une a su receptor al retículo sarcoplásmico proximal de las membranas (SR) el cual media la liberación rápida de Ca²⁺ al citosol. La movilidad del Ca²⁺ en el citosol es requerida para iniciar la contracción muscular⁵³. Lo anterior sugiere la interacción de la Cav-1 con diferentes vías de señalización implicadas en los eventos de contracción muscular, además de su estrecha relación con los miembros del DAPC / UAPC. Sin embargo, hoy en día no existen suficientes reportes científicos sobre esta correlación⁵⁵.

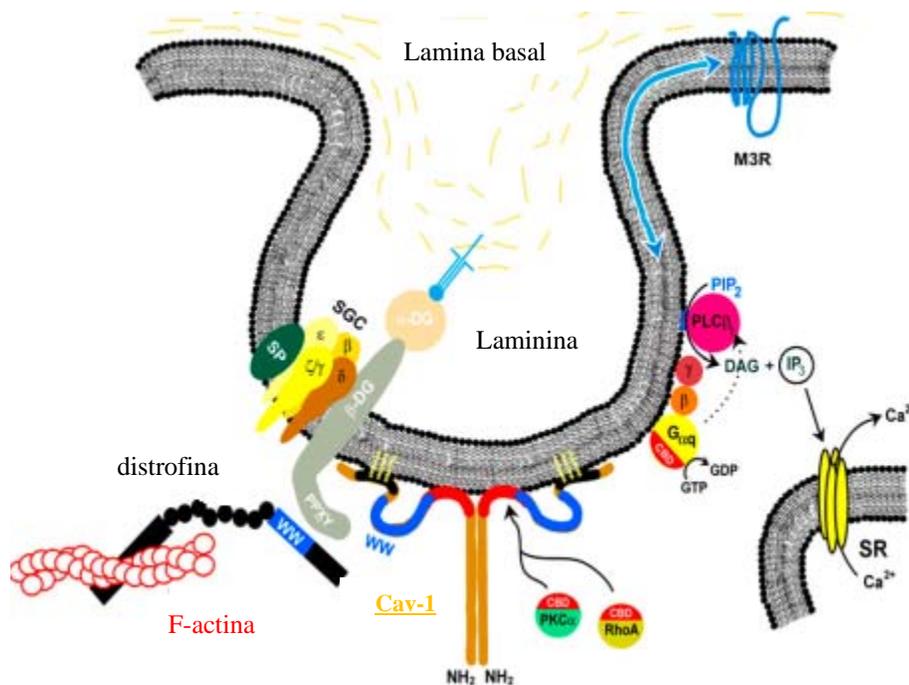


Figura 9. Relación entre la caveolina-1 y el DAPC asociado con el receptor acoplado a proteínas G que median la señalización intracelular en músculo liso vascular. Por simplicidad se muestra solo un homodímero de caveolina. La caveolina-1 se ancla al citoplasma por medio de las regiones C-MAS (negro) y N-MAD (rojo). Los dominios WW (azules) tanto de cav-1 como de la distrofina tienen afinidad a los dominios WW del β-distroglicano⁵⁵.

2.3.2. FUNCIÓN DE CAVEOLINA-1.

La caveolina-1 interacciona tanto con los lípidos así como con los sitios de anclaje lipídico de las proteínas. Estas interacciones predicen que la Cav-1 posee funciones tales como se describen a continuación:

a) La Cav-1 en el transporte de lípidos.

El colesterol es requerido para la estructura y función de las caveolas. En ensayos in vitro se ha mostrado que la Cav-1 interacciona con el colesterol, lo que sugiere que esta interacción organiza el colesterol de la membrana en las caveolas.

b) La Cav-1 en el tráfico de la membrana celular.

La Cav-1 es capaz de atraer proteínas a la caveola y funciona como un motor molecular que favorece la invaginación de la membrana. Asimismo, se ha reportado que la Cav-1 interactúa con algunos receptores de tipo tirosina cinasas.

c) La Cav-1 en la transducción de señales.

La Cav-1 puede modular la transducción de señales a través de su interacción con los lípidos, más que con su interacción con las proteínas. Se ha reportado que la Cav-1 se encuentra involucrada en el mantenimiento de la integridad del colesterol en las caveolas. Asimismo, el colesterol es claramente requerido para la localización de ciertas moléculas de señalización en las caveolas así como para modular la interacción entre las moléculas de señalización.

Por otra parte, en tejidos musculares no se ha descrito mucho al respecto de la funcionalidad de Cav-1. Los estudios hechos con fracciones congeladas de la membrana de las células de músculo esquelético y estriado permitieron establecer la hipótesis de que las caveolas pueden aplanarse durante condiciones de estiramiento producidas por estrés mecánico. Estudios posteriores, han asociado a las caveolas con la respuesta mecanosensitiva de la célula⁵⁶.

Aún cuando las caveolas han sido directamente relacionadas con la respuesta de la célula al estrés mecánico, sus funciones siguen sin ser del todo definidas. Además, un número de estudios han revelado que las caveolas se encuentran involucradas en la regulación mediada por los receptores acoplados a proteína G (GPCR) de la contracción del músculo liso⁶⁰.

2.3.3. DISTRIBUCIÓN Y EXPRESIÓN CELULAR DE LA CAVEOLINA-1.

2.3.3.1. TEJIDOS MUSCULARES.

Se ha asociado la presencia de Cav-1 a varios tipos de tejidos muscular, sin embargo, en este respecto aún existen incertidumbres sobre su comunicación y anclaje con el complejo de proteínas asociado a la distrofina / utrofina⁵⁶.

2.3.3.2. TEJIDOS NO-MUSCULARES.

Al igual que en los tejidos musculares, aún falta mayor investigación en cuanto a la presencia de Cav-1 en otros tejidos. Hoy en día, se ha encontrado descrita en endotelio, adipocitos, fibroblastos y astrocitos⁵⁶.

2.3.4. PRESENCIA DE LA CAVEOLINA-1 EN MICRO-DOMINIOS LIPÍDICOS.

Las caveolas fueron en primer lugar identificadas por microscopía como invaginaciones de la membrana plasmática de 50-100nm. Hoy en día se sabe que las caveolas representan un punto donde son secuestrados multitudes de receptores, proteínas de señalización y canales iónicos los cuales crean puntos calientes para regular la actividad celular⁵⁷.

Tres tipos de caveolinas son expresadas por genes diferentes de las cuales, cav-1 y cav-3 inducen la formación de las caveolas de forma independiente⁵⁸.

Cav-1 puede formar complejos oligoméricos junto con cav-2, la isoforma más abundante en músculo liso vascular y de las vías respiratorias, mientras que cav-3 es más específica de músculo esquelético⁵⁹.

La abundancia de la proteína Cav-1 incrementa de forma significativa al tiempo que las células del músculo liso adquieren el fenotipo contráctil, lo que resulta en la aparición de números significativos de caveolas que se organizan en arreglos en forma de costilla sobre la membrana plasmática⁶⁰.

Por otra parte, se piensa que la familia de caveolinas funciona como proteínas de anclaje para organizar y concentrar lípidos específicos (colesterol y esfingolípidos) y los lípidos a su vez, modifican a las moléculas de señalización (quinasas parecidas a Src, H-Ras, eNOS y proteínas G; dentro de las caveolas⁶⁵.

Dentro de este contexto, la unión a caveolina-1 puede funcionalmente suprimir la actividad GTPasa de las proteínas heterotriméricas G e inhibir la actividad cinasa de la familia de tirosina cinasa Src a través de un dominio caveolar común, denominado “dominio de anclaje a caveolina”⁶⁰.

La interacción directa de caveolina-1 con las moléculas de señalización conlleva a su inactivación y dado que muchas de estas moléculas pueden ocasionar transformaciones celulares cuando son constitutivamente activadas, es razonable especular que caveolina-1 por sí misma, posee una actividad de señalización supresora. Por lo anterior, caveolina-1 se encuentra abundantemente expresada en células terminalmente diferenciadas como lo son: adipocitos, células endoteliales y células musculares⁶¹. Un resumen de todo lo anterior se puede apreciar en la figura 10.

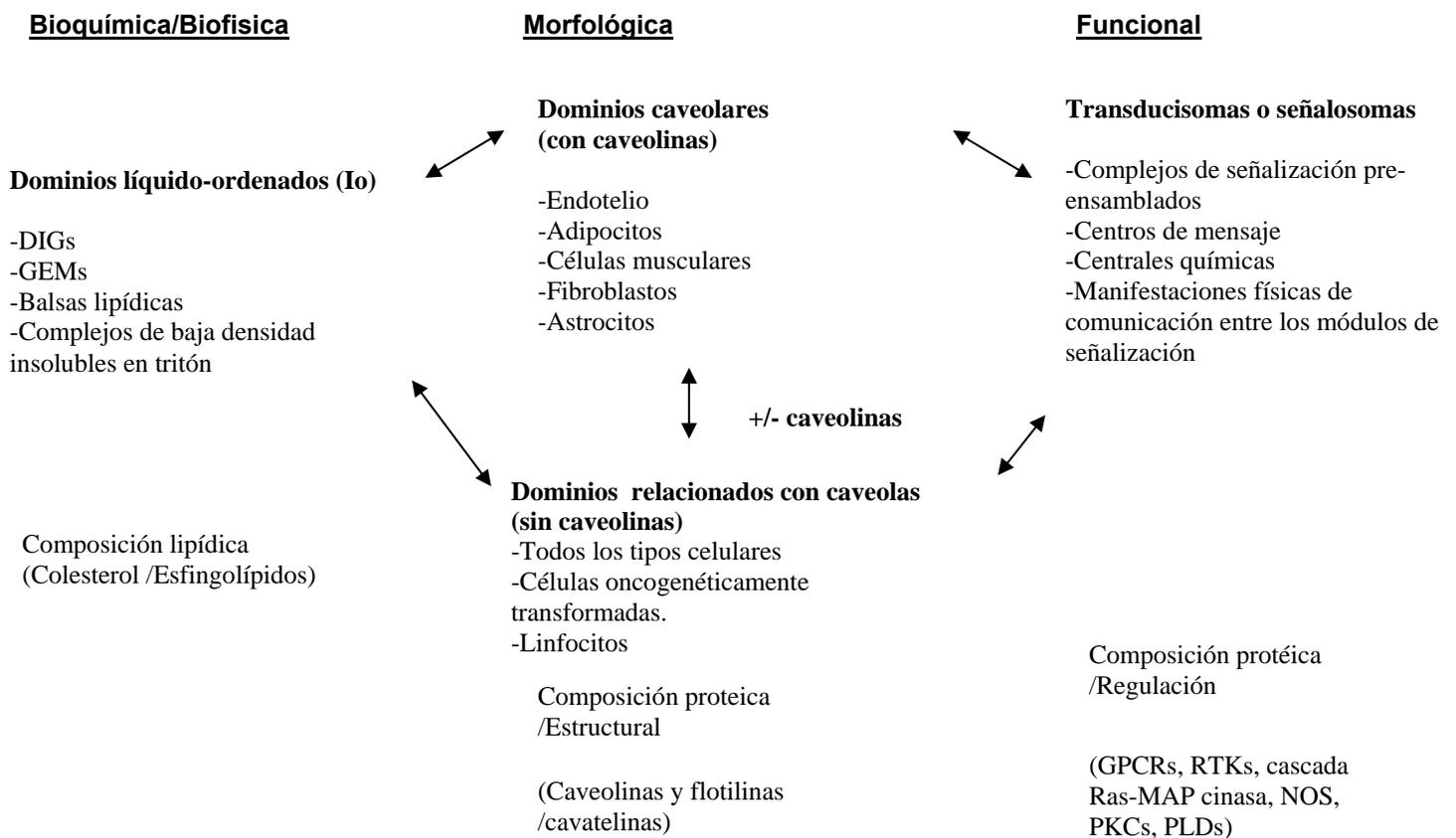


Figura 10. Dominios caveolares y su relación a la caveolina. El esquema resume las características bioquímicas, morfológicas y funcionales de estos microdominios asociados a la membrana plasmática⁴⁸.

CAPÍTULO 3

3.1. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA DISTROFINA Y LA UTROFINA.

Las distrofias musculares son un grupo heterogéneo de desórdenes genéticos caracterizados por la pérdida progresiva de la integridad y fuerza muscular. Las distrofias musculares muestran una variación en el tamaño de la fibra muscular, infiltración del tejido graso y conjuntivo y de la ubicación centralizada del núcleo. Las membranas de las fibras se vuelven frágiles dando paso a la aparición de un daño extensivo lo que conlleva a la necrosis y consumo del músculo.

Estas distrofias musculares se encuentran mapeadas en 29 *loci* diferentes que dan lugar a 34 desórdenes distintos, variando entre ellos en: la edad de aparición, grado de severidad, modo de herencia y el grupo de músculos que son afectados en primera instancia⁶².

El tipo de distrofia muscular que con mayor frecuencia se presenta en las poblaciones es la Distrofia Muscular de Duchenne, descrita como un trastorno recesivo ligado al cromosoma-X, la cual fue descubierta en 1861 por GB Duchenne. La clonación posicional del gen alterado en DMD dio lugar a la descripción de la distrofina. La caracterización bioquímica de la distrofina en las células musculares propició la elucidación de la base molecular de muchas formas de distrofia muscular⁶³.

Sin embargo, la identificación de la distrofina dio paso a la caracterización del complejo de proteínas asociadas a la distrofina, con sus componentes periféricos e integrales en músculo liso esquelético, hallazgo que permitió entender la base molecular de la enfermedad⁶⁴.



Figura 11. La utrofina y la distrofina son similares en tamaño y poseen arquitectura modular comparable. Estas similitudes significan que la utrofina en algunas ocasiones sustituye a la distrofina, lo que proporciona una ruta potencial para la terapia de los padecimientos de las distrofias musculares asociadas a la proteína.

Por otra parte, la utrofina es considerada el homólogo autosómico de la distrofina (Figura 11), formalmente llamada proteína relacionada a la distrofina (PRD) Como la distrofina, la utrofina es capaz de proporcionar un enlace estructural entre la base de la actina en el citoesqueleto y la matriz extracelular por medio de su unión al complejo de proteínas asociadas a la distrofina, cruzando la membrana de las fibras musculares. Cuatro dominios estructurales son comunes tanto en la distrofina y la utrofina, los cuales son:

1. El amino terminal (NH₂) el cual contiene sitios de unión para la F-actina del citoesqueleto.
2. El dominio rod domain, el cual contiene repeticiones similares a la espectrina.
3. El dominio rico en cisteína, el cual contiene sitios de unión para β-distroglicano, proteína que es crítica para la última unión con laminina-2 en la matriz extracelular.
4. El carboxilo Terminal (COOH) el cual contiene sitios de unión para sintrofina y distrobrevina.

No obstante, se ha reportado que en modelos de ratones *mdx*, a los cuales se les sobreexpresa un transgén de la utrofina truncada en músculo, se observa una reducción en la histopatología de la distrofia así como mejoras en el funcionamiento a nivel muscular. Además, se ha visto que en ratones deficientes en la utrofina y la distrofina se presenta un fenotipo más severo de distrofia que en aquellos en que solo se presenta, por lo menos, una de ellas⁶⁶.

Sin embargo, la utrofina se ha visto expresada en un gran número de tejidos y tipos celulares en el organismo, así como en los músculos de pacientes con DMD. No obstante, hacia las últimas fases del trastorno, la utrofina se ha encontrado en niveles deficientes para mantener la integridad de las fibras musculares. Asimismo, la utrofina no resulta ser un neoantígeno en los músculos deficientes de la distrofina y ha sido propuesto por diferentes grupos de investigación que su sobreexpresión en las miofibras afectadas por la distrofia (ya sea incluso por regulación *in vivo* arriba del gene endogénico de utrofina o por la transferencia del gen de utrofina mediada por un vector) podría evitar respuestas inmunológicas adversas inherentemente asociadas con el reemplazo del gen de la distrofina en un huésped deficiente de la misma. La utrofina ofrece una ventaja teórica sobre este tema.

Cabe mencionar que estudios *in vivo* han indicado que la distrofina y la utrofina juegan papeles similares a nivel fisiológico, sin embargo, estudios *in-vitro* han demostrado que dichas proteínas no interaccionan bajo los mismas vías bioquímicas. A pesar de que ambas proteínas se unen a la actina con similiar afinidad y que estabilizan los filamentos de actina contra la despolimerización, la distrofina y la utrofina difieren en los efectos que originan a lo largo de su asociación lateral con la actina, así como en la dependencia de la fuerza iónica para su unión a la actina. Por otra parte, se sabe que no compiten por los mismos sitios de unión en los filamentos de actina⁶⁶.

En la tabla 4 se resumen las diferencias existentes entre la distrofina y la utrofina.

Tabla 4. Diferencias entre la distrofina y la utrofina

CARACTERÍSTICAS	DISTROFINA	UTROFINA
Tejidos musculares	Distribuida a lo largo del sarcolema de las células musculares.	Restringida a las conjunciones neuromusculares y miotendinosas.
Tejidos no-musculares	Expresada en sistema nervioso central, vasos sanguíneos y membranas, capa retinal, capas nucleares internas del ojo, arterias y venas pequeñas, plaquetas, pulmones y nervios periféricos.	Expresada en sistema nervioso central, vasos sanguíneos y membranas, capa retinal, capas nucleares internas del ojo, arterias y venas pequeñas, plaquetas, pulmones y nervios periféricos.
Unión con el complejo de glicoproteínas asociadas	Mayor afinidad por las sintrofinas α -1 y β -1.	Mayor afinidad por las sintrofinas β -1 y β -2.
Dominio de unión a actina	Las primeras 10 repeticiones parecidas a espectrina no se unen a actina, tiene un segundo dominio que consiste de 11-17 repeticiones parecidas a espectrina.	Completado por las primeras 10 repeticiones parecidas a espectrina.
Dominio amino terminal	246 aminoácidos. La diferencia en tamaño con la utrofina sugiere que la distrofina posee contactos más extensivos con la actina, lo que favorece la estabilidad del sarcolema durante la contracción muscular.	261 aminoácidos. Menor contacto con la actina.

3.1.1. DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) fue descrita por primera vez por el neurólogo francés Guillaume Benjamín Amand Duchenne en la década de 1860. La DMD es tan sólo una enfermedad de un grupo de distrofias musculares caracterizadas por la dilatación de los músculos. La DMD es un tipo de distrofia muscular prevaeciente que consiste en la rápida y progresiva degeneración del músculo. La aparición de este trastorno se reconoce clínicamente en los pacientes por la dificultad para caminar a edades entre los dos y cinco años. Los pacientes con este trastorno presentan probabilidad alta de fallecer hacia la edad de 30 años como resultado de fallas respiratorias y cardíacas. Por sus características moleculares, la DMD es considerada un trastorno ligado al cromosoma X que afecta principalmente a hombres (1 de 3,500 nacidos vivos de la población mundial). No obstante en algunos casos clínicos, la DMD compromete la función cardíaca debido al reemplazo progresivo de las fibras miocárdicas por tejido conectivo y graso⁶⁴.

Diferentes grupos de investigación han asociado el fenotipo de la enfermedad a la desestabilización del DAPC, ya que cuando la distrofina se encuentra ausente, existe una disminución de los niveles de las proteínas que componen el DAPC lo que conlleva al daño progresivo de la fibra muscular y a la disrupción de la membrana⁶⁶.

Por otra parte, en la DMD es evidente un número anormal, forma y tamaño de las caveolas, lo que sugiere que la pérdida de un componente del DAPC, asimismo, compromete la organización de las caveolas en la membrana plasmática⁶⁶.

3.1.2. DISTROFIA MUSCULAR DE BECKER.

La distrofia muscular de Becker (DMB) fue por primera vez descrita en la década de 1950 por el médico alemán Meter Emil Becker. La distrofia muscular de Becker (DMB) es causada por mutaciones que resultan de la reducción de la expresión de la distrofina, o de la expresión de formas truncadas que son parcialmente funcionales de la proteína.

La falla cardíaca también es común en la BMD, la cual evoluciona a lo largo de la vida del paciente⁶².

3.1.3. CARDIOMIOPATÍA DILATADA.

La cardiomiopatía dilatada es una enfermedad heterogénea originada por la función anormal del músculo cardíaco. La cardiomiopatía dilatada se caracteriza por la dilatación de la cavidad ventricular acompañada de disfunción sistólica. El síntoma clínico es una falla en el corazón asociada con la muerte repentina del paciente⁶⁸.

Se ha descrito en modelos murinos (ratones knockout), que la disrupción de las asociaciones entre las proteínas de la DAPC, se debe primordialmente a la ausencia o a defectos en la distrofina y/o en los sarcoglicanos (β , γ y δ), siendo el caso particular de los defectos de la proteína δ sarcoglicano asociados a la aparición de cardiomiopatía en músculo liso vascular¹⁰.

La disociación del complejo de proteínas asociadas a la distrofina/utrofina origina la inestabilidad del sarcolema causando contracción inducida que da paso a la ruptura del sarcolema. Subsecuentemente a este daño, se ha observado un incremento en el influjo del ion calcio (Ca^{2+}). La mitocondria, en un esfuerzo por eliminar el exceso de calcio, es sobrecargada provocando un aumento en su permeabilidad. Si estas condiciones prevalecen, las fibras musculares se vuelven susceptibles a necrosis y/o apoptosis, característica patológica principal de las distrofias musculares⁶⁶.

CAPÍTULO 4

4.1. ESTUDIO DEL DAPC/UAPC EN MÚSCULO LISO VASCULAR.

Diferentes grupos de investigación han descrito la presencia del DAPC / UAPC en el tejido vascular de los vasos sanguíneos. Es importante mencionar que los vasos sanguíneos se encuentran permanentemente sujetos a fuerzas mecánicas traducidas en estiramientos, abarcando ciclos mecánicos de tensión debidos a la naturaleza pulsátil del flujo sanguíneo y al estrés interrumpido que se genera en las superficies del vaso. Lo anterior genera fuerzas tangenciales y radiales que contrarrestan los efectos de la presión intraluminal, mismas que afectan a todos los tipos celulares que conforman el vaso. El estrés interrumpido del flujo es el resultado de la fricción de la sangre contra las paredes del vaso, el cual actúa de forma paralela a su superficie. Este estrés interrumpido es sentido principalmente por las células endoteliales las cuales se encuentran situadas en la interfase del flujo sanguíneo y el vaso.

Las alteraciones en el estiramiento o el estrés interrumpido invariablemente producen transformaciones en la pared del vaso que se han correlacionado con ajustes pasajeros de su diámetro, mediados por la liberación de agonistas vasoactivos o cambios en el tono miogénico. Sin embargo, si se alteran de forma crónica las fuerzas mecánicas, éstas usualmente promueven la aparición de alteraciones adaptativas de la pared del vaso, afectando su composición estructural, mismo que podría estar relacionado con alteraciones del DAPC /UAPC⁶⁸.

Sin embargo, en el cordón umbilical humano, la función de los vasos sanguíneos es inversa.

La vena proporciona sangre oxigenada y los nutrimentos al feto, mientras que las arterias transportan sangre desoxigenada. El único sitio en el cuerpo humano donde ocurre el mismo fenómeno es en las arterias y venas pulmonares, las cuales conectan a los pulmones con el corazón⁶⁸.

Asimismo, existe un nivel de heterogenicidad en las células del músculo liso vascular, esto significa que las CMLV presentan propiedades morfológicas y funcionales diferentes dentro y

a lo largo del mismo vaso sanguíneo, así como en diferentes tipos de vasos, por ejemplo, venas y arterias.

La principal función de las CMLV es mantener el tono vascular y la resistencia del vaso. Por otra parte, las CMLV diferenciadas muestran el fenotipo contráctil, por lo que expresan proteínas citoesqueléticas contráctiles específicas⁵⁹.

La adhesión de las células contráctiles del músculo liso vascular se fortifica para mantener tensiones considerables aunadas a la contracción de las CMLV y a las fuerzas hemodinámicas, lo anterior pudiera involucrar los niveles de expresión de los componentes de la DAPC /UAPC aunados a su función estructural y de resistencia mecánica dentro de los vasos sanguíneos⁶⁹.

Reportes utilizando ratones *knock out*, han indicado que la DAPC juega un papel importante en las función contráctil y estructural del músculo liso vascular. Asimismo, se ha visto que al inhibir la expresión de los β y δ sarcoglicanos da como resultado la disrupción del DAPC en las células de músculo liso vascular, lo que sustenta el papel de los sarcoglicanos en la estabilidad del DAPC⁶⁹.

Ratones y modelos de hamsters BIO14.6 deficientes en δ sarcoglicano han desarrollado anormalidades cardíacas causadas por disfunciones vasculares primarias. Los ratones deficientes de β sarcoglicano desarrollan irregularidades en las arterias coronarias, lo que conlleva a la aparición de necrosis miocárdial en los ratones y constricciones en el corazón, diafragma y riñones; lo que resulta en una distrofia muscular y cardiomiopatía con áreas focalizadas de necrosis asociadas a la disrupción del DAPC en todos los tipos musculares. Ambas mutaciones en los β y δ sarcoglicanos perturban la función vascular, lo que da como resultado el inicio de la cardiomiopatía²⁹.

La vena porta, en conjunto con la vena superior mesentérica, son los únicos ejemplos de actividad espontánea del músculo liso vascular. En un estudio realizado por Mancinelli y colaboradores, se demostró que en la vena porta de modelo de ratón de distrofia muscular (ratones *mdx*) se encuentran alteradas las cargas intracelulares en comparación con ratones

sanos cuando se evaluó su actividad ante la presencia de agentes químicos despolarizantes. Estos resultados proveen la evidencia de que los procesos distróficos no solo afectan las funciones del músculo esquelético sino también del músculo liso, y en este caso particular, la motilidad de la vena porta⁶⁸.

CAPÍTULO 5

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En trabajos anteriores de nuestro grupo de trabajo (Coral y colaboradores) desarrollados a partir de cultivos primarios de vena y arteria, se determinó que existe una diferencia significativa entre las cantidades de utrofina que se expresan en las arterias y en la vena del cordón umbilical humano, pero no así en el resto de las proteínas que se asocian al UAPC, sin embargo, la diferencia no había sido cuantificada (datos no publicados). Lo anterior nos impulsó a predecir que las determinaciones sobre una muestra enriquecida de vena o arteria de un pool de un universo de ocho cordones nos daría un resultado similar pero con una concentración mayor, característica necesaria para lograr hacer evidente la diferencia que ya se había observado anteriormente.

Hoy en día, diversos estudios han mostrado la importancia del DAPC/UAPC sobre la implicación clínica de las distrofias musculares asociada a alteraciones en los genes que codifican para la distrofina y los sarcoglicanos; así como la aparición consecuente de la cardiomiopatía dilatada, manifestación clínica que no solo se encuentra relacionada con deterioro sobre la funcionalidad del músculo estriado, sino también al daño sobre la fisiología de tipo vascular. Sobre este contexto, resulta importante definir la presencia y nivel de expresión de las proteínas (a través de su cuantificación) que conforman este complejo en músculo liso de vena y arteria, lo que arroja un mejor entendimiento sobre el papel que desempeñan estas proteínas sobre la membrana de las células de músculo liso. Un modelo asequible es la vena y arteria de cordón umbilical humano

CAPÍTULO 6

HIPÓTESIS.

Existe una diferencia cuantitativa entre los niveles de las proteínas utrofina, distrofina y cav-1 así como en las proteínas asociadas al DAPC/UAPC en músculo liso vascular de vena y arteria de cordón umbilical humano asociada a la función que desempeñan.

CAPÍTULO 7

OBJETIVOS.

7.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar, mediante ensayos de Western Blot semi-cuantitativo, los niveles de proteínas asociadas al complejo DAP/UAP en el músculo liso vascular de cordón umbilical humano (vena/arteria).

7.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Obtener un extracto de proteínas totales de músculo liso vascular de cordón umbilical humano (vena/arteria).
- Evaluar, por ensayos de Western Blot, la presencia de las proteínas asociadas a distrofina / utrofina (DAP/UAP) en músculo liso vascular (vena/arteria).
- Cuantificar las señales obtenidas de los ensayos de Western Blot por medio de ensayos densitométricos.

CAPÍTULO 8

MATERIAL.

8.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

8.1.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO.

La obtención de muestras fue llevada a cabo a través del servicio médico de Tococirugía del Hospital General Xoco de la Secretaría de Salud del Distrito Federal con previa autorización y revisión del protocolo por parte del comité de ética del servicio de Tococirugía del hospital mencionado. Los cordones obtenidos fueron de nacimientos normales a término y colectados inmediatamente después del parto con previo consentimiento informado. Se obtuvieron ocho muestras de cordón umbilical, con una longitud de 10 a 12 cm cada una, fueron trasladadas al laboratorio en una solución de NaCl 0.9% (Sigma, EEUU) adicionado con 1% de mezcla de antibióticos (penicilina 100 U / mL, estreptomicina 1 g/ mL y anfotericina B 25 mg/mL GIBCO-BRL- EUA) a una temperatura de 4°C.

8.1.2. ANTICUERPOS.

Anticuerpos primarios.

- *Alpha Smooth Muscle (α SMA-1) Novocastra Laboratories, Ltd.* [Monoclonal hecho en ratón].
- *Beta-sarcoglycan (H-17) Santa Cruz Biotechnology, Inc.* [Policlonal hecho en conejo].
- *β -dystroglycan (JAF).* [Policlonal hecho en conejo].
- *Caveolin-1 Novocastra Laboratories, Ltd.* [Monoclonal hecho en ratón].
- *Dystrophin (C-20) Santa Cruz Biotechnology, Inc.* [Policlonal hecho en cabra].
- *Dystrophin (Rod-Domain) Novocastra Laboratories, Ltd.* [Monoclonal hecho en ratón].
- *Epsilon-Sarcoglycan (H-20) Santa Cruz Biotechnology, Inc* [Policlonal hecho en cabra].
- *Epsilon-Sarcoglycan (H-67) Santa Cruz Biotechnology, Inc* [Policlonal hecho en cabra].
- *GAPDH (A-14) Santa Cruz Biotechnology, Inc.* [Policlonal hecho en cabra].
- *Utrophin (H-300) Santa Cruz Biotechnology, Inc.* [Policlonal hecho en conejo].
- *Utrophin (N-19) Santa Cruz Biotechnology, Inc.* [Policlonal hecho en cabra].

CAPÍTULO 9

METODOLOGÍA.

9.1. DISECCIÓN DE VENA Y ARTERIA DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO.

Una vez obtenidas las muestras, fueron colocadas de manera individual sobre cajas petri con solución salina isotónica sobre una cama de hielo-agua. Posteriormente con la ayuda de un microscopio estereoscópico e instrumentos de disección fueron aisladas las arterias y la vena. Ambos tejidos fueron cortados en pequeñas fracciones y lavados con solución salina fisiológica 3 veces. Al término de este procedimiento los fragmentos de la vena y la arteria fueron cortados de manera transversal para exponer la luz del vaso y facilitar la eliminación del endotelio.

9.2. ELIMINACIÓN DEL ENDOTELIO.

Para la eliminación del endotelio, los fragmentos de la vena y arteria fueron incubados durante 20 min con 2 mL de tripsina a 37°C y con agitación constante. Al término de este tiempo la tripsina fue inactivada con suero fetal bovino (SFB) y retirada de ambos tejidos. Para eliminar el endotelio en suspensión se realizaron de 4 a 6 lavados con buffer de fosfatos (PBS). Finalmente los tejidos se congelaron a -70°C hasta su análisis. Este procedimiento fue llevado a cabo en cada cordón.

9.3. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE MÚSCULO LISO VASCULAR DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO (VENA Y ARTERIA).

Para la extracción de proteínas totales, cada tejido fue colocado sobre un mortero previamente enfriado en nitrógeno líquido y pulverizado durante 5 min. de cada muestra (vena y arteria) se pesó aproximadamente de 0.1 g a 0.15 g de tejido. Posteriormente cada peso individual tanto de las venas como de las arterias y se pusieron todas juntas en una relación de 1:2, se adicionó un volumen de 200 ul de buffer de extracción por cada 0.1 g de tejido.

Para la extracción de proteínas totales, se colocó un mortero previamente esterilizado en una cama de hielo. Posteriormente, al mortero fue vertido nitrógeno líquido para enfriarlo.

Asimismo, en otro recipiente con nitrógeno líquido, fueron colocados eppendorfs de 2.0 mL. Una vez que los eppendorfs fueron enfriados, se taró la balanza analítica con el peso de los mismos. Se colocaron fragmentos de tejido sobre el mortero que fueron extendidos sobre la superficie del mismo con ayuda del pistilo (este paso se desarrolló por separado para cada uno de los cordones). Consecuentemente, se vertió nitrógeno líquido sobre el tejido extendido y se procedió a pulverizarlo. Se pesó de 0.1 g a 0.15 g de tejido pulverizado de cada uno de las venas y arterias provenientes de cada uno de los ocho cordones. Los pesos obtenidos de cada muestra (vena o arteria) fueron juntados en un solo tubo y en una relación de 1:2 se adicionaron 200 μ L de amortiguador de extracción de proteínas por cada 0.1 g de muestra. Ambas mezclas fueron homogenizadas en un equipo politrón durante 30 s, tres veces con intervalos de descanso de 30 s a 4°C. Para optimizar la extracción de proteínas cada homogenado fue colocado en un agitador orbital a 4°C durante 30 min. con agitación constante. Transcurrido el tiempo, el homogenado fue centrifugado a 14,000 rpm durante 20 minutos para obtener el sobrenadante y sedimentar los restos celulares. Finalmente se tomaron 10 μ L de ambos sobrenadantes y se cuantificaron las proteínas mediante el método de Bradford. Ambos extractos fueron divididos en alícuotas de 100 μ L y conservados a -80°C. Esta metodología se desarrolló de igual forma para ambos tejidos (vena y arteria) por separado.

Es importante señalar que esta misma metodología fue llevada a cabo para cuatro cordones adicionales, los cuales fueron homogenizados y cuantificados por separado. Estos tejidos (venas y arterias) fueron utilizados únicamente con fines de estandarización del Western Blot.

Para elegir el amortiguador de extracción dos cordones adicionales fueron tratados como se describe anteriormente con tres diferentes amortiguadores de extracción TNE, RIPA Y SDS. Los sobrenadantes obtenidos fueron cuantificados y analizados en la estandarización del Western blot. A partir de este procedimiento se decidió usar TNE.

9.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS (MÉTODO DE BRADFORD).

La alícuota de 10 µL tomada del sobrenadante fue cuantificada utilizando una curva de BSA en las proporciones que se describen en la tabla a continuación:

Tabla 5. Curva de BSA

ALICUOTA	BSA [1mg/mL]	H ₂ O _{dest.} µL	Reactivo de Bradford	µg/mL
Blanco	0	400	100	0
1	1.5	398.5	100	3
2	3	397	100	6
3	4.5	395.5	100	9
4	6	394	100	12
5	7.5	392.5	100	15
6	9	391	100	18
7	10.5	389.5	100	21
8	12	388	100	24

Las alícuotas y las muestras fueron leídas en espectrofotómetro a λ 595 nm.

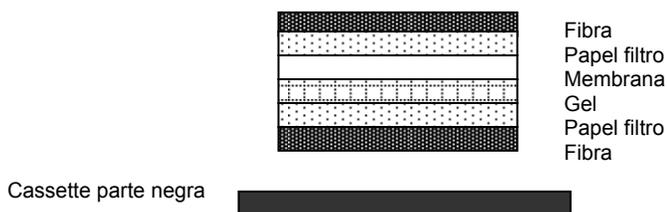
9.5. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) CON TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DE NITROCELULOSA Y PVDF (SISTEMA HÚMEDO Y SEMI-SECO).

Se prepararon geles desnatularizantes en sistemas discontinuos de poliacrilamida de una sola concentración (8%) y en gradiente (2.5-14%), en vidrios de 0.75mm. Se prepararon las muestras (20 µg/µL) provenientes de los extractos totales de proteínas obtenidos de cada tejido (vena y arteria) con el amortiguador de muestra 1:6 y se calentaron por 4 minutos en baño maría a ebullición. Simultáneamente, se armó el sistema de electroforesis con solución de corrida 1x en donde fueron depositados los geles y consecuentemente cargadas las muestras en los pozos asignados. Se dejaron correr las muestras en el sistema por un periodo de 80 min a 90 V. Una vez terminado el proceso, se destinó una parte del gel para la evaluación de integridad y patrón de corrimiento con tinción de azul de Coomassie y con la otra parte del gel que no se tiño, se realizó la transferencia de las proteínas por dos metodologías:

❖ Sistema húmedo

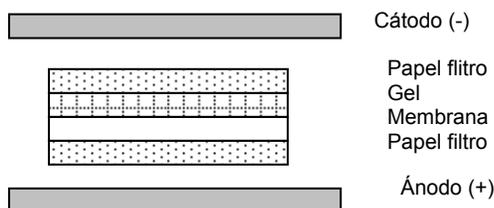
Los geles obtenidos de la corrida electroforética y las membranas de nitrocelulosa fueron equilibrados durante 10 min. con el amortiguador de transferencia previamente enfriado (4°C). Para el caso de de las membranas de PVDF, estas fueron previamente equilibradas con metanol por 10 min, y después puestas durante 5 min en amortiguador de transferencia frío.

Se remojaron los papeles filtro y las fibras, por separado, con el mismo amortiguador. Todos los elementos anteriores fueron colocados en sándwich (ver esquema) evitando la formación de burbujas entre los mismos y puestos dentro del sistema de transferencia a temperatura de 4°C por 1 h 30 min a 350 mA y 100 V.



❖ Sistema semi-seco

Los geles obtenidos de la corrida electroforética y las membranas de nitrocelulosa fueron equilibrados con el amortiguador de transferencia a temperatura ambiente. Para el caso de las membranas de PVDF, estas fueron previamente equilibradas con metanol por 10 min, y después puestas durante 5min en amortiguador de transferencia. Posteriormente, fueron colocados cada uno de los elementos del sándwich dentro del equipo de transferencia (ver figura inferior) por 1 h15 min a 15 V.



9.6. CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS POR ENSAYOS DE WESTERN BLOT.

Para cada una de las proteínas, se estandarizaron las condiciones de reacción de los ensayos Western Blot mediante la elaboración de matrices 2 x 2 (dos condiciones de incubación de anticuerpo primario contra dos condiciones de concentración tanto del anticuerpo primario como del anticuerpo secundario). Las condiciones ideales de reacción finales utilizadas se describen a continuación:

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN	CONDICIONES DE REACCIÓN	ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN	CONDICIONES DE REACCIÓN
utrofina (-COOH) H300	1:500	Bloqueo: toda la noche Temp: 4°C Condiciones: agitación constante.	Anti-inmonuglobulinas totales de conejo	1:5,000	Incubación: 1 h. Temp: ambiente Condiciones: Agitación constante.
		Incubación: 8h Temp: 4°C Condiciones: agitación constante.			Lavados: 4 de 11 min.
		Lavados: 4 de 12 min.			
distrofina Rod Domain	1:500	Bloqueo: toda la noche Temp: 4°C Condiciones: Agitación constante.	Anti-inmonuglobulinas totales de ratón	1: 5,000	Incubación: 1 h. Temp: ambiente Condiciones: Agitación constante.
		Incubación: 8h Temp: 4°C Condiciones: agitación constante			Lavados: 4 de 11 min.
		Lavados: 4 de 12 min.			
utrofina (-NH ₂) N-19	1:500	Bloqueo: toda la noche Temp: 4°C Condiciones: agitación constante	Anti-inmonuglobulinas totales de cabra	1:10, 000	Incubación: 1 h. Temp: ambiente Condiciones: Agitación constante.
		Incubación: 16h Temp: 4°C Condiciones: agitación constante			Lavados: 4 de 11 min.
		Lavados: 4 de 12 min			
distrofina C-20	1:500	Bloqueo: toda la noche Temp: 4°C Condiciones: agitación constante	Anti-inmonuglobulinas	1:10, 000	Incubación: 1 h. Temp: ambiente Condiciones: Agitación constante.

		Incubación: 16h Temp: 4°C Condiciones: agitación constante Lavados: 4 de 12 min	totales de cabra		Lavados: 4 de 11 min.
GAPDH	1:500	Bloqueo: toda la noche Temp: 4°C Condiciones: agitación constante. Incubación: 8h Temp: 4°C Condiciones: agitación constante. Lavados: 4 de 12 min.	Anti-inmonoglobulinas totales de cabra	1:5,000	Incubación: 1 h. Temp: ambiente Condiciones: Agitación constante. Lavados: 4 de 11 min.
Cav-1	1:1,000	Bloqueo: 5 h Temp: 4°C Condiciones: agitación constante Incubación: 12h Temp: 4°C Lavados: 4 lavados de 12min.	Anti-inmonoglobulinas totales de ratón	1:7,500	Incubación: 1 h. Temp: ambiente Condiciones: Agitación constante. Lavados: 3 lavados de 16 min y 1 lavado final de 20 min.
β-distroglicano	1:1,000	Bloqueo: 5 h Temp: 4°C Condiciones: agitación constante Incubación: 12h Temp: 4°C Lavados: 4 lavados de 12min.	Anti-inmonoglobulinas totales de ratón	1:7,500	Incubación: 1 h. Temp: ambiente Condiciones: Agitación constante. Lavados: 3 lavados de 16 min y 1 lavado final de 20 min.
β-sarcoglicano	1:500	Bloqueo: 6h Temp: 4°C Condiciones: Agitación constante Incubación: 12h Temp: 4°C	Anti-inmonoglobulinas totales de cabra	1:5,000	Incubación: 1 h. Temp: ambiente Condiciones: Agitación constante. Lavados: 4 de 11 min.

		Lavados: 4 lavados de 12min.			
ε -sarcoglicano	1:400		Anti-inmonoglobulinas totales de conejo	1:5,000	Incubación: 1 h. Temp: ambiente Condiciones: Agitación constante.
					Lavados: 4 de 11 min.

Se realizó la detección de las proteínas mediante una reacción quimioluminiscente (kit Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products) tomando impresiones en placas fotográficas en exposiciones de 1 min y después cada 3 min por tres ocasiones más, obteniendo un total de 4 impresiones.

9.7. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR DENSITOMETRÍA.

Se obtuvieron las lecturas densitométricas de cada una de las imágenes de los ensayos de Western Blot con el programa Corestream MI. Se normalizaron los datos con respecto al control interno gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Posteriormente, se efectuaron las comparaciones estadísticas empleando la prueba de U de Mann-Whitney para comprobar la heterogeneidad de los datos utilizando el programa GraphPad Prism 4.

CAPÍTULO 10

RESULTADOS.

10.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE PROTEÍNA TOTAL.

Con el fin de obtener un extracto de proteínas totales de vena y arteria de cordón umbilical humano, se hicieron disecciones de dichos vasos a partir de diferentes cordones umbilicales de embarazos normales logrados a término con previo consentimiento informado de las participantes (servicio de Tococirugía del Hospital General Xoco de la Secretaría de Salud del Distrito Federal) de acuerdo a la metodología que se describe en el numeral 9.1. En las figuras 12, 13 y 14, se muestra el cordón umbilical humano y la ubicación de una vena y dos arterias (propias de la muestra) para su disección.

Las venas y arterias obtenidas fueron fragmentadas en secciones de tamaño similar, a las cuales posteriormente se les eliminó el endotelio por incubación con tripsina a 37°C durante 20 min. en baño maría para evitar la interferencia del mismo en los resultados experimentales.

DISECCIÓN DE LA VENA Y ARTERIA DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO



Figura 12. Muestra biológica. Fragmento de cordón umbilical humano de aproximadamente 15 cm.

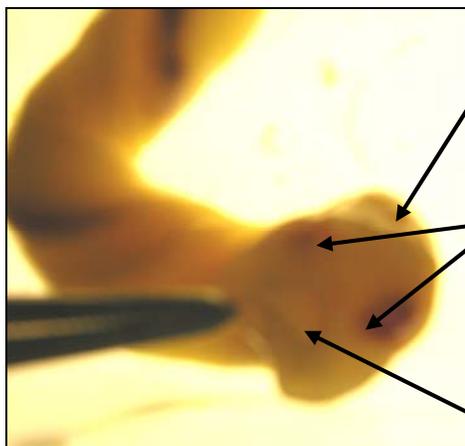


Figura 13. Cordón umbilical humano- vista frontal. Ubicación del tejido liso vascular para disección.

Gelatina de Wharton

Arterias

Vena

Arteria →

Arteria →



↑
Vena

Figura 14. Cordón umbilical humano. En la imagen se muestra la ubicación de la vena y las dos arterias.

Con la finalidad de obtener un concentrado de proteína total para cada uno de los tejidos (vena y arteria) se realizaron extracciones de la mezcla de varios fragmentos de dichos tejidos a través del método descrito en el numeral 9.3.

10.2. CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN SEMI-CUANTITATIVA DEL DAPC / UAPC.

Se determinó la integridad de las proteínas mediante el corrimiento electroforético de dichos extractos en geles de poliacrilamida a diferentes concentraciones cargando en cada pozo 20µg. En el panel A, figura 15, se muestra el patrón de proteínas obtenido en un gel al 8% teñido con azul de Coomassie. A partir de este resultado, se observaron nítidamente los patrones para las proteínas de bajo peso molecular (cav-1, α -actina, ϵ -sarcoglicano, β -dístroglicano, β -sarcoglicano y GAPDH), sin embargo, la separación entre proteínas de alto peso molecular no mostró claridad, condición necesaria para evaluar los caso particulares de las proteínas utrofina y distrofina, con lo cual se realizaron geles de gradiente (2.5% a 14%) como se muestra en el panel A , figura 16. Con la certeza de dicha integridad, se procedió a transferirlas en membranas de nitrocelulosa y PVDF por dos métodos diferentes (húmedo y semi-húmedo) para garantizar la mayor transferencia de las proteínas, así se muestra en los paneles B y C de las figuras 15 y 16.

PATRÓN DE PROTEÍNAS

GEL AL 8%

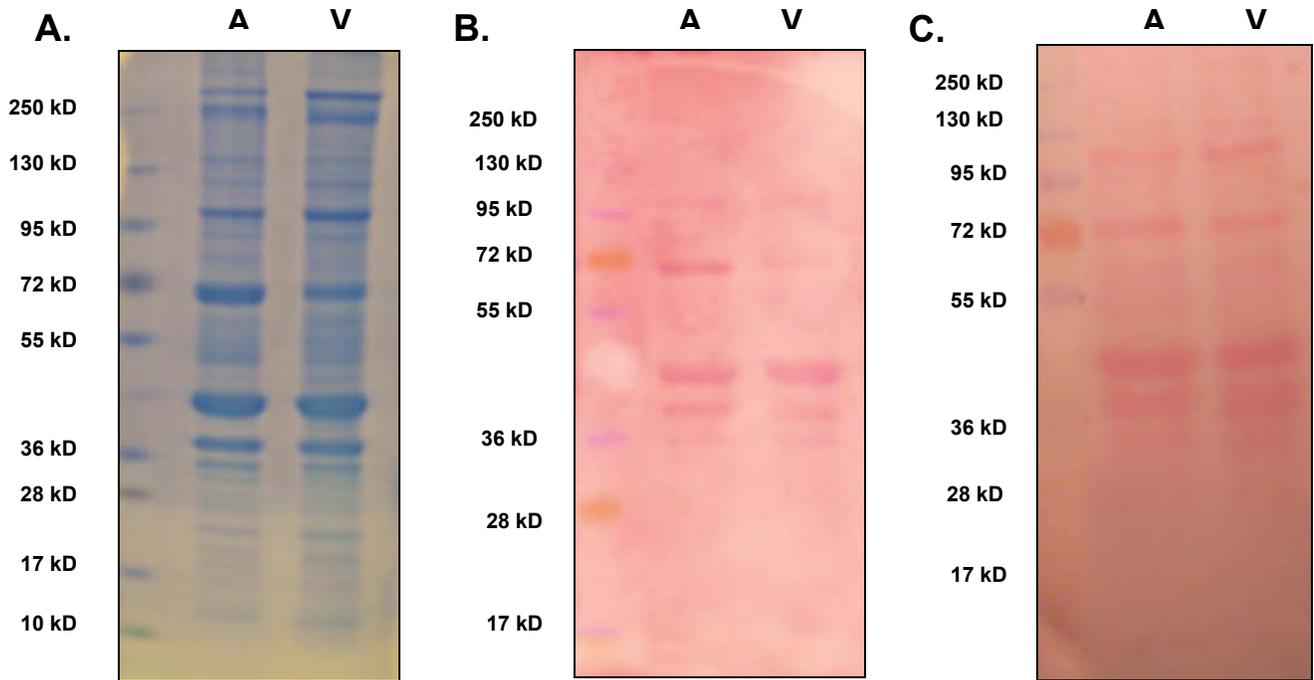


Figura 15. Patrón de proteínas en geles de poliacrilamida al 8%. A. Gel de poliacrilamida al 8% con tinción de Azul de Coomassie. B. Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa con tinción de Rojo de Ponceau. C. Transferencia de proteínas a membrana de PVDF con tinción de Rojo de Ponceau. En la imagen A= arteria y V= vena.

GEL DE GRADIENTE (2.5% A 14%)

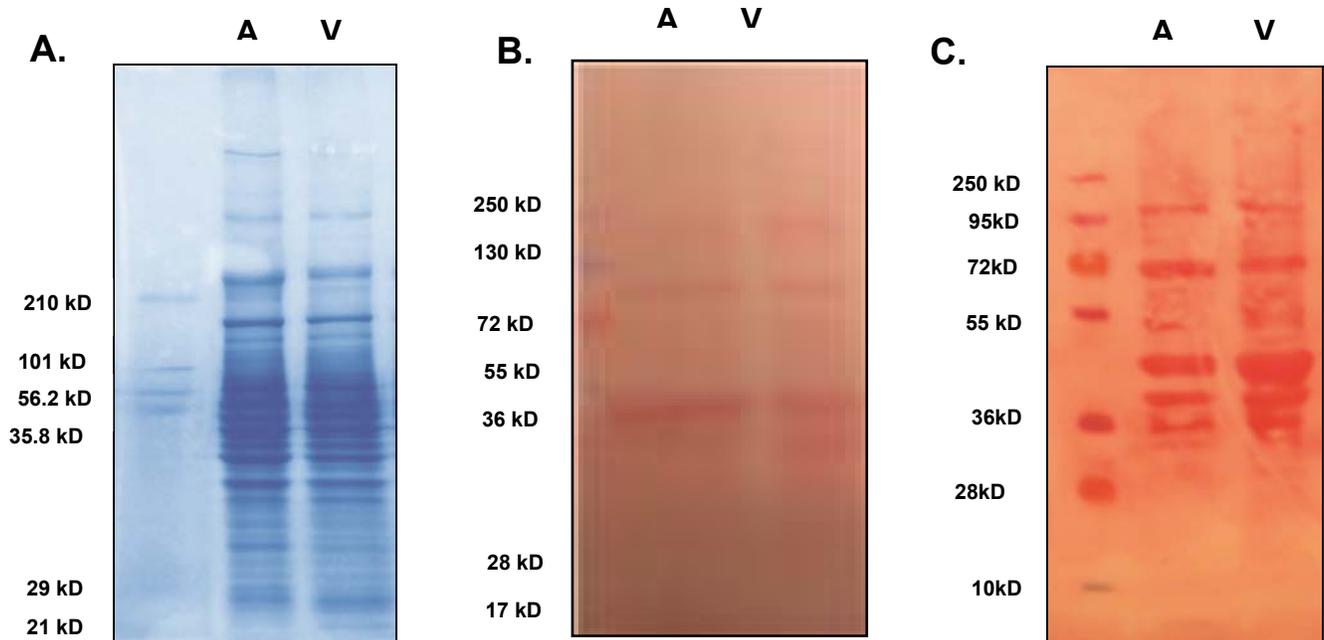


Figura 16. Patrón de proteínas en geles de gradiente de poliacrilamida A. Gel de poliacrilamida (gradiente de 2.5% a 12%) con tinción de Azul de Coomassie. B. Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa con tinción de Rojo de Ponceau. C. Transferencia de proteínas a membrana de PVDF con tinción de Rojo de Ponceau. En la imagen A= arteria y V= vena.

Posteriormente, se recortaron las membranas de PVDF y nitrocelulosa con las proteínas a la altura de las masas descritas por la literatura, entre las dos masas vecinas delimitadas por el marcador de masas, se marcaron cuidadosamente las membranas con las abreviaturas de v=vena y a=arteria con pluma. Las membranas fueron lavadas con solución de PBS o de PBS-alcohol para retirar el rojo de Ponceau.

Cabe mencionar que fue necesario realizar la estandarización del panel de anticuerpos para los ensayos de Western Blot. En la tabla 6 se muestra la estrategia utilizada para la obtención de la concentración óptima.

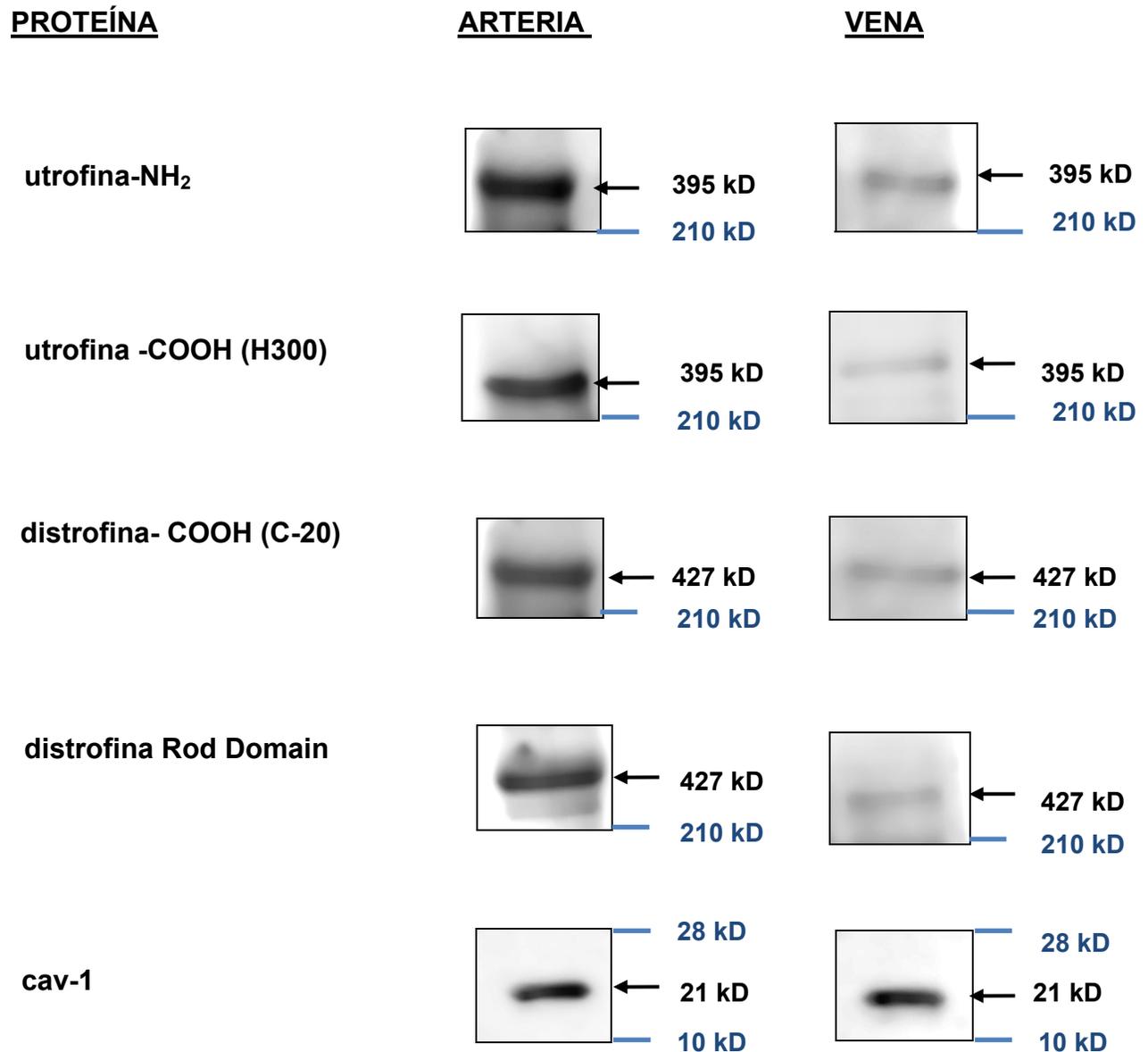
Además, la reacción quimioluminiscente se realizó tomando impresiones en placas fotográficas en exposiciones de 1 min y después cada 3 min por tres ocasiones más, obteniendo un total de 4 impresiones. La placa del tiempo de exposición elegido para la evaluación se eligió para cada caso de acuerdo tiempo donde se apreciaba mayor la reacción y así se realizó en cada una de las réplicas del ensayo.

Tabla 6. Ejemplo de una matriz de estandarización de anticuerpos para ensayo de Western Blot.

Anticuerpo primario	Dilución	Tiempo de incubación	Anticuerpo secundario	Dilución	Tiempo de incubación
ε –sarcoglicano (H-20)	1:100	1. 1 h / temperatura ambiente	Anti-inmunoglobulinas totales de cabra	1:10,000	1 h / temperatura ambiente
		A. 6 h / 4°C			
	1:1000	2.1 h / temperatura ambiente	Anti-inmunoglobulinas totales de cabra	1:5,000	
		B. 6 h / 4°C			
ε –sarcoglicano (H-67)	1:100	3.1 h / temperatura ambiente	Anti-inmunoglobulinas totales de conejo	1:10,000	
		C. 6 h / 4°C			
	1:1000	4. 1 h / temperatura ambiente	Anti-inmunoglobulinas totales de conejo	1:5,000	
		D 6 h / 4°C			
β-sarcoglicano (H-17)	1:100	5.1 h / temperatura ambiente	Anti-inmunoglobulinas totales de cabra	1:10,000	
		E. 6 h / 4°C			
	1:1000	6.1 h / temperatura ambiente	Anti-inmunoglobulinas totales de cabra	1:5,000	
		F. 6 h / 4°C			
Controles negativos	PBS-T	7. 1 h / temperatura ambiente	Anti-inmunoglobulinas totales de cabra	1: 5,000	
		G. 6 h / 4°C			
		8. 1 h / temperatura ambiente	Anti-inmunoglobulinas totales de conejo	1: 5,000	
		H. 6 h / 4°C			

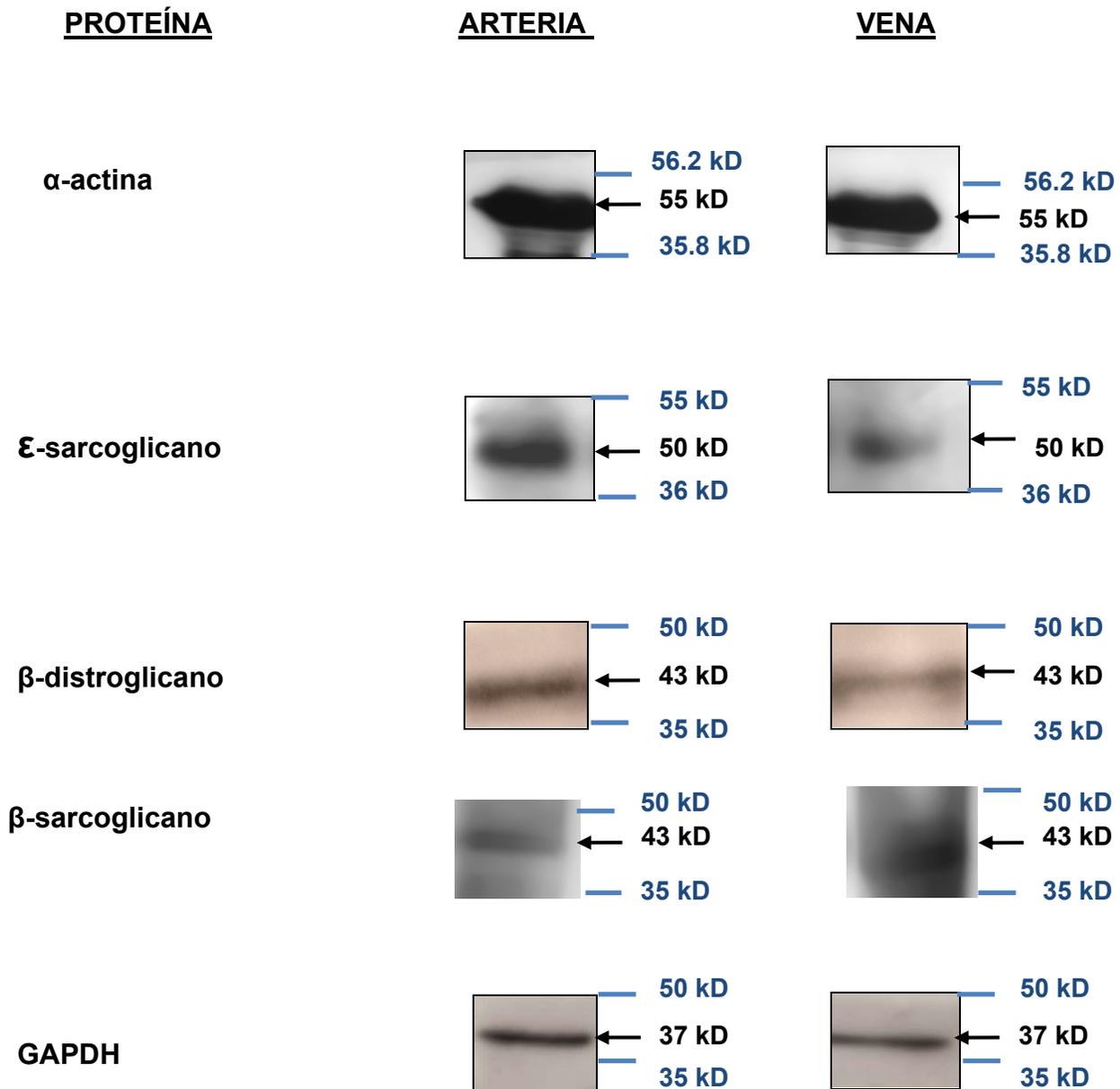
Una vez estandarizadas las concentraciones de anticuerpos, se realizaron ensayos de Western Blot para determinar la masa y medir la cantidad relativa de las proteínas que conforman el DAPC / UAPC; cuyos patrones de identificación se muestran en la figura 17 y 18. Los ensayos para la detección de cada una de las proteínas se realizaron de forma simultánea para vena y arteria utilizando las mismas condiciones de reacción para ambos casos. Al finalizar la incubación y los lavados del segundo anticuerpo, se utilizó para su detección una reacción de quimioluminiscencia.

En dichas figuras (17 y 18) se muestra una clara diferencia entre las cantidades de las proteínas utrofina y distrofina de vena y arteria, mientras que en las proteínas evaluadas que se asocian al complejo (ϵ -sarcoglicano, β -dístroglicano y β -sarcoglicano) no se visualiza una diferencia significativa. Siendo GAPDH y α -actina controles internos para el sistema propuesto dado a que son proteínas que se expresan en cantidades relativamente constantes. Por otra parte, la cav-1, proteína formadora de caveolas, se observa en ambos tejidos en cantidades semejantes.



 Marcador de peso molecular

Figura 17. Identificación de las proteínas utrofina, distrofina y caveolina-1 en músculo liso vascular de vena/arteria de cordón umbilical humano. Imagen representativa de los ensayos Western Blot hechos con extractos de proteínas totales en geles de poliácridamida [20 µg por pozo]. Se realizaron tres réplicas de los ensayos por proteína.



 Marcador de peso molecular

Figura 18. Identificación de las proteínas que componen el complejo de proteínas asociadas a distrofina / utrofina en el músculo liso vascular de vena / arteria de cordón umbilical humano. Imagen representativa de los ensayos Western Blot hechos con extractos de proteínas totales en geles de poliácridamida [20 μ g por pozo]. Se realizaron tres réplicas de los ensayos por proteína, excepto para el caso de β -dístroglicano y β -sarcoglicano, de los cuales se realizó solo una réplica.

10.3. LA UTROFINA Y LA DISTROFINA SE EXPRESAN EN MAYOR PROPORCIÓN EN LAS ARTERIAS QUE EN LA VENA DEL CORDÓN UMBILICAL HUMANO MIENTRAS QUE CAV-1 SE EXPRESA EN PROPORCIONES SEMEJANTES EN AMBOS TEJIDOS.

De acuerdo con los resultados obtenidos de las evaluaciones densitométricas y estadísticas para cada una de las proteínas estudiadas, se observó que la utrofina y la distrofina se encuentran significativamente en mayor cantidad en las arterias del cordón umbilical humano (Figura 19) que en la vena. Por otra parte, la Cav-1 no mostró una diferencia significativa en ambos tejidos (Figura 19).

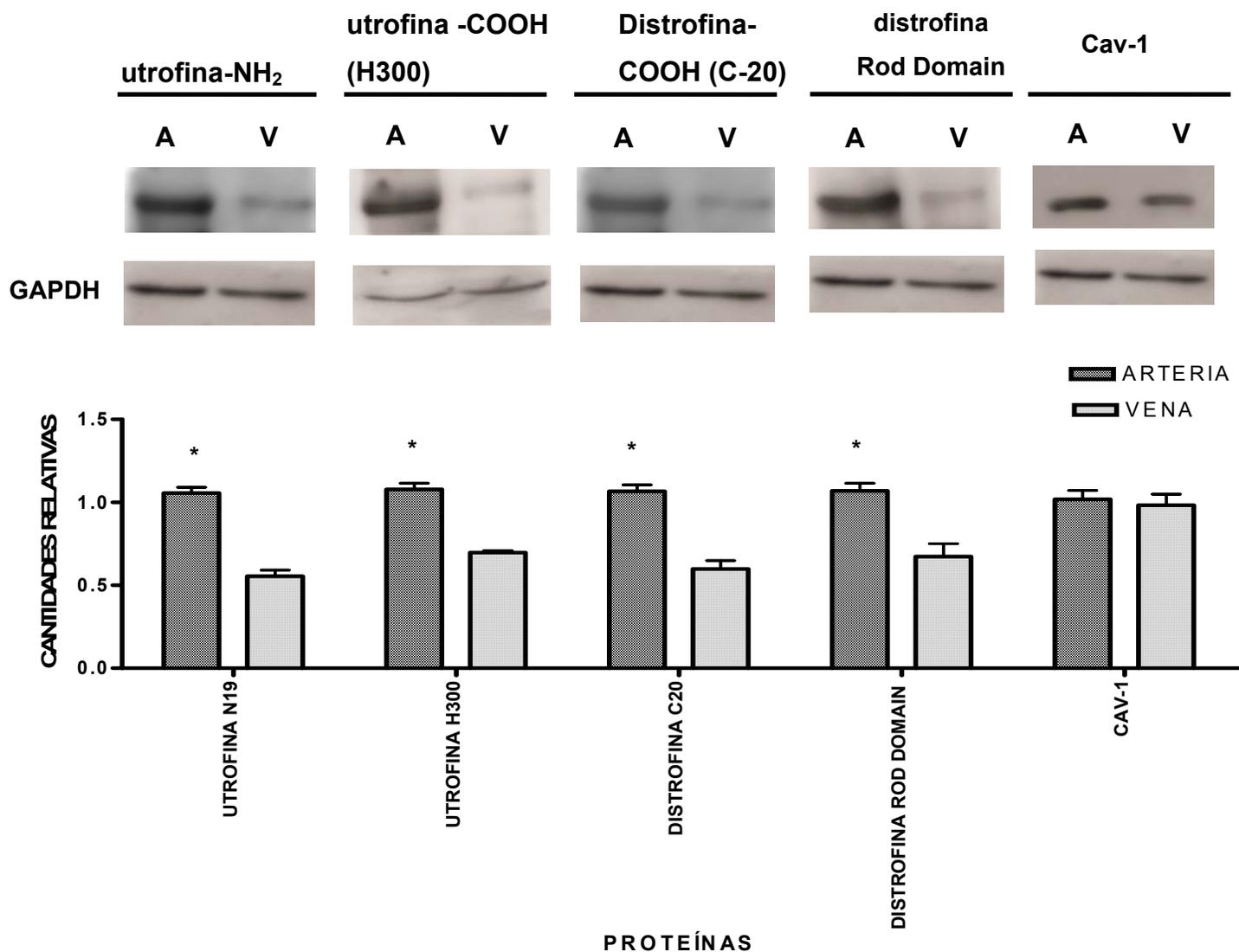


Figura 19. La utrofina y la distrofina se expresan en mayor proporción en las arterias que en la vena del cordón umbilical humano. Se analizaron las medias de tres réplicas de ensayos Western Blot evaluados por densitometría. En la gráfica se muestra que son mayores los niveles de las proteínas utrofina y distrofina en arteria (*). [* P<0.05 vs vena]. Para cav-1 no se encontraron diferencias significativas. En la imagen A= arteria y V= vena.

Tabla 7. Datos densitométricos. Cantidades relativas de proteína normalizadas con el control interno (GAPDH).

PROTEÍNA	ARTERIA píxeles			VENA píxeles		
	1	2	3	1	2	3
UTROFINA N19	1.1185	1.0517	0.9960	0.6009	0.4800	0.5823
UTROFINA H300*	1.1182	1.0052	1.1119	0.6734	0.7035	0.7153
DISTROFINA C20	1.0414	1.0160	1.1421	0.5612	0.5343	0.6990
DISTROFINA ROD DOMAIN *	1.1279	0.9775	1.1027	0.8098	0.5400	0.6696
CAV-1	1.1143	1.0121	0.9292	1.0203	1.0747	0.8537

10.4. LA α -ACTINA Y EL ϵ -SARCOGLICANO SE EXPRESAN EN CANTIDADES SEMEJANTES EN LA VENA Y EN LAS ARTERIAS DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO.

En las gráficas mostradas en la figura 20 se puede apreciar que poseen cantidades relativamente diferentes, siendo la expresión de α -actina ligeramente menor su cantidad en las arterias que en las vena y para ϵ -sarcoglicano es mayor es ligeramente mayor la cantidad de esta proteína en las arterias que en la vena del cordón umbilical humano. Sin embargo, de acuerdo con el análisis estadístico realizado, esta diferencia no resulta significativa.

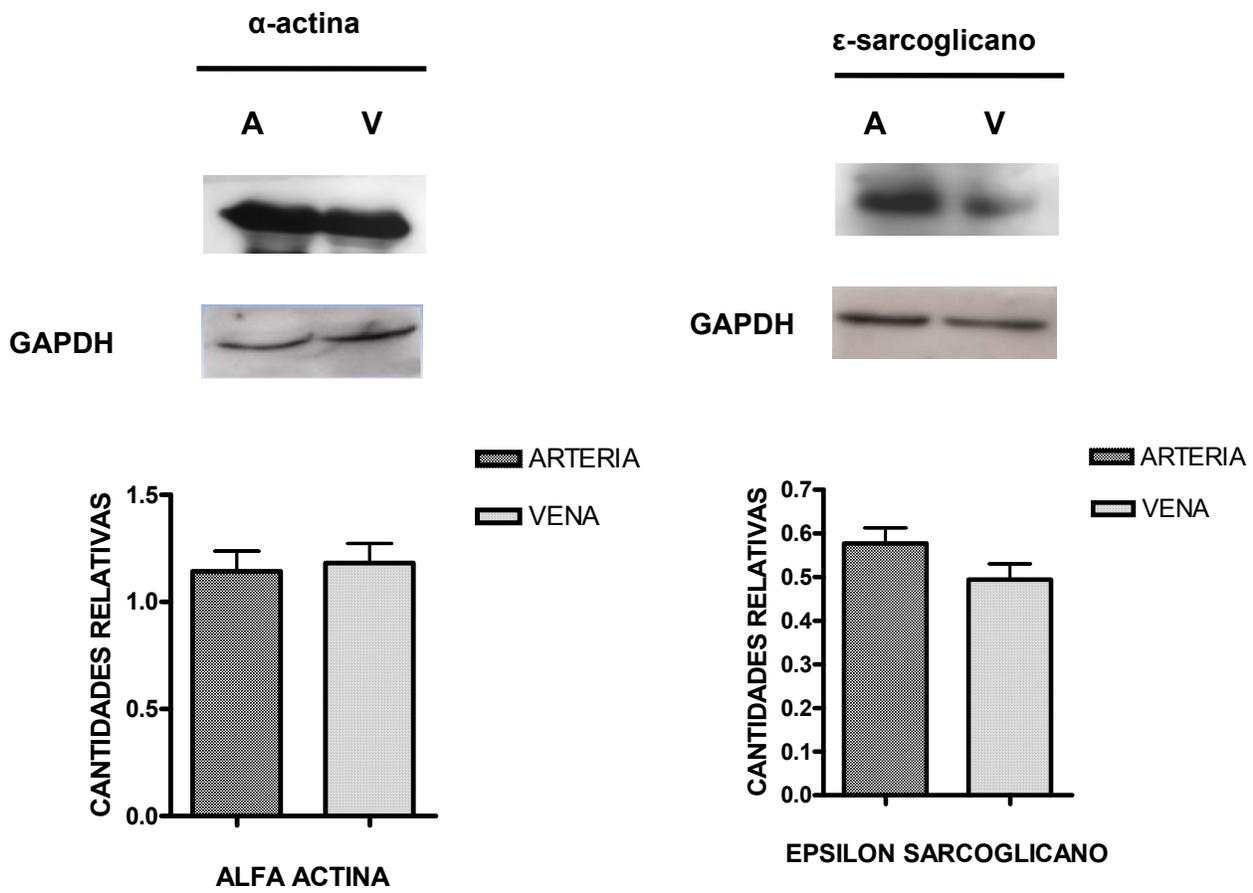


Figura 20. La α -actina y ϵ -sarcoglicano se expresan en cantidades semejantes en la vena y las arterias de cordón umbilical humano. Se evaluaron las medias de tres réplicas de ensayos Western Blot por densitometría. No se encontraron diferencias significativas. Las replicas para los ensayos Western Blot de β -dístroglicano no fueron realizados. En la imagen A= arteria y V= vena.

Tabla 8. Datos densitométricos. Cantidades relativas de proteína normalizadas con el control interno (GAPDH).

PROTEÍNA	ARTERIA píxeles			VENA píxeles		
	1	2	3	1	2	3
ALFA ACTINA	1.3278	1.0121	1.0906	1.3628	1.0747	1.108
EPSILON SARCOGLICANO	0.6198	0.6053	0.5057	0.5146	0.5447	0.4233

CAPÍTULO 11

DISCUSIÓN.

En un seguimiento científico sobre la proteína faltante en el músculo afectado con DMD, Campbell y colaboradores demostraron que la distrofina podría ser solubilizada a partir de homogenados obtenidos de membrana del músculo esquelético utilizando para dicho fin, un detergente (la digitonina)⁷¹. Posteriormente, al ser empleados ensayos de centrifugación con gradiente de sacarosa, y teñidos con azul de Coomassie, se demostró que existían nueve proteínas que co-sedimentaban con la distrofina⁷². Simultáneamente, Ozawa y colaboradores, demostraron, mediante ensayos de Blot Overlay (unión de proteínas recombinantes en nitrocelulosa), que el complejo de glicoproteínas asociado a la distrofina podría ser disociado en tres subcomplejos⁷³. Sin embargo, no fue hasta mucho tiempo después que estas proteínas fueron descritas en músculo liso vascular^{74,75,76}.

Hoy en día, diversos estudios han mostrado la importancia del DAPC/UAPC sobre la implicación clínica de las distrofias musculares asociada a alteraciones en los genes que codifican para la distrofina y los sarcoglicanos; así como la aparición consecuente de la cardiomiopatía dilatada, manifestación clínica que no solo se encuentra relacionada con deterioro sobre la funcionalidad del músculo estriado, sino también al daño sobre la fisiología de tipo vascular. Sobre este contexto, resulta importante definir la presencia y nivel de expresión de las proteínas (a través de su cuantificación) que conforman este complejo en músculo liso de vena y arteria, lo que arroja un mejor entendimiento sobre el papel que desempeñan estas proteínas sobre la membrana de las células de músculo liso. Un modelo asequible es la vena y arteria de cordón umbilical humano⁷⁰.

En el presente trabajo mostramos mediante ensayos de Western Blot (Figuras 17 y 18) y evaluaciones densitométricas (Tabla 7 y Figura 20), una clara diferencia en los niveles de la distrofina y la utrofina en músculo liso vascular. Asimismo, se analizaron las proteínas que se asocian a las mismas en músculo liso vascular (ϵ -sarcoglicano, β -sarcoglicano, β -dístroglicano y cav-1), de las cuales, únicamente se logró reproducir el ensayo con ϵ -sarcoglicano y cav-1 y de estas últimas no se observaron diferencias significativas (Figuras 18 y 20) en las evaluaciones densitométricas.

En la propuesta experimental fue llevar a cabo un análisis de las proteínas utrofina, distrofina y caveolina-1 mediante ensayos de Western Blot, seguidos de análisis densitométricos utilizando extractos de proteína total provenientes de pools de venas y arterias. En trabajos anteriores de nuestro grupo de trabajo (Coral y colaboradores) desarrollados a partir de cultivos primarios de vena y arteria, se había determinado un resultado similar en cuanto a que existe una diferencia significativa entre las cantidades de la utrofina y no así en el resto de las proteínas que se asocian, sin embargo, la diferencia no había sido cuantificada. Lo anterior nos impulsó a predecir que las determinaciones sobre una muestra enriquecida de vena o arteria de un pool de un universo de ocho cordones nos daría un resultado similar pero con una concentración mayor, característica necesaria para lograr cargar una cantidad suficiente en los geles para hacer evidente la diferencia que ya se había observado anteriormente.

Por otro lado, durante la estandarización de los ensayos de Western Blot sobre el extracto de proteína total, se utilizaron muestras de arteria y vena por separado, siendo estas proteínas extraídas mediante tres medios diferentes (TNE, SDS y RIPA); cuyas determinaciones arrojaron siempre el mismo resultado (una diferencia semi-cuantitativa-datos no mostrados) esto nos sugirió que la determinación del nivel de los diferentes miembros del UAPC en un pool de proteínas nos demostraría el mismo resultado.

Cabe señalar que el uso de un control interno (α -actina y GAPDH) en cada determinación electroforética, así como los resultados obtenidos en la estandarización del amortiguador (TNE, SDS y RIPA) nos permitió demostrar que en ambos casos, tanto en el pool de vena como de arteria, la cantidad cargada en el gel de SDS-PAGE era la misma. Aun y pesar de no evaluar por separado cada muestra, por la naturaleza y por el tipo de criterios que contempla nuestro protocolo de investigación, creemos que nuestros criterios de inclusión garantizan la homogeneidad de los tipos de muestra seleccionados. No obstante, las proteínas evaluadas dentro del presente trabajo, son proteínas que se expresan de forma constitutiva en músculo liso vascular de pacientes sanos^{7,10,18}

Así entonces, la diferencia encontrada en las cantidades de la distrofina y la utrofina puede explicar el papel funcional de ambas proteínas. Por una parte, la distrofina se encuentra involucrada de forma activa en proveer resistencia mecánica a la membrana del músculo, lo cual resulta esencial para las arterias y venas largas así como para las pequeñas arterias las cuales poseen propiedades contráctiles⁹. Lo anterior en el entendido de que estos sistemas vasculares son los encargados de transportar cantidades sustanciales de sangre a lo largo del organismo, de ahí su importancia en la circulación sanguínea. Sin embargo, se ha descrito una función inversa en las venas y las arterias del cordón umbilical humano. No obstante, en los resultados experimentales se muestra clara evidencia de mayor expresión de la distrofina en arterias que en las venas del cordón umbilical humano, esto pudiera apuntar hacia la diferencia en la intensidad de los flujos sanguíneos que atraviesan la luz de dichos vasos⁶⁸.

Por otro lado, se ha descrito que la utrofina juega un papel importante para el correcto ensamblaje de las proteínas de la membrana de las células musculares^{9,10,18,33}. La presencia de niveles altos de la utrofina en las arterias del cordón umbilical humano se puede explicar bajo el concepto de que la utrofina se sintetiza como precursor de la distrofina³³, además lo anterior puede estar relacionado con el papel estructural que juegan estas proteínas en dichos tejidos, ya que la fuerza de los flujos sanguíneos en ambos conductos es particular gracias a la exigencia de transporte para cada uno de los casos anteriormente citados, situación que genera diferente intensidad de estrés mecánico sobre las paredes de los vasos, lo cual pudiera estar generando la necesidad de mayor expresión de dichas proteínas de anclaje hacia el lumen de estos tejidos⁶⁸.

Por tanto, el rol mecánico de la distrofina se encuentra directamente relacionado con su capacidad de unión a actina^{3,6}, la cual puede verse favorecida por la unión de calcio y calmodulina¹¹, pero asimismo modulada por la fosforilación de la distrofina³³. Dicho mecanismo difiere del descrito para la utrofina, ya que la utrofina se une a la F-actina, unión que es disociada por la formación del complejo calcio-cadmodulina. Esta condición conlleva a la conexión ineficiente con la F-actina durante la contracción muscular^{9,18}.

Lo anterior se encuentra en concordancia con lo propuesto por Rivier y colaboradores, quienes encontraron resultados similares al evaluar un panel de anticuerpos contra la utrofina y distrofina de las venas y arterias extraídas del músculo esquelético de piernas de conejo ⁹.

Por otra parte, se demostró que en músculo liso vascular de la vena y arteria del cordón umbilical humano, se encuentran presentes, además de la distrofina, y la utrofina, las proteínas: α -actina, β -sarcoglicano, ϵ -sarcoglicano y β -dystroglicano; siendo esta segunda serie componentes del complejo de proteínas asociados a distrofina / utrofina ^{2,10,15,29,32,38}, así se puede observar en las figuras 19 y 20, cuyos niveles de expresión no arrojaron diferencias significativas en sus niveles de expresión. Lo anterior sugiere que estas proteínas se encuentran mayormente relacionadas con funciones de señalización que de resistencia mecánica ^{15,66}, ya que de participar en la resistencia mecánica del vaso, estas proteínas se verían en mayor cantidad debido a la funcionalidad estructural que confieren en el tejido para soportar la intensidad del flujo sanguíneo. No obstante, se han reportado algunas de las funciones de señalización en las que participan estas proteínas ¹⁵.

En relación a cav-1, esta proteína se encontró presente en ambos tejidos (Figura 19), sin embargo, para comprender su asociación con el complejo, se requerirá de realizar un estudio a mayor profundidad con ensayos de inmunoprecipitación para correlacionar la interacción de esta proteína con el DAPC/ UAPC, no obstante, diferentes grupos de investigación ya han propuesto una correlación de cav-1 referida a implicaciones en mecanismos de señalización ^{48,55,56}. Asimismo, se encontró a cav-1 con niveles semejantes en ambos tejidos, lo cual puede explicar la posible generación de complejos con ambas proteínas pero que pudiera ofrecer diferente funcionalidad, dada la diferencia encontrada entre los niveles de la distrofina y la utrofina de ambos tejidos.

En resumen, estos resultados sugieren que existe una diferencia significativa en los niveles de ciertas proteínas, lo cual podría estar relacionado a las distintas funciones de la vena y la arteria en el cordón umbilical: la vena transporta sangre oxigenada y la arteria sangre desoxigenada, es una circulación invertida con respecto al resto de los vasos del organismo (excepto en los pulmones). Estos estudios ponen de manifiesto diferencias en niveles de

proteínas, posiblemente asociadas a funciones específicas; no obstante sería importante en experimentos futuros analizar las proteínas que tuvieron estas diferencias cuantitativas en vasos individuales. En este sentido, nuestro grupo de trabajo esta analizando estas proteínas, no solamente en el contexto de la membrana, sino que se están realizando separaciones de dominios membranales, como son balsas lipídicas y no lipídicas, con el fin de analizar más en detalle las proteínas presentes en estas regiones, estudio que nos dará mas información sobre la formación de complejos de proteínas asociadas a la distrofina o la utrofina.

CAPÍTULO 12

CONCLUSIONES.

- En el presente trabajo fue posible encontrar una diferencia cuantitativa entre los niveles de las proteínas utrofina y distrofina provenientes de tejido vascular liso (vena y arteria de cordón umbilical humano), diferencia que pudiera estar asociada con la función estructural de estas proteínas.
- Los resultados encontrados en la vena y arteria de cordón umbilical humano coinciden con los resultados reportados en modelos animales.
- Se encontró la presencia de las proteínas β -sarcoglicano, ϵ -sarcoglicano y β -dystroglicano, componentes del complejo de proteínas asociados a distrofina/ utrofina, cuyos niveles no fueron diferentes ente los extractos proteínicos de la vena y arteria de cordón umbilical.
- Para el caso de cav-1, no se encontraron diferencias significativas en sus niveles. así como en las proteínas asociadas al complejo distrofina/utrofina en músculo liso vascular de vena y arteria de cordón umbilical humano.

CAPÍTULO 13

REFERENCIAS.

1. Estrada FJ, Monet D, Rosas-Vargas H, Angulo A, Hernandez M, Becker V, Rendon A, Ramons-Kuri M, Coral –Vazquez RM (2006) A novel isoform of delta-sarcoglycan is localized at the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 340(3):865-71.
2. Crawford GE, Faulkner JA, Crosbie RH, Campbell KP, Froehner SC, Chamberlain JS (2000) Assembly of the dystrophin-associated protein complex does not require the dystrophin COOH-terminal domain. *J Cell Biol*, 150(6):1399-410.
3. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE (2002) Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev*, 82(2):291-329.
4. Kurana TS, Davies KE (2003) Pharmacological strategies for muscular dystrophy, *Nat Rev Drug Discov*, (2):379-390.
5. Perkins KJ, Davies KE (2002) The role of utrophin in the potential therapy of duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, Suppl 1:S78-89.
6. Culligan K, Glover L, Dowling P, Ohlendieck K (2001) Brain dystrophin-glycoprotein complex: persistent expression of beta-dystroglycan, impaired oligomerization of Dp71 and up-regulation of utrophins in animal models of muscular dystrophy. *BMC Cell Biology*, 2:2.
7. Coral-Vazquez R, Cohn RD, Moore SA , Hill JA, Weiss RM, Davisson RL, Straub V, Barresi R, Bansal D, Hrstka R F, Williamson R, Campbell KP (1999) Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell*, 98(4):465-74.

8. McNally ME, MacLeod H (2005) Therapy insight: cardiovascular complications associated with muscular dystrophies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, Jun; 2(6):301-8.
9. Rivier F, Robert A., Hugon G., Mornet D (1997) Different utrophin and dystrophin properties related to their vascular smooth muscle distributions. *FEBS Lett*, 408(1):94-8.
10. Ramirez-Sanchez I, Ceballos-Reyes G, Rosas-Vargas H, Cerecedo-Mercado D, Zentella-Dehesa A, Salamanca F, Coral-Vazquez RM (2007) Expression and function of utrophin associated protein complex in stretched endothelial cells: dissociation and activation of eNOS. *Front Biosci*,12:1956-62.
11. Sancar F, Touroutine D, Gao S, Oh HJ, Gendrel M, Bessereau JL, Kim H, Zhen M, Richmond JE (2011) The dystrophin-associated protein complex maintains muscle excitability by regulating Ca(2+)-dependent K(+) (BK) channel localization. *J Biol Chem*, 286(38):33501-10.
12. Medioni D, Pons F., Léger J, Anoal M, Mornet D, Viala JL, J. Léger J (1991) Dystrophin and dystrophin homologue in the uterus: diversity of dystrophin Isoforms in smooth muscles. *BAM 1 (2): 145-152.*
13. Tennyson C, Klamut HJ, Worton RG (1995) The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced, (2):184-90.
14. Nakamura A, Takeda S (2011) Mammalian models of duchenne muscular dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. *J Biomed Biotechnol*, 2011:184393.
15. Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM (2004) The dystrophin glycoprotein complex signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res Rev*, (8):1023-31.
16. Bustos I, Castañeda C, Rendón E, Reyes H, Romero I, (2008) Distrofinas y visión: aspectos normales y patológicos, *Mensaje Bioquímico*, Vol XXXIII, Depto de Bioquímica, Fac. de Medicina, UNAM.

17. Burton EA, Davies KE, (2002) Muscular dystrophy-reason for optimism?, *Cell*, 108(1):5-8.
18. Perronnet C, Vaillend C (2010) Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. *J Biomed Biotechnol*, 2010:849426.
19. McNally EM, MacLeod H. (2005) The insight: cardiovascular complications associated with muscular dystrophies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, (6):301-8.
20. Sciandra F, Bozzi M, Bianchi M, Pavoni E, Giardina B, Brancaccio A (2003) Dystroglycan and muscular dystrophies related to the dystrophin-glycoprotein complex. *Ann Ist Super Sanita*, 39(2):173-81.
21. Bowe MA, Mendis DB, Fallon JR (2000) The small leucine-rich repeat proteoglycan biglycan binds to α -dystroglycan and is upregulated in dystrophic muscle. *J Cell Biol*, 148(4):801-10.
22. Smythe GM, Eby JC, Disatnik MH, Rando TA (2003) A Caveolin-3 mutant that causes limb girdle muscular dystrophy type 1C disrupts Src localization and activity and induces apoptosis in skeletal myotubes. *J Cell Sci*, 116(Pt 23):4739-49.
23. Ichida F, Tsubata S, Bowles K, Haneda N, Uese K, Miyawaki T, Dreyer WJ, Messina J, Li H, Bowles NE, Towbin JA (2001) Novel gene mutations in patients with left ventricular noncompaction or Barth syndrome. *Circulation*, 103: pp. 1,256–1,263.
24. Macioce P, Gambarà G, Bernassola M, Gaddini L, Torrieri P, Macchia G, Ramoni C, Ceccarini M, Petrucci TC (2003) beta-dystrobrevin interacts directly with kinesin heavy chain in brain. *J Cell Sci*, 116(Pt 23):4847-56.
25. Artegiani B, Labbaye C, Sferra A, Quaranta MT, Torrieri P, Macchia G, Ceccarini M, Petrucci TC, Macioce P (2010) The interaction with HMG20a/b proteins suggests a potential role for beta-dystrobrevin in neuronal differentiation, *J Biol Chem*, 285(32):24740-50.

26. Cohn RD, Campbell KP (2000) Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle & Nerv*, (10): 1456–1471.
27. Dalkilic I, Kunkel LM (2003) Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Curr Opin Genet Dev*, 13(3):231-8.
28. Peters MF, Adams ME, Froehner SC (1997) Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J Cell Biol*, 138(1): 81–93.
29. Barresi R, Moore SA, Stolle CA, Mendell JR, Campbell KP (2000) Expression of g-sarcoglycan in smooth muscle and its interaction with the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J Biol Chem*, 275(49):38554-60.
30. Grady RM, Zhou H, Cunningham JM, Henry MD, Campbell KP, Sanes JR (2000) Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin-glycoprotein complex. *Neuron*, (2):279-93.
31. Galbiati F, Razani B, Lisanti MP (2001) Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell*, 106(4):403-11.
32. Halayko AJ, Stelmack GL (2005) The association of caveolae, actin, and the dystrophin-glycoprotein complex: a role in smooth muscle phenotype and function?, *Can J Physiol Pharmacol*, 83(10):877-91.
33. Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE (1996) Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol*, 6(1):37-47.
34. Pozzoli U, Sironi M, Cagliani R, Comi GP, Bardoni A, Bresolin N (2002) Comparative analysis of the human dystrophin and utrophin gene structures. *Genetics*.160(2):793-8.

35. Takahashi J, Itoh Y, Fujimori K, Imamura M, Wakayama Y, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S (2005) The utrophin promoter A drives high expression of the transgenic LacZ gene in liver, testis, colon, submandibular gland, and small intestine. *J Gene Med*, (2):237-48.
36. Winder SJ, Gibson TJ, Kendrick-Jones J (1995) Dystrophin and utrophin: the missing links!, *FEBS Lett*, 369(1):27-33.
37. Haenggi T, Fritschy J-M (2006) Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cell Mol Life Sci*, 63(14):1614–1631.
38. Bewick GS, Nicholson LV, Young C, O'Donnell E, Slater CR (1992) Different distributions of dystrophin and related proteins at nerve muscle junctions. *Neuroreport*, 3(10):857-60.
39. Law DJ, Allen DL, Tidball, JG (1994) Talin, vinculin and DRP (utrophin) concentrations are increased at the mdx myotendin. *J Cell Sci*, 107 (Pt 6):1477-83.
40. Ervasti JM, Kahl SD, Campbell KP (1991) Purification of dystrophin from skeletal muscle. *J Biol Chem*, 266(14):9161-5.
41. Matsumura K, Campbell KP (1994) Dystrophin–glycoprotein complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies, *Muscle Nerve*, (1):2-15.
42. Sadoulet-Puccio HM, Rajala M, Kunkel LM (1997) Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(23):12413-8.
43. Campanelli JT, Roberds SL, Campbell KP, Scheller RH (1994) A role for dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in agrin-induced AChR clustering. *Cell*, 77(5):663-74.
44. Zuellig RA, Bornhauser BC, Knuesel I, Heller F, Fritschy JM, Schaub MC (2000) Identification and characterisation of transcript and protein of a new short N-terminal utrophin isoform. *J Cell Biochem*, 77(3):418-31.

45. Lumeng CN, Phelps SF, Rafael JA, Cox GA, Hutchinson TL, Begy CR, Adkins E, Wiltshire R, Chamberlain JS (1999) Characterization of dystrophin and utrophin diversity in the mouse, *Hum Mol Genet*, (4):593-9.
46. Jimenez-Mallebrera C, Davies K, Putt W, Edwards YH (2003) A study of short utrophin isoforms in mice deficient for full-length utrophin. *Mamm Genome*, (1):47-60.
47. Tang Y, Zeng X, He F, Liao Y, Qian N, Toi M (2011) Caveolin-1 is related to invasion, survival, and poor prognosis in hepatocellular cancer. *Med Oncol*.
48. Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP (1999) Caveolins, liquid ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol*, (11):7289-304.
49. Davidson B, Goldberg I, Givant-Horwitz V, Nesland JM, Berner A, Bryne M, Risberg B, Kopolovic J, Kristensen GB, Tropé CG, van de Putte G, Reich R (2002) Caveolin-1 Expression in Ovarian Carcinoma Is MDR1 Independent. *Am J Clin Pathol*, 117(2):225-34.
50. Hurlstone AF, Reid G, Reeves JR, Fraser J, Strathdee G, Rahilly M, Parkinson EK, Black DM (1999) Analysis of the CAVEOLIN-1 gene at human chromosome 7q31.1 in primary tumours and tumour-derived cell lines. *Oncogene*, 18(10):1881-90.
51. Engelman JA, Zhang X, Galbiati F, Volonte D, Sotgia F, Pestell RG, Minetti C, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP (1998) Molecular genetics of the caveolin gene family: implications for human cancers, diabetes, Alzheimer disease, and muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*, 63(6):1578-87.
52. Schlegel A, Lisanti MP (2000) A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo. *J Biol Chem*, 275(28):21605-17.

53. Couet J, Sargiacomo M, Lisanti MP (1997) Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem*, 272(48):30429-38.
54. Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP (1997) Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem*, 272(10):6525-33.
55. Halayko AJ, Tran T, Gosens R (2008) Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle: role of caveolae and caveolins. *Proc Am Thorac Soc*, 5(1):80-8.
56. Liu P, Rudick M, Anderson R (2002) Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem*, 277, 41295-41298.
57. Schutzer WE, Reed JF, Mader SL (2005) Decline in caveolin-1 expression and scaffolding of G protein receptor kinase-2 with age in Fischer 344 aortic vascular smooth muscle. *AJP – Heart*, 288 (5): H2457-H2464.
58. Barresi v, Cerasoli S, Paioli G, Vitarelli E, Giuffrè G, Guiducci G, Tuccari G, Barresi G (2006) Caveolin-1 in meningiomas: expression and clinico-pathological correlations. *Acta Neuropathol*, 112 (5), 617-626.
59. Williams TM, Lisanti MP (2004) The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann Med*, 36(8):584-95.
60. Hardin CD, Vallejo J (2006) Caveolins in vascular smooth muscle: form organizing function. *Cardiovasc Res*, 69(4):808-15.
61. Gratton JP, Bernatchez P, Sessa WC (2004) Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *Circ Res*, 94(11):1408-17.

62. Prochniewicz E, Henderson D, Ervasti JM, Thomas DD (2009) Dystrophin and utrophin have distinct effects on the structural dynamics of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(19):7822-7.
63. Spehrs-Ciaffi V, Pierre-Yves J, Sekarski N (2008) Cardiovascular surveillance on duchenne and becker muscular dystrophy and female carriers, *Curr Pediatr Rev*, 4 (3), 159-163(5).
64. Nowak KJ, Davies KE (2004) Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep*, (9): 872–876.
65. Bonilla E, Fischbeck K, Schotland DL (1981) Freeze fracture studies of muscle caveolae in human muscular dystrophy. *Am J Pathol*, 104(2): 167–173.
66. Chamberlain SJ (2010) Duchenne muscular dystrophy models show their age. *Cell*, 143(7): 1040-1042, 23.
67. Kimura A (2010) Molecular basis of hereditary cardiomyopathy: abnormalities in calcium sensitivity, stretch response, stress response and beyond. *J Hum Genet*, 55(2):81-90.
68. Cohn RD, Henry MD, Michele DE, Barresi R, Saito F, Moore SA, Flanagan JD, Skwarchuk MW, Robbins ME, Mendell JR, Williamson RA, Campbell KP (2002) Disruption of *Dag1* in differentiated skeletal muscle reveals a role for dystroglycan in muscle regeneration, *Cell*, 110(5):639-48.
69. Lehoux S, Tedgui A (2003) Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *J Biomech*, 36(5):631-43.
70. Moiseeva EP (2001) Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res*, 52(3):372-86.

71. Durbeej M, Campbell KP (2002) Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev*, (3):349-61.
72. Campbell KP, Steven DK (1989) Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*, 338,259-262.
73. Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD. et al. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature*. 1990;345:315–319.
74. Yoshida M, Suzuki A, Yamamoto H (1994) Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl β -D-glucoside. *Eur J Biochem*, 222:1055–1061.
75. Durbeej, M, Henry, MD, Ferletta, M, Campbell, KP, Ekblom, P (1998) Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem*, 46, 449–457.
76. Byers, TJ, Kunkel, LM, Watkins, SC (1991) The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. *J Cell Biol*, 115, 411–421.

CAPÍTULO 14

ANEXO.

Amortiguador de corrida 10x, pH 8.3 (para 1 L)

30.3 g.....Tris base
144.0 g.....Glicina
10.0 g.....SDS

Disolver y llevar a un volumen total de 1,000mL con agua destilada. No ajustar el pH con ácido o base. Almacenar a temperatura ambiente.

Amortiguador de transferencia 10x (para 1 L)

30.3 g.....Tris base
144.0 g.....Glicina

Disolver y llevar a un volumen total de 1,000mL con agua destilada. No ajustar el pH con ácido o base. Almacenar a temperatura ambiente.

Amortiguador de muestra 6x (Amortiguador reductor SDS)

2.0 mL.....glicerol
3 mL.....β-mercaptoetanol
1.2 g.....10% (p/v) SDS
1.2 mg.....0.5% (p/v) azul de bromofenol
10 mL.....Volumen total

Llevar a 10mL con 0.5M Tris-HCl pH 6.8. Almacenar a temperatura ambiente.

Tris-HCl 1.5M, pH 8.8

27.23 g.....Tris base
80 mL..... H₂O_{dest} (18.15 g / 100 mL)

Ajustar el pH 8.8. con HCl 6 N. Llevar a un volumen total de 150 mL con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

Tris-HCl 0.5M, pH 6.8

6 g.....Tris base
60 mL..... H₂O_{dest}

Ajustar el pH 6.8 con HCl 6N. Llevar a un volumen total de 150mL con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

Bisacrilamida (30% T, 2.67% C)

87.6 g.....Acrilamida (29.2g/100mL)
2.4 g.....N`N`-bis-metilen-acrilamida (0.8g/100mL)

Llevar a un volumen de 300mL con agua destilada. Filtrar la solución almacenar la solución en frasco ambar.

SDS 10% (p/v)

10 g.....SDS
100 mL.....H₂O_{dest}

Disolver 10g de SDS en 90mL de agua con agitación constante y llevar a 100mL con H₂O_{dest}

FORMULACIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA

Formulación del gel concentrador

Gel al 3% (para 5mL)

3.2 mL.....H₂O_{dest}
0.5 mL.....Bisacrilamida
1.25 mL.....0.5MTris-HCl, pH 6.8
0.05 mL.....SDS10% (p/v)
25µL.....APS 10%
5 µL.....TEMED

Mezclar H₂O_{dest}, bisacrilamida, 0.5MTris-HCl, pH 6.8 y el SDS10% (p/v). Previamente a la colocación de la solución en los vidrios, mezclar el APS 10% y TEMED en la solución.

Formulación del gel de gradiente

Gel al 2.5% (para 5mL)

3.275mL..... H₂O_{dest}
0.425mL..... Bisacrilamida
1.25mL.....0.5MTris-HCl, pH 6.8
0.05mL.....SDS10% (p/v)
25µL.....APS 10%
5 µL.....TEMED

Gel al 14% (para 5mL)

1.35 mL..... H₂O_{dest}
2.35 mL..... Bisacrilamida
1.25 mL.....0.5MTris-HCl, pH 6.8
0.05 mL.....SDS10% (p/v)
25 µL.....APS 10%
5 µL.....TEMED

Mezclar los dos geles con ayuda de un mezclador de gradiente. Las cantidades anteriormente descritas se utilizaron para la formación del gel en vidrios de 0.75mm.

Formulación del gel al 8%

(para 5 mL)

2.3 mL..... H₂O_{dest}
1.35 mL..... Bisacrilamida
1.25 mL.....0.5MTris-HCl, pH 6.8
0.05 mL.....SDS10% (p/v)
25 µL.....APS 10%
5 µL.....TEMED

Las cantidades anteriormente descritas se utilizaron para la formación de geles en vidrios de 0.75 mm.

TNE 1x

NaCl0.2072 g (140 mM)
Tris-base.....0.06 g (20 mM)
EDTA.....14.165 g(2 mM)
Tritón.....0.05% (0.0125 mL)

Rojo de Ponceau

2.5 g.....Reactivo Rojo de Ponceau
5 mL.....Ácido acético glacial

Disolver con 200 mL de H₂O_{dest}, con agitación constante. Llevar la solución a 500 mL con H₂O_{dest}.

PBS 10x

80 g.....NaCl		80 g.....NaCl
2 g.....KCl		2 g.....KCl
15 g.....Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	o bien	11.5 g.....Na ₂ HPO ₄
2 g.....KH ₂ PO ₄		2 g.....KH ₂ PO ₄

Disolver con 500 mL de H₂O_{dest}, con agitación constante. Llevar a 1000 mL con H₂O_{dest}