

140

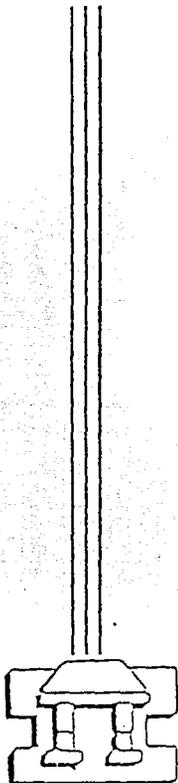
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEJO SARCOGLICANO- SARCOSPAN EN VENA Y ARTERIA DE CORDÓN UMBILICAL”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

P R E S E N T A :
RAMÍREZ SÁNCHEZ ISRAEL
DIRECTORA DE TESIS:
DRA. HAYDEÉ ROSAS VARGAS



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, MÉXICO

MÉXICO 2001

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

" Quien dice 'instante' dice 'instante' fatal: el instante es el envolvimiento recíproco y contradictorio del antes por el después; se es todavía lo que se va a dejar de ser y ya se es lo que se va a ser; se vive su muerte, se muere su vida; se siente uno mismo y otro, lo eterno está presente en un átomo de duración; en el seno de la vida más plena se presiente que no se hará más que sobrevivir, se teme al porvenir".

Jean Paul Sartre.

" Las cosas siendo ellas mismas, no son libres: simplemente son, su ser les es dado fatalmente. El hombre, por el contrario, no es: existe, es decir, consiste en ir siendo, en ir fabricando su propia vida que le es dada sin más, en ir cumpliendo un proyecto de vida, un algo todavía no hecho, una faena por hacer. Somos la suma de nuestros actos, por lo mismo somos la libertad..."

Jean Paul Sartre.

" Todas las relaciones fijas, estancadas, con su antigua y venerable sucesión de prejuicios y opiniones, se desechan, y todas las recién formadas pierden actualidad antes de cosificarse. Todo lo que es sólido se evapora en el aire todo lo que es sagrado se profana, y los hombres, al final, tienen que enfrentarse a las condiciones reales de sus vidas y sus relaciones con los semejantes".

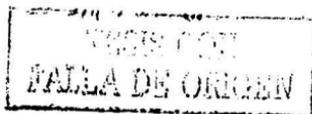
Karl Marx.

*" Llévame en tu vida que la mía recuerda
Cárgame en tu historia que la mía respira*

Amigo: Bebe mi tiempo

Que lo haré mientras viva."

Paul Demián Delgado.



" Y hablando de los griegos, entre los que tú te cuentas, dijo Sócrates, ¿cuáles te parece que llevan una vida más agradable, los que mandan o los que obedecen?.

-Pero yo no me cuento tampoco entre los esclavos, dijo Aristipo, pues me parece que hay un camino intermedio por el que trato de marchar. Este camino no pasa por el poder ni por la esclavitud, sino por la LIBERTAD que es la gran ruta de la felicidad.

-Si este camino no pasa ni por el poder ni por la esclavitud, respondió Sócrates, no pasara tampoco por la sociedad de los hombres, podría tener sentido lo que tu dices. Pero si, viviendo entre los hombres, no quieres mandar, ni obedecer, ni servir de buen grado a los que mandan, creo que no ignoras de qué modo los más fuertes se las arreglan para hacer sufrir a los más débiles y convertirlos en esclavos. ¿O es que no ves como recogen las cosechas que otros han sembrado... y cómo asedian de todas suertes a los que se niegan a servirlos, hasta que los llevan a preferir la esclavitud a una lucha con los que son más fuertes que ellos...

-Sí, contestó: pero para evitar esos males, yo no me encierro siquiera en una ciudad, y soy extranjero en todas partes.

-He ahí, exclamó Sócrates, un artificio hábil."

JONOFONTE, Memorables (II,1)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

RESUMEN.....	4
I. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1- LOS SARCOGLICANOS EN EL COMPLEJO DE GLICOPROTEINAS ASOCIADAS A LA DISTROFINA.....	5
1.2- REGULACIÓN DE LA EXPRESION DE LOS SARCOGLICANOS.....	8
1.3.-LAS SARCOGLICANOPATIAS DENTRO DEL GRUPO DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURA.....	10
1.4.- MORFOFISIOLOGIA DEL CORDÓN UMBILICAL.....	12
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
III. OBJETIVOS.....	15
3.1.- OBJETIVO GENERAL.....	15
3.2.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	16
V. MATERIALES Y METODOS.....	17
5.1.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CORDÓN UMBILICAL.....	17
5.2.- DISECCIÓN DE LA VENA Y LAS ARTERIAS UMBILICALES.....	17
5.3.- EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE VENA Y ARTERIA UMBILICALES.....	17
5.4.- DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN, PUREZA E INTEGRIDAD DEL RNA.....	18
5.5.-ENSAYOS DE RT-PCR SEMI-CUANTITATIVO.....	19

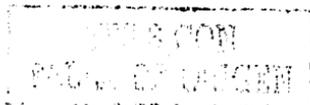


5.5.1.-SÍNTESIS DE cDNA.....	20
5.5.2.-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	21
5.6.-CINÉTICAS DE COAMPLIFICACION.....	23
5.7.-INMUNOFLUORESCENCIA.....	24
VI. RESULTADOS.....	26
6.1.- EXPRESIÓN DEL COMPLEJO SG-SPN EN CRIOSECCIONES DE VENA Y ARTERIA DE CORDÓN UMBILICAL.....	26
6.2.- EXPRESIÓN DE LOS TRANSCRITOS CODIFICANTES DEL COMPLEJO SG-SPN.....	26
6.3.- CINÉTICAS DE COAMPLIFICACION POR RT-PCR DEL COMPLEJO SG- SPN Y GAPDH.....	30
6.4.- ANÁLISIS SEMI-CUANTITATIVO DE LA EXPRESIÓN DEL COMPLEJO SG- SPN.....	32
VII. DISCUSIÓN.....	43
VIII. CONCLUSIONES.....	46
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	47

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

El complejo sarcoglicano-sarcospán (SG-SPN) se encuentra compuesto por un grupo de proteínas transmembranales denominadas sarcoglicanos α , β , γ , δ , ϵ y sarcospán. La expresión de los SGs α y γ se encuentra restringida a músculo estriado, mientras que los SGs β , δ y ϵ , además de expresarse en músculo cardíaco y esquelético, también se encuentran presentes en músculo liso y en otros tejidos no musculares. Las mutaciones en los genes de los sarcoglicanos γ , α , β y δ , causan las distrofias musculares de cintura autosómico-recesivas del tipo LGMD2C, 2D, 2E y 2F, respectivamente (sarcoglicanopatías), que en ocasiones se presentan acompañadas del desarrollo de cardiomiopatías. Así mismo, existen ratones transgénicos deficientes en los SGs β ó δ que presentan una distrofia muscular grave y progresiva similar a la LGMD2D y F, que se ve acompañada por el desarrollo de cardiomiopatía dilatada. Al parecer, la pérdida del complejo SG-SPN en el músculo liso vascular es la causa primaria de las cardiomiopatías. En conjunción con otras evidencias, todo parece indicar que el complejo SG-SPN juega un papel importante en el mantenimiento de la morfofisiología vascular. Bajo estos antecedentes, en el presente trabajo se analizó la expresión de los transcritos y proteínas de los miembros del complejo SG-SPN en los vasos del cordón umbilical como modelo de músculo liso vascular. Por vez primera, se detectó la presencia del transcrito del SG α en músculo liso vascular. No obstante, mediante los ensayos de inmunofluorescencia únicamente se detectó la presencia de los sarcoglicanos β , δ , ϵ y SPN, lo cual es un indicio de que la regulación de la expresión de los sarcoglicanos α y γ en este tejido, involucra eventos transcripcionales y post-transcripcionales.



I. INTRODUCCIÓN

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

El complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina (DGC) es un grupo de proteínas periféricas e integrales de la membrana celular de músculo cardíaco y esquelético (Fig.1) (Straub y Campbell, 1997). Si bien no se conoce la función específica de este complejo, se cree que son proteínas versátiles que entre otras funciones protegen al sarcolema del daño inducido por la contracción (Ervasti y Campbell, 1993). El DGC a su vez se puede dividir en tres grupos de acuerdo a sus características bioquímicas. El componente citoplásmico consiste en una serie de proteínas periféricas a la membrana: la distrofina con peso molecular de 427 kDa (Ervasti y Campbell, 1993); las sintrofinas α , β 1, β 2, γ 1, y γ 2, todas ellas con un peso molecular de 58 kDa (Suzuki et al., 1995); y la distrobrevina con peso molecular de 80 kDa (Yoshida et al., 1994). Tanto las sintrofinas como la distrobrevina se asocian al extremo carboxilo terminal de la distrofina y de su homólogo autosómico, la utrofina (Sadoulet-Puccio et al., 1997). El segundo subcomplejo en el DGC es el complejo distroglicano, el cual está compuesto de dos proteínas muy relacionadas; el distroglicano α con peso molecular de 156 kDa y el distroglicano β con peso de 43 kDa; de los cuales el distroglicano α se une a la laminina en la matriz extracelular, mientras que el distroglicano β se une a la distrofina o su homólogo utrofina en la cara intracelular de la membrana citoplasmática (Suzuki et al., 1994). El tercer complejo consiste en un grupo de proteínas transmembranales llamadas sarcoglicanos (SG) α , β , γ , δ y ϵ , con pesos moleculares de 50, 43, 35, 35 y 50 kDa, respectivamente (Campbell, 1995). A este complejo se le suma una proteína llamada sarcospan (SPN) con un peso de 25 kDa, por lo que en su conjunto constituyen el llamado complejo sarcoglicano-sarcospan (SG-SPN) (Fig. 2) (Crosbie et al., 1997). Los genes para los sarcoglicanos, α , β , γ , δ , y ϵ están localizados en los cromosomas humanos 17q21, 4q12, 13q12, 5q33 y 7q21, respectivamente. (Nigro et al.,

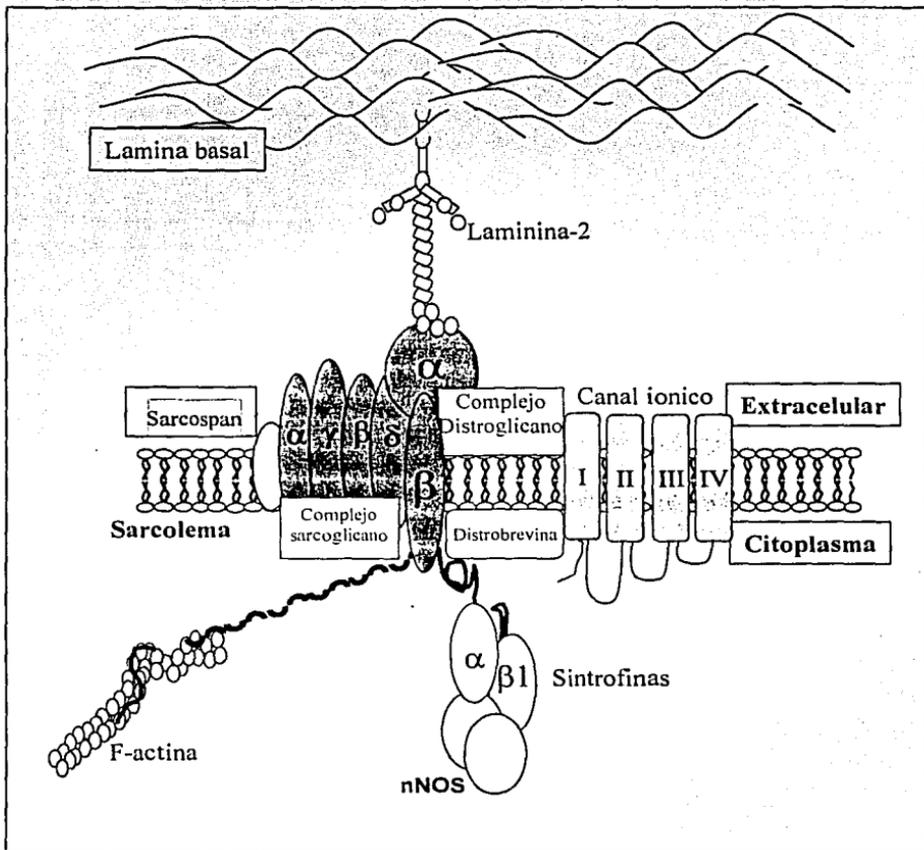


Figura 1. Organización molecular del complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina (DGC) en el músculo estriado. Dentro del DGC de músculo estriado se identifican diversos subcomplejos, dentro de los que destacan el complejo distroglicano y el complejo sarcoglicano-sarcospan. La característica estructural y funcional más relevante del DGC es la formación de un puente de comunicación entre la matriz extracelular y el citoesqueleto mediante su asociación con laminina-2 y F-actina, respectivamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

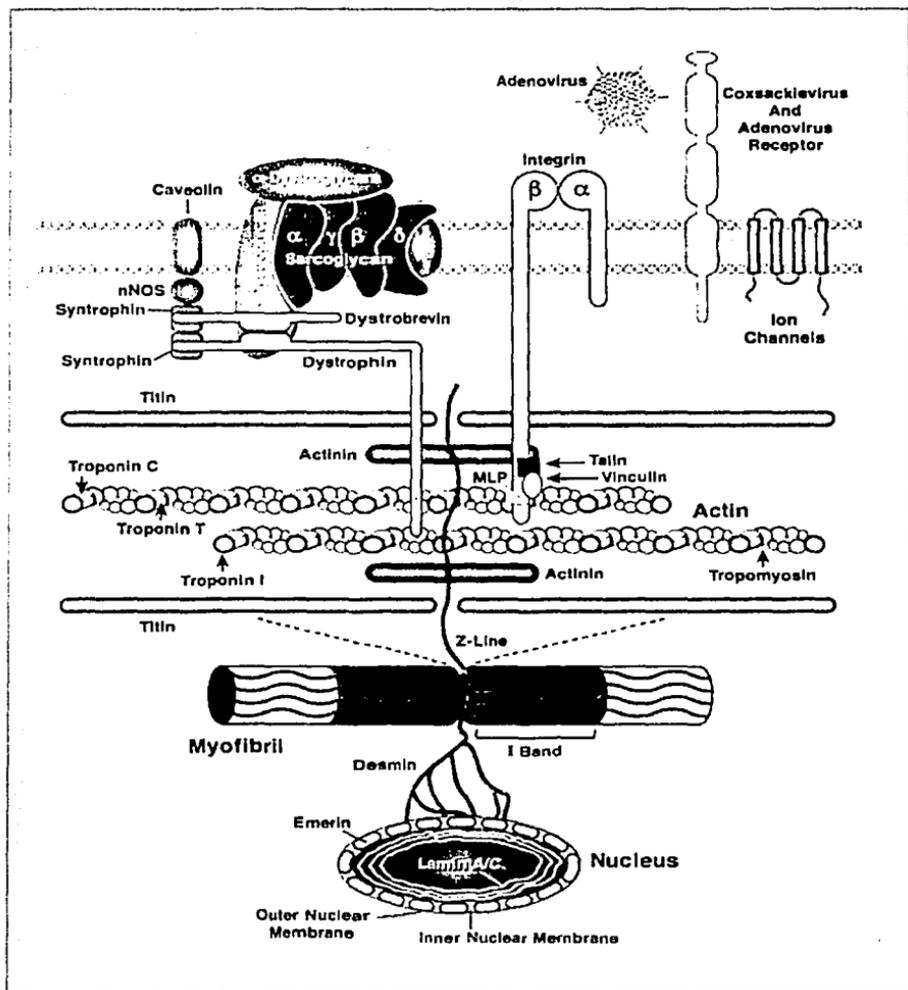


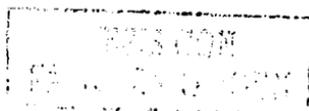
Figura. 2 Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina y otras proteínas relacionadas con el citoesqueleto y con la contracción de una célula de músculo esquelético.

OTROS CON
FALLA DE ORIGEN

1996). La estructura primaria de los SGs α y ϵ indica que son proteínas transmembranales tipo I (con la región carboxilo intracelular), mientras que los SGs β , γ , y δ son proteínas transmembranales tipo II (con la región amino intracelular) (Liu et al., 1999). Todos los SGs tienen una topología similar en la membrana celular; cuentan con un largo dominio extracelular y un dominio citoplasmático corto, separados por un dominio transmembranal. Cuentan además con sitios potenciales de glicosilación en su dominio extracelular y sitios putativos de fosforilación en su dominio citoplasmático, por lo cual se cree que participan en procesos de transducción de señales (Campbell, 1995). Los SGs β , γ y δ tienen un grupo de residuos de cisteína localizado en la región carboxilo terminal, lo cual corresponde a una estructura frecuentemente encontrada en moléculas receptoras (Matsumura et al., 1999).

1.2 REGULACIÓN DE LA EXPRESION DE LOS SARCOGLICANOS

Hasta hace poco, se pensaba que la expresión de los SGs α y γ se encontraba restringida a músculo estriado (Noguchi et al., 1995), sin embargo reportes recientes indican que el SG- γ también se expresa en músculo liso pulmonar aunque en menor cantidad (Barresi et al., 2000). En contraste, los SGs β , δ y ϵ tienen una expresión más generalizada que incluye músculo liso, esquelético y cardíaco, así como otros tejidos no musculares. Específicamente en el músculo liso de útero, aorta, pulmón e intestino, el complejo está formado por los SGs ϵ , β , δ y SPN (Straub et al., 1999). En el caso del músculo estriado existen dos formas del complejo, una que incluye los SGs α , β , γ , δ y SPN, y otro que lo conforman los SGs ϵ , β , γ , δ y SPN (Liu et al., 1999) (Fig. 3). En cuanto al ensamblaje del complejo SG, se forma tan pronto como se sintetizan los SGs individuales en el retículo endoplásmico. Además, el complejo SG se encuentra asociado con el complejo distroglicano, formando un complejo de glicoproteínas durante su transporte desde el aparato de Golgi, donde son glicosilados, hasta la membrana celular donde finalmente se anclan (Noguchi et al., 2000).



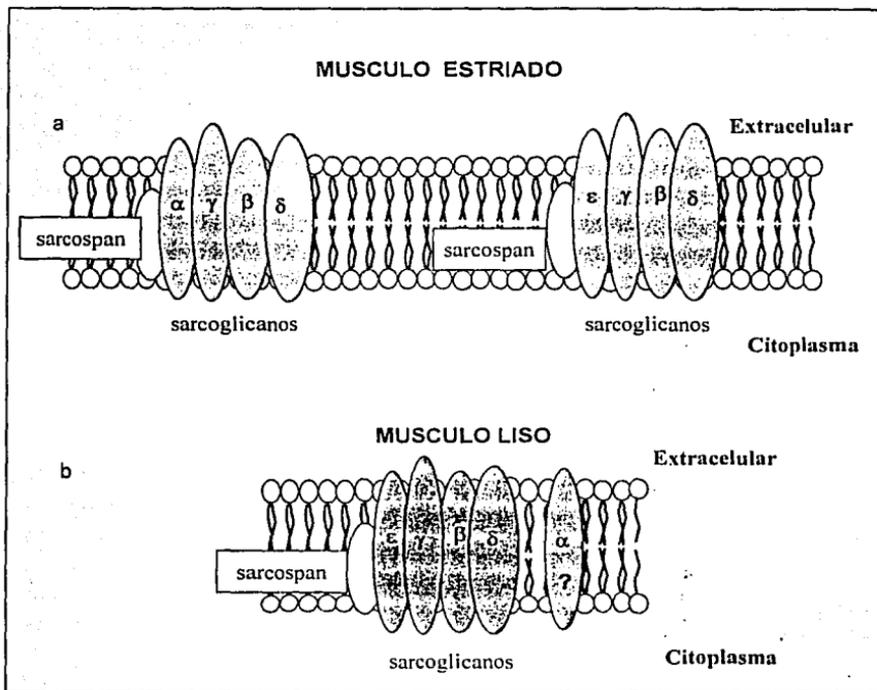


Figura 3.- Complejos Alternativos Sarcoglicano-Sarcospán. a) Complejos SG-SPN en el músculo estriado, uno de ellos caracterizado por la presencia del SG- α y el otro caracterizado por la presencia del SG- ϵ , b) Complejo SG-SPN en músculo liso, en el que se observa la existencia del SG- ϵ . Si bien se detecta la presencia del transcrito del SG- α , la presencia de la proteína aún no se comprueba.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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

Algunos reportes indican que todos los transcritos de los diferentes sarcoglicanos están presentes de manera abundante en los músculos esqueléticos y cardiacos (Noguchi et al., 1999). Mediante un análisis de la expresión de los sarcoglicanos en relación con el proceso de diferenciación de células musculares, se detectaron todos los transcritos del complejo sarcoglicano en cantidad elevada en mioblastos en proliferación.

Por otra parte se observó que ninguna de las proteínas del complejo SG-SPN aparecen en las primeras cuarenta horas de diferenciación celular. No es sino hasta el cuarto día de diferenciación que se observan pequeñas cantidades de los sarcoglicanos β y δ , mientras que los sarcoglicanos α y γ se encuentran a partir del día seis, y al día ocho todo el complejo sarcoglicano se detecta en grandes cantidades (Noguchi et al. 1999). Conforme la diferenciación progresa, la expresión del mRNA de los sarcoglicanos α y γ incrementa significativamente veinte y cincuenta veces, respectivamente. En contraste los mRNA de los sarcoglicanos β y δ permanecen sin cambio. Por lo tanto las respuestas transcripcionales de cada uno de los genes del complejo sarcoglicano durante la diferenciación celular son claramente diferentes (Noguchi et al. 1999).

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

La presencia de mutaciones en los genes de los sarcoglicanos α , β , γ y δ causan las distrofias musculares de cintura autosómico-recesivas del tipo LGMD2D, LGMD2E, LGMD2C y LGMD2F, respectivamente (Nigro et al., 1996), mismas que en su conjunto se denominan como sarcoglicanopatías (Ozawa et al.1995). Las mutaciones más comunes de los SGs α , β , γ y δ se han

encontrado en sus dominios extracelulares (Lim y Campbell, 1998). La deficiencia primaria en alguno de los sarcoglicanos, deriva en una disminución secundaria o pérdida total del resto de los miembros del complejo SG-SPN. Curiosamente, en un modelo murino carente del SG α se detectan niveles residuales de los SG's β y δ . Al parecer la existencia del complejo caracterizado por el SG ϵ juega un papel compensatorio tanto en el ratón carente de SG α como en pacientes con una deficiencia en el mismo (Liu y Engvall, 1999).

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

Por otro lado se han desarrollado modelos animales deficientes en los SGs α (Duclos et al., 1998), β (Durbeej et al., 2000), γ (McNally et al., 1998) y δ (Coral et al., 1999). Los ratones deficientes en el SG β o δ , muestran una distrofia muscular grave, con grandes regiones musculares necrosadas como característica distintiva, semejante a lo observado en tejidos infartados. La severidad de estas distrofias, se puede explicar con base en la importancia de los SGs β y δ durante la formación del complejo como se explicó anteriormente. Ambos ratones presentan una distrofia muscular progresiva similar a las LGMD2E y LGMD2F respectivamente (Coral et al., 1999 y Durbeej et al., 2000). Así mismo estos modelos animales desarrollan una cardiomiopatía dilatada, misma que se propone es causada por la pérdida completa del complejo SG-SSPN en músculo liso vascular. La ausencia de estas proteínas en dicho tejido ocasiona que haya un decremento en el tamaño del lumen vascular, lo cual conduce a una lesión isquémica que da como resultado la aparición de áreas de necrosis y el inicio de la

cardiomiopatía, acompañado de un agravamiento de la distrofia muscular (Coral et al., 1999 , Durbeej et al., 2000).

La importancia de la integridad del complejo SG-SPN en la morfología vascular queda confirmada con el estudio del hamster cardiomiopático BIO 14.6 el cual, debido a la carencia natural del SG- δ , pierde como consecuencia el resto de los sarcoglicanos (Ervasti et al 1990). Adicionalmente se piensa que la patología del músculo liso vascular en este modelo animal se desarrolla a causa de una función vascular alterada y una contractilidad anormal de las aortas (Mizuno et al 1995 y Towbin 1998), disfunciones que se originan a causa de la pérdida total del complejo SG-SPN en el músculo liso vascular (Coral et al 1999).

Con base en estas evidencias, es claro que la importancia del complejo SG-SPN no se remite únicamente a su función en músculo esquelético, sino que es sumamente importante su presencia e integridad en músculo liso. Sin embargo, no se ha ahondado en estudios al respecto, es por ello que decidimos iniciar con el análisis de la expresión del complejo SG-SPN en un modelo de músculo liso vascular muy particular como son los vasos de cordón umbilical.

1.4 MORFOFISIOLOGIA DEL CORDÓN UMBILICAL

El cordón umbilical consiste de una vena y dos arterias envueltas por una matriz denominada gelatina de Warthon, que se compone principalmente de tejido mesenquimatoso y carbohidratos. La vena ocupa una posición central, está desprovista de fibras elásticas y tiene dos capas de músculo liso unidas: una externa longitudinal y una interna, circular y más gruesa. Las dos arterias carecen de fibras elásticas, y contienen dos capas de músculo liso que se enrollan en sentido opuesto. Las arterias, que son más largas que la vena, se enrollan alrededor del eje funicular, formando un número variable de espirales. El cordón umbilical tiene una longitud promedio de 60cm y un diámetro de 1.5cm (Fig. 4) (Iffy 1986).

En el humano, la vena umbilical penetra en el hígado y forma una arcada de la que emergen diversas ramas mayores. Estas ramas conducen la sangre fetal

ESTRUCTURA ANATOMICA DEL CORDON UMBILICAL Y SUS VASOS

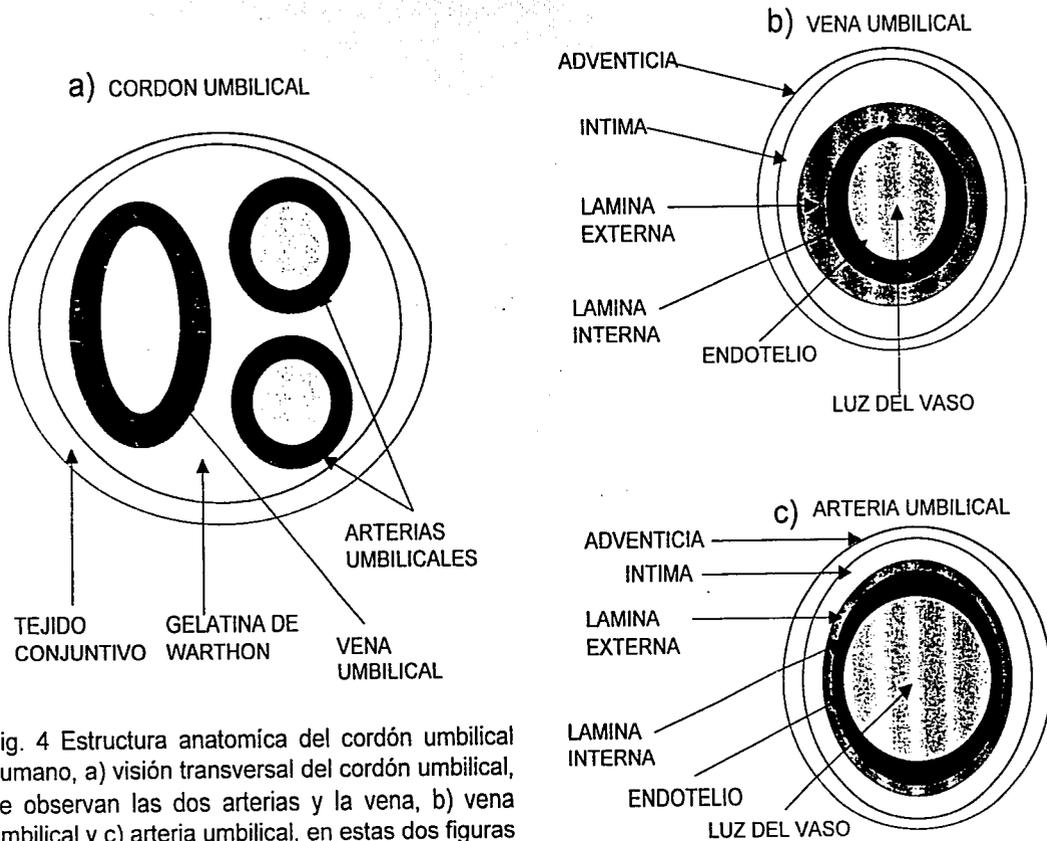


Fig. 4 Estructura anatomica del cordón umbilical humano, a) visión transversal del cordón umbilical, se observan las dos arterias y la vena, b) vena umbilical y c) arteria umbilical, en estas dos figuras se muestran las diferentes capas que conforman cada vaso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

más oxigenada. La rama mayor que parece ser la unión principal entre la vena umbilical y la vena cava inferior constituye el ducto venoso.

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

La anatomía general de los vasos sanguíneos presenta diversas capas celulares dentro de las cuales se pueden destacar: el endotelio, que son células altamente especializadas que se encuentran en contacto directo con la luz del vaso e interactúa por medio de sus receptores de membrana con los elementos de la sangre; la íntima que se compone de tejido conectivo, células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas, fibroblastos y en gran proporción células de músculo liso, linfocitos y monocitos; la capa media que está formada por la lámina elástica interna y por la lámina elástica externa, ambas láminas tienen un 90% de células de músculo liso otra diferencia importante con respecto a los vasos umbilicales; por último se encuentra la adventicia que es la capa más externa de los vasos sanguíneos y esta formada por fibroblastos, colágeno y fibras nerviosas (López-Jaramillo, 2001).

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

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

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De acuerdo con los antecedentes, es evidente que los estudios encaminados a conocer la expresión del complejo SG-SPN se han enfocado principalmente al estudio del músculo estriado. Sin embargo, recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia del complejo SG-SPN en el funcionamiento del músculo liso vascular y la participación de este complejo en el desarrollo de cardiomiopatías asociadas a las LGMD's. Debido a esto, en el presente trabajo se realizó un estudio sobre la expresión del complejo SG-SPN en el músculo liso vascular utilizando los vasos sanguíneos de cordón umbilical como modelo .

III. OBJETIVOS

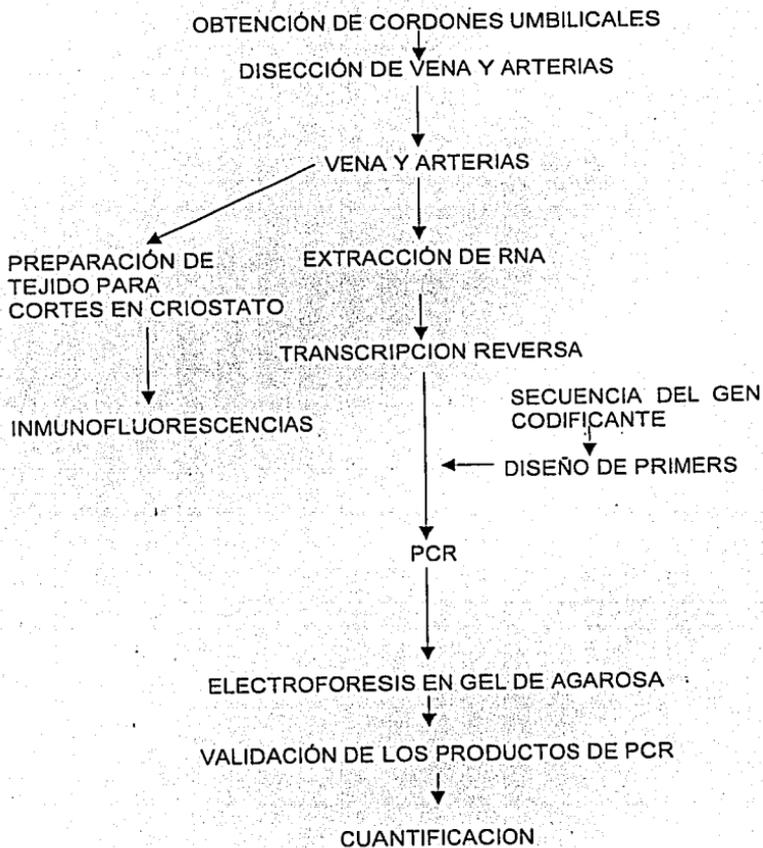
3.1 OBJETIVO GENERAL:

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

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

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

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



V. MATERIALES Y METODOS

5.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CORDÓN UMBILICAL.

Las muestras de cordón umbilical fueron proporcionados por el servicio de Ginecobstetricia del Hospital General de México. Los cordones de aproximadamente 10 cm de largo, se colocaron en un tubo cónico estéril con solución de NaCl al 0.9% y fueron transportados en hielo hasta el laboratorio. De inmediato se procedió a la disección para aislar los fragmentos de vena y arteria a partir de los cuales se obtuvo el RNA total y las criosecciones para los ensayos de inmunofluorescencia. Los fragmentos de tejido para inmunofluorescencia se conservaron a -70°C .

5.2 DISECCIÓN DE LA VENA Y LAS ARTERIAS UMBILICALES.

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

5.3 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE VENA Y ARTERIA UMBILICALES.

El RNA total fue obtenido a partir de las células de músculo liso vascular de cordón umbilical (vena y arteria), por medio del método de extracción fenólica (Chomczyk et al., 1980) con TRIZOL (Gibco, BRL™). Se pesó 1 gr de cada uno de los vasos en un tubo cónico de 50 ml nuevo y estéril, y se adicionó a cada uno 20 ml de TRIZOL (fenol-sales de guanidina), se homogenizó el tejido con un homogenizador con aspas de metal, las cuales fueron previamente lavadas con agua DEPC 0.1%, NaOH 0.2 N, RNAsaway (Gibco, BRL™), y por ultimo con agua DEPC en orden secuencial. El tejido se homogenizó y de inmediato se centrifugó a 3500 xg por 5 min a 4°C , en este paso se precipitan restos celulares grandes y proteínas. Se transfirió el sobrenadante a un tubo Corex de 30 ml frío el cual fue previamente lavado y horneado a 200° por 3 horas. Se adicionaron 2 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 seg. y se incubó en hielo por 15 min. Posteriormente la muestra se centrifugó a 12000 xg a 4°C por 15 min. En

este paso se formaron dos fases por diferencia de densidad, la fase fenólica orgánica contiene el DNA y restos de proteínas desnaturalizadas, mientras que la fase acuosa superior contiene el RNA. Esta fase se transfirió a un tubo cónico nuevo estéril, y se adicionó un volumen igual de isopropanol el cual minimiza la hidrólisis química del RNA, se agitó y almacenó a -20°C , al menos por 45 min. Enseguida se tomaron alícuotas de 1 ml y se dispusieron en tubos de 1.5 ml nuevos y estériles que se centrifugaron por 15 min. a $12000 \times g$ a 4°C , con lo que el RNA se precipitó formando una pastilla. Para lavar y deshidratar el RNA se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en etanol al 75%, luego se centrifugó por 5 min. a $12000 \times g$ a 4°C (2 veces). Se decantó el etanol y la pastilla se secó por 10 min. Al final la pastilla de RNA se disolvió en un volumen aproximado de $50 \mu\text{l}$ de agua DEPC al 0.1 % y se almacenó a -70°C (es importante hacer este procedimiento a 4°C , este procedimiento se realizó en la campana de flujo y se utilizaron guantes de látex estériles cambiándolos al menos en dos ocasiones).

5.4 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACION, PUREZA e INTEGRIDAD DEL RNA

Para conocer la concentración que tiene el RNA obtenido de ambos vasos, se tomó una pequeña alícuota del RNA obtenido y se preparó una dilución 1:100 con agua DEPC y se midió la absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro con lámpara UV.

Para determinar la integridad del RNA extraído, se sometió a electroforesis horizontal en gel de agarosa. La técnica de electroforesis se basa en el corrimiento de las muestras a través de la matriz porosa formada por la agarosa polimerizada, siendo el tamaño del poro determinado por la concentración de este reactivo en una solución de sales. Al aplicarse una corriente eléctrica a través del gel, los ácidos nucleicos que poseen una carga negativa conferida por los grupos fosfato, migran hacia el ánodo en condiciones de pH neutro. (Maniatis et al 1989).

El gel de agarosa al 1%, adicionalmente contiene $0.5 \mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio, este compuesto es un colorante fluorescente a la luz UV que posee en su

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

5.5 ENSAYOS DE RT - PCR SEMI-CUANTITATIVO.

En los últimos años, se han desarrollado varios adelantos moleculares para la detección y cuantificación de moléculas individuales de RNA. La más sensible de estas técnicas es la reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa (RT - PCR), la cual tiene la ventaja de detectar bajas copias de RNA mensajero mRNA a partir de una pequeña cantidad de células (Siebert et al., 1998).

Debido a que el proceso de amplificación es exponencial, pocas diferencias en algunas de las variables que controlan la amplificación pueden afectar de gran manera la cantidad de DNA producido. Un método producido para la cuantificación de RNA compara la señal de RT - PCR de un RNA determinado con la señal dada por el mRNA de un gen constitutivo (Chelly et al., 1990).

Para el análisis de la cantidad de mRNA de cada uno de los componentes del complejo SG-SPN, el RNA total obtenido de las células de músculo liso vascular de la vena y la arteria de cordón umbilical fue sometido al método semi-cuantitativo de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-

PCR) (Förster, 1994), para lo cual se requirió de la elaboración del DNA copia (cDNA) y posteriormente se realizaron los ensayos de PCR.

El cDNA es una molécula de DNA copiada a partir de un mRNA por medio de transcripción reversa, por lo tanto carente de los intrones presentes en el DNA geonómico, teniendo como base este fundamento la secuenciación del cDNA permite conocer de manera deductiva la secuencia de aminoácidos de una proteína (Lodish et al 1995).

Esta técnica se realiza una vez que se ha obtenido el RNA total del tejido y se fundamenta en la creación de una cadena complementaria del RNA, el cual funciona como molde, con la participación de los hexámeros al azar que funcionan como primers o cebadores y de los nucleótidos que funcionan como sustrato para la transcriptasa reversa adicionados a la reacción, de lo que resulta una doble hebra de DNA complementario (Alberts et al 1994).

5.5.1 SÍNTESIS DE cDNA:

El molde de cDNA para los ensayos de RT-PCR fue sintetizado a partir del RNA total por medio de transcripción reversa utilizando el método de hexámeros al azar, el cual se realizó en dos fases y es de la siguiente manera:

Una vez obtenida la concentración del RNA se calculó la cantidad necesaria para tener 1 μg en un volumen x, y se realizó la siguiente reacción:

-Primera fase de la reacción:

1 μg de RNA

0.5 μl de hexámeros 100 μM

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

-Segunda fase de la reacción:

4 μl de amortiguador 5x para cadena molde el cual contiene 50 mM de Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl y 3 mM de MgCl_2 .

1 μl de mezcla de dNTP's 10 mM, neutralizados a pH 7.0 con NaOH.

1 μl de la enzima transcriptasa reversa M-MLV 200 unidades/ μl (virus de la leucemia murina de Moloney).

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

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

5.5.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR):

La PCR consiste en la amplificación logarítmica de un segmento de DNA. Para amplificar las regiones transcritas de los miembros del complejo SG-SPN, se diseñaron oligonucleótidos específicos de cada uno de ellos. El diseño se realizó en base a las secuencias de cDNA reportadas en la base de datos GenBank, de donde se eligieron primers de 20 nucleótidos cuya secuencia se encontrara flanqueando parte de los exones 1 y 2 de cada gen del complejo SG-SPN. También se tomaron en cuenta criterios estándar como el contenido de 50% de GCs, que amplifiquen en un rango de temperatura de 55° a 62°C, y que no formen dímeros ni estructuras secundarias estables. Las secuencias de los oligonucleótidos que fueron utilizados son las siguientes:

SG-β sentido 5'- ATGCGTGAGAAGGCTGTTGA-3' (nt 106 a 126), antisentido 5'- TTTGGTCCAATGCGAATCAC-3' (nt 307 a 327), secuencia en GenBank E15251, el tamaño esperado del amplificado es de 221 bases; SG-γ sentido 5'- TACTCATCATCCTCGTTGTG-3' (nt 252 a 272), antisentido 5'- TACAGTCACATTCTGGGTTG-3' (nt 444 a 464) secuencia en GenBank E15252, el tamaño esperado del amplificado es de 212 bases; SG-ε sentido 5'-TCCACCTTACCCAAAACCTG-3' (nt 252 a 272), antisentido 5'- AACGGGAAGTCTTCTGCAGA-3' (nt 493 a 513) secuencia en GenBank AF036364, el tamaño esperado del amplificado es de 261 bases; SG-δ, sentido 5'- ACACCTAATGTCAGGGCAGAC-3' (nt 576 a 597), antisentido 5'-

TCTGTCCTTCTCATCCCTCAC-3' (nt 738 a 759) secuencia en GenBank U58331, el tamaño esperado del amplificado es de 203 bases. Para el SG- α los primers utilizados fueron, sentido 5'-GCAATTGGTGAGCAGAGCAGCAGAT-3' (nt 118 a 153) antisentido 5'-GGTGCAATGTGACCCTGGTGGATAA-3' (nt 396 a 421) secuencia en GenBank E15249, el tamaño esperado del amplificado es de 680 bases. Para el sarcospan los primers fueron, sentido 5'-CTAGTCAGGGACACTCCATT-3' (nt 244 a 264), antisentido 5'-GGCACTCAGCAGAAAAGTATAA-3' (nt 371 a 392) secuencia en GenBank AF016028, con un tamaño esperado de amplificado de 147 bases. Como control interno se amplificó simultáneamente un fragmento de GAPDH (gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa) con los siguientes primers sentido 5'-ATCCCATCACCATCTTCCAG-3' (nt 275 a 295), antisentido 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3' (nt 572 a 592) secuencia en GenBank NM002046, con un tamaño esperado de amplificado de 317 bases. Los ensayos de PCR fueron realizados con los siguientes reactivos y con el método tradicional:

2.5 μ l de cDNA

0.2 μ l de Taq-Polimerasa 5 U/ μ l

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

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

1.5 μ l de MgCl₂ 15 mM

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

agua para llevar la reacción a 25 μ l

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

Un ciclo de desnaturalización de la doble cadena de cDNA a 95°C por 5 min, a partir de los siguientes parámetros se realizaron 30 ciclos de PCR, 30 segundos a 95°C para alinear los primers, 30 seg a 62°C para síntesis en el caso del sarcoglicano β y δ , 30 seg a 59°C para síntesis en el caso de los sarcoglicanos ϵ , γ y sarcospan, y 30 seg a 72°C para el caso del sarcoglicano α , 72°C por 30 seg de

extensión de los primers alineados y por último 72°C por 7 min. Transcurridos los 30 ciclos de reacción la muestra se almacenó a -20°C.

Los productos obtenidos del PCR se corrieron en electroforesis en gel de agarosa horizontal al 2% teñido con bromuro de etidio 0.5 µg/ml. La muestra se mezcla con 3 µl de colorante de corrida (azul de bromofenol y cianol xileno al 0.1% y 30% de glicerol), para la preparación del gel se requirieron los siguientes reactivos: agarosa, amortiguador de corrida 1x el cual contiene Tris-base 89 mM, ácido bórico 89mM y EDTA 2 mM (Maniatis et al., 1989). El gel utilizado tiene dimensiones de 11 x 13.5 cm y se corrió a un voltaje de 100 V. Los productos amplificados por PCR se visualizaron en el gel por medio de una lámpara UV se les tomó una foto y posteriormente se cuantificaron los productos de RT-PCR obtenidos a través de densitometría y se normalizaron los valores obtenidos del transcrito del sarcoglicano correspondiente entre el control GAPDH.

5.6 CINÉTICAS DE COAMPLIFICACION.

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

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

2.5 µl de cDNA

0.2 µl de Taq-Polimerasa 5 U/µl

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

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

1.5 μ l de MgCl₂ 15 mM

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

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

agua para llevar la reacción a 25 μ l

NOTA: exclusivamente para el caso de la amplificación del transcrito del SG- α se utilizo DMSO (dimetil sulfoxido) a una concentración del 4% en el volumen final de la reacción, este reactivo se utiliza para eliminar bandas inespecificas en la reacción.

Las condiciones de la PCR fueron las mismas que para la amplificación de cada transcrito del complejo SG-SPN de manera individual, solo que en este ensayo los productos de la reacción de PCR se analizaron en los ciclos 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32.

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

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

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

Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

5.7 INMUNOFLUORESCENCIA.

Con el fin de determinar la localización de cada uno de los componentes del complejo SG-SSPN en las células de músculo liso vascular de cordón umbilical se tomaron fragmentos de la vena y la arteria umbilicales de aproximadamente 2 cm

que se adhirieron por medio de una resina a una hoja de corcho, una vez que se congeló la resina y la muestra quedo bien adherida al corcho las muestras permanecieron congeladas a -70°C . Posteriormente se hicieron cortes transversales en criostato de un grosor de $7\ \mu\text{m}$ en un criostato, los cortes se pusieron sobre un portaobjetos al cual quedaron adheridas. Una vez hechos los cortes, éstos se lavaron con amortiguador de sales de fosfato de sodio $0.5\ \text{M}$ y albúmina sérica de bovino al $5\ \%$ p/v (PBS 1X / BSA 5%) para bloquear el fondo. Enseguida se incubaron las células con el anticuerpo primario específico para cada SG (Novocastra) a una dilución de 1:20 con PBS por 3 hr. a 4°C , posteriormente se lavaron las células cuatro veces (5min/lavado) con PBS 1X / BSA 5% frío. Enseguida se incubaron con el anticuerpo secundario que es inmunoglobulina G de ratón, unida a un fluorocromo (Cy3), el cual se une al anticuerpo primario por 1 hr. a 4°C . Transcurrido este tiempo se lavaron las muestras cuatro veces con PBS 1X / BSA 5% frío. Posteriormente a las muestras se les quitó el exceso de solución amortiguadora y se les adicionó $20\ \mu\text{l}$ de medio de montaje (Vecta Shield) de inmediato se pone el cubreobjetos sobre la muestra y se sellan las orillas del mismo con un poco de barniz de uñas para evitar que la muestra se deslice en el portaobjetos. Se dejaron secar un poco y se observaron en el microscopio de fluorescencia (Kaaren y Janssen, 1989).

VI. RESULTADOS

6.1 EXPRESIÓN DEL COMPLEJO SG-SPN EN CRIOSECCIONES DE VENA Y ARTERIA DE CORDÓN UMBILICAL

La presencia del complejo SG-SPN en las células de vena y arteria del cordón umbilical se analizó por medio de ensayos de inmunofluorescencia indirecta en criosecciones transversales de ambos vasos como se describe en material y métodos. Para realizar este tipo de ensayos, se utilizaron anticuerpos específicos para los SGs α , γ , β , δ , ϵ y SPN. Como control positivo se utilizaron anticuerpos específicos para la porción amino (NH) y carboxilo (COOH) de la distrofina (DIS). Como se demuestra en las figuras 5 y 6, los SGs β , ϵ y δ y el SPN se expresan en músculo liso tanto de la vena como de la arteria del cordón umbilical de la misma manera que la distrofina. En cuanto a los SGs α y γ , no se observó su presencia en vena ni en arteria por esta metodología.

6.2 EXPRESIÓN DE LOS TRANSCRITOS CODIFICANTES DEL COMPLEJO SG-SPN

Para el análisis de la expresión de los transcritos codificantes de los componentes del complejo SG-SPN, se extrajo RNA total de vena y arteria de cordón umbilical humano de fase terminal de gestación como único criterio de inclusión, independientemente del tipo de parto y del sexo del recién nacido. Se obtuvo una concentración de RNA de 100 -200 ng/ μ l, lo cual fue óptimo para llevar a cabo los ensayos de RT-PCR. En la figura 7 se puede observar el corrimiento electroforético de los RNAs obtenidos a partir de vena y arteria de cordón umbilical, así como de músculo esquelético humano, mismo que se utilizó en algunos ensayos como control positivo. Una vez cuantificado y verificado la integridad de los RNAs, se procedió a continuar con los ensayos de RT-PCR.

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

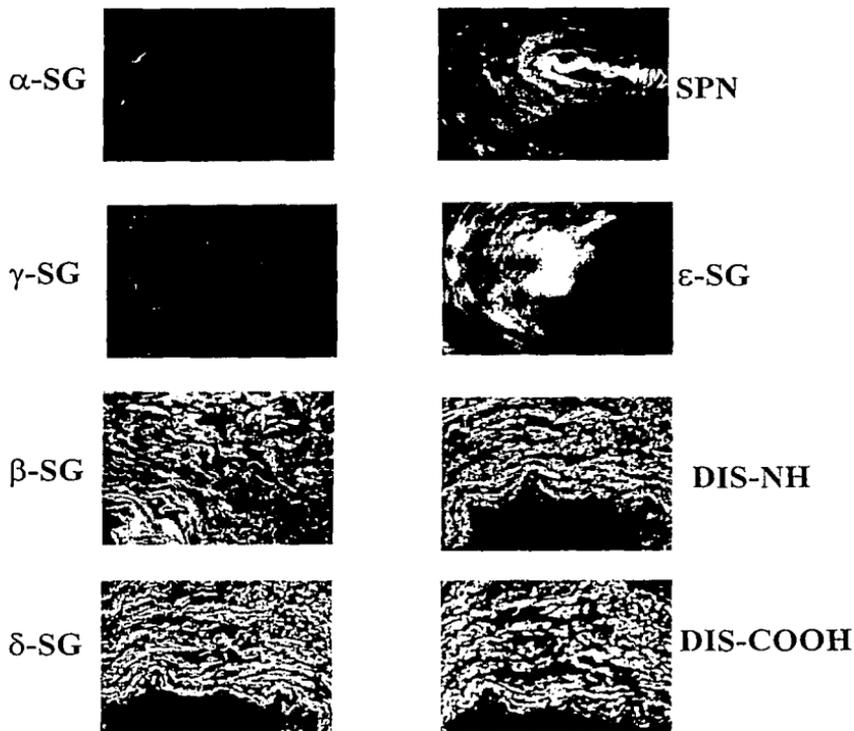


Figura 5.-Inmunoblot del complejo SG-SPN y de la distrofina en el musculo liso de la arteria del cordón umbilical . Se utilizaron anticuerpos específicos contra cada uno de los miembros del complejo y contra la región amino (NH) y la región carboxilo(COOH) de la distrofina (DIS).

FALLA DE ORIGEN

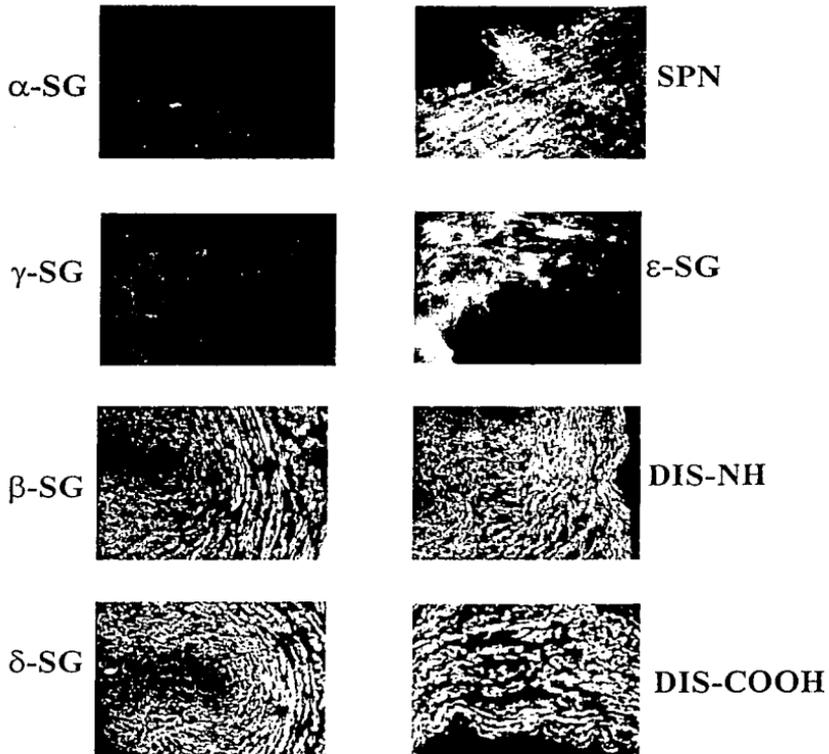


Figura 6.- Inmunoblot del complejo SG-SPN y de la distrofina en el musculo liso de la vena del cordón umbilical . Se utilizaron anticuerpos específicos contra cada uno de los miembros del complejo y contra la región amino (NH) y la región carboxilo(COOH) de la distrofina.

TESIS CON
 FALSO DE SEGURIDAD

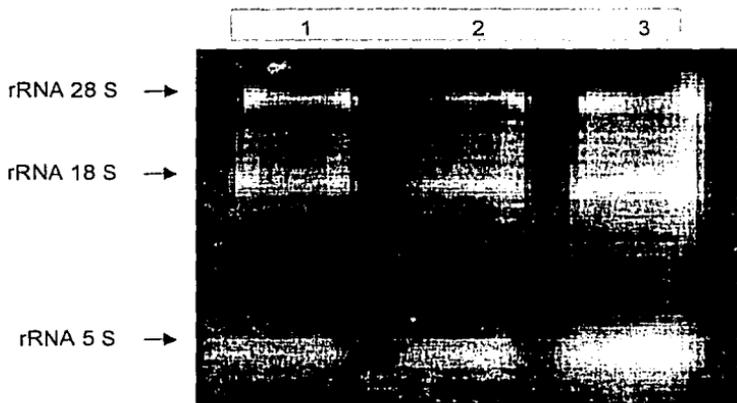


Figura 7. Análisis de integridad del RNA extraído a partir de vena y arteria de cordón umbilical humano. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio de RNA total extraído con sales de guanidina a partir de diferentes tejidos: 1) RNA músculo esquelético 2) RNA de vena umbilical 3) RNA de arteria umbilical.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de los tamaños esperados: para el caso del SPN el tamaño del amplificado es de 147 pb; para el SG δ el tamaño del amplificado es de 203 pb; para el SG γ el tamaño del amplificado es de 212 pb; del SG β el tamaño del amplificado es de 221 pb; para el SG ϵ el tamaño del amplificado es de 261 pb; para el caso del SG α el tamaño del amplificado es de 680 pb y el tamaño esperado del amplificado para la GAPDH es de 317 pb, como se puede observar en la figura 8. Los mRNAs de los SG β , δ , ϵ y del SPN se expresaron en niveles elevados tanto en vena como en arteria. En el caso del SG γ la expresión fue reducida en comparación con lo observado para los otros sarcoglicanos y con el nivel de expresión observado para el músculo esquelético. Se observó un patrón similar de expresión para el SG α , que sin embargo, se detecta en mayor concentración que el SG γ . (fig. 8)

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

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

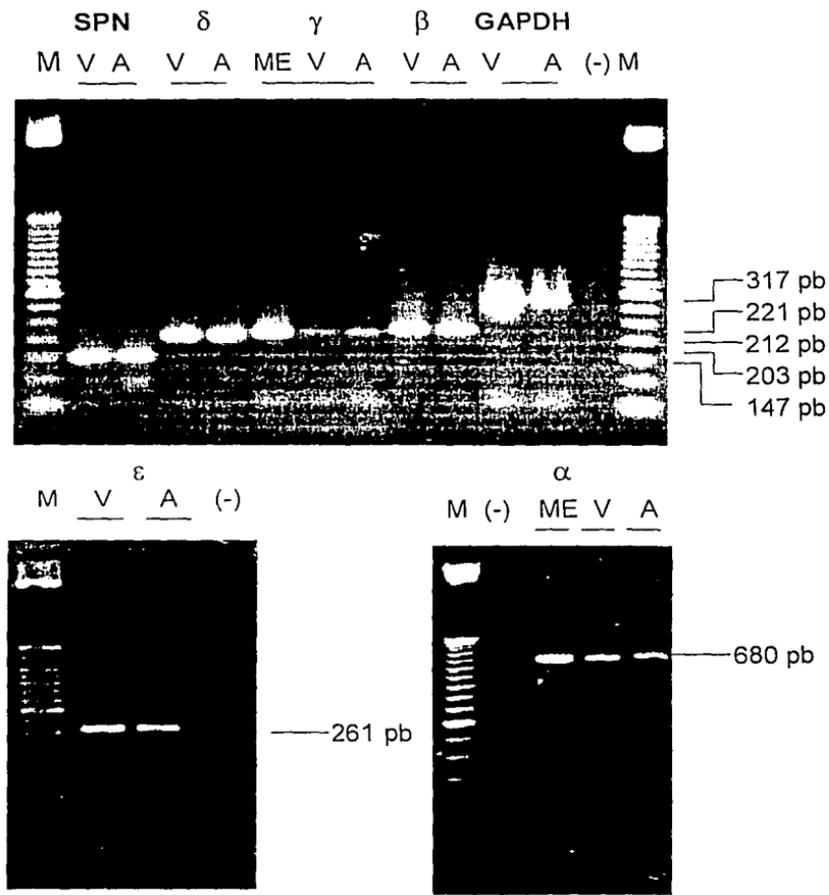
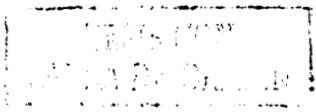


Figura 8. Análisis de la expresión por RT-PCR del complejo sarcoglicano-sarcospan en el músculo liso de la vena y la arteria del cordón umbilical. Los RNA mensajeros de los sarcoglicanos α , β , γ , δ , ϵ y sarcospan (SPN) fueron amplificados a partir de RNA total de vena (V) y arteria (A) del cordón umbilical por medio de RT-PCR utilizando oligonucleotidos específicos. Para el caso de los SG's α y γ se utilizó como control positivo el amplificado a partir de músculo esquelético (ME). M: marcador de peso molecular en escalera de 50 pares de bases, (-): control negativo; Glicer aldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa: GAPDH.



parámetro en el control constitutivo, ya que está sometido a las mismas condiciones de amplificación y es cuantificado siguiendo el mismo principio. Finalmente, se elige el ciclo óptimo en que ambos productos de PCR se encuentren en fase exponencial y sean perfectamente detectables.

La cinética de coamplificación se llevó a cabo tomando muestras de los ciclos 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 de la PCR. Como se puede observar en la fig. 9 todos los transcritos del complejo SG-SPN se coamplificaron aceptablemente con el control interno GAPDH. Se realizó el análisis densitométrico de cada uno de los productos de PCR y los valores obtenidos fueron graficados (fig. 10). De acuerdo a los valores obtenidos, decidimos tomar el ciclo 28 como el óptimo para llevar a cabo los ensayos semi-cuantitativos, ya que es en este ciclo en el que los productos de PCR se encuentran en fase exponencial, de tal forma que nos permite detectar diferencias de expresión.

Como se observa en la figura 11, la expresión del transcrito del gen constitutivo GAPDH a 28 ciclos de PCR es muy constante en cada reacción de coamplificación, lo cual nos indica que este gen presenta un patrón de expresión uniforme en nuestro modelo de estudio, lo cual lo hace sumamente confiable para los ensayos semi-cuantitativos. En lo que respecta a la expresión de los transcritos de los integrantes del complejo SG-SPN, se apreció un menor nivel de expresión de los SG's α y γ comparado con el resto de los SGs.

Estos resultados así como los de amplificación simple del complejo SG-SPN nos muestran y corroboran la presencia de los transcritos de los SGs α y γ en el músculo liso vascular aunque en niveles de expresión menor que el resto de los SGs y aproximadamente en una cuarta parte del nivel de expresión del transcrito del gen constitutivo, esto nos sugiere una vez más que la regulación de estos dos genes es diferente al del resto de los sarcoglicanos en este modelo vascular.

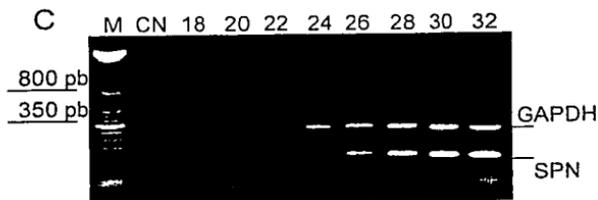
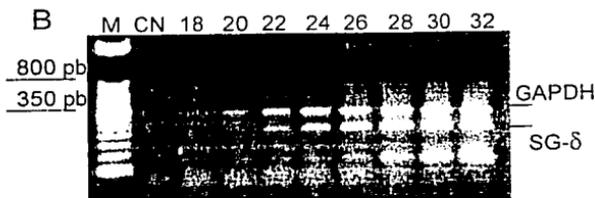
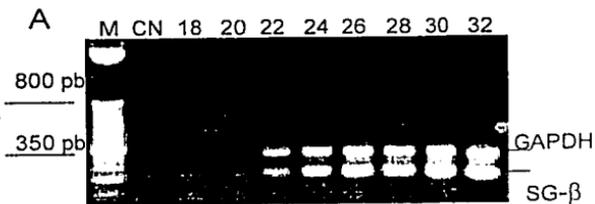
6.4 ANÁLISIS SEMI-CUANTITATIVO DE LA EXPRESIÓN DEL COMPLEJO SG-SPN

Este análisis se llevo a cabo por medio de un programa computacional el cual se encarga de hacer una cuantificación del nivel de intensidad que

presentan las bandas del amplificado teñidas con bromuro de etidio en el gel de agarosa, lo que nos permite conocer la expresión relativa de transcrito amplificado. Para analizar los resultados, se normalizaron los valores de la expresión de cada uno de los transcritos amplificados entre el valor obtenido del control endógeno (GAPDH), (fig.12) lo cual elimina las variaciones intrínsecas de cada reacción de PCR a lo largo de todo el proceso. Una vez normalizados los valores, se graficó la expresión relativa de todos los transcritos (fig. 12). Los resultados demuestran que, para ambos vasos, existen diferentes niveles de expresión de los transcritos del complejo SG-SPN. El transcrito de mayor expresión en vena fue el SPN, seguido por los SGs β y δ que se expresan casi al mismo nivel que SPN, concretamente 0.97 veces. A éstos los siguen los SGs ϵ y α , que se expresan 0.66 y 0.63 veces, respectivamente, con respecto a SPN. Por último, el transcrito de SG γ fue el que mostró una menor expresión de todos los miembros del complejo, con un nivel de 0.34 veces con respecto a SPN.

En cuanto a los transcritos de arteria, el de mayor expresión fue el correspondiente al SG β , seguido por los de SPN y SG δ que se expresan 0.83 y 0.82 veces, respectivamente con respecto al SG β . El SG ϵ , al igual que en vena, mostró una expresión de 0.66 veces contra el transcrito de mayor expresión, mientras que el nivel de SG α fue de 0.58 veces. Finalmente, del transcrito de SG γ que es el de menor expresión, se observaron los mismos niveles que en vena, es decir, 0.34 veces con respecto a SPN.

En resumen, los miembros del complejo SG-SPN de mayor expresión tanto en vena como en arteria, fueron SPN, SG β y SG δ , que son de expresión ubicua y son los SGs, nucleadores del complejo durante su ensamblaje. En nivel de expresión decreciente, se encontraron los SGs ϵ y α , que coincidentemente, guardan una alta homología en cuanto a su secuencia aminoacídica y estructural. El menor nivel de expresión, se observó en el SG γ , cuya expresión se ha asociado típicamente con músculo esquelético.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

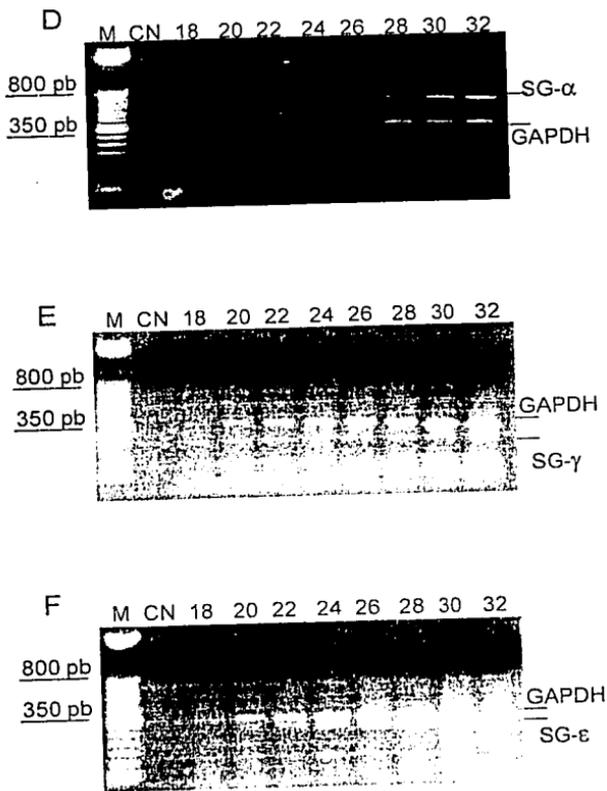
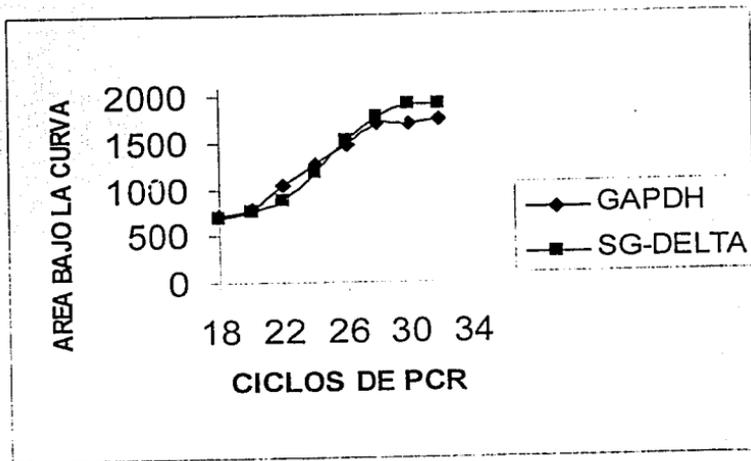


Figura 9. Cinéticas de coamplificación de los transcritos del complejo SG-SPN y GAPDH. Electroforésis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR correspondientes a las cinéticas de coamplificación de los transcritos del complejo SG-SPN de vena umbilical de 18 a 32 ciclos. M:marcador de peso molecular en escalera de 50 pb CN:control negativo de la reacción. A:SG- β ; B:SG- δ ; C:SPN; D:SG- α ; E:SG- γ ; F:SG- ϵ

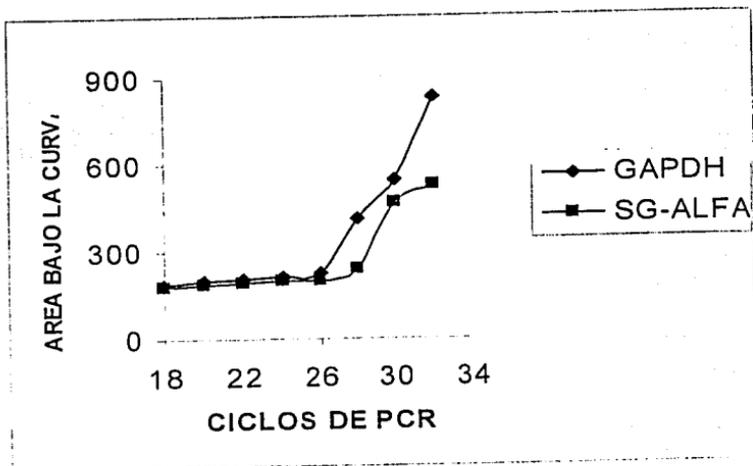
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CINETICAS DE COAMPLIFICACIÓN DEL COMPLEJO SG-SPN Y GAPDH

A

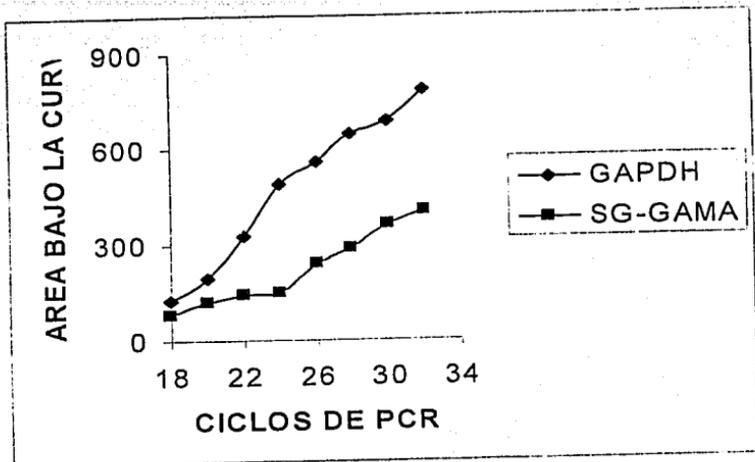


B

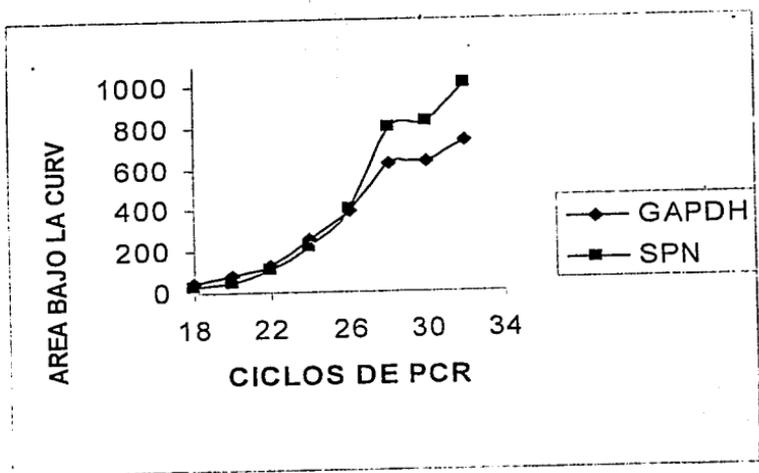


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C



D



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

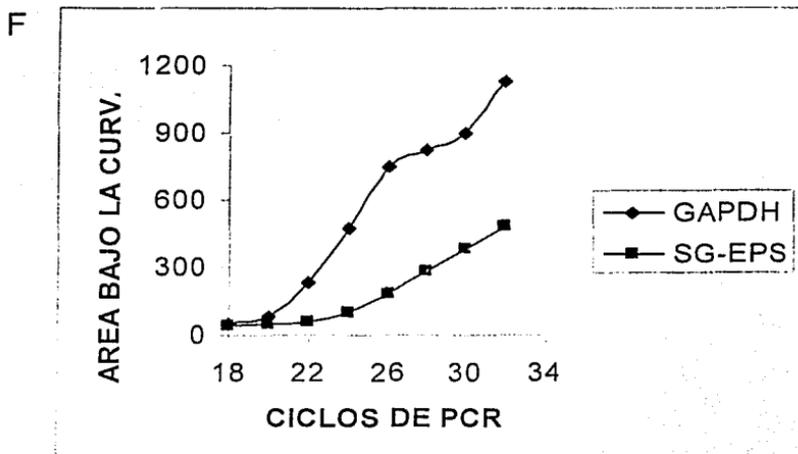
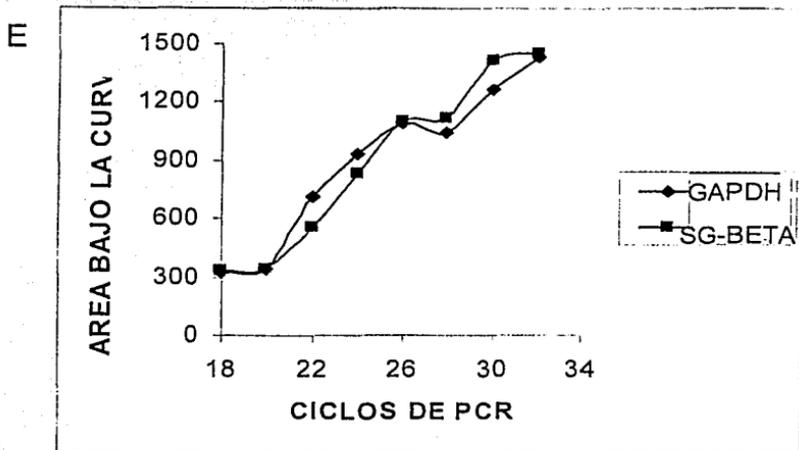
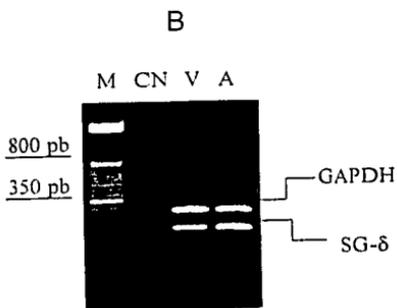
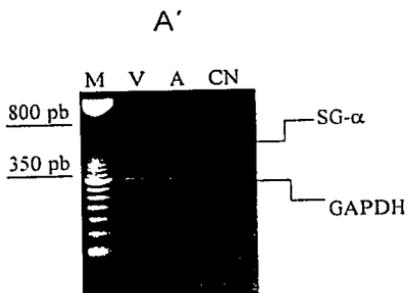
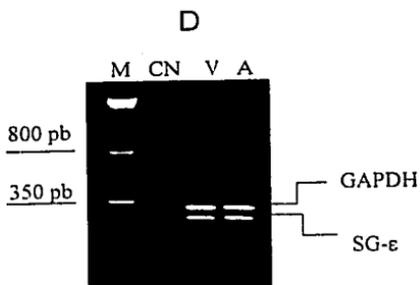
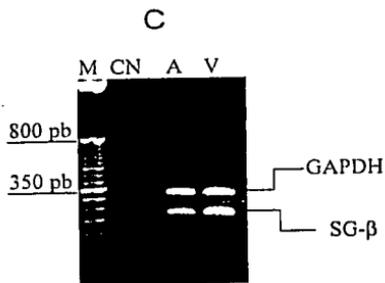


Figura 10.- Cinetica de coamplificación del (A) SG- δ y GAPDH, (B) del SG- α y GAPDH (C) del SG- γ y GAPDH, (D) del SPN y GAPDH (E) del SG- β y GAPDH y (F) del SG- ϵ y GAPDH en músculo liso de vena de cordón umbilical. El eje "ciclos de PCR" indica el numero de ciclos de PCR, el valor de los puntos de los SG's, SPN y GAPDH indica la intensidad relativa de la banda amplificada y teñida en el gel.



1997
 10
 1997



TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

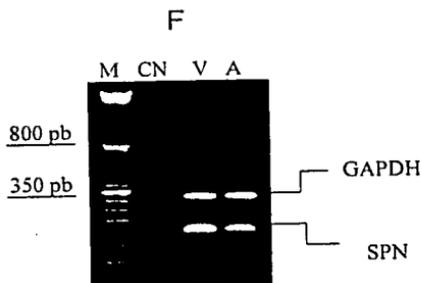
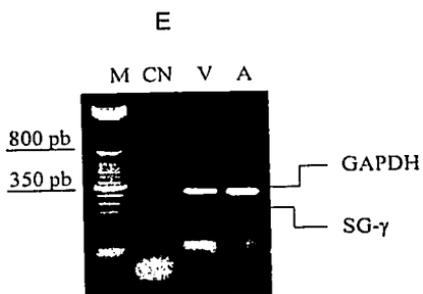
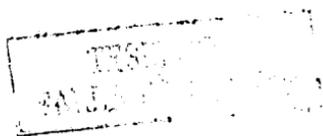


Figura 11. RT-PCR de los sarcoglicanos y sarcospán de vena y arteria de cordón umbilical humano. Electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % de los productos de RT-PCR en el que se coamplificaron cada uno de los transcritos del complejo SG-SPN y del control interno GAPDH a 28 ciclos de la PCR. M: marcador de peso molecular en escalera de 50 pb, CN: control negativo de la reacción, V: vena, A: arteria de cordón umbilical. A': SG- α ; B: SG- δ ; C: SG- β ; D: SG- ϵ ; E: SG- γ ; F: SPN.



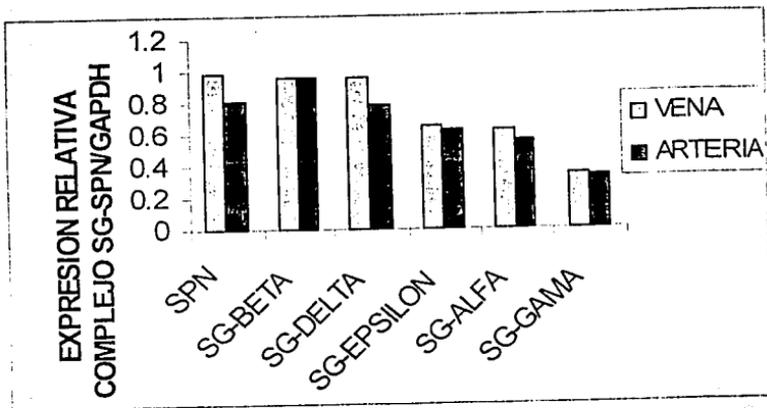


Figura 12.- Expresión relativa de los transcritos del complejo SG-SPN. Valores normalizados con el control endógeno (GAPDH) en la vena y la arteria del cordón umbilical a 28 ciclos de PCR.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII. DISCUSIÓN

Mediante este trabajo, se analizó la expresión del complejo SG-SPN en el músculo liso vascular de la arteria y la vena del cordón umbilical.

Los resultados que aquí se presentan, prueban que los transcritos de todos los miembros del complejo SG-SPN se encuentran expresados en músculo liso tanto de vena como de arteria umbilicales, mientras que a nivel de proteína se detectaron únicamente los SG's β y δ .

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

En adición a lo mencionado anteriormente, Barresi y col. (2000) describen en su estudio que a nivel de RNA mensajero se encuentran dos transcritos de SG- γ en músculo esquelético, uno de los cuales se presume que se origina a partir de procesamiento alternativo del exón 1 y que no se traduce. Mientras tanto, en músculo liso únicamente se encontró un transcrito que es igual en secuencia al mismo que se traduce en músculo esquelético, lo cual concuerda con el hallazgo del transcrito del SG- γ reportado en el presente trabajo.

Al realizar ensayos de inmunofluorescencia, no pudimos detectar la presencia de los SGs α y γ . Sin embargo, esto no significa necesariamente que no se exprese la proteína, ya que al localizarse transmembranalmente, es muy posible que el epitopo contra el cual están dirigidos los anticuerpos utilizados no se

encuentre accesible. Esto se encuentra ejemplificado en lo descrito por Barresi y col. (2000), que al realizar ensayos de inmunoblot con extractos proteicos de algunos órganos que contienen músculo liso y utilizando un grupo de nuevos anticuerpos producidos en su laboratorio y que se encuentran dirigidos contra diferentes porciones del SG γ , detecta una banda de aproximadamente 35kDa, lo cual indica la presencia de la proteína en estos tejidos, aún cuando anteriormente no se habían logrado detectar por inmunofluorescencia. La ventaja del análisis por inmunoblot en este caso, consiste en que al solubilizar la proteína y desdoblar su estructura cuaternaria por medio de detergentes tanto en el buffer de lisis como durante la electroforesis en un gel desnaturizante, los anticuerpos pueden localizar porciones de la proteína que cuando se encuentra embebida en la membrana no pueden localizar, como es en el caso de las inmunofluorescencias. Es por ello que se ha contemplado la realización de ensayos de inmunoblot para la detección de todos los sarcoglicanos en la continuación de este trabajo.

En lo que respecta a la expresión del transcrito del SG α en músculo liso, no existen reportes anteriores que indiquen este fenómeno. Por el contrario, se afirma fehacientemente que este SG está ausente en músculo liso. Nosotros en este trabajo detectamos la presencia del transcrito del SG α , y al igual que el SG γ , es muy posible que también se exprese la proteína, pero que no hayamos podido detectarla por medio de inmunofluorescencia. En contraparte, es posible que la ausencia de SG α se deba en realidad a la regulación post-transcripcional negativa del mismo, debido a un patrón de expresión específico. Se sabe que durante el desarrollo embrionario, el músculo liso y el músculo estriado presentan diferente composición de SGs. Es así que la proteína SG ϵ se puede detectar en niveles altos a través del desarrollo del músculo liso, al tiempo que se observa muy disminuido en el músculo estriado (Straub et al., 1999). Por otra parte, el SG α nunca se detecta en músculo liso, mientras que en músculo estriado se ve incrementado conforme el desarrollo del embrión va progresando. Esto puede ser un indicativo de un patrón de expresión inverso que presentan estos dos SGs en los dos tipos musculares, tal como se ha descrito para la distrofina y su homólogo autosómico la utrofina (Radojevic et al., 2000), mismas que se asocian con los

SGs en el DGC. Se ha observado que mientras que en las primeras etapas del desarrollo embrionario utrofina se expresa predominantemente en músculo esquelético, distrofina apenas es detectable en pequeñas cantidades. Conforme avanza el desarrollo, la expresión de ambas proteínas se invierte con una expresión preponderante de distrofina y una evidente disminución de utrofina.

El bajo nivel del SG α con respecto al SG ϵ en el músculo esquelético durante el desarrollo embrionario temprano, y el cambio de expresión inversa de estos dos SGs en etapas embrionarias tardías, sugiere que el SG ϵ se va sustituyendo por el SG α conforme progresa el desarrollo, sin que el primero llegue a desaparecer. De esta manera se constituyen dos tipos de complejo SG-SPN en el músculo estriado uno conformado por los SGs ϵ , β , γ , δ y SPN y otro caracterizado por la presencia de los SGs α , β , γ , δ y SPN (Ettinger et al., 1997). Este antecedente nos hace pensar en la posibilidad de que en el músculo liso vascular de cordón umbilical pueda estar ocurriendo en fenómeno similar inverso en el que se regule negativamente la expresión del SG α a nivel postranscripcional.

Por su parte el transcrito del SG δ y β presenta elevados niveles de expresión, esto sugiere una función fundamental en el músculo liso vascular, tal como lo reportan Coral y col. (1999) en su modelo de ratón transgénico carente del SG- δ el cual desarrolla una cardiomiopatía dilatada severa además de la distrofia aguda, ambas patologías asociadas a la deficiencia de este SG en el ratón.

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

VIII. CONCLUSIONES

La expresión del transcrito de todos los SGs y del SPN se hizo evidente tanto en la vena como en la arteria del cordón umbilical mediante los ensayos de RT – PCR. En el caso de los sarcoglicanos α y γ la expresión de los mRNAs fue reducida en comparación con lo obtenido para el resto de los transcritos miembros del complejo SG-SPN, siendo más evidente para este último, como lo indica el análisis semi-cuantitativo de la RT-PCR. A nivel de proteína se observaron por medio de inmunofluorescencia los productos de los genes de los SGs β y δ pero no de los SGs α y γ . Este resultado junto con los de RT-PCR sugieren que la regulación de la expresión de estas dos últimas proteínas puede estar dada a nivel post-transcripcional.

IX. BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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

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

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

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

Duclos, F, Straub, V, Moore, SA, Venzke, DP, Hrstka, RF, Crosbie, RH, Durbeej, M, Lebakken, CS, Ettinger, AJ, van der Meulen, J, Holt, KH, Campbell, KP (1998) Progressive muscular dystrophy in alfa-sarcoglycan deficient mice. *J. Cell Biol.* 142: 1461-1471.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sakamoto, A, Ono, K, Abe, M, Jasmin, G, Eki, T, Murakami, Y, Mazaki, T, Toyooka, T and Hanoaka, F (1997) Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan in hamster: an animal model of disrupted dystrophin – associated glycoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 13873-13878.



Sakamoto, A, Abe, M and Masaki, T (1999) Delineation of genomic deletion in cardiomyopathic hamster. FEBS lett. 447: 124-128.

Siebert, PD and Larrick, JW (1998) Gene cloning and analysis by RT – PCR, The biotechniques on molecular laboratory methods, number 1, cap. 4, Biotechniques Books, division of Eaton Publishing USA.

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

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

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

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

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

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

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN