



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



"Estudio de la expresión de utrofina en el ratón *mdx* mediante RT-PCR semi-cuantitativo"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

OSCAR HERNANDEZ HERNANDEZ

ASESORES: DRA. HAYDEE ROSAS VARGAS
DR. BULMARO CISNEROS VEGA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2002

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.

PAGINACIÓN
DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
U. N. A. M.
DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Estudio de la expresión de utrofina en el ratón mdx
mediante RT-PCR semi-cuantitativo".

que presenta el pasante: Oscar Hernández Hernández
con número de cuenta: 9111297-6 para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Junio de 2002

PRESIDENTE Dr. Ricardo V. Santiago Díaz

VOCAL M. en C. Sandra Díaz Barriga Arceo

SECRETARIO Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez

PRIMER SUPLENTE M. en C. Norma L. Delgado Buenrostro

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Alejandra Hernández Ceruelos

A mis padres, Don MANUEL y Doña GUILLE.

A mis hermanos NORMA y MANOLO.

A FER y a JOSE LUIS.

A ROSY.

Agradecimientos

A mis padres, por su amor infinito, su plena confianza, su esfuerzo constante y su paciencia interminable. Sin ustedes esta meta habría sido inalcanzable. -LOS AMO-

A mis hermanos Norma y Manolo por el apoyo que en todo momento he tenido de ustedes.

A Rosy, gracias por tu apoyo, tu compañía, tu amor y tu comprensión.

A la UNAM y a la FES Cuautitlán, por el conocimiento y la formación que en sus instalaciones he obtenido. El espíritu universitario lo llevaré siempre en mi corazón.

Al Dr. Bulmaro, por aceptarme en su laboratorio y así darme la oportunidad de conocer de cerca la labor de los hombres de ciencia. A Haydeé, la primera persona en enseñarme a trabajar en un laboratorio de Biología Molecular. A ambos por permitirme realizar este trabajo bajo su dirección.

A la maestra Sandra por la revisión y comentarios hechos a este trabajo.

A mis profesores, compañeros y amigos de la FES Cuautitlán.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 12: Pablo, Mario, Víctor, Luigi, Rafa, Marco y Everardo.

A mis amigos Valentina, Elizabeth y Moises, gracias por estar ahí.

A todos los que contribuyeron de alguna manera a la terminación de este trabajo.

**Recorrer los caminos que tienen corazón,
cualquier camino con corazón.
Por ahí recorrer, y la única prueba que
vale es atravesar todo su largo.
Por ahí recorrer, mirando, mirando, sin aliento.**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 12 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. bajo la asesoría de la Dra. Haydé Rosas Vargas y del Dr. Bulmaro Cisneros Vega.

Indice

	Página
Indice de figuras y tablas	iv
Abreviaturas	v
Resumen	vii
I Introducción	1
1.1 La Distrofia Muscular de Duchenne	1
1.2 El gene <i>dmd</i> y las isoformas de distrofina	2
1.3 El gene <i>utrn</i> y las isoformas de utrofina	4
1.4 Estructura proteica de la distrofina y de la utrofina	6
1.5 El complejo de proteínas asociadas a distrofina/utrofina	8
1.5.1 El complejo distroglicano	9
1.5.2 El complejo sarcoglicano-sarcospan	10
1.5.3 El subcomplejo citoplasmático distrobrevina-sintrofinas	10
1.6 Funciones de la distrofina y de la utrofina	11
1.7 El ratón <i>mdx</i> como modelo de estudio de la DMD	13
1.8 Terapias contra la DMD	15
1.9 Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa	17
1.9.1 RT	17
1.9.2 PCR	19
1.9.3 Aspectos teóricos de la RT-PCR	22
1.9.4 Uso de moléculas de RNA como estándares en el RT-PCR semi-cuantitativo.	23
II Justificación	28

III Objetivos	29
3.1 Objetivo general	29
3.2 Objetivos particulares	29
IV Estrategia experimental	30
V Metodología	32
5.1 Obtención de tejidos	32
5.2 Caracterización de los ratones <i>mdx</i> mediante PCR	32
5.2.1 Extracción de DNA	32
5.2.2 PCR	33
5.3 Purificación de RNA total	34
5.4 Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído	34
5.5 Síntesis de cDNA	34
5.6 Síntesis de RNA estándar	35
5.6.1 Síntesis de cDNA y PCR	35
5.6.2 Transcripción <i>in vitro</i>	36
5.7 Marcaje radiactivo del oligo DRPI.R	37
5.8 RT-PCR semi-cuantitativo	37
VI Resultados	38
6.1 Síntesis de un RNA estándar como control exógeno	38
6.2 Estandarización del PCR competitivo	40
6.3 Sensibilidad del ensayo de RT-PCR	41
6.4 Caracterización de ratones <i>mdx</i>	42
6.5 Análisis semi-cuantitativo de la expresión de utrofina en el ratón <i>mdx</i>	44
VII Discusión	50

VIII Conclusiones	55
IX Glosario	56
X Referencias	59

Índice de figuras y tablas

	Página
Figura 1. La distrofina y sus isoformas	3
Figura 2. La utrofina y sus isoformas	5
Figura 3. Organización de los dominios del extremo C-terminal de distrofina y utrofina	8
Figura 4. El complejo de proteínas asociadas a la distrofina y a la utrofina (DAPC)	9
Figura 5. Etapas de la RT-PCR	19
Figura 6. Pasos de la PCR	21
Figura 7. Curva estándar para la obtención de los niveles absolutos de un mRNA	27
Figura 8. Diagrama de flujo de los pasos involucrados en la reacción de RT-PCR semi-cuantitativo	27
Figura 9. Diagrama de flujo estrategia experimental	31
Figura 10. Síntesis del RNA estándar	39
Figura 11. Estrategia para la síntesis de RNA estándar	39
Figura 12. RT-PCR competitivo para el transcrito de la Up400	40
Figura 13. Análisis de la sensibilidad del método de RT-PCR semicuantitativo	41
Figura 14. Estrategia para la caracterización genotípica de los ratones <i>mdx</i>	43
Figura 15. Caracterización de los ratones <i>mdx</i>	44
Figura 16. Integridad del RNA total de los tejidos de ratón	45
Figura 17. Expresión de la utrofina en los tejidos del ratón silvestre C57BL/6	46
Figura 18. Expresión de la utrofina en los tejidos del ratón <i>mdx</i>	47
Figura 19. Niveles relativos del transcrito de utrofina	48
Tabla I. Características comparativas entre la distrofina y la utrofina	12
Tabla II. Secuencia de oligonucleótidos empleados en los ensayos de PCR	35
Tabla III. Expresión relativa de la utrofina	49

Abreviaturas

ABS	sitio de unión a actina
Agua DEPC	agua dietilpirocarbonatada
°C	grados centígrados
cDNA	DNA complementario
cpm	cuentas por minuto
DAPC	complejo de proteínas asociadas a distrofina/utrofina
DMD	distrofia muscular de Duchenne
<i>dmd</i>	gene codificante para distrofina
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleótidos trifosfato
DRP	proteína relacionada a la distrofina (utrofina)
DTT	ditiotreitól
[γ - ³² P]-ATP	adenosintrifosfato marcado con fósforo radiactivo en posición gamma
Kb	kilobases
kDa	kilodaltones
Mb	megabases
mM	milimolar
mRNA	RNA mensajero
ng	nanogramos
PBS	buffer salino de fosfatos

PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pg	picogramos
RNA	ácido ribonucleico
rNTPs	ribonucleótidos trifosfatos
rRNA	RNA ribosomal
RT	transcripción reversa
SNC	sistema nervioso central
<i>utrn</i>	gene codificante para utrofina
UV	luz ultravioleta
μ Ci	microcuries
μ g	microgramos
μ l	microlitros

Resumen

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X, caracterizada por la ausencia de la distrofina. La falta de esta proteína en el músculo esquelético genera una inestabilidad membranal que afecta directamente la función y homeostasis de la miofibra. La DMD tiene una frecuencia de 1 en cada 3500 varones nacidos vivos en todo el mundo, mismos que fallecen alrededor de los 30 años de edad debido a insuficiencia cardíaca y/o respiratoria causada por debilidad de los músculos intercostales y del diafragma.

La distrofina está codificada por el gene más grande descrito a la fecha (2.5 Mb) su transcrito es de 14 Kb y la proteína tiene un peso de 427 KDa. Los dominios que componen a la distrofina le permiten interactuar con la actina, así como con proteínas membranales enlazando el citoesqueleto con la matriz extracelular. Tiempo después de la clonación del gene de la distrofina, se demostró la existencia de una proteína expresada extensamente que es codificada en el cromosoma 6 humano: la utrofina. La distrofina y la utrofina tienen una organización genómica similar y consecuentemente una alta homología estructural; interesantemente se ha demostrado que la utrofina se encuentra en altos niveles en músculo distrófico, lo cual sugirió que puede compensar funcionalmente la falta de distrofina en este tejido. Se han desarrollado estrategias terapéuticas experimentales encaminadas a aumentar la expresión de utrofina en el músculo esquelético utilizando modelos animales como el ratón *mdx*, el cual se originó por una mutación espontánea en el gene de la distrofina por lo que carece totalmente de ella, y presenta características histopatológicas similares a las observadas en los pacientes con DMD que se revierten tras la sobreexpresión de utrofina.

Debido a que la sobreexpresión de utrofina se comienza a emplear experimentalmente como un camino terapéutico prometedor contra la DMD, es necesario contar con un método rápido y sensible que nos permita evaluar su expresión. Con esta finalidad, en este trabajo se evaluó un método particular de RT-PCR semi-cuantitativo, con el que se analizaron los niveles relativos del RNA mensajero de la utrofina en diversos órganos de ratones silvestres y *mdx*. Los resultados muestran que el método de cuantificación es confiable y sensible, que los niveles del mensajero no son los mismos en varios de los tejidos analizados y que no existen diferencias significativas en los niveles del mensajero cuando se compara el mismo tipo de tejido entre ratones silvestres y *mdx*, lo cual no corresponde con las diferencias reportadas a nivel de proteína, por lo que se podría sugerir una regulación de la expresión de utrofina a nivel post-transcripcional.

Capítulo 1

Introducción

1.1 La Distrofia Muscular de Duchenne

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad neuromuscular hereditaria causada por mutaciones en el gene *dmd* que se transmiten de forma recesiva ligadas al cromosoma X. La DMD se presenta con una frecuencia de 1 en cada 3500 varones nacidos vivos en todo el mundo y se caracteriza principalmente por degeneración muscular progresiva que aparece durante los primeros años de vida y evoluciona a formas severas causando la muerte de los varones afectados antes de los 30 años de edad, debido a una deficiencia cardíaca y/o respiratoria (Emery, 1993).

Los pacientes con DMD presentan fases recurrentes de degeneración de las fibras musculares y, debido a la capacidad limitada de regeneración de las fibras dañadas, se produce una acumulación gradual de tejido conectivo fibroso e infiltración de grasa en las zonas afectadas lo cual a su vez produce pseudohipertrofia y finalmente un abatimiento total de la función de la fibra muscular. Entre las características clínicas observadas en los individuos con DMD se encuentran: debilidad muscular progresiva, contracturas, cardiomiopatía severa y disfunción de la retina, además de un déficit cognoscitivo no progresivo registrado en un tercio de los casos. En esta subpoblación de los pacientes con DMD, se detecta un ligero retraso mental que se caracteriza por dificultades en la capacidad de razonamiento, lenguaje y lectura (Billard et al., 1992).

1.2 El gene *dmd* y las isoformas de distrofina

El gene *dmd* se identificó en 1987 por clonación posicional (Koenig et al., 1987), siendo el más grande reportado a la fecha. Su secuencia codificante está distribuida en 79 exones que se expanden sobre 2500 Mb de DNA genómico en el locus Xp21 de humano (Monaco et al., 1992; Roberts et al., 1993).

La expresión del gene *dmd* se controla de forma compleja; ya que a lo largo de su secuencia existen al menos 7 promotores que están regulados durante las diferentes etapas del desarrollo y de manera tejida específica. A partir de estos promotores se producen varias isoformas de la distrofina que se diferencian entre sí de acuerdo a su peso molecular (figura 1A). La distrofina de longitud completa se transcribe a partir de 3 promotores: un promotor *M* activo en músculo esquelético y cardíaco, un promotor *B* activo en hipocampo y corteza cerebral, y un promotor *P* que dirige la síntesis de distrofina en las células cerebelares de Purkinje. El mRNA producido en los tres casos es de 14 Kb, pero cada uno de ellos tiene un primer exón único, ensamblado con un segundo exón común. Finalmente, los tres transcritos producen una proteína de 427 KDa (Dp427). (Sadoulet-Puccio & Kunkel 1996). La Dp427 está formada por 4 dominios (figura 1B): un dominio amino terminal de unión a actina, un dominio central con estructura de triple hélice, un dominio rico en cisteínas y un dominio carboxilo terminal, estos dos últimos están involucrados en la

interacción de distrofina con un complejo de proteínas asociadas a membrana conocidas en conjunto como complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAP) (Ervasti & Campbell, 1993).

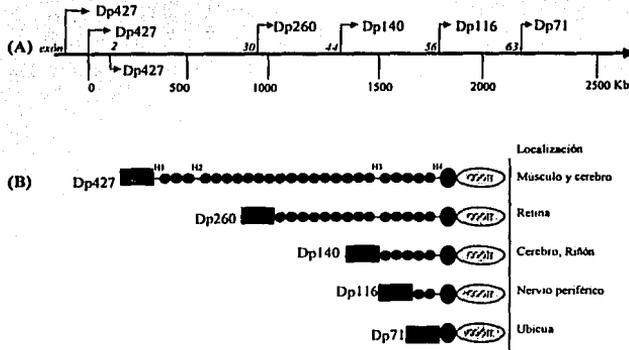


Figura 1. La distrofina y sus isoformas. (A) Esquema del gen *dmd* en el cual se indican los exones donde se localizan los diferentes promotores que dan origen a las isoformas de la distrofina, nombrados de acuerdo a su peso molecular. (B) Representación de la estructura de la distrofina y de sus isoformas. Se indica el extremo amino terminal el cual, en las isoformas pequeñas Dp260, Dp116 y Dp71 no es homólogo al de la Dp427. Los pequeños círculos representan el dominio medio helicoidal en el cual se indican las regiones de bisagra (H1-H4). Se muestra la región rica en cisteínas en forma de óvalo seguida por el dominio carboxilo terminal. Estas dos últimas regiones son importantes para la unión con el complejo DAP. (Blake & Kröger 2000)

El gene codifica cuatro transcritos adicionales a partir de promotores situados hacia el extremo 3' del gene: el promotor de retina, localizado hacia el extremo 5' del exón 30, da lugar a la isoforma de 260 KDa (Dp260). Una isoforma de 140 KDa (Dp140) se sintetiza a partir de un promotor localizado hacia el extremo 5' del exón 44, el cual es activo en SNC y en riñón. Una isoforma de 116 KDa (Dp116), presente en sistema nervioso periférico, es regulada por su promotor situado hacia el extremo 5' del exón 56. Finalmente, un promotor localizado entre los exones 62 y 63 regula la producción de un transcrito de 6.5 Kb que

codifica la isoforma de 71 KDa (Dp71), cuya expresión es extensa en tejidos musculares, principalmente en cerebro. La Dp71 es el producto mayoritario del gene *dmd* y mediante el procesamiento alternativo de los exones 71 a 74 y 78 genera variantes que muestran una localización subcelular diferente, dependiente de la presencia o ausencia de los exones 71 y 78 (González et al., 2000).

1.3 El gene *utrn* y las isoformas de utrofina

Dos años después de la clonación del gene *dmd* se identificó una proteína con gran homología a la distrofina, inicialmente llamada proteína relacionada a la distrofina (DRP por sus siglas en inglés) y posteriormente conocida como utrofina debido a su patrón de expresión ubicua. La utrofina se identificó al analizar una librería de cDNA de músculo esquelético fetal, utilizando como sondas oligonucleótidos dirigidos contra el dominio carboxilo terminal de la distrofina (Love et al., 1989); subsecuentemente se ubicó el gene de la utrofina (*utrn*) en el cromosoma 10 de ratón y en el cromosoma 6 humano (banda 6q24). La utrofina está codificada por un gene organizado de forma similar al de la distrofina y excepcionalmente largo, ya que contiene al menos 34 exones que abarcan más de 1 Mb en el genoma humano (Tinsley et al., 1992; Pearce et al., 1993). El gene codifica para un transcrito de 13 Kb regulado por un promotor de tipo *housekeeping* (Dennis et al., 1996), la traducción da origen a una proteína de 400 KDa presente en la mayoría de los tejidos y cultivos celulares analizados a la fecha (Love et al., 1991; Khurana et al., 1991, 1992; Matsumura et al., 1993; Pons et al., 1994; Fabbrizio et al., 1995). Estructuralmente, la utrofina es similar a la distrofina, ya que contiene un dominio amino terminal de unión a actina, una región central de triple hélice, una región rica en cisteínas y un dominio carboxilo terminal que también es capaz de unirse al complejo DAP (Winder et al., 1997). De hecho, la comparación de la secuencia de aminoácidos entre las dos proteínas muestra una identidad mayor al 70% en los dominios amino y carboxilo terminales (Pearce et al., 1993).

La utrofina también presenta varias isoformas (figura 2). Blake y colaboradores describieron un mensajero de 5.5 Kb que codifica para una proteína de 113 KDa conocida

como G-utrofina. Esta proteína se expresa en la espina dorsal sensorial y en los ganglios craneales, y en general es abundante en el sistema nervioso. La G-utrofina contiene un extremo amino terminal único, además de los repetidos 21 al 23 del dominio medio, la región rica en cisteínas y el dominio carboxilo terminal de la distrofina, por lo cual se le considera como el homólogo autosómico de la Dp116 (Blake et al., 1995).

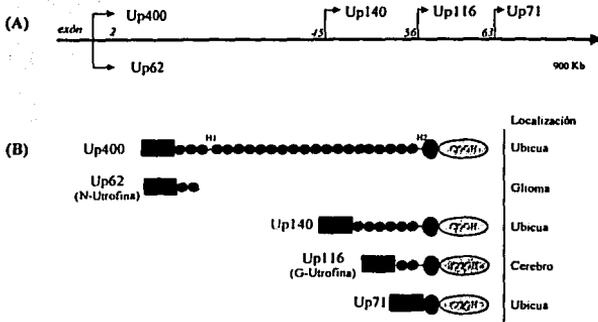


Figura 2. La utrofina y sus isoformas. (A) Representación esquemática del gen de la utrofina en el cual se indican los exones donde se localizan los diferentes promotores que regulan la expresión de las diversas isoformas. (B) Esquema de la estructura primaria de la utrofina y de sus isoformas, nombradas de acuerdo a su peso molecular; se indican los extremos amino y carboxilo terminales, el dominio central se muestra a manera de pequeños círculos y la región rica en cisteínas se indica como un óvalo adyacente al dominio carboxilo terminal. (Winder 1997; Wilson et al., 1999).

Se han descrito además las isoformas de 71 y 155 KDa (Up71 y Up140), las cuales son producidas a partir de mRNAs de 4.0 y 6.7 Kb, respectivamente. La Up140 esta constituida por los últimos 6 repetidos del dominio medio, la región rica en cisteínas y el dominio carboxilo terminal, mientras que la Up71 presenta un dominio amino terminal único y los dominios rico en cisteínas y carboxilo terminal. Ambas isoformas presentan un primer exón único, y al igual que sus homólogos de distrofina, presentan procesamiento diferencial del exón 71, pero no del 78 (Wilson et al., 1999). Las isoformas pequeñas

difieren de la utrofina de longitud completa en el mismo punto del gene en que difieren las distrofinas cortas con respecto a la Dp427, por lo que se considera que ambos genes son resultado de una duplicación a partir de un gene ancestral común (Wang et al., 1998).

Adicionalmente, se ha descrito una proteína de 80 KDa presente en SNC y arterias periféricas pequeñas, sin embargo su mRNA no se ha encontrado y se cree que en realidad es la Up71. Por otro lado, en células C6 de glioma de rata se identificó a la isoforma de utrofina Up62 o N-utrofina, producida a partir de transcritos de 3.7 y 3.4 Kb (Zuellig et al., 2000). Esta isoforma presenta el dominio amino terminal y los primeros dos y medio repetidos del dominio central.

1.4 Estructura proteica de la distrofina y de la utrofina

La distrofina y la utrofina se han clasificado como miembros de la familia de proteínas de citoesqueleto que también contiene a la α -actinina y a la espectrina. Estas proteínas comparten los siguientes elementos estructurales: un dominio amino terminal de unión a F-actina, un dominio central super enrollado de triple hélice y un dominio carboxilo terminal de unión a proteínas de membrana y a elementos regulatorios (Winder, 1997).

El dominio amino terminal tiene una similitud del 85% entre ambas proteínas (Pearce et al., 1993) y está formado por los primeros 240 aminoácidos dentro de los cuales existen 3 sitios de unión a F-actina nombrados por sus siglas en inglés como ABS 1-3 (actin binding site) numerados del extremo amino terminal hacia el carboxilo terminal. La interacción con F-actina se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Winder, 1997), y si bien ninguno de estos subdominios es esencial para la unión con actina, los tres contribuyen para la conformación correcta del sitio de interacción.

El dominio medio de distrofina está formado por aproximadamente 2400 aminoácidos que se distribuyen en 24 unidades repetidas de ~110 residuos cada una; estos repetidos forman una triple hélice super enrollada similar a la de espectrina la cual se interrumpe por 4 regiones ricas en prolina que funcionan como bisagras (H1-H4)

proporcionando flexibilidad a la molécula (Sadoulet & Kunkel 1996). Dentro de este dominio, en distrofina mas no en utrofina, se han identificado 2 ABS adicionales (ABS 4-5, repetidos 1-10 y 12-16 respectivamente) (Amann et al., 1998) los cuales regulan su interacción con actina a través de su fosforilación por la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA), caseína cinasa II (CKII) y proteína cinasa C (PKC) (Senter et al., 1995). El análisis de la secuencia de utrofina revela que contiene solo 22 repetidos y 2 bisagras, debido a la ausencia de los repetidos 15 y 19 presentes en distrofina. Por lo que respecta a este dominio, la homología es menor al 45% entre ambas proteínas (figuras 1 y 2) (Pearce et al., 1993).

El dominio carboxilo terminal es el más importante funcionalmente, ya que la presencia de mutaciones en esta región causan el fenotipo más severo de la DMD. Este dominio presenta una homología del 83% entre ambas moléculas, está separado del dominio central por una región rica en cisteínas seguido por un dominio WW, dos dominios EF, un dominio ZZ y dos regiones super enrolladas (figura 3) (Winder, 1997). El dominio WW está formado por aproximadamente 40 aminoácidos con dos residuos de triptófano altamente conservados, este dominio se une directamente con la proteína transmembranal β -distroglicano del complejo DAP a través de su secuencia consenso de interacción PPxY (donde P es prolina, x cualquier aminoácido y Y tirosina). Por otro lado, los dominios EF contienen regiones que forman sitios de unión a calcio y por lo tanto pueden funcionar como sensores de este ión. Se ha demostrado que el dominio EF estabiliza la interacción del dominio WW con el β -distroglicano. El dominio ZZ representa un sitio aceptor de zinc y al igual que el dominio EF mantiene la estabilidad en la interacción de distrofina/utrofina con β -distroglicano (Rentschler et al., 1999). La estructura final del extremo carboxilo terminal de distrofina contiene un par de hélices en forma de dímeros antiparalelos que generan una región super enrollada que contiene sitios de unión para componentes citoplasmáticos del complejo DAP como α -distrobrevina, y sintrofinas (Anh & Kunkel, 1995). Por otra parte, dentro de los últimos 200 aminoácidos de la distrofina existen sitios susceptibles de fosforilación, los cuales no están conservados en la utrofina.

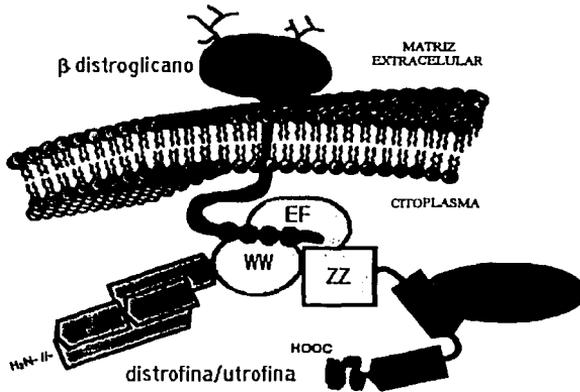


Figura 3. Organización de los dominios del extremo C-terminal de distrofina y utrofina. El dominio WW de la distrofina y utrofina se une al β -distroglicano a través de la secuencia consenso PPXY, la unión es estabilizada por los dominios EF y ZZ. La región super-enrollada puede unirse con sintrofinas (Sint) y distrobrevina. (Winder 1997).

1.5 El complejo de proteínas asociadas a distrofina/utrofina

La distrofina y la utrofina interactúan con proteínas integrales y periféricas de la membrana plasmática formando el denominado complejo de proteínas asociadas a distrofina/utrofina (DAP) el cual forma un puente molecular que enlaza el citoesqueleto con la matriz extracelular (figura 4). En el músculo el ensamble de este complejo depende de la presencia de la distrofina ya que en su ausencia se observa una disminución en los niveles de los componentes del complejo DAP. Se piensa que tales alteraciones contribuyen directamente con la patología observada en el músculo deficiente de distrofina. El complejo DAP está integrado por varias proteínas las cuales se agrupan en tres subcomplejos: el complejo distroglicano, el complejo sarcoglicano-sarcospan y el complejo citoplasmático distrobrevina-sintrofinas.

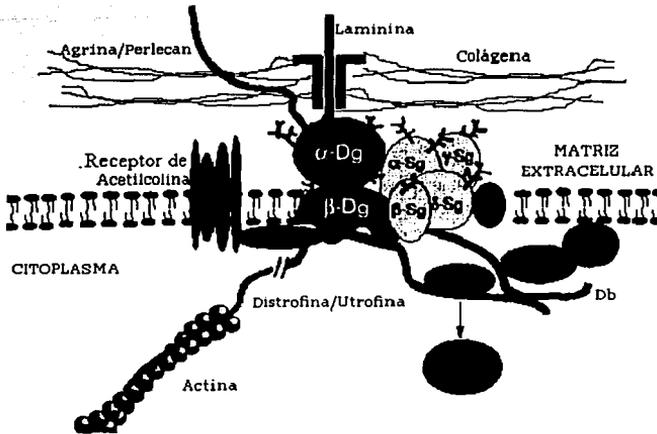


Figura 4. El complejo de proteínas asociadas a la distrofina y a la utrofina (DAPC). La distrofina y la utrofina pueden formar un puente molecular entre el citoesqueleto y la matriz extracelular mediante su unión con F-actina a través de su dominio amino terminal y con laminina, agrina o perlecan a través de su interacción con el complejo de los distroglicanos (α -Dg y β -Dg). α -, β -, γ - δ -Sg=sarcoglicanos, Spn=sarcospan, Sini=sintrofina. Db=distrovirebina. (Chamberlain & Benlan 2000).

1.5.1 El complejo distroglicano

El complejo distroglicano está integrado por dos glicoproteínas: α -distroglicano (156KDa) y β -distroglicano (43KDa), ambas codificadas por un mismo gene (locus 3p21) y generadas a partir de un precursor común por rompimiento proteolítico. El α -distroglicano se localiza extracelularmente e interacciona a través de grupos carbohidratos con componentes de la matriz extracelular, tales como laminina-2, laminina-4, perlecan y agrina. Adicionalmente, se ha reportado que el α -distroglicano actúa como receptor para agentes infecciosos tales como *Mycobacterium leprae*, el virus de la fiebre de Lassa y el virus de la coriomeningitis linfocítica (Rambukkana, et al., 1998; Cao et al., 1998). Por su parte el β -distroglicano es una proteína transmembranal que se une por su extremo amino terminal al α -distroglicano y a través de su extremo carboxilo a los dominios WW y EF de la región rica en cisteínas de la distrofina y/o la utrofina. La expresión de los distroglicanos

es extensa, encontrándose en todos los tejidos y tipos celulares de los vertebrados estudiados a la fecha y es esencial en las primeras etapas del desarrollo embrionario. Por otro lado, la región citoplasmática del β -distroglicano presenta sitios de unión a moléculas involucradas en la transducción de señales como las proteínas adaptadoras con dominios SH2 y SH3 (GRB2), la cinasa de adhesión focal (FAK) y la $\alpha 5 \beta 1$ -integrina, lo que sugiere que su función no es únicamente estructural (Winder, 2001).

1.5.2 El complejo sarcoglicano-sarcospan

El complejo sarcoglicano se compone de 4 glicoproteínas transmembranales conocidas como α -, β -, γ - y δ - sarcoglicano, así como de un miembro de la familia de proteínas de la tetraspanina llamado sarcospan. Estos componentes se codifican en distintos genes autosómicos y su expresión es predominante en el tejido muscular. El ensamble y el tráfico del complejo sarcoglicano a la membrana depende de la síntesis coordinada de todos sus componentes, por lo que la pérdida de uno de ellos produce una disminución en los niveles del resto de los integrantes del complejo. Lo anterior se observa en diferentes tipos de distrofia muscular de cintura autosómico-recesivas conocidas como LGMD por sus siglas en inglés (limb-girdle muscular dystrophy) (Campbell & Straub, 1997).

1.5.3 El subcomplejo citoplasmático distrobrevina-sintrofina

Este complejo lo integran las isoformas de la sintrofina y de la distrobrevina, proteínas periféricas de membrana que se asocian con la región super enrollada del dominio carboxilo terminal de la distrofina y/o la utrofina. Las sintrofinas contienen dominios PDZ que les permiten conectar al complejo DAP con moléculas involucradas en la transducción de señales, como el canal de sodio, la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), la serina/treonina cinasa asociada a microtúbulos y la proteína cinasa 3 activada por estrés (Brenman et al., 1996; Lumeng et al., 1999). Se conocen 5 diferentes sintrofinas: $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ y $\gamma 2$ las cuales son codificadas por diferentes genes. Su patrón de expresión es específica de tejido y depende de las etapas del desarrollo (Peters et al., 1997), lo cual

indica que los complejos DAPs pueden contener diferentes sintrofinas y muy probablemente realicen funciones diferentes. A este respecto, se han encontrado varias isoformas de sintrofina en un mismo tipo celular pero con distinta localización subcelular, lo cual fortalece la hipótesis de la función diferencial.

Por otro lado, la familia de las distrobrevinas está codificada por al menos dos genes que producen a la α -distrobrevina y a la β -distrobrevina (Sadoulet-Puccio et al., 1996; Peters et al., 1997; Blake et al., 1998). Existen diferentes isoformas de la α -distrobrevina que se expresan en músculo debido al procesamiento alternativo que experimenta su transcrito primario: la α -distrobrevina-1 reside principalmente en la unión neuromuscular, mientras que la α -distrobrevina-2 se encuentra a lo largo del sarcolema. La β -distrobrevina es característica de tejidos no musculares y se ha encontrado asociada con la sintrofina y con la Dp71.

1.6 Funciones de la distrofina y de la utrofina

En los pacientes con DMD se sugiere que los defectos en la membrana de la fibra muscular debidos a la ausencia de distrofina causan un influjo anormal de calcio, lo cual provoca un aumento en la actividad de proteasas dependientes de calcio, disminución de la estabilidad osmótica membranal, lisis celular, daño tisular y finalmente miopatía (Gillis, 1996). La distrofina es una proteína de citoesqueleto que se localiza a lo largo del sarcolema de la fibra muscular asociada con el complejo DAP; por lo anterior se le ha implicado en el mantenimiento de la integridad membranal confiriendo estabilidad mecánica a la fibra muscular durante los ciclos de contracción-relajación (Petrof et al., 1993). Por otro lado, se sugiere que la utrofina actúa como un homólogo fetal de la distrofina debido a su abundancia en tejidos fetales (Love et al., 1991; Rigoletto et al., 1995). En el caso particular del músculo esquelético, los niveles de utrofina son abundantes en etapa fetal y van disminuyendo conforme el tejido se va desarrollando, concomitantemente va aumentando la expresión de la distrofina.

Tabla 1. Características comparativas entre la distrofina y la utrofina

	DISTROFINA	UTROFINA
LOCUS	Xp21	6q24
TAMAÑO DEL GENE	2.5 X 10 ⁶ pb	9 X 10 ⁶ pb
PESO MOLECULAR DE LA PROTEINA	427 KDa	400Ka
DOMINIOS	4 dominios; N.terminal, rod, rico en cisteínas, C-terminal	Los mismos que distrofina
PRESENCIA DE ISOFORMAS	Si	Si
REGULACIÓN DURANTE EL DESARROLLO	Si	Si
EXPRESIÓN EN TEJIDOS	Músculo, corazón y cerebro	Todos los tejidos
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR EN LA MIOFIBRA	A lo largo del sarcolema	Unión neuromuscular
PROTEINAS ASOCIADAS	DAP	DAP
AUSENCIA PATOLÓGICA	DMD	Ninguna
SOBRERREGULACIÓN ESPONTÁNEA	-	Deficiencia de distrofina y Miopatías inflamatorias

Adicionalmente, la presencia de la distrofina en determinadas regiones de la célula tales como las depresiones de la membrana post-sináptica de la unión neuromuscular y de la utrofina en las crestas de la unión neuromuscular, sugiere que ambas moléculas pueden organizar especializaciones membranales como el agrupamiento de canales de sodio y receptores de acetilcolina, respectivamente. La presencia de utrofina en los contactos

célula-célula y/o célula-matriz extracelular sugieren un papel adicional de esta proteína en estas regiones especializadas. Finalmente, existen varias evidencias que sugieren la participación de la distrofina y utrofina a través del complejo DAP en eventos de transducción de señales, entre ellas se pueden señalar las siguientes: 1) en la región citoplasmática del β -distroglicano residen sitios de unión para la proteína adaptadora GRB2 a través de la cual puede interactuar con la cinasa de adhesión focal FAK (Yoshida et al., 1998), 2) el complejo DAP y la utrofina se asocian con estructuras de adhesión focal enriquecidas con integrinas del tipo $\alpha 5\beta 1$, 3) el complejo DAP y la utrofina colocalizan con canales de Na^+ y receptores de acetilcolina en músculo y cerebro (Gee et al., 1998), 4) las sintrofinas pueden asociarse a la nNOS, a los canales de sodio activados por voltaje, a las cinasas de serina/treonina asociadas a microtúbulos y a la proteína cinasa-3 activada por estrés (Brennan et al., 1996; Lumeng et al., 1999). Lo anterior sugiere que la distrofina y la utrofina a través del complejo DAP tienen funciones que van más allá del mantenimiento de la integridad membranal. En la tabla 1 se muestran las semejanzas y diferencias entre la distrofina y la utrofina.

1.7 El ratón *mdx* como modelo de estudio de la DMD

Los modelos animales en el estudio de la distrofia muscular han sido fundamentales para la comprensión de la patofisiología de esta enfermedad, así como para la investigación de terapias experimentales. El perro carente de distrofina exhibe un desorden progresivo mucho más rápido que los pacientes humanos, mientras que el gato y el ratón carentes de distrofina muestran una enfermedad benigna con hipertrofia muscular como uno de los síntomas más obvios comparados con los individuos con DMD (Hoffman & Dressman 2001). De estos animales se ha utilizado más ampliamente el modelo murino, con el cual se han logrado los mayores avances en el estudio de la DMD.

El ratón *mdx* se generó por una mutación espontánea cuya consecuencia es la deficiencia de la distrofina (Hoffman et al., 1987). Este ratón se identificó durante el análisis bioquímico de la cepa C57BL/10 la cual presentaba altos niveles séricos de las enzimas musculares piruvato cinasa y creatina cinasa, así como lesiones histopatológicas

características de la distrofia muscular (Bulfield et al., 1984). En este mismo reporte, el análisis de ligamiento demostró que este fenotipo se hereda ligado al cromosoma X, por lo que esta nueva cepa se nombró como *mdx* por sus siglas en inglés (*X chromosome-linked muscular dystrophy*).

Posteriormente, se clonó el cDNA de la distrofina de ratón y el análisis de la secuencia de los productos de amplificación por PCR demostró la existencia de una sustitución de C por T en la posición 3185 del gene, dentro del exón 23. La consecuencia de esta mutación es la formación de un codón de paro que provoca la terminación prematura de la traducción dando lugar a una proteína truncada que es inestable (Sicinski et al., 1989).

Histológicamente, el ratón *mdx* presenta cambios similares a los observados en los pacientes jóvenes con DMD: variación en el tamaño de la fibra muscular, núcleos localizados centralmente, infiltración celular y fagocitosis, lo cual indica la recurrencia de ciclos de degeneración-regeneración muscular (Fassati et al., 1997). A diferencia de los humanos enfermos, el ratón *mdx* no presenta fibrosis intersticial ni infiltración adiposa, lo cual sugiere que el proceso de regeneración es más rápido y/o que la degeneración es menos severa. Sin embargo los músculos intercostales y del diafragma son la excepción ya que en estos se observa fibrosis como en los pacientes con DMD y en ambos organismos estos músculos pierden progresivamente su función conforme avanza la edad (Lynch et al., 1997). Es importante mencionar que el músculo esquelético del ratón no se ve tan afectado como el de los pacientes; de hecho, el ratón no manifiesta características clínicas, y su tiempo de vida así como su comportamiento es el de un ratón normal.

En el ratón *mdx* se aprecia una capacidad para compensar la falta de distrofina. En este sentido, las proteínas relacionadas estructuralmente como la utrofina son de gran interés para la investigación de terapias potenciales. Al parecer, la utrofina juega un papel importante, ya que sus niveles y su localización se afectan bajo ciertas condiciones de enfermedad. Normalmente la utrofina se encuentra en el sarcolema de las fibras musculares durante el desarrollo fetal, pero al momento del nacimiento es reemplazada por la

distrofina, a partir de este momento, la utrofina se detecta exclusivamente en la unión neuromuscular y miotendinosa (Bewick et al., 1992; Law et al., 1994). No obstante, se pueden encontrar altos niveles de utrofina a lo largo del sarcolema de miofibras en regeneración de ratones *mdx* adultos, así como en tejidos como corazón y cerebro. De manera similar, en el músculo de pacientes con DMD, los niveles de utrofina se incrementan y la expresión se extiende hacia compartimentos extrasinápticos de la fibra muscular (Helliwell et al., 1992; Karpati et al., 1993; Pons et al., 1994).

Por otro lado, se han descrito diferentes mutantes del ratón *mdx* generados a través de agentes químicos como la N-etilnitrosourea. Las mutaciones inducidas se localizan en diferentes regiones del gen provocando la ausencia de una o varias isoformas de la distrofina; de esta manera los ratones mdx^{5cv} , mdx^{2cv} , mdx^{4cv} y mdx^{3cv} carecen de la Dp427; Dp427 y Dp260; Dp427, Dp260 y Dp140; Dp427, Dp260, Dp140 y Dp71 respectivamente. Tales ratones pueden emplearse para el estudio de la función de cada una de estas isoformas de la distrofina (Bin Im et al., 1996).

1.8 Terapias contra la DMD

Con el uso de los modelos animales, principalmente del ratón *mdx*, en los últimos años se han desarrollado experimentalmente diversas estrategias terapéuticas contra la DMD las cuales se han clasificado en tres categorías:

- Terapia génica
- Terapia celular y
- Terapia farmacológica

“La terapia génica de la DMD” consiste en la introducción de DNA terapéutico en el tejido muscular dañado. Se han probado varias alternativas entre las que se encuentran la utilización de vectores virales portadores del cDNA de la distrofina o de la utrofina, así como la introducción de minigenes o de oligonucleótidos antisentido.

El uso de adenovirus como vectores del cDNA o del minigen de la distrofina disminuye considerablemente el fenotipo distrófico en el ratón *mdx*, sin embargo, se presenta una toxicidad elevada y una respuesta inmunológica contra los productos virales incluida la distrofina (Acsadi et al., 1991). La utilización de vectores adeno asociados muestra algunas ventajas ya que se activa de forma mínima la respuesta inmunológica, además, el vector muestra gran afinidad por el tejido muscular y los productos liberados por este persisten por largos periodos de tiempo (Allamand & Campbell 2000; Moisset et al., 2001; Hoffman & Dressman 2001). La misma metodología aplicada para introducir el cDNA de la utrofina o de su minigen en el tejido afectado experimentalmente ha tenido mayor éxito, ya que además de rescatar histológica y funcionalmente el músculo distrófico, no activa la respuesta inmunológica puesto que existe una expresión endógena de utrofina en el tejido muscular (Tinsley et al., 1996; Gilbert et al., 1999; Campbell & Crosbie 1996; Yamamoto et al., 2000). También se ha utilizado la tecnología antisentido contra la DMD, la cual consiste en la liberación de moléculas de RNAs antisentido dirigidos hacia el sitio aceptor de *splicing* presente en el exón mutante del gene *dmd* (exón 23), de esta forma el sitio se "oculta" y el RNA mensajero maduro no incluye el exón mutado (Mann et al., 2000).

"La terapia celular contra la DMD" consiste en el transplante de células miogénicas: mioblastos o células satélite, o incluso de médula ósea obtenidas de organismos sanos. Mediante este procedimiento se han logrado elevar ligeramente los niveles de expresión de la distrofina en el ratón *mdx*. Así mismo, la obtención de células precursoras musculares mejor purificadas y el descubrimiento de fuentes alternas de células como la médula ósea, las células tímicas o fetales y la mejor comprensión de la función del microambiente tisular en la diferenciación y proliferación de los mioblastos vislumbran un futuro prometedor para la aplicación de la terapia celular en la DMD (Hoffman & Dressman 2001).

"La terapia farmacológica" va encaminada a detener la progresión de la degeneración muscular y a la sobre-expresión de proteínas compensatorias, como la utrofina. Los primeros fármacos usados exitosamente contra la progresión de la enfermedad fueron los corticosteroides, como la prednisona y el deflazacort. Recientemente se ha

demostrado que estos fármacos actúan inhibiendo a las células dendríticas tisulares y a los linfocitos T, lo cual promueve la disminución de la proliferación del tejido fibrótico (Morrison et al., 2000). Actualmente se ha reportado el uso de la gentamicina, un aminoglucósido que se une al ribosoma evitando que la traducción se detenga debido a la presencia del codón de paro prematuro en el RNA mensajero de la distrofina (Howard et al., 2000). Este tratamiento se probó en ratones *mdx* los cuales mostraron una mejoría hasta de un 30% (Barton-Davis et al., 1999). Por otro lado, muchos estudios se han dirigido hacia el descubrimiento de sustancias que incrementen la producción endógena de utrofina así como su relocalización a lo largo del sarcolema de la miofibra deficiente en distrofina. La heregulina, un factor de crecimiento derivado de neuritas, ha demostrado ser un potente inductor de la expresión de utrofina, por lo cual aquellas sustancias que favorezcan este efecto podrían ser usadas como agentes terapéuticos. Recientemente se ha descrito un promotor adicional del gene de la utrofina el cual comienza a estudiarse para emplearlo como blanco para su sobre-regulación (Burton et al., 1998).

1.9 Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

1.9.1 Transcripción reversa

El control de la transcripción juega un papel crítico en la regulación de la expresión genética; los niveles de los RNA mensajeros dentro de la célula se modifican en respuesta a una gran variedad de señales que ocurren durante la diferenciación celular, durante las etapas del desarrollo y durante diversos procesos patológicos. Tradicionalmente, los niveles de un mRNA específico se han analizado por métodos como *Northern blot* e hibridación *in situ*, sin embargo estos métodos requieren de gran cantidad de RNA total y consumen mucho tiempo. La aparición de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis et al., 1987) y su combinación con la reacción de transcripción reversa condujo a la creación de la técnica de RT-PCR (Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction por sus siglas en inglés), la cual ha permitido una detección y cuantificación mucho más rápida y sensible de los mRNAs, especialmente de aquellos presentes en baja abundancia, así como en cantidades limitadas de células ó de tejidos (Becker & Hahlbrock 1989).

El paso inicial de la RT-PCR consiste en la purificación de RNA a partir de las células o de los tejidos a estudiar, la obtención de muestras de RNA con alta calidad es un factor crítico para el análisis del transcrito. El método más común para obtener una muestra de RNA puro se basa en el uso de un agente desnaturante potente como el isotiocianato de guanidina, este agente inactiva las ribonucleasas presentes en la muestra y disgrega el resto de los componentes celulares manteniendo intacta la integridad del RNA (Chomczynsky & Sacchi 1987). Todas las preparaciones de RNA se deben analizar mediante electroforesis en gel en condiciones desnaturantes para determinar su integridad, la observación nítida de los rRNAs 28S y 18S es indicativo de tal integridad.

El siguiente paso consiste en la síntesis de un DNA complementario (cDNA) producido a partir del RNA mediante el uso de una transcriptasa reversa. Comúnmente se utilizan 2 tipos principales de retrotranscriptas disponibles comercialmente: la AMV-RT (avian mioblastosis viruses-reverse transcriptase), y la MMLV-RT (moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase). La eficiencia en la conversión de RNA a DNA es de gran importancia para un análisis cuantitativo, generalmente, después de la síntesis de cDNA los restos de RNA se digieren para evitar su interferencia en los pasos posteriores. En la mayoría de los casos, la actividad intrínseca de RNasa H de las enzimas AMV y MMLV es suficiente para degradar el RNA excedente.

Existen 3 formas de iniciar la síntesis de cDNA: iniciación al azar, uso de un oligonucleotido dT y el método denominado gene específico. El método de iniciación al azar utiliza oligonucleotidos pequeños (típicamente hexámeros) los cuales se alinean al azar a las moléculas de RNA a lo largo de su secuencia. En contraste, a través del método oligo dT se transcriben solo los RNAs mensajeros, debido a que el oligonucleotido dT se alinea específicamente a las colas poli-A del mRNA. Por su parte, el método gene específico permite producir únicamente el cDNA del gene de interés, mediante el uso de un oligonucleótido antisentido específico al gene que se desea amplificar (figura 5) (Rashtchian, 1994).

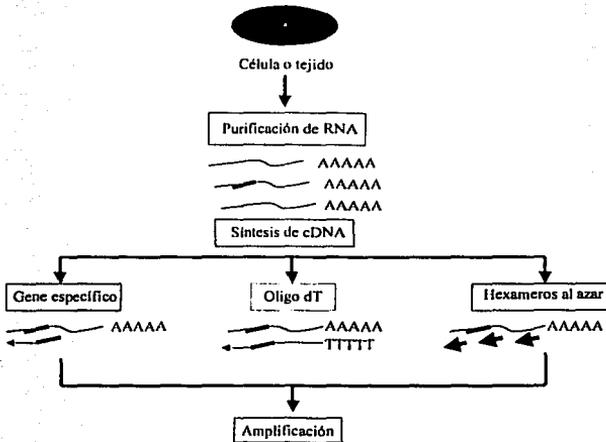


Figura 5 Etapas de la RT-PCR. El RNA total se purifica de la célula o tejido y se retrotranscribe a cDNA mediante una de tres alternativas: a través del método gene específica, mediante el método del oligo dT o mediante el uso de hexámeros al azar. Finalmente el cDNA se amplifica por PCR. (Rashtchian 1994).

1.9.2 Reacción en cadena de la polimerasa

Numerosos reportes han documentado la versatilidad de la PCR; entre las muchas aplicaciones de esta técnica se encuentran la clonación, la caracterización de *splicing* del RNA, la detección de interacciones DNA-proteína, la secuenciación de DNA, el diagnóstico clínico y forense, la obtención de mutantes, la síntesis de sondas de ácidos nucleicos y la amplificación de RNA a través de RT-PCR (Innis et al., 1990).

Después de la reacción de retrotranscripción, el cDNA es amplificado mediante PCR, en la cual las moléculas de DNA blanco son duplicadas *in vitro* por una DNA

polimerasa termoestable. El proceso se lleva a cabo durante tres pasos sucesivos que se repiten cíclicamente: 1) desnaturalización, 2) alineamiento, y 3) extensión o síntesis (figura 6).

1) Desnaturalización- Esta primera etapa se realiza a una temperatura de reacción entre 90°C y 95°C, lo que permite la desnaturalización de la molécula de DNA molde y la destrucción de posibles estructuras secundarias formadas entre los oligonucleótidos utilizados.

2) Alineamiento- Durante este paso hibridan las cadenas de DNA molde con los oligonucleótidos o iniciadores debido a una disminución en la temperatura de 90-95°C a 50-60°C. La temperatura exacta de alineamiento depende de la secuencia y longitud de los iniciadores. De esta forma, las secuencias con alto contenido en GC son más estables y es necesario incrementar la temperatura de alineamiento para permitir su hibridación con el DNA molde. Existen fórmulas que toman en cuenta estos factores para el cálculo de la temperatura óptima de alineamiento.

3) Extensión- Durante este paso la temperatura se eleva a 72°C, punto óptimo para la actividad de la enzima Taq DNA polimerasa, la cual incorpora cada dNTP complementario al DNA molde en dirección 5' a 3' lo que resulta en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción

En cada uno de los ciclos que integran la reacción de PCR, se duplican nuevas cadenas de DNA, lográndose una producción exponencial de millones de copias del segmento de DNA específico sometido al proceso. Los componentes básicos de la reacción son el DNA molde, un par de oligonucleótidos iniciadores que deben flanquear la región que se desea amplificar, una DNA polimerasa termoestable, una mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato y una solución amortiguadora.

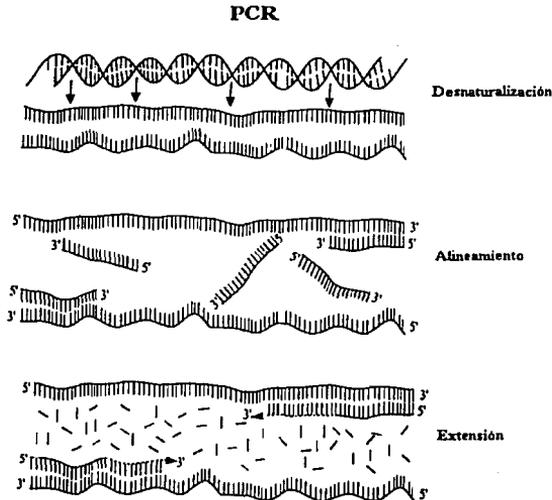


Figura 6. Pasos de la PCR. La amplificación de DNA por PCR consiste de tres pasos sucesivos que se repiten ciclicamente. Durante la desnaturalización se separa la doble hélice de DNA para que durante la fase de alineamiento los oligonucleótidos utilizados hibriden en secuencias específicas flanqueando la secuencia a amplificar. Finalmente durante la fase de extensión la DNA polimerasa sintetiza las cadenas complementarias incorporando a la cadena creciente de DNA los dNTP's correspondientes.

La identidad del producto de amplificación se realiza verificando la longitud del producto mediante un corrimiento electroforético, por secuenciación, mediante análisis del patrón de restricción o por hibridación con sondas específicas. Por otro lado, el método más común para cuantificar los productos de PCR, consiste en la medición de la marca radiactiva presente en uno o ambos oligonucleótidos empleados en la reacción. Existen métodos alternativo basados en el uso de compuestos fluorescentes, o en sistemas biotina-estreptavidina.

1.9.3 Aspectos teóricos de la RT-PCR

El paso de transcripción reversa de la RT-PCR es simple, la única variable es el porcentaje de mRNA que se convierte en cDNA, es decir la eficiencia de la retrotranscripción la cual está representada por la siguiente ecuación:

$$[\text{cDNA}] = [\text{RNA}] \times \text{Eficiencia}$$

La eficiencia puede disminuir notablemente debido a la presencia de contaminantes, así mismo la cantidad de un producto amplificado a partir de dos muestras con cantidades equivalentes de RNA es totalmente diferente entre ambas si la eficiencia de retrotranscripción entre las dos reacciones es diferente.

Por el contrario, el paso de amplificación (PCR) es más complejo que el de retrotranscripción. Como el producto de un ciclo de amplificación sirve como sustrato para el siguiente, la cantidad de este se incrementa exponencialmente como lo indica la siguiente ecuación:

$$N = N_0 (1 + E)^n$$

Donde:

N = número de moléculas amplificadas,

N_0 = número inicial de moléculas,

n = número de ciclos de amplificación y

E = eficiencia de amplificación,

La eficiencia de amplificación es el porcentaje de cDNA copiado por cada ciclo de reacción. De esta forma, diferencias de sólo un 5% en la eficiencia de amplificación entre 2 muestras de cantidades equivalentes de DNA resultan en la generación de casi el doble de producto sintetizado a partir de la muestra con mayor eficiencia.

Experimentalmente la cantidad de producto generado durante la reacción se desvía del caso teórico. La fase exponencial va seguida por una fase conocida como meseta, que generalmente aparece después de 30-35 ciclos de reacción, en la cual los reactivos comienzan a limitarse, hay acumulación de subproductos inhibidores de la polimerasa como los pirofosfatos, o se presenta una pérdida en la actividad propia de la polimerasa, adicionalmente la acumulación de los productos de amplificación promueve una competencia con los oligonucleótidos.

1.9.4 Uso de moléculas de RNA como estándares en el RT-PCR cuantitativo.

La RT-PCR se ha usado extensamente en análisis cualitativos de la expresión de genes, sin embargo, debido a que el proceso requiere de dos pasos enzimáticos: la síntesis del cDNA y la amplificación por PCR, las mediciones cuantitativas de los niveles de RNA en diferentes muestras requieren del uso de controles internos. Por un lado, el paso de síntesis de cDNA es el reflejo de la cantidad de un transcrito sólo si el RNA obtenido es de alta calidad y si la transcripción reversa de este es eficiente. Por otro lado, la amplificación representa el paso crucial del método, es decir, debido a la naturaleza exponencial, pequeñas variaciones en la eficiencia de la amplificación pueden afectar drásticamente el rendimiento del producto. Por otro lado, debido a que la eficiencia disminuye en las últimas etapas de la reacción, cualquier intento para cuantificar un transcrito mediante PCR debe limitarse al análisis de los productos generados solamente durante la fase exponencial de la amplificación. Bajo estas condiciones, la RT-PCR es un método que produce información precisa de los cambios relativos en los niveles de un transcrito (Willard et al., 1999).

Para controlar el proceso, se han utilizado dos tipos generales de estándares (a) estándar endógeno y (b) estándar exógeno; en ambos casos, la cantidad de producto de PCR obtenido del mRNA de interés se compara con el producto amplificado originado a partir de una secuencia de referencia en el mismo tubo de reacción.

a) El método del “estándar endógeno” utiliza un RNA expresado endógenamente (Chelly et al., 1988) el cual es amplificado junto con el RNA blanco, por lo tanto actúa como un control de las variaciones de muestra a muestra durante los dos pasos enzimáticos. Después de la normalización con su control interno respectivo, los niveles de RNA blanco de muestras separadas pueden ser comparados directamente. Los transcritos que codifican enzimas metabólicas, proteínas ribosomales o factores de la traducción son particularmente usados como estándares internos, ya que tienden a expresarse de manera ubicua (por ejemplo, genes *housekeeping* como el de actina, o el de gliceraldehído fosfato deshidrogenasa). Una limitación de este tipo de control es la mayor abundancia del RNA estándar con respecto al RNA blanco, la cinética de amplificación y la duración de la fase exponencial de ambos productos puede ser diferente debido a que no son secuencias homólogas. Adicionalmente, se necesita de un par de iniciadores que reconozcan al RNA estándar, lo cual también es una limitante debido a que estos pueden interferir con los iniciadores que reconocen al RNA blanco.

b) El método del “estándar exógeno” hace uso de un RNA exógeno como control de la reacción, (Wang et al., 1989). El estándar exógeno puede definirse como un RNA sintético producido mediante transcripción *in vitro* que comparte con el RNA blanco los mismos sitios de unión a los oligonucleótidos y que contiene la misma secuencia que este excepto por una pequeña deleción o inserción lo cual permite diferenciar ambas moléculas durante la cuantificación de la señal. Con este método se obtienen varias ventajas como son: i) el RNA exógeno puede sintetizarse fácilmente mediante transcripción *in vitro*; ii) la eficiencia de amplificación es idéntica para ambos RNAs, debido a que ambos transcritos (control y problema) por presentar prácticamente la misma secuencia utilizan el mismo par de iniciadores y iii) los productos de PCR provenientes del RNA estándar y del RNA blanco, se puede diferenciar mediante la inserción o eliminación de nucleótidos en la secuencia del primero. A esta técnica se le conoce también como PCR competitivo ya que como se utiliza solo un par de iniciadores, ambas moléculas de RNA compiten por los oligonucleótidos disponibles.

Después de la co-amplificación la señal generada por el RNA estándar se utiliza para normalizar los valores obtenidos a partir del RNA blanco. Las cantidades relativas de ambas secuencias pueden determinarse mediante la siguiente ecuación:

$$N_{01} / N_{0s} = N_1 (1 + E_2)^n / N_s (1 + E_1)^n$$

Donde:

N_{01} = número inicial de moléculas de RNA blanco,

N_{0s} = número inicial de moléculas de RNA estándar,

N_1 = número de moléculas amplificadas de RNA blanco,

N_s = número de moléculas amplificadas de RNA estándar,

E_1 = eficiencia de amplificación del RNA blanco,

E_2 = eficiencia de amplificación del RNA estándar,

n = número de ciclos de amplificación.

Cuando la eficiencia de amplificación del blanco y del estándar es la misma, la ecuación queda simplificada de la siguiente manera:

$$N_{01} / N_{0s} = N_1 / N_s = A_1 / A_s$$

Donde:

A_1 = cantidad de RNA blanco amplificado (en cpm o en unidades de densidad óptica)

A_s = cantidad de RNA estándar amplificado (en cpm o en unidades de densidad óptica)

De esta forma, se pueden obtener los niveles relativos del transcrito blanco dividiendo las cpm obtenidas de la banda correspondiente al producto endógeno entre las cpm obtenidas a partir de la banda control inmediatamente después de la separación electroforética.

Para obtener resultados absolutos, esto es, determinar el número de moléculas de RNA blanco por unidad de RNA total, se mezcla una cantidad conocida de RNA estándar con una cantidad conocida de RNA total y se realiza la retrotranscripción; subsecuentemente se preparan una serie de diluciones de cDNA las cuales se someten a amplificación. Después de la PCR, se determinan las cantidades de los productos obtenidos del estándar y del blanco y se construye una grafica como se indica en la figura 7. La curva del RNA estándar se genera graficando el logaritmo del numero inicial de moléculas de RNA estándar ($\text{Log } N_{0s}$) como una función del logaritmo de la cantidad de producto amplificado de estándar ($\text{Log } N_s$). La curva del RNA blanco se produce graficando el logaritmo de la cantidad inicial de RNA blanco ($\text{Log } N_{0t}$) como una función de la cantidad de producto amplificado de RNA blanco ($\text{Log } N_t$). Para determinar el número de moléculas de mRNA por unidad de RNA total se elige un valor de N_{0t} donde las curvas son paralelas, esto es donde la eficiencia de amplificación es la misma para ambos RNAs, para ello se traza una línea desde la curva experimental hacia la curva estándar (A a B) y una línea a partir de la curva estándar hacia el eje vertical (B a C). El valor en este punto se considera como el número de moléculas de RNA blanco N_{0t} por cada microgramo de RNA total. Alternativamente, si se conoce la cantidad de RNA total presente en cada célula, se puede calcular el numero de moléculas de RNA blanco por célula. En la figura 8 se esquematizan de forma global los pasos necesarios para llevar a cabo la cuantificación de un mRNA mediante la técnica de RT-PCR

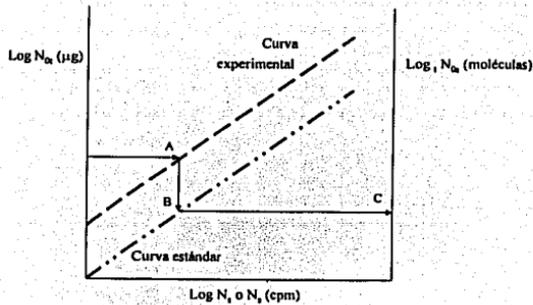


Figura 7. Uso de una curva estándar para la obtención de los niveles absolutos de un mRNA.

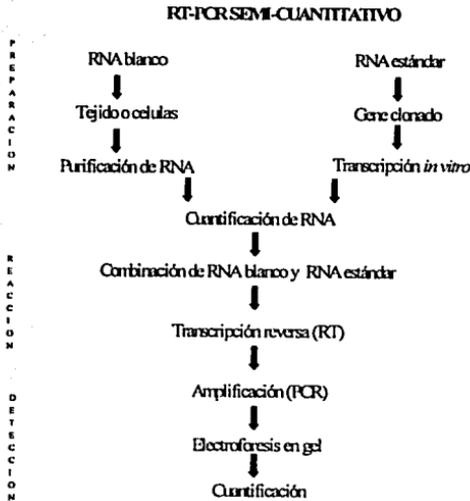


Figura 8. Diagrama de flujo de los pasos involucrados en la reacción de RT-PCR semi-cuantitativo.

Capítulo II

Justificación

La DMD es una enfermedad neuromuscular con una alta incidencia mundial. Actualmente no se conoce ningún tratamiento efectivo, sin embargo, muchos datos experimentales indican que la sobreexpresión de la utrofina en el tejido muscular dañado puede disminuir el fenotipo distrófico en los modelos estudiados, tal como se observa en el ratón *mdx*. Debido a que la sobreexpresión de utrofina se ha comenzado a emplear experimentalmente como un tratamiento contra la DMD, es necesario contar con un método sensible y relativamente sencillo para determinar su expresión. Asimismo, para conocer cómo se regula genéticamente esta proteína, es necesario conocer los niveles de expresión de la utrofina en los diferentes tejidos de los mamíferos. Por lo anterior, en el presente trabajo empleamos la técnica de RT-PCR semi-cuantitativo para analizar la expresión del RNA mensajero de la utrofina en los diferentes órganos del ratón *mdx*, modelo de estudio de la distrofia muscular de Duchenne.

Capítulo III

Objetivos

3.1 Objetivo General

Medir por medio de RT-PCR semi-cuantitativo la expresión del RNA mensajero de la utrofina de longitud completa (Up400) en diferentes tejidos de los ratones *mdx* y silvestres.

3.2 Objetivos Particulares

- a) Sintetizar *in vitro* un RNA estándar para utilizarlo como control exógeno en la reacción de RT-PCR semi-cuantitativo.
- b) Aislar el RNA total de los diferentes tejidos de los ratones *mdx* y silvestres.
- c) Establecer las condiciones óptimas para el ensayo de RT-PCR semi-cuantitativo.
- d) Determinar los niveles relativos del mRNA de la utrofina en los diferentes órganos de los ratones silvestres y *mdx*.

Capítulo IV

Estrategia experimental

La estrategia experimental seguida en este trabajo se dividió en tres etapas las cuales se esquematizan en la figura 9. En la primera etapa (I) se establecieron las condiciones óptimas del PCR competitivo utilizando el RNA total obtenido de las células C2C12 y un RNA estándar obtenido mediante transcripción *in vitro*. La segunda etapa (II) consistió en la caracterización genotípica de los ratones silvestres y *mdx* a través de PCR así como en la obtención de las muestras de RNA total de los diferentes tejidos analizados. En la última etapa (III) se realizó el RT-PCR semi-cuantitativo co-amplificando el RNA total de cada tejido y el RNA estándar, utilizando ^{32}P incorporado a uno de los oligonucleótidos con lo cual se obtuvo mayor sensibilidad.

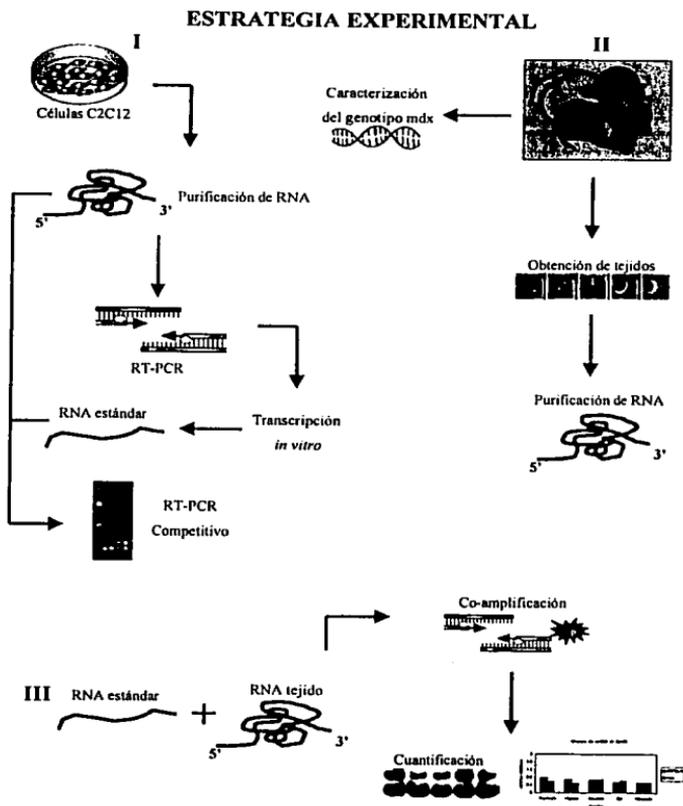


Figura 9. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.

Capítulo V

Metodología

5.1 Obtención de tejidos

Se utilizaron tres ratones silvestres cepa C57BL/6 y tres ratones *mdx*, previamente caracterizados por PCR los cuales se sacrificaron mediante una sobredosis de cloroformo vía inhalatoria. Se extrajeron por disección los siguientes órganos: intestino delgado, testículo, riñón, bazo, hígado, corazón, pulmón, músculo esquelético, cerebro y ojo. Los órganos se lavaron en PBS y se transfirieron de inmediato a criotubos, los cuales se depositaron en nitrógeno líquido para su congelación rápida y se almacenaron en un ultracongelador a -70°C.

5.2 Caracterización de los ratones *mdx* mediante PCR

5.2.1 Extracción de DNA

Se utilizaron muestras de 2 cm de la cola de cada ratón las cuales se digirieron a 55°C en 500 µl de buffer de digestión (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 400 mM, EDTA 100 mM, SDS 0.6 %, proteinasa K 0.6 mg/ml), después se agregaron 180 µl de solución

saturada de NaCl y las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente, se recuperó el sobrenadante y el DNA se precipitó con un volumen de etanol al 95 % . Después de una centrifugación a 8500 rpm por 20 minutos, el DNA se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en 200 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8.0. El DNA se corrió electroforéticamente en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio 0.5 µg/ml y se cuantificó en un espectrofotómetro GeneQuant (Pharmacia Biotech).

5.2.2 PCR

En un volumen total de 25 µl se mezclaron 50 ng de DNA, 200 ng de cada iniciador: p9427 y DMD23 (tabla II), 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1.5 mM, Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM y 2.5 unidades de la enzima Taq polimerasa (GibcoBRL). Los parámetros de la reacción consistieron en un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos consistentes en un paso de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, una etapa de alineamiento a 58°C durante 30 segundos, y un paso de síntesis a 72°C por 1 minuto. De esta reacción, denominada "primera vuelta de PCR", se obtuvo un producto de 245 pb dentro del cual se encuentran representados tanto el alelo silvestre como el mutante. De esta primera reacción, se utilizó 1 µl y se mezcló con 200 ng de los oligonucleótidos p259 y p9427 o p260 y p9427 los cuales diferencian el alelo silvestre del mutante (tabla II), 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1.5 mM, Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM y 2.5 unidades de la enzima Taq DNA polimerasa en un volumen de reacción final de 25 µl. Los parámetros de esta "segunda vuelta de PCR" consistieron en un paso previo de desnaturalización a 94°C por 3 minutos seguidos por 35 ciclos consistentes en un paso de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, un paso de alineamiento a 55°C por 30 segundos y un paso de síntesis a 72°C durante 30 segundos. Finalmente, los productos de PCR, se resolvieron en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio 0.5 µg/ml y se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

5.3 Purificación de RNA total

Una muestra de cada tejido congelado (100 mg) se depositó sobre un mortero previamente esterilizado y congelado sobre un baño de nitrógeno líquido. Posteriormente, la muestra se trituró y homogenizó con 1 ml del reactivo TRIzol (fenol/isotiocianato de guanidina) (GibcoBRL), el cual rompe las células y disgrega los componentes celulares manteniendo la integridad del RNA celular (Chomczynsky & Sacchi 1987). El homogenizado se colectó en un tubo eppendorf donde se mezcló con cloroformo y se centrifugó para separar dos fases. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el RNA con 500 μ l de isopropanol. Enseguida, el RNA se lavó con etanol al 75% y se resuspendió en 200 μ l de agua DEPC. Finalmente el RNA se cuantificó en un espectrofotómetro GeneQuant (Pharmacia Biotech) a una longitud de onda de 260 nm y su integridad se verificó a través de electroforesis en geles de agarosa-formaldehído al 1%.

5.4 Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído

Se disolvió 1 gr de agarosa en 62.5 ml de agua DEPC y se calentó a 60°C hasta su disolución total. Posteriormente, se adicionó la solución amortiguadora de formaldehído gel corrimiento 5 X y formaldehído 12.3 M para obtener una concentración final de 1X y 2.2 M respectivamente en un volumen total de 100 ml. Por otro lado se mezclaron 0.5 μ g de RNA con 3 μ l de solución amortiguadora de carga y 1.0 μ l de bromuro de etidio (1:20 de un stock de 10 mg/ml). La mezcla se calentó a 65°C por 15 minutos y se cargó en el gel previamente precorrído a 100 volts por 5 minutos. Las muestras se sometieron a electroforesis durante 20 minutos a 100 volts y finalmente los geles se visualizaron mediante un transiluminador de luz UV.

5.5 Síntesis de cDNA

Se mezclaron 1 μ g de RNA total (como molde para sintetizar el cDNA) con 1.5 μ g de hexameros al azar (como iniciadores de la reacción) los cuales se desnaturalizaron por 3 minutos a 70 °C; posteriormente se agregaron a la mezcla anterior 200 unidades de la

enzima MMLV-RT (GibcoBRL), solución amortiguadora de síntesis de cDNA 10X (Gibco BRL), solución de dNTPs 10 mM y DTT 0.1 M en un volumen final de 20 µl; la síntesis se llevó a cabo a 37°C durante 1 hora en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

Tabla II Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR.

Producto detectado	Oligo	Secuencia (5' a 3')	Tamaño del producto amplificado	Fuente
Up400 endógena	DRP1.F	5'-ACTGGTGTGCCCTTCTCTGACTTGG-3'	126 pb	Rosas et al., 2000
	DRP1.R	5'-CTCAATCTGGGCACCTCTCCTCATCC-3'		
Up400 Estándar	T7a	5'-TAATACGACTCACTATAGGACTGGTGTGCCCTTCTCTGACTTGG-3'	111 pb	Rosas et al., 2000
	T7b	5'-CACTCTCTCATCCTTTCCACAAATTTAACATATTTTCTCAATCTGGG-3'		
Alelo mdx/silvestre	DMD23	5'-TTCATATGTTCTTCTAGCTTTTGGC-3'	245 pb	Este trabajo
	p9427	5'-AACTCATCAAATATGCGTGTAGTG-3'		
Alelo mdx/silvestre	p259	5'-GTCACCTCAGATAGTTGAAGCCATTTAA-3'	105 pb	Amalfitano & Chamberlain, 1996
	p260	5'-GTCACCTCAGATAGTTGAAGCCATTTAG-3'		

5.6 Síntesis de RNA estándar

5.6.1 Síntesis de cDNA y PCR

Se utilizó 1.0 µg de RNA total purificado de las células C2C12, esta línea celular proviene de mioblastos murinos, los cuales pueden diferenciarse a miotubos contráctiles y producir proteínas musculares características. El RNA se retrotranscribió como se describió anteriormente y el cDNA obtenido se amplificó mediante PCR, utilizando los

oligonucleótidos DRP1.R. y DRP1.F (tabla II). Estos iniciadores reconocen específicamente a la Up400 (ID Y12229 GeneBank) y el producto de amplificación obtenido es de 126 pb, el cual abarca de la base 5303 a la 5428 del cDNA de la utrofina de ratón. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 100 ng de cDNA, 200 μ M de cada dNTP, 200 ng de cada oligonucleótido, $MgCl_2$ 1.5 mM, Tris-HCl 20mM, KCl 50mM y 2.5 unidades de la enzima Taq DNA polimerasa (GibcoBRL), en una mezcla de reacción de 25 μ l. Se llevaron a cabo amplificaciones de 30 ciclos que consistieron en un paso de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, una etapa de alineamiento a 62°C durante 30 segundos y una de polimerización a 72°C por 30 segundos, precedidos por un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos.

El producto obtenido de 126 pb se reamplificó por 35 ciclos empleando las condiciones de reacción antes mencionadas y a los oligonucleótidos T7a y T7b (tabla II). Estos iniciadores producen una delección en el fragmento amplificado debido a modificaciones en su secuencia. El producto de amplificación, de 111 pb, se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio 0.5 μ g/ml y se purificó mediante el *kit* "Concert Gel Extraction Systems" (Gibco BRL). El fragmento purificado se utilizó como molde para la reacción de transcripción *in vitro*.

5.6.2 Transcripción *in vitro*

La reacción de transcripción *in vitro* se llevó a cabo empleando 50 unidades de la RNA polimerasa del fago T7, 200 ng de DNA molde, DTT 10 mM, mezcla de rNTPs 1mM, solución amortiguadora de transcripción 1X y 40 unidades del inhibidor de RNAsas RNasin (Promega), en una mezcla de reacción de 20 μ l. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C y posteriormente el cDNA molde se sometió a digestión con DNasa I durante 15 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, la DNasa I se inactivó por adición de EDTA 25 mM y una incubación a 65°C por 10 minutos. El RNA estándar se precipitó con acetato de sodio 2.6 M pH 5.2 y etanol absoluto, se resuspendió en agua DEPC y se cuantificó en un espectrofotómetro GeneQuant (Pharmacia Biotech) a 260 nm. Para

observar la integridad del RNA sintetizado, este se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

5.7 Marcaje radiactivo del oligo DRP1.R

El marcaje se llevó a cabo mezclando 10 unidades de la enzima T4 polinucleótido cinasa (Gibco BRL), [γ - ^{32}P]-ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 3000 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$), 2 μg de oligonucleótido DRP1.R y la solución amortiguadora de marcaje 5X. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos y posteriormente se calentó a 65°C por 10 minutos para detener la reacción. Finalmente, se determinaron las cpm del producto radioactivo empleando un contador de centelleo Beckman LS 6000SC.

5.8 RT-PCR semi-cuantitativo

Para determinar la cantidad óptima de RNA estándar a utilizar en la reacción de RT-PCR, se co-amplificaron 0.5 μg de RNA total de las células C2C12 con diferentes cantidades de RNA estándar: 1000 pg, 100 pg, 10 pg y 1 pg. Por otro lado, para determinar la sensibilidad del método de medición, se variaron las cantidades de RNA celular: 0.25 μg , 0.5 μg , 1.0 μg y 2.0 μg manteniéndose constante la cantidad de RNA estándar en 10 pg.

Finalmente, a partir del RNA estándar sintetizado y del RNA total obtenido de cada tejido, se sintetizó el cDNA, como se describió anteriormente. La co-amplificación del cDNA se llevó a cabo con los oligos DRP1.F y DRP1.R, este último marcado radiactivamente con ^{32}P en su extremo 5'. Los productos de la co-amplificación se resolvieron en geles de poliacrilamida al 8%. Los geles se secaron y los productos de PCR se cuantificaron en un radioanalizador de imágenes, AMBIS 4000 (Scanalytis). Adicionalmente, los geles se expusieron a una película radiográfica durante 4.5 horas para obtener la placa autorradiográfica. Para determinar la cantidad relativa del mRNA de la utrofina en cada tejido, se calculó la radioactividad (cpm) presente en cada producto de amplificación, los datos se normalizaron dividiendo el valor obtenido de la banda correspondiente a utrofina endógena entre el valor obtenido de la banda control.

Capítulo VI

Resultados

6.1 Síntesis de un RNA estándar como control exógeno

En este trabajo se sintetizó un RNA estándar para utilizarlo como un control exógeno en la reacción de RT-PCR. Con este fin, se purificó el RNA total de las células C2C12 (figura 10A), esta línea celular proviene de mioblastos murinos y tiene la propiedad de diferenciarse a miotubos contráctiles que producen proteínas musculares características. Posteriormente, el RNA total se retrotranscribió a cDNA el cual se amplificó con los iniciadores DRP1.R y DRP1.F, específicos para la Up400 (Rosas et al., 2000). El producto de 126 pb generado (figura 10B, carril 1) se reamplificó utilizando los oligonucleótidos T7a y T7b. Estos oligonucleótidos derivan de los oligos DRP1.F y DRP1.R, pero presentan las modificaciones siguientes: al extremo 5' del oligo DRP1.F se le adicionó la secuencia del promotor de la T7 RNA polimerasa para dar origen al oligo T7a, mientras que al oligo DRP1.R se le incorporó en su extremo 3' una secuencia interna del cDNA de la utrofina para dar origen al oligo T7b (figura 11). Con estos nuevos iniciadores se obtuvo un producto de amplificación de 111pb (figura 10B, carril 2 y figura 11) el cual sirvió como molde para la reacción de transcripción *in vitro* la cual finalmente dió origen al RNA estándar de 93 bases de longitud (figura 10C y 11).

TEMAS CON FALLA DE ORIGEN

Oscar Hernández Hernández

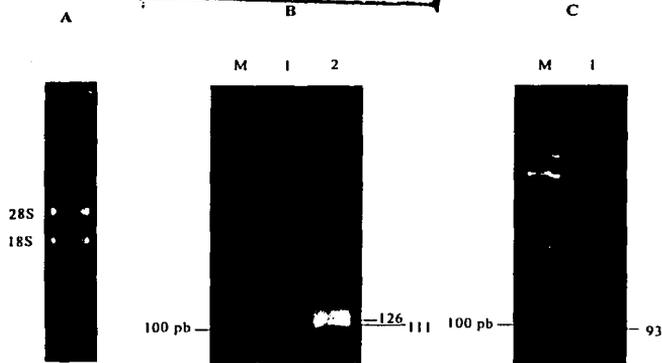


Figura 10. Síntesis del RNA estándar. (A) RNA total de las células C2C12 sometido a electroforesis en un gel de agarosa-formaldehído al 1% teñido con bromuro de etidio; se indican las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 28S y 18S. (B) Producto de amplificación de la utrofina de 126 pb (carril 1) y DNA molde de 111pb empleado para la generación del RNA estándar (carril 2), visualizados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. (C) RNA estándar de 93 bases sintetizado mediante transcripción in vitro. M, representa al marcador de peso molecular de 100pb (Gibco-BRL).

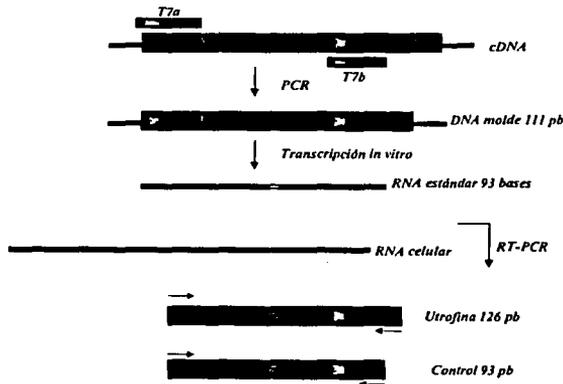


Figura 11. Estrategia para la síntesis del RNA estándar. Se muestran esquemáticamente los pasos seguidos para la síntesis del cDNA usando los oligos modificados así como los productos de la co-amplificación generados con los iniciadores originales (explicación en el texto).

6.2 Estandarización del PCR competitivo

El RNA control y el RNA total de las células C2C12 se sometieron simultáneamente a la reacción de RT-PCR utilizando los oligonucleotidos DRP1.F y DRP1.R. La reacción de PCR consistió en 30 ciclos debido a que en un trabajo previo se había determinado que la fase exponencial temprana de la reacción de PCR, para productos homólogos, se ubicaba en este número de ciclos (Rosas et al., 2000). En la figura 12 se observa que al utilizar 1000 y 100 pg de RNA control en la reacción de RT-PCR, la producción de su cDNA predomina sobre la del RNA celular (carriles 1 y 2); de la misma manera, cuando se disminuyó la cantidad del RNA control en la reacción, se incrementó el cDNA proveniente del RNA celular (carril 4). Estos resultados demuestran que se establece una competencia entre los dos moldes por el empleo de los oligonucleótidos. La utilización de 10 pg de RNA control en la reacción de co-amplificación permite detectar cantidades comparables de ambos productos (Figura 12, carril 3) por lo que esta cantidad se empleó en los ensayos posteriores.

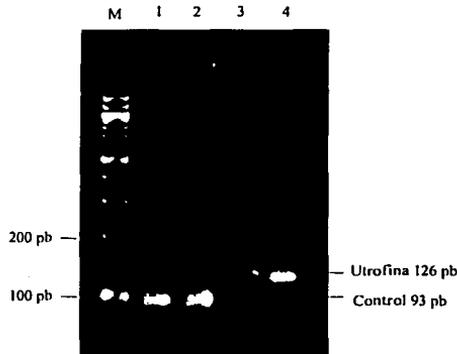


Figura 12. RT-PCR competitivo para el transcrito de la Up400. Se muestran los productos de co-amplificación en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se utilizaron diferentes cantidades de RNA control: 1000 pg (carril 1), 100 pg (carril 2), 10 pg (carril 3) y 1 pg (carril 4) y se mantuvo constante la cantidad del RNA total de las células C2C12 (500 ng). M, marcador de 100 pb (Gibco-BRL). Se señalan en la parte derecha de la figura los productos del RT-PCR obtenidos para la utrofina y el control.

6.3 Sensibilidad del ensayo de RT-PCR

Para asegurar que el sistema de cuantificación era adecuado para detectar variaciones en la expresión del RNA mensajero de la utrofina, se realizó el ensayo de RT-PCR semi-cuantitativo usando cantidades variables del RNA total de las células C2C12 manteniendo constante la cantidad del RNA estándar. En la figura 13 se observa que el método pudo detectar variaciones en la cantidad del transcrito de la utrofina, tan pequeñas como 250 ng.

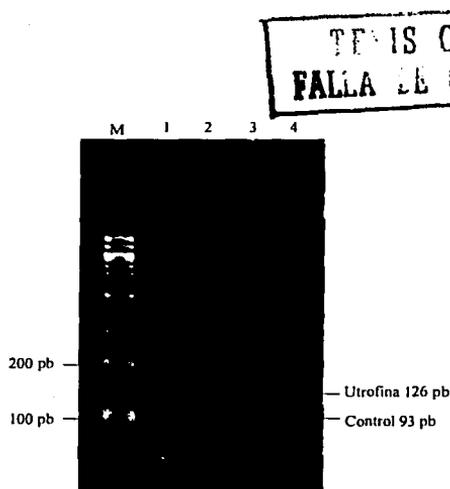


Figura 13. Análisis de la sensibilidad del método de RT-PCR semi-cuantitativo. Se muestran los productos de RT-PCR en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. El ensayo de RT-PCR se llevó a cabo como se describe en Metodología. Se utilizaron diferentes cantidades del RNA celular: 250 ng (carril 1), 500 ng (carril 2), 1.0 µg (carril 3) y 2.0 µg (carril 4) y se mantuvo constante la cantidad del RNA estándar (10 µg). Se señalan en la parte derecha de la figura los productos del RT-PCR obtenidos para la utrofina y el control. M, marcador de 100 pb (Gibco-BRL).

6.4 Caracterización de ratones *mdx*

La caracterización del genotipo *mdx* de cada uno de los ratones utilizados en este trabajo se fundamentó en el análisis de la mutación espontánea en el exón 23 del gene *dmd* (transición C por T). Inicialmente se amplificó un fragmento de 245 pb utilizando los oligos p9427 y DMD 23 en la denominada "primera vuelta de PCR" (figura 14), este producto se obtuvo a partir de DNA genómico de ratón independientemente de la existencia de mutación. Posteriormente, en la "segunda vuelta de PCR" se utilizaron los pares de oligos p9427/p259 y p9427/p260. El oligonucleótido p9427 es complementario a una región localizada dentro del intrón 22, mientras que los oligonucleótidos p259 y p260 hibridan en una secuencia localizada al interior del exón 23 del DNA genómico de ratón, 105 pb río arriba del sitio de hibridación del oligo DMD 23 (figura 14). El oligo p259 está diseñado de tal forma que el último nucleótido en posición 3' es complementario únicamente al DNA proveniente de ratones *mdx* y no de ratones silvestres, por el contrario, el último nucleótido del extremo 3' del oligo p260 sólo es complementario al DNA silvestre pero no al *mdx*. (Amalfitano & Chamberlain 1996). De esta manera al usar el par de oligonucleótidos p9427/p259 se produce un fragmento de 105 pb sólo si el DNA pertenece a un ratón *mdx*, mientras que el uso del par de oligos p9427/p260 genera un producto del mismo tamaño sólo a partir de DNA libre de la mutación en el exón 23. En la figura 15 se muestran los productos de amplificación obtenidos a partir del DNA genómico provenientes de un ratón *mdx* y de un ratón control C57BL/6.

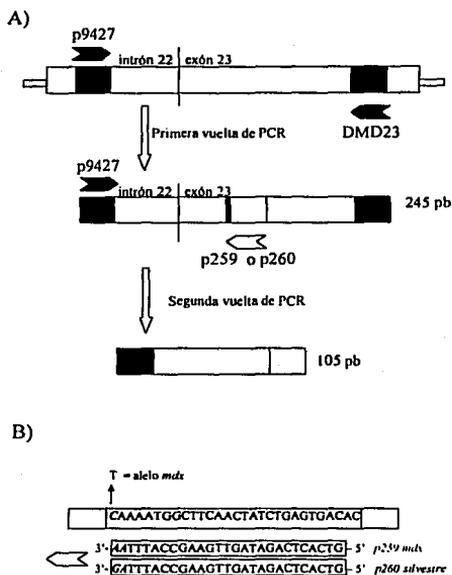


Figura 14. Estrategia para la caracterización genotípica de los ratones máx. A) En la primera vuelta de PCR se utiliza el par de oligos p9427 y DMD 23 produciendo un fragmento de 245 pb, a partir del cual se realiza la segunda vuelta de PCR usando los pares de oligos p9427/p259 o p9427/p260. B) Representación de la mutación dentro del exón 23 que indica la secuencia de hibridación entre los oligos utilizados así como la secuencia mutante y silvestre.

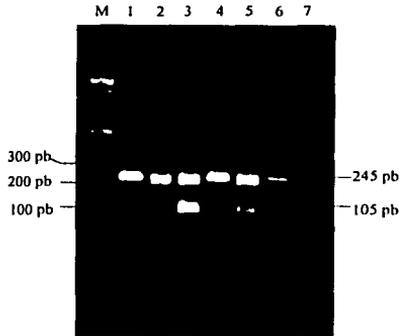


Figura 15. Caracterización de los ratones *mdx*. Se muestran los productos de PCR en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Carriles 1 y 4 productos de amplificación de primera vuelta obtenidos con el par de oligos p9427/DMD 23. Carriles 2 y 3 productos de PCR obtenidos con el par de oligos p9427/p259. Carriles 5 y 6 productos obtenidos con el par de oligos p9427/p260. M, marcador de 100pb, carril 7 control negativo. Los carriles 3 y 6 corresponden a una muestra de DNA proveniente de ratón *mdx* mientras que los carriles 2 y 5 corresponden a una muestra de origen silvestre.

6.5 Análisis semi-cuantitativo de la expresión de utrofina en el ratón *mdx*

Se analizaron los niveles de la utrofina en tres ratones machos adultos de la cepa C57BL/6 como controles y tres ratones *mdx* machos adultos. Se aisló el RNA total de los siguientes tejidos: intestino delgado, testículo, riñón, bazo, hígado, corazón, pulmón, músculo esquelético, cerebro y ojo. En las figura 16 A y 16 B se muestra la integridad de los RNAs obtenidos a partir de un ratón silvestre y un ratón *mdx*, respectivamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

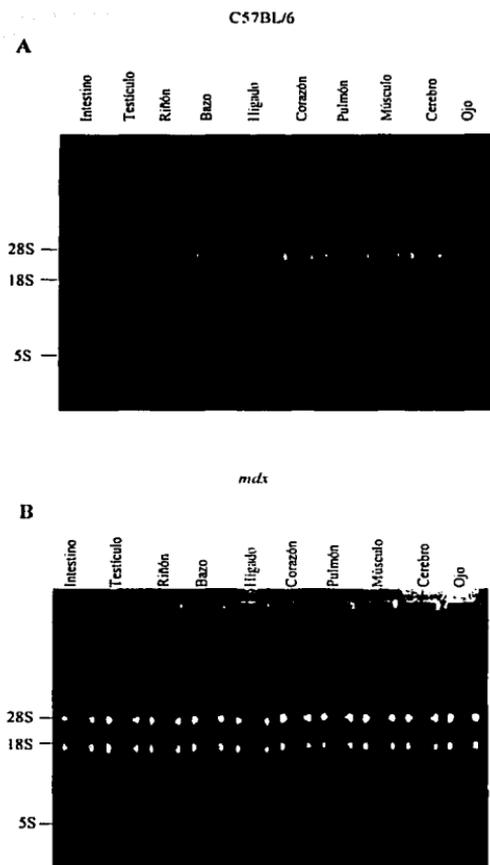


Figura 16. Integridad del RNA total de los tejidos de ratón. Se analizaron 500 ng de RNA de un ratón silvestre (A) y de un ratón *mdx* (B), obtenidos a partir de los tejidos que se señalan en la parte superior de la figura, en un gel de agarosa-formaldehído al 1% teñido con bromuro de etidio. Se observan las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 28S, 18S y 5S como un indicativo de la integridad del RNA total.

Después de haber comprobado la integridad del RNA de cada tejido, se efectuaron las reacciones de RT-PCR semi-cuantitativo utilizando el oligo DRP1.R marcado con ^{32}P en su extremo 5'. Los productos de la co-amplificación se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% (figura 17A y 18A) con lo cual se logró una mejor resolución. Los geles se expusieron a una placa autorradiográfica durante 4.5 horas (figura 17B y 18B) y se cuantificó la radiactividad emitida por las bandas correspondientes a cada producto.

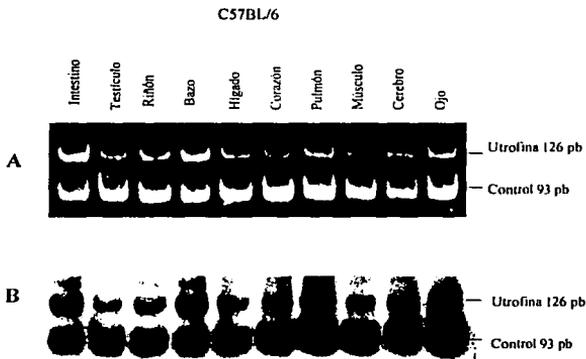


Figura 17. Expresión de la utrofina en los diferentes tejidos del ratón silvestre C57BL/6. (A) Gel de poliacrilamida al 8% teñido con bromuro de etido en el cual se muestran los productos del RT-PCR semicuantitativo. (B) Placa autorradiográfica de A.

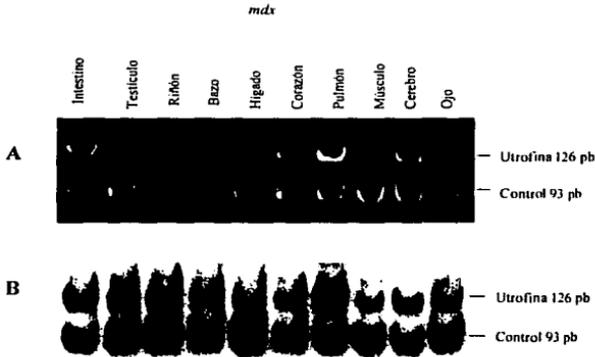


Figura 18. Expresión de la utrofina en los diferentes tejidos del ratón *mdx*. (A) Gel de poliacrilamida al 8% teñido con bromuro de etido en el cual se muestran los productos del RT-PCR semicuantitativo. (B) Placa autoradiográfica de A.

Los valores se normalizaron dividiendo las cuentas totales del amplificado de la utrofina (producto de 126 pb) entre las cuentas totales del control respectivo (producto de 93 pb). Para obtener valores representativos de la cantidad relativa del transcrito de la utrofina presente en cada tejido analizado, se grafico un valor promedio considerando los datos obtenidos a partir de los tres ratones silvestres y los tres ratones *mdx* (Figura 19). En las graficas se pudo observar que existen diferencias evidentes en la cantidad del mensajero de la utrofina entre los diferentes tipos de tejido analizados, tanto en el ratón silvestre como en el *mdx* (tabla 3). La expresión del transcrito de utrofina se detectó en todos los órganos analizados, la expresión máxima se encontró en el pulmón, riñón y bazo, y en menor cantidad en el músculo, ojo y cerebro (tabla III). Por otra parte, no se encontró diferencia significativa en los niveles relativos del mRNA de la utrofina entre los tejidos de los ratones silvestres y *mdx* ($p < 0.05$).

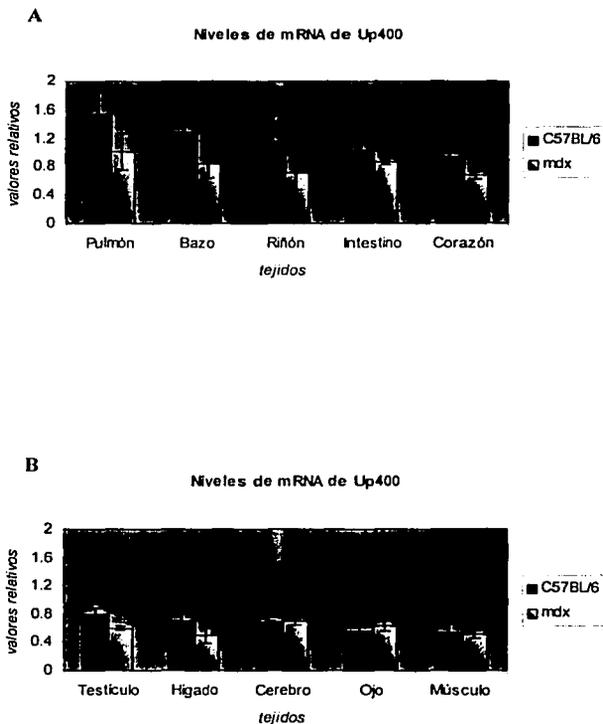


Figura 19. Niveles relativos del transcrito de la utrofina. La expresión relativa del transcrito de la utrofina se obtuvo de las figuras 12 y 13 dividiendo las c.p.m. del producto de la utrofina entre las c.p.m. de su control respectivo. Los valores mostrados corresponden al promedio de 3 muestras de cada tejido.

TEJIDO	PULMÓN	BAZO	RINÓN	INTESTINO	CORAZÓN	TESTÍCULO	HÍGADO	CEREBRO	OJO
Ratón C57BL/6	2.7	2.4	2.0	1.9	1.6	1.5	1.3	1.3	1.1
Ratón mdx	2.3	1.9	1.5	1.7	1.4	1.3	1.1	1.3	1.1

Tabla III. Expresión relativa de la utrofina. Los valores indican cuantas veces más del transcrito de utrofina se encontraron en los diferentes tejidos en relación a la cantidad relativa del transcrito detectada en el músculo esquelético.

Capítulo VII

Discusión

La DMD se desarrolla debido a la ausencia o deficiencia funcional de la distrofina, proteína codificada en el gene *dmd*. La distrofina se localiza en la parte interna del sarcolema, en conjunto con el complejo DAP, la distrofina mantiene la estabilidad de la fibra muscular durante la contracción de este tejido. Actualmente no existe cura para la DMD, sin embargo la mayoría de las estrategias terapéuticas se basan en la inducción de la sobre-expresión de utrofina en el tejido dañado, ya sea mediante fármacos que activan una respuesta endógena o mediante el uso de vectores a través de la terapia génica.

De esta manera, para evaluar este tipo de estrategias es necesario contar con métodos finos que nos permitan medir la expresión del transcrito de utrofina no sólo en el tejido muscular sino también en otros órganos. Adicionalmente, en la literatura no existen reportes cuantitativos que nos permitan conocer la distribución de esta proteína, por lo que en este trabajo, se evaluaron los niveles relativos de su transcrito en diversos tejidos de ratón empleando un ensayo particular de RT-PCR semi-cuantitativo.

La sensibilidad de la técnica de RT-PCR es muy superior a la que brindan los métodos tradicionales de detección de RNA, como la hibridación tipo *northern*. Sin embargo, para obtener información cuantitativa es necesario controlar la eficiencia de los pasos involucrados en el proceso de RT-PCR, como es la transcripción reversa y la amplificación del cDNA. Para controlar la variación que se presenta entre reacción y reacción de RT-PCR es necesario emplear un control que permita normalizar los datos. Tradicionalmente se ha empleado la co-amplificación por RT-PCR del gen problema y genes endógenos que presentan una expresión ubica y constante, tal es el caso del gen del RNA ribosomal 18S, el gen de la enzima GAPDH y el gen de la actina, entre otros (Kevin et al., 1993). Sin embargo, el uso de estos genes presenta la desventaja de que se requiere usar sus iniciadores específicos en conjunto con los iniciadores del gen problema y asumir que la reacción de RT-PCR va a presentar una eficiencia similar para ambas moléculas. Debido a que los niveles relativos del transcrito de los genes controles mencionados son normalmente más elevados que los del gen problema es muy probable que la amplificación por RT-PCR de los primeros presente una eficiencia mayor. Aunado a lo anterior, el hecho de usar dos pares de oligos diferentes complica la estandarización del RT-PCR. Para solventar estos problemas, en el presente trabajo se hizo uso de una molécula de RNA estándar de secuencia y concentración conocida, como control exógeno de la reacción de RT-PCR. El RNA estándar y la utrofina endógena se amplificaron utilizando el mismo par de iniciadores, y debido a que el producto de amplificación del RNA estándar es 33 pb menor, se lograron distinguir ambos productos mediante una electroforesis. Debido a las características mencionadas, se asume que la eficiencia de amplificación para ambos transcritos es muy similar y por lo tanto se pudo realizar el análisis. Adicionalmente, el sistema de cuantificación por RT-PCR semi-cuantitativo empleado en este trabajo demostró ser sensible ya que se pudo detectar el transcrito de utrofina usando cantidades de RNA total tan pequeñas como 250 ng.

Por otro lado, es importante mencionar que el gene de la utrofina está controlado por un promotor de tipo *housekeeping*. Teóricamente estos promotores manejan la expresión de genes constitutivos, es decir de genes que se expresan de manera extensa en todos los tejidos debido a que proporcionan funciones básicas necesarias para la célula

(Dennis et al., 1996). Lo anterior concuerda con reportes que demuestran una expresión generalizada de la utrofina, la cual se ha detectado cualitativamente en músculo esquelético, músculo cardiaco, músculo liso, sistema nervioso central y periférico, retina, endotelios, plaquetas y en alta cantidad en pulmón y riñón (Love et al., 1991; Lumeng et al., 1999). A diferencia de la utrofina, cuya expresión es ubicua, la expresión de la Dp427 se restringe a músculo y cerebro, lo que indica que en tejidos no musculares la función de la utrofina puede ser la de estabilizar la membrana celular, como se sugiere que lo hace en el músculo fetal (Love et al., 1991; Rigoletto et al., 1995). Para cumplir con esta función es necesario que el complejo de las DAPs o al menos algunos de sus componentes se expresen también de forma ubicua. En este sentido, se ha encontrado que la expresión del complejo distroglicano así como la de la β -distrobrevina es extensa en tejidos no musculares (Winder 2001), de hecho, el complejo distroglicano se ha detectado en todos los tejidos de vertebrados y tipos celulares analizados a la fecha. De esta manera, debido a que la utrofina y el β -distroglicano tienen la capacidad de interactuar, se puede sugerir que en los tejidos no musculares ambas proteínas son importantes para la formación del puente molecular que enlaza a la matriz extracelular con el citoesqueleto.

En este trabajo se encontraron diferencias en los niveles relativos del transcrito de la utrofina en los diversos tejidos analizados, lo cual probablemente responde a las necesidades fisiológicas de cada uno de ellos. Por ejemplo, en el pulmón y el riñón que son órganos formados en gran proporción por células endoteliales, detectamos un nivel relativamente alto de expresión de utrofina, lo que coincide con reportes previos (Matsumura et al., 1993). Por analogía a la distrofina muscular, la utrofina puede tener un papel importante durante el estrés mecánico de las células endoteliales que forman parte de estos tejidos, lo que explicaría sus niveles altos. A este respecto, Loh y col., (2000) reportaron que existen al menos seis complejos DAP diferentes en el riñón, cuyos componentes varían de acuerdo a la anatomía renal, en este tejido la utrofina se encontró formando parte de complejos DAP ubicados en el glomérulo y en los tubulos distal y colector.

En contraste, nosotros encontramos los niveles mas bajos de expresión de utrofina en tejidos como músculo, cerebro y ojo, en donde es probable que la necesidad por la utrofina sea menor porque en ellos se expresan eficientemente diversas distrofinas como la Dp427 en músculo, la Dp71 en cerebro y la Dp260 en retina. Por ejemplo, en músculo se sabe que la utrofina se requiere específicamente solo en la unión neuromuscular, en donde agrupa especializaciones membranales (Helliwell et al., 1992; Khurana et al., 1992).

De manera interesante, en el músculo esquelético proveniente de pacientes con DMD y de ratón *mdx* se han encontrado niveles elevados de utrofina, comparados con aquellos encontrados en el músculo normal (Clerk et al., 1993; Helliwell et al., 1992). Este fenómeno se ha explicado como un mecanismo celular para tratar de compensar la ausencia de la distrofina en la fibra muscular. Debido a que la utrofina también es capaz de unirse a la actina del citoesqueleto y al complejo de proteínas que forman el complejo DAP (Matsumura, et. al., 1992), su sobreexpresión en el músculo esquelético de ratones *mdx* revierte o alivia el fenotipo distrófico mediante el restablecimiento de los niveles del complejo DAP (Tinsley, et al., 1996). En los últimos años se han desarrollado terapias experimentales para incrementar la expresión de utrofina en el músculo esquelético y se han obtenido resultados alentadores, sin embargo, el conocimiento de esta proteína debe de extenderse a diferentes niveles, tales como el análisis de su promotor, de búsqueda y análisis de nuevas isoformas y el estudio de su función en tejidos musculares y no musculares.

En este trabajo no se encontraron diferencias significativas en la cantidad relativa del transcrito de la utrofina al comparar los mismos tipos de tejidos entre los ratones silvestres y *mdx*. Por lo que respecta al tejido muscular, como se mencionó anteriormente, se sabe que los niveles de la proteína utrofina se incrementan en el ratón *mdx*, sin embargo, mediante la técnica de RT-PCR semi-cuantitativo utilizada en este trabajo no detectamos ninguna diferencia en la expresión del transcrito de utrofina entre el ratón *mdx* y el ratón silvestre. En concordancia con los resultados de este trabajo, Gramolini et al., (1999) reportaron que los niveles del RNA mensajero de utrofina son iguales entre el músculo distrófico y sano, tanto en el humano como en el ratón. Lo anterior sugiere que mecanismos

post-transcripcionales son los responsables del aumento de la proteína en este tejido, sin embargo consideramos que es necesario realizar la cuantificación a nivel de proteína en los tejidos analizados en este estudio para poder obtener una conclusión a este respecto.

Capítulo VIII

Conclusiones

- 1.-Se establecieron las condiciones óptimas de la reacción de RT-PCR semi-cuantitativo para el análisis de la expresión del transcrito de utrofina. La metodología demostró ser sensible y reproducible.
- 2.-Tanto en los ratones silvestres como en los *mdx*, los tejidos con los niveles de expresión de utrofina más elevados fueron pulmón, bazo y riñón, mientras que los niveles más bajos se encontraron en cerebro, ojo y músculo esquelético.
- 3.-No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de la utrofina al comparar los tejidos de los ratones silvestres y *mdx*.

Capítulo IX

Glosario

•atrofia: estado de desgaste del músculo, disminución del tamaño de la fibra muscular individual hacia una pérdida progresiva de miofibrillas.

•biología molecular: rama de la biología nacida a raíz de la identificación de la naturaleza química (molecular) del material genético. Se hace referencia a la biología molecular al hablar de estudios o técnicas centradas en los genes y sus productos inmediatos, las proteínas.

•célula satélite: célula madre de la musculatura esquelética de un adulto, se mantiene en reserva en estado quiescente. Son utilizables cuando se requiere una autorrenovación de las células diferenciadas en forma terminal.

•cepa silvestre: variedad natural de un determinado organismo. Su contraparte es una cepa mutante que contiene lesiones particulares en su genoma.

•citoesqueleto: sistema de filamentos proteicos del citoplasma de las células eucariotas que proporciona a la célula forma y capacidad para realizar movimientos dirigidos.

•distrofia muscular: degeneración de las fibras musculares individuales que conduce a una atrofia progresiva del músculo esquelético.

•DNA complementario (cDNA): molécula de DNA sintetizada como una copia de un mRNA. Se utiliza para determinar la secuencia de aminoácidos de una proteína mediante secuenciación del DNA o para

sintetizar una proteína en grandes cantidades mediante su clonación. Molécula sintetizada a partir de una cadena de RNA por acción de la transcriptasa reversa.

•DNA genómico: la totalidad del DNA que forma parte del genoma de una célula.

•dominio. región discreta y continua de una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos generalmente asociada con una función particular.

•exón: segmento de un gene eucariótico que codifica secuencias nucleotídicas en el mRNA. Habitualmente está adyacente a una secuencia de DNA no codificante llamada intrón.

•fibrosis: formación de tejido conectivo fibroso en sitios donde normalmente no existe. Es una consecuencia de lesión muscular o de degeneración.

•gene: región del DNA que controla una característica hereditaria discreta. Segmento de DNA involucrado en la producción de una cadena polipeptídica, abarca la unidad funcional completa incluyendo las secuencias codificantes, reguladoras no codificantes y los intrones.

•gene housekeeping: genes constitutivos que se expresan extensamente debido a que proporcionan funciones básicas necesarias para el mantenimiento de todo tipo celular.

•genóma: termino que se refiere a todo el material genético de un organismo vivo.

•*in vitro*: se refiere a condiciones experimentales en las que no existen células u organismos vivos. Condiciones dadas en un tubo de ensayo.

•intrón: región no codificante de un gene eucariótico que se transcribe a RNA pero que se elimina durante la maduración o el procesamiento del transcrito primario.

•isoformas: múltiples formas de una misma proteína que difieren en alguna parte de su secuencia de aminoácidos. Pueden ser producidas por genes diferentes o por procesamiento alternativo del transcrito proveniente de un mismo gene.

•marco de lectura: fase en que son leídos los nucleótidos en grupos de tres codificando un polipéptido. Una molécula de mRNA puede leerse siguiendo tres pautas de lectura diferentes.

•matriz extracelular: red de polisacáridos y de proteínas secretada por la célula. Elemento estructural que influye en el desarrollo y la fisiología celular.

• mioblasto: célula mononucleada e indiferenciada precursora de una fibra muscular. Una célula de músculo esquelético se forma por la fusión de varios mioblastos.

•**mutación:** alteración heredable en la secuencia de nucleótidos de la molécula de DNA.

•**nucleótido:** unidad fundamental de los ácidos nucleicos. Constituida por una base nitrogenada, un azúcar y un fosfato. Un oligonucleótido es un polímero de nucleótidos de longitud corta (generalmente alrededor de 25 bases)

•**promotor:** región del DNA involucrada en la unión de la RNA polimerasa para iniciar la transcripción.

• **mRNA:** molécula de RNA, copia de un gene, que lleva la información desde el genoma hasta donde se realiza la traducción.

• **rRNA:** molécula de RNA que forma parte de la estructura del ribosoma y que participa

en la síntesis de proteínas. Se diferencian por su coeficiente de sedimentación como rRNA 28S, 18S, etc.

•**splicing:** procesamiento o maduración del RNA que consiste en la eliminación de intrones y empalme de exones de un transcrito primario para generar una molécula de mRNA. El procesamiento alternativo se refiere al empalme diferencial de secuencias codificantes de un mismo gene con lo cual se producen isoformas de la proteína codificada.

•**transcripción:** proceso mediante el cual un gene se expresa mediante la síntesis de un RNA que contiene la misma secuencia del gene.

•**transcriptasa reversa:** enzima presente en los retrovirus capaz de sintetizar una copia de DNA a partir de una molécula de RNA.

Capítulo X

Referencias

- Amalfitano, A. & Chamberlain, J.S. (1996) The *mdx*-amplification-resistant mutation system assay, a simple and rapid polymerase chain reaction-based detection of the *mdx* allele. *Muscle & Nerve* 19:1549-1553
- Acsadi, G., Dickson, G., Love, D., Jani, A., Gurusinghe, A., Walsh, F.S., Wolff, J.A., & Davies, K.E. (1991) Human dystrophin expression in *mdx* mice after injection of DNA constructs. *Nature* 352: 815-818
- Ahn, A.H. & Kunkel, L.M. (1995) Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *J.Cell Biol.* 128:363-371
- Allamand, V. & Campbell, K.P. (2000) Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. *Hum.Mol.Genet.* 9:2459-2467
- Amann, K. J., Renley, B.A. & Ervasti, J.M. (1998) A cluster of basic repeats in the dystrophin rod domain binds F-actin through an electrostatic interaction. *J.Biol.Chem.* 273:28419-28423
- Barton-Davis, E.R. (1999) Aminoglycoside antibiotics restores dystrophin function to skeletal muscles of *mdx* mice. *J.Clin.Invest.* 104: 375-381
- Becker-André & Hahlbrock, K. (1989) Absolutem RNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res.* 17:9437-9446
- Bewick, G.S., Nicholson, L.V., Young, C., O'Donnell, E., & Slater, C.R. (1992) Different distributions of dystrophin and related proteins at nerve-muscle junctions. *Neuroreport.* 3:857-860
- Billard, C. (1992) Cognitive functions in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal and comparison with spinal muscular atrophy. *Neuromusc. Disord.* 2:371-378

- Bin Im, W., Phelps, S.F., Copen, E.H., Adams, E.G., Slightom, J.L. & Chamberlain, J.S. (1996) Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations. *Hum.Mol.Genet.* 5:1149-1153
- Blake, D.J. & Kröger, S. (2002) The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *TRENDS Neurosci.* 23:92-99
- Blake, D.J., Schofield, J.N., Zuellig, R.A., Gorecki, D.C., Phelps, S.R., Branard, E.A., Edwards, Y.H. & Davies, K.E. (1995) G-utrophin, the atosomal homologue of dystrophin Dp116, is expressed in sensory ganglia and brain. *Proc Natl.Acad.Sci.USA* 92:2697-3701
- Blake D.J., Nawrotzki R., Loh N.Y., Gorecki D.C. & Davies K.E. (1998) β -dystrobrevin, a member of the dystrophin-related family. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 95:241-246
- Brenman, J.E., Chao, R.S., Gee, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., Froehner, S.C. & Bredt, D.S. (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84:757-767
- Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A.L. & Moore, K.J. (1984) X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse (animal model), *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81:1189-1192
- Burton, E.A., Tinsley, P.J., Holzfield, N.R., & Davies, K.E. (1999) A second promoter provides an alternative target for therapeutic up-regulation of utrophin in Duchenne muscular dystrophy. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96: 14025-12030
- Cao, W., Henry, M. D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J.H., Ravkov, E.V., Nichol, S.T., Compans, R.W., Campbell, K.P. & Oldstone, M.B. (1998) Identification of alpha dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* 282:2079-2081
- Campbell K.P. & Straub V. (1997) Muscular dystrophies and the dystrophin -glycoprotein complex. *Curr.Opin.Neurol.* 10:168-175
- Campbell, K.P. & Crosbie, R.H. (1996) Utrophin to the rescue. *Nature* 384:308-309
- Clerk, A., Morris, G.E., Dubowitz, V., Davies, K.E. & Cegri, C.A. (1993) Dystrophin-related protein, utrophin, in normal and dystrophic human fetal skeletal muscle. *Histochem. J.* 25:554-561
- Chamberlain, J.S. & Benian, G. M. (2000) Muscular dystrophy: the worm turns to genetic disease. *Curr. Biol.* 10:R795-R797
- Chelly, J., Kaplan, J.C., Maire, P., Gautron, S. & Kahn, A. (1988) Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue. *Nature* 333:858-60
- Chomczynski, C. & Sacchi, N. (1987) Single-Step method of RNA Isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159
- Dennis, C.L., Tinsley, J.M., Deconinck, A.E., & Davies, K.E. (1996). Molecular and functional analysis of the utrophin promoter. *Nuc. Acids Research* 24:1646-1652
- Emery, A.E.H.(1993) Duchenne muscular dystrophy Oxford: Oxford University Press
- Ervasti, J.M. & Campbell, K.P. (1993) A role for the dystrophin glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J.Cell Biol.* 122:809-823

- Fassati, A., Murphy, S. & Dickson, G. (1997) Gene therapy of duchenne muscular dystrophy. *Adv in Genet.* 35:117-153
- Gillis, J.M. (1996) Membrane abnormalities and Ca homeostasis in muscles of the *mdx* mouse, an animal model of the Duchenne muscular dystrophy: a review. *Acta Physiol.Scand.* 156:397-406
- Gilbert, R., Nalbantoglu, J., Petrof, B.J., Ebihara, S., Guibinga, G.H., Tinsley, J.M., Kamen, A., Massie, B., Davies, K.E., & Karpati, G. (1999) Adenovirus-mediated utrophin gene transfer mitigates the dystrophic phenotype of *mdx* mouse muscles. *Hum Gene Ther.* 10:1299-1310
- Fabbrizio, E., Latouche, J., Rivier, F., Hugon, G. & Mornet, D. (1995) Re-evaluation of the distributions of dystrophin and utrophin in sciatic nerve. *Biochem.J.* 312:309-314
- González, E., Montañés, C., Ray, P.N., Howar, P.L., García-Sierra, F., Mornet, D. & Cisneros, B. (2000) Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS lett.* 482:209-214
- Gramolini, A.O., Karpati, G. & Jazmin, B.J. (1999) Discordant Expression of Utrophin and its Transcript in Human and Mouse Skeletal Muscles. *J. Neuropathol Exp. Neurol.* 58:235-244
- Helliwell, T.R., Man, N.T., Morris, G.E., & Davies, K.E. (1992) The dystrophin-related protein, utrophin is expressed on the sarcolemma of regenerating human skeletal muscle fibres in dystrophies and inflammatory myopathies. *Neuromusc.Disord.* 2:177-184
- Hoffman, E.P., Brown, R.H., & Kunkel, L.M. (1987) Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919-928
- Hoffman, E.P. & Dressman, D. (2001) Molecular Pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. *TRENDS Pharmacol. Sci.* 22:465-470
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (1990) *PCR Protocols: A guide to methods and applications.* Academic Press
- Khurana, T.S., Watkins, S.C., Chafey, P., Chelly, J., Tome, m.s., Fardeau, M., Kaplan, J. & Kunkel, L.M. (1991) Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromusc.Disord.* 1:185-194
- Karpati, G., Carpenter, S., Morris, G.E., Davies, K.E., Guerin, C., & Holland, P. (1993). Localization and quantitation of the chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in normal and pathological human muscle. *J.Neuropathol. Exp. Neurol.* 52:119-128
- Kevin, P.F., Mark, W.L. & James, D.E. (1993) Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Technical Focus* 9:380-385
- Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Fenner, C. & Kunkel, M. (1987) Complete cloning of the Duchenne muscular-dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50:509-517
- Law, D.J., Allen, D.L., & Tidball, J.G. (1994) Talin, vinculin and DRP (utrophin) concentrations are increased at the *mdx* myotendinous junctions following onset of necrosis. *J.Cell. Sci.* 107: 1477-1483
- Lederfein, D., Yaffe, D. & Nudel, U. (1993) A housekeeping type promoter located in the 3' region of the Duchenne muscular dystrophy gene controls the expression of Dp71 a major product of the gene. *Hum.Mol.Genet.* 2:1883-1888

- Lederfein, D., Levy, Z., Augier, N., Mornet, D., Morris, G., Fuchs, O., Yaffe, D. Nudel, U. (1992) A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 89: 5346-5350
- Loh, N.Y., Newey, S.E., Davies, K.E. & Blake D.J. (2000) Assembly of multiple dystrobrevin-containing complexes in the kidney. *J. Cell.Sci.* 113:2715-2724
- Love, D.R., Hill, D.F., Dickinson, G., Spurr, N.K., Byth, B.C., Marseden, R.F., Walsh, F.S., Edwards, Y.H. & Davies, K.E. (1989) An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339:55-58
- Love, D.R., Morris, G.E., Ellis, J.M., Fairbrother, U., Marseden, R.F., Bloomfield, J.F., Edwards, Y.H., Slater, C.P., Parry D.J. & Davies, K.E. (1989) Tissue distribution of the dystrophin-related gene product and expression in the *mdx* and *dy* mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:3243-3247
- Lumeng, C., Phelps, S., Crawford, G.E., Walden, P.D., Barald K. & Chamberlain, J. (1999) Interactions between β 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nature Neurosci.* 2:611-617
- Lynch, G.S., Rafael, J.A., Hinkle, R.T., Cole, N.M. Chamberlain, J.S. & Faulkner, J.A. (1997) Contractile properties of diaphragm muscle segments from old *mdx* and old transgenic *mdx* mice. *Am J Physiol.* 272:C2063-C2068
- Man, C.J., et al. (2000) Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the *mdx* mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 97: 5363-5368
- Matsumura, K., Ervasti, J.M., Ohlendieck, K., Kahl, S.D. & Campbell, K.P. (1992) Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in *mdx* mouse muscle. *Nature* 360:588-91
- Matsumura, K., Douglas, M.S. & Campbell, K.P. (1993) Purification of dystrophin-related protein (utrophin) from lung and its identification in pulmonary artery endothelial cells. *FEBS Letters* 326:289-293
- Moisset, P.A. & Tremblay, J.P. (2001) Gene therapy: a strategy for the treatment of inherited muscle diseases? *Curr.Opin.Pharmacol.* 1: 294-299
- Monaco, A.P., Walker, A.P., Millwood, I., Larin, Z. & Lehrach, H. (1992) A yeast artificial chromosome contig containing the complete Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics* 12:465-473
- Morrison, J., Lu, Q.L., Pastore, C., Partridge, T. & Bou-Gharios, G. (2000) T-cell-dependent fibrosis in the *mdx* dystrophic mouse. *Lab Invest.* 80:881-91
- Mullis, K., and Faloona, F. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction, *Meth. Enzymol.* 55: 335-350
- Pearce, M., Blake, D.J., Tinsley, J.M., Byth, B.C., Campbell, L., Monaco, A.P. & Davies, K.E. (1993) The utrophin and dystrophin share similarities in genomic structure. *Hum. Mol. Genet.* 2:1765-1772
- Peters M.F., O'Brien K.F., Sadoulet-Puccio H.M., Kunkel L.M., Adams M.E. & Frohener S.C. (1997) β -dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. *J.Biol.Chem.* 272:31561-31569
- Petrof, B.F., Shrager, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M. & Sweeney, H.L. (1993) Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 90:3710-3714

- Pons, F., Robert, A., Fabbriozzi, E., Hugon, G., Califano, J.C., Fehrentz, J.A., Martinez, J., & Mornet, D. (1994) Utrophin localization in normal and dystrophin-deficient heart. *Circulation* 90:369-374
- Rambukkana, A., Yamada, H., Zanazzi, G., Mathus, T., Salzer, J.L., Yurchenco, P.D., Campbell, K.P. & Fischetti, V.A. (1998) Role of alpha.dystroglycan as a Schwann cell receptor for Mycobacterium leprae. *Science* 282:2076-2079
- Rashtchian A. (1994) Amplification of RNA. *Life Technologies Inc. PCR Methods and Applications* 583-591
- Rentschler, S., Linn, H., Deininger, K., Bedford, M.T., Espanel, X. & Sudol, M. (1999) The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with β -dystroglycan. *Biol.Chem.* 380:431-442
- Rigoletto, C., Prella, A., Ciscato, P., Moggio, M., Comi, G., Fortunato, F. & Scarlato, G. (1995) Utrophin expression during human fetal development. *Int.J.Dev.Neurosc.* 13:585-593
- Roberts, R.G., Coffey, A.J., Bobrow, M. & Bentley, D.R. (1993) Exon structure of the human dystrophy gene. *Genomics* 16:536-538
- Rosas-Vargas, H., Montañés, C., Rendón, A., Mornet, D., García, F. C. & Cisneros, B. (2000) Expression and localization of utrophin in differentiating PC12 cells. *Neuroreport* 10:2253-2257
- Sadoulet-Puccio H.M., Khurana T.S., Cohen J.B., & Kunkel L.M. (1996) Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ post-synaptic membrane. *Hum.Mol.Genet.*, 5:489-496
- Sadoulet-Puccio, H.M. & Kunkel L.M. (1996) Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathology* 6:25-35
- Senter, L., Ceoldo, S., Mezmaric, M. & Salviati, G. (1995) Phosphorylation of dystrophin: effects on actin binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206:57-63
- Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A.S., Barnard, E. A., Darlison, M. G. & Barnard, P.J. (1989) The molecular basis of muscular dystrophy in the *mdx* mouse: a point mutation. *Science* 244:1578-1580
- Tinsley, J.M., Blake, D.J., Roche, A., Fairbrother, U., Riss, J., Byth, B.C., Kinigh, A.E., Kendrick-Jones, J., Suthers, G.K., Love, D.R., Edwards, Y.H. & Davies, K.E. (1992) Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* 360:591-593
- Tinsley, J.M. et al., (1996) Amelioration of the dystrophic phenotype of *mdx* mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* 384:349-353
- Wang, A.M., Doyle, M.V. & Mark, D.F. (1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:9717-21
- Wang, J., Pansky, A., Venuti, J.M., Yaffe, D. & Nudel, U. (1998) A sea urchin gene encoding dystrophin-related proteins. *Hum.Mol.Genet.* 7: 581-588
- Willard, M.F., Walker, S.J. & Kent, E.V. (1999) Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26:112-125
- Wilson, J., Putt, W., Jimenez, C. & Edwards, Y.H. (1999) Up 71 and Up140, two novel transcripts of utrophin that are homologues of short forms of dystrophin. *Hum. Mol. Genet.* 8:1271-1278
- Winder S.J. (1997) The membrana-cytoskeleton interface: the role of dystrophin and utrophin. *J.Muscle Res. Cell Mot.* 18:617-629

- Winder S.J. (2001) The complexities of dystroglycan. *TRENDS in Biochem. Sci.* 26:118-124
- Yamamoto, K., et al.(2000) Immune response to adenovirus-delivered antigens upregulates utrophin and results in mitigation of muscle pathology in *mdx* mice. *Hum Gene Ther.*11:669-680
- Yoshida, T., Pan, Y., Hanada, H., Iwata, Y. & Shigekawa, M. (1998) Bidirectional signaling between sarcoglycans and the integrin adhesion system in cultured L6 myocytes. *J.Biol.Chem.* 273:1583-1590
- Zuellig, R.A., Bornhauser, B.C., Knuesel, I., Heller, F., Fritschy, J.M. & Schaub, M.C. (2000) Identification and characterisation of transcript and protein of a new short N-terminal utrophin isoform. *J Cell Biochem.* 3:418-31

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN