

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis de la expresión del complejo de
proteínas asociado a distrofina en
preadipocitos humanos**

Tesis que presenta

Byanka Sthefany Espinoza López

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la tesis

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

San Luis Potosí, S.L.P., Diciembre de 2014



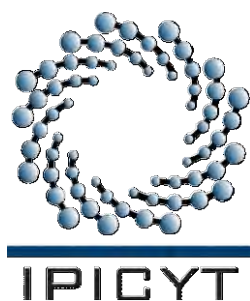
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Análisis de la expresión del complejo de proteínas asociado a distrofina en preadipocitos humanos**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Byanka Sthefany Espinoza López** y aprobada el **diecinueve de diciembre del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Director de la tesis

Dr. Rubén López Revilla
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Samuel Lara González
Miembro del Comité Tutorial



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Luis Antonio Salazar Olivo.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (490578) y un apoyo especial del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 125 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 19 días del mes de diciembre del año 2014, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. Samuel Lara González	Secretario	IPICYT
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Byanka Sthefany Espinoza López

sobre la Tesis intitulada:

Análisis de la expresión del complejo de proteínas asociado a distrofina en preadipocitos humanos

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:20 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 19 días del mes de diciembre de 2014.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatoria

A mis papás Mariana y Esteban por ser mi más grande inspiración para continuar, por su apoyo incondicional y por estar siempre conmigo.

A Javier, Flor, José, Vico y Ana por ser los mejores hermanos y a esos grandes y pequeños angelitos que han llegado a nuestra familia y nos han hecho crecer y aprender más de la vida...

Agradecimientos

Gracias Dr. Luis por sus enseñanzas, su asesoría, su apoyo, su paciencia y por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo.

Gracias Dr. Rubén y Dr. Samuel por las observaciones hechas a mis escritos durante este tiempo.

Gracias Dr. Jaime y Dr. Refugio por ayudarnos con las biopsias.

Gracias Dra. Angélica Montoya Contreras por el apoyo técnico y académico que me brindaste durante mi estancia en el laboratorio, ya que sin tu ayuda no lo hubiera podido lograr.

Gracias Gloria y Guadalupe por apoyarme y enseñarme durante el tiempo que compartí junto a ustedes.

Gracias Adriana, Víctor, Macario, Alán, Cindy, Julián, y Paty por los buenos momentos, los consejos técnicos de cómo hacer algo y por su apoyo durante el trabajo diario.

Gracias Magnolia, Omayra, Cesia y Maritere por sus enseñanzas, por disipar mis dudas y por todo lo que compartimos juntas.

Gracias Ricardo, por leer mi escrito y animarme a continuar.

Resumen

Análisis de la expresión del complejo de proteínas asociado a distrofina en preadipocitos humanos

El complejo de proteínas asociado a distrofina (DAPC) se expresa en músculo esquelético, corazón, riñón, cerebro y otros tejidos. En células musculares se localiza en el sarcolema y provee una sólida conexión mecánica entre la matriz extracelular y el citoesqueleto. La ausencia del DAPC en el sarcolema conduce a distrofias musculares y sarcoglicanopatías. El DAPC está presente también en tejido adiposo de rata y la expresión de algunos de sus elementos cambian en el curso de la adipogénesis. Aquí mostramos que el DAPC también se expresa en tejido adiposo subcutáneo y visceral humano. Analizamos la transcripción de 13 genes del DAPC en cultivos de adipocitos subcutáneos y viscerales humanos y encontramos que las distrofinas Dp427 y Dp71, las distrobrevinas α y β y el α -sarcoglicano se expresaron diferencialmente durante las etapas de la diferenciación adiposa. Los niveles de los transcritos de otros genes del DAPC como distroglicano, sintrofinas α I, β I y β II y los sarcoglicanos β , γ , δ , y ϵ no cambiaron durante la adipogénesis. Estos resultados sugieren que el DAPC participa en la diferenciación del tejido adiposo humano y sus mecanismos pueden analizarse ventajosamente en este modelo de estudio.

PALABRAS CLAVE. Adipogénesis in vitro, Distrobrevinas, Distrofinas, Distroglicano, Sarcoglicanos, Sintrofinas, Tejido adiposo humano.

Abstract

Analysis of the expression of the dystrophin-associated protein complex in human preadipocytes

The dystrophin-associated protein complex (DAPC) is expressed in skeletal muscle, heart, kidney, brain and other tissues. In muscle cells DAPC is located in the sarcolemma and provides a solid mechanical connection between the extracellular matrix and the cytoskeleton. DAPC absence in sarcolemma leads to muscular dystrophies and sacoglycanopathies. DAPC is also expressed in rat adipocytes and the expression of some its elements changes during rat adipogenesis. Here we show that DAPC are also expressed in human subcutaneous and visceral adipose tissues. We analyze the transcription of 13 genes of DAPC in cultured human subcutaneous and visceral adipocytes and we found that mRNAs for Dp427 and Dp71 dystrophins, α - and β -dystrobrevins and α -sarcoglycan were differentially expressed during stages of adipose differentiation. Transcripts levels of other DAPC genes such as dystroglycan, α I-, β I- and β II-syntrophins and β -, γ -, δ -, and ϵ -sarcoglycans did not change during adipogenesis. These results suggest that DAPC participates in the differentiation of human adipose tissue and their mechanisms can be advantageously analyzed in this model system.

KEY WORDS. Adipogenesis in vitro, Dystrobrevins, Dystrophins, Dystroglycan, Human adipose tissue, Sarcoglycans, Syntrophins.

Análisis de la expresión del complejo de proteínas asociado a distrofina en preadipocitos humanos

Byanka S. Espinoza-López¹, Angélica Montoya-Contreras¹, José Romo-Yáñez²,
Cecilia Montañez³, Jaime Parés⁴, José Refugio Medina-León⁵, Luis A. Salazar-
Olivo^{1,*}

¹ División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y
Tecnológica, San Luis Potosí, SLP, México

² Departamento de Genómica Humana, Instituto Nacional de Perinatología, México
DF, México

³ Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV, México DF,
México

⁴ Hospital Militar Regional San Luis Potosí; SLP, México

⁵ Hospital Militar de Zona Campo Militar No. 1-A. México DF, México

* Autor para correspondencia:

Camino a la Presa San José 2055, San Luis Potosí 78716, SLP. México.

Tel: +52 444 834 2054. E-mail: olivo@ipicyt.edu.mx

1. Introducción

El complejo de proteínas asociado a distrofina (DAPC por sus siglas en inglés) está compuesto por proteínas citoplásmicas, transmembranales y extracelulares que comprenden diversas isoformas de distroglicanos, sarcoglicanos, sintrofinas, distrobrevinas y sarcospan unidas a alguna distrofina — cuya isoforma principal es un polipéptido de 3,685 aminoácidos con un peso molecular de 427 KDa— o su homólogo autosómico, utrofina [1].

En el músculo esquelético el DAPC se localiza en el sarcolema, conecta el citoesqueleto con la matriz extracelular [2] y participa en la regulación de transducción de señales [3]. El DAPC también está presente en el cerebro, corazón, tejidos secretores y en los que forman barreras entre compartimentos funcionales como la barrera hematoencefálica, el plexo coroideo, la retina y el riñón [4]. Mutaciones en los genes que codifican las proteínas del DAPC conducen a enfermedades graves tales como distrofias musculares [5] y sarcoglicanopatías [6].

La distrofina, componente principal del DAPC, se localiza en la cara citoplásmica del sarcolema. Mutaciones puntuales, deleciones y duplicaciones en su gen codificante (DMD) dan como resultado la deficiencia parcial o total de la función de la proteína con desintegración del complejo de la membrana plasmática [7, 8]. Algunos de estos cambios en la secuencia del gen DMD pueden provocar la distrofia muscular de Duchenne (DMD), un síndrome letal del músculo esquelético [9].

Una característica particular de las distrofias musculares es la deposición ectópica de grasa en el músculo [8,10] que por eso es usada como un marcador

de progresión de la enfermedad [11,12]. Esta deposición sugiere una desregulación en la adipogénesis en personas con distrofias. Así mismo, existe evidencia que elementos del DAPC están presentes en el tejido adiposo de rata [13,14].

El tejido adiposo blanco de ratas expresa elementos del complejo de sarcoglicanos (Scg) β -, δ - y ϵ -Scg, que parece ser específico del tejido adiposo, ya que carece de α - y γ -Scg [13]. El complejo de sarcoglicanos en el tejido adiposo podría funcionar como una sola unidad, pues aunque no estén presentes otros componentes del DAPC, el complejo se mantiene en la membrana, mientras que la pérdida de β -Scg o δ -Scg conduce a la pérdida completa del complejo de los otros sarcoglicanos así como de sarcospan [13]. Se ha sugerido que el complejo de sarcoglicano participa en la homeostasis de la glucosa en el tejido adiposo y el músculo esquelético, ya que ratones nulos para β -sarcoglicano, carentes del DAPC en el tejido adiposo y el músculo esquelético son intolerantes a la glucosa y resistentes a insulina [13].

Romo-Yáñez et al. (2011) encontraron transcritos del DAPC en cultivos de adipocitos subcutáneos y viscerales de rata cuya expresión varía durante la adipogénesis y de acuerdo al sustrato en el que crecen las células. En depósitos de tejido adiposo subcutáneo y visceral de rata se expresan mRNAs de las cinco isoformas de la distrofina Dp427, Dp260, Dp140, Dp116 y Dp71, pero sólo Dp427, Dp116 y Dp71 corresponden a células adiposas, así como de mRNAs de utrofina, α - y β -distrobrevina, β -dístroglicano, β I-, β II- y γ -sintrofina. Estos resultados, complementan los descritos para la expresión del complejo de SGs y refuerzan la idea de que el DAPC efectivamente contribuye en la función del tejido adiposo

[14]. Sin embargo, hasta ahora se desconoce si el DAPC se expresa en tejidos adiposos humanos y su posible función.

En este trabajo analizamos la transcripción de los genes del complejo de proteínas asociadas a distrofina en tejido adiposo humano y durante la adipogénesis subcutánea y visceral humana in vitro.

2. Materiales y métodos

2.1. Muestras de tejido adiposo humano

Las biopsias de tejido adiposo subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) se obtuvieron de pacientes sometidos a procedimientos quirúrgicos (hernioplastia umbilical o inguinal) en el Hospital Regional Militar de San Luis Potosí o en el Hospital Militar de Zona Campo Militar No. 1-A. Las muestras fueron preservadas en RNAlater (Sigma-Aldrich) para la posterior obtención de RNA total y en PBS con 1% albúmina sérica bovina, 1 g/L glucosa (Sigma-Aldrich), estreptomicina 100 µg/mL y penicilina 100 U/mL, para la obtención de células estromales cultivables. Todas las muestras tisulares se procesaron el día de su obtención. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Regional de San Luis Potosí y todos los donadores aceptaron participar voluntariamente bajo consentimiento informado por escrito. Se integró un grupo de estudio formado por seis donantes masculinos euglucémicos con normopeso y sobrepeso (Tabla 1).

2.2. Diferenciación *in vitro* de preadipocitos humanos

Las muestras de tejido adiposo colectadas en PBS se lavaron dos veces con PBS adicionado con estreptomicina 100 µg/mL, penicilina 100 U/mL en condiciones asépticas. Las muestras se cortaron finamente y se digirieron con 3 mg/mL de colagenasa tipo II de *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich), 2% de albúmina sérica bovina en solución A (Glucosa 10 mM, NaCl 130 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 7H₂O 5 mM, HEPES 30 mM, Rojo de fenol 1%, pH 7.6) durante 1 hora a 37°C en agitación constante. La suspensión celular se centrifugó (4,300 rpm; 5

min) y las células del estroma adiposo sedimentadas se sembraron en medio L15 (Gibco) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) (Hyclone) y antibióticos (estreptomina 100 µg/mL, penicilina 100 U/mL) [15].

Cultivos confluentes de células estromales adiposas, subcutáneas o viscerales, se indujeron a diferenciación adiposa con medio de inducción (L15, SFB 5%, biotina 33 µM, pantotenato de calcio 17 µM, insulina 100 nM, cortisol 100 nM, transferrina 5 µg/mL, triyodotironina 2 nM, dexametasona 100 nM, isobutil metil xantina 500 µM, rosiglitazona 1 µM y antibióticos) durante 6 días y posteriormente permanecieron en medio de mantenimiento (L15, SFB 5%, biotina 33 µM, pantotenato de calcio 17 µM, insulina 100 nM, cortisol 100 nM, transferrina 5 µg/mL, triyodotironina 2 nM y antibióticos) hasta su diferenciación terminal. Para los análisis de RT-PCR se obtuvo el RNA total de preadipocitos preconfluentes, preadipocitos quiescentes, células comprometidas a diferenciación por el tratamiento con medio de inducción y de adipocitos en diferenciación terminal.

2.3. Extracción de RNA y RT-PCR de punto final

EL RNA total de tejidos y células cultivadas se extrajo con Trizol (Invitrogen) y se incubó 1:1 con DNase I Grado Amplificación (Invitrogen) por 15 min a 37 °C. La retrotranscripción se realizó usando 0.5 µg de *Random Primers* (Invitrogen) y transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El cDNA se amplificó usando oligonucleótidos específicos para cada mRNA, diseñados con base en las secuencias reportadas para humano en GenBank (Tabla 2). El volumen de reacción fue de 25 µL y se añadieron 800 µg de cDNA, 0.2 mM de cada dNTP,

200 ng de oligonucleótidos y 1.0 U de Taq-DNA polimerasa (Promega) en amortiguador con $MgCl_2$ 1.5 mM. Las PCR incluyeron un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguido de 25-33 ciclos a 95 °C por 30 s, 60-62 °C por 30 s y 72 °C por 40 s y un ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% con TAE teñidos con bromuro de etidio y se analizaron en ChemiDoc XR (Bio-Rad).

2.4. RT-qPCR

Se usó el Kit QuantiTect Probe PCR de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante, con 100 ng de cDNA en un volumen total de 10 μ L. Se usaron oligonucleótidos específicos para cada mRNA analizado. Las reacciones se corrieron en el equipo LightCycler 2.0. El análisis de la expresión relativa de los mRNAs para los genes seleccionados se hizo por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [16]. Los datos obtenidos fueron normalizados con respecto al gen constitutivo GAPDH y contra la condición control, preadipocitos proliferantes. Los datos fueron analizados por ANOVA, el nivel de $P \leq 0.05$ se usó como criterio de significancia estadística.

3. Resultados

3.1. Los tejidos adiposos humanos subcutáneo y visceral expresan mRNAs de los componentes del DAPC

Como se mencionó previamente, hasta ahora no hay información sobre la expresión del DAPC en tejido adiposo humano, por lo que evaluamos la expresión de transcritos de las distrofinas Dp427 y Dp71, las distrobrevinas (Dbn) α y β , distroglicano (Dg), las sintrofinas (Snt) α I, β I y β II y los sarcoglicanos (Scg) α , β , γ , δ y ϵ .

Los resultados obtenidos muestran que los mRNAs de Dp427, Dp71, α - y β -Dbn, Dg, α I-, β I- y β II-Snt, y α -, β -, γ -, δ - y ϵ - Scg se expresaron claramente en los tejidos adiposos subcutáneo y visceral humanos de manera similar que los mRNAs de control de GAPDH. La expresión de las Dps y Dbns, así como la del α -Scg fue menor con respecto al control en las muestras del tejido subcutáneo que en las del tejido visceral. El resto de los mensajeros mostró niveles de expresión equiparables en ambos tejidos. Salvo las muestras viscerales del donante 3, todas las muestras expresaron la totalidad de los mRNAs analizados (Fig. 1).

3.2. Los componentes del DAPC se expresan en los distintos estadios de la adipogénesis terminal humana

El tejido adiposo está formado por una variedad de tipos celulares entre los que se encuentran células endoteliales, pericitos, fibroblastos, preadipocitos, macrófagos, otras células del sistema inmune y principalmente adipocitos maduros [17]. Para determinar si la expresión de los elementos del DAPC en el tejido adiposo ocurre en células del linaje adiposo (preadipocitos o adipocitos),

analizamos el perfil de expresión del DAPC durante la adipogénesis subcutánea y visceral humana (Fig. 2A).

El transcrito de Dp427 mostró una expresión creciente conforme avanza la diferenciación adiposa, mientras que los mRNAs codificantes para Dp71, Dg, α - y β II-Snt, así como para β -, δ - y ϵ -Scg no mostraron cambios sustantivos en su expresión en los distintos estadios de diferenciación analizados. Por otra parte, los transcritos de α - y β -Dbn, β I-Snt mostraron niveles de expresión bajos respecto al gen constitutivo GAPDH en los estadios de preadipocito proliferante y adipocito recién comprometido y niveles de expresión mayores en los estadios de preadipocito quiescente y adipocito terminal. Este mismo patrón se observó en la expresión de α -Scg en una de las poblaciones celulares analizadas (D4), mientras que, en la población restante, la señal de este mensajero fue casi nula a lo largo de la adipogénesis subcutánea o visceral. Los mRNAs de γ - y δ -Scg tampoco mostraron patrones de expresión similares entre las dos poblaciones celulares analizadas: en las células de uno de los donantes (D4) mostraron claramente un comportamiento oscilante como el escrito para α - y β -Dbn, en tanto que en la población restante (D6), este comportamiento fue evidente en la población visceral, pero no en la subcutánea (Fig. 2B).

3.3. Los niveles de expresión de algunos componentes del DAPC varían durante la adipogénesis humana terminal

Los resultados de RT-PCR de punto final mostraron que Dp427, α -Dbn y α -Scg se expresaron diferencialmente durante la adipogénesis subcutánea y visceral. Por esta razón se evaluaron los niveles de expresión de estos genes así

como de Dp71 y β -Dbn que mostraron ligeros cambios de expresión durante la adipogénesis por RT-PCR. Para estos experimentos se usó a GAPDH como gen normalizador.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión de Dp427, Dp71, α - y β -Dbn, se incrementan a partir de preadipocitos quiescentes y se mantuvieron en los siguientes estadios de la diferenciación adiposa subcutánea y visceral en ambos donantes. Los mensajeros de α -Scg aumentaron en preadipocitos quiescentes, y se reprimieron en las células comprometidas a diferenciación y en adipocitos maduros durante la adipogénesis subcutánea del D4 y D6. Mientras que en la diferenciación visceral el mRNA de α -Scg se incrementó a partir de preadipocitos quiescentes y se mantuvo en las siguientes etapas adiposas en ambos donantes (Fig. 3).

4. Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los tejidos adiposos subcutáneo y visceral humanos expresan mRNAs para las distrofinas Dp427 y Dp71, las distrobrevinas α y β , distroglicano, las sintrofinas αI , βI , y βII , y los sarcoglicanos α , β , γ , δ y ϵ . También muestran que los mRNAs de Dp427, α -Dbn y α -Scg se expresan diferencialmente durante la adipogénesis subcutánea y visceral in vitro.

El tejido adiposo humano expresa elementos del DAPC

El perfil de expresión de los elementos del DAPC fue similar en ambos tejidos adiposos de los donantes, sólo algunos de los elementos del complejo mostraron una expresión atenuada (Dp71, β -Dbn, βI - y βII -Snt, α -, γ - y δ -Scg) o nula (Dp427) en una de las muestras de tejido visceral (donante 3). Los niveles de expresión de α -Dbn, Dg, αI -Snt, β - y ϵ -Scg en la misma muestra tisular fueron similares al control GAPDH y descartan la posibilidad de que esa muestra careciera de calidad para el análisis realizado. Dado que otros elementos del complejo mostraron también variaciones entre los sujetos estudiados como Dp71, α -, δ - y ϵ -Scg, los resultados del tejido visceral del donante 3 pueden reflejar variaciones en la expresión del DAPC entre individuos. Estudios de la expresión tisular del DAPC en una población mayor son necesarios para explorar la significancia y el posible papel fisiológico de estas variaciones. En este estudio se muestra que en el tejido adiposo subcutáneo y visceral humano se expresan transcritos para α -, β -, γ -, δ - y ϵ -Scg, lo que concuerda con la información

publicada por Groh et al. [13] quienes reportaron un complejo de sarcoglicanos único para adipocitos blancos de rata que incluye β -, δ - y ϵ -Scg.

Los elementos del DAPC se expresan durante la adipogénesis humana

El perfil de expresión para los elementos del DAPC durante la adipogénesis muestra que Dp427, α -Dbn y α -Scg se expresan diferencialmente, mientras que los transcritos para Dp71, β -Dbn, distroglicano, α -Snt, β I-Snt y β II-Snt, parecen no cambiar.

Para corroborar estos cambios medimos la expresión relativa de algunos elementos del DAPC y encontramos que Dp427 aumenta su expresión en preadipocitos quiescentes y se mantiene en las siguientes etapas de la adipogénesis subcutánea y visceral. Así mismo, Dp71 una proteína que se expresa en la mayoría de los tejidos y participa en procesos de división celular [18], aumenta su expresión a partir de preadipocitos quiescentes y se mantiene en las siguientes etapas durante la diferenciación adiposa subcutánea y visceral.

Medimos la expresión de α -Dbn durante la adipogénesis subcutánea y visceral humana y encontramos que la expresión aumenta a partir de preadipocitos quiescentes y se mantiene en las siguientes etapas. Estos resultados concuerdan con la expresión de α -Dbn en la adipogénesis de rata, y coinciden en estadios de la diferenciación adiposa visceral. En conjunto, estas evidencias sugieren que α -Dbn podría participar en la regulación de la adipogénesis.

Cuantificamos también los niveles de expresión de β -Dbn en el curso de la adipogénesis humana. Aunque los resultados de RT-PCR de punto final no

mostraron variaciones en el nivel de expresión de este gen, los análisis de RT-qPCR muestran que se sobreexpresa en preadipocitos quiescentes y su expresión se mantiene en los estadios posteriores. Hasta ahora no se conocen claramente las funciones de las distrobrevinas, pero se les han atribuido funciones de señalización intracelular en músculo y en tejidos no musculares [19].

Como se mencionó anteriormente sólo α -Scg mostró cambios en su expresión por lo que se evaluó por RT-qPCR. Encontramos que durante la adipogénesis subcutánea la expresión de α -Scg aumenta en preadipocitos quiescentes y está reprimida en células comprometidas y adipocitos maduros, mientras que durante la diferenciación visceral la expresión de α -Scg se induce en preadipocitos quiescentes y se mantiene en estadios siguientes de ambos donantes. α -Scg es 62% similar a nivel de aminoácidos a ϵ -Scg y tiene actividad de ATPasa [6] por lo que su función podría ser reemplazada por ϵ -Scg [20] en los adipocitos. Se sabe que en el músculo esquelético y en células musculares cultivadas C2C12, existen dos tipos de complejos de sarcoglicanos, el primero contiene α , β -, γ - y δ -Scg y el segundo a β -, γ -, δ - y ϵ -Scg [20]. En tejido adiposo podría ser similar, ya que en los explantes tisulares se observa la expresión del mRNA de α -Scg pero no en cultivo de preadipocitos.

Previamente nuestro grupo de trabajo reportó que elementos del DAPC se expresan durante la adipogénesis subcutánea y visceral de rata pero sólo Dp71, Dp116, α -Dbn y β I-Snt cambian su expresión durante este proceso y podrían estar involucrados en la adipogénesis [14]. Romo-Yañez et al. [14] han sugerido que los cambios en la forma de la célula, la remodelación extensiva del citoesqueleto y la

matriz extracelular [21] que ocurren durante la adipogénesis podrían en parte estar mediados por el DAPC.

En resumen, nuestros resultados muestran que los mRNAs de las distrofinas Dp427 y Dp71, las distrobrevinas α y β , distroglicano, las sintrofinas αI , βI y βII y los sarcoglicanos α , β , γ , δ y ϵ se expresan en el tejido adiposo humano y sólo algunos cambian su expresión durante la adipogénesis. Estos hallazgos sugieren que el DAPC participa en la diferenciación y el metabolismo del tejido adiposo cuya función puede estudiarse en el futuro.

Agradecimientos

BSEL agradece a CONACYT por la beca 279139 y al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Rubén López Revilla y al Dr. Samuel Lara González por los comentarios hechos para este escrito.

Referencias

- [1] K. A. Lavidos, R. Kakkar, E. M. McNally, The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma, *Circ. Res.* 94 (2004) 1023–31
- [2] J. M. Ervasti, Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy, *Biochim. Biophysica Acta* 1772 (2007) 108–17
- [3] A. Heydemann, E. M. McNally, Consequences of disrupting the dystrophin-sarcoglycan complex in cardiac and skeletal myopathy, *Trends Cardiovasc. Med.* 17 (2007) 55–59
- [4] T. Haenggi, J. M. Fritschy, Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue, *Cell. Mol. Life Sci.* 63, (2006) 1614–31
- [5] A. E. H. Emery, The muscular dystrophies, *Lancet*, 359 (2002) 687–95
- [6] E. Ozawa, Y. Mizuno, Y. Hagiwara *et al.*, Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex, *Muscle Nerve*, 32 (2005) 563–76
- [7] J. Zimowski, E. Fidziańska, M. Holding *et al.*, Two mutations in one dystrophin gene, *Pol. J. Neurol. Neurosurg.* 2 (2013) 131–137
- [8] J. Shin, M. M. Tajrishi, Y. Ogura, et al., Wasting mechanisms in muscular dystrophy, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2013) 1–14
- [9] R.G. Roberts, Dystrophins and dystrobrevins, *Genome Biol.* 2 (2001) 3006.1–6.7
- [10] E. M. McNally, P. Pytel, Muscle diseases: the muscular dystrophies, *Annu. Rev. Pathol.* 2 (2007) 87–109

- [11] T. A. L. Wren, S. Bluml, L. Tseng-Ong, et al., Three-point technique of fat quantification of muscle tissue as a marker of disease progression in Duchenne muscular dystrophy: preliminary study, *Am. J. Roentgenol.* 190 (2008) 8–12
- [12] W. P. Chan, G. C. Liu, MR imaging of primary skeletal muscle diseases in children, *Am. J. Roentgenol.* 179 (2002) 989–97
- [13] S. Groh, H. Zong, M. M. Goddeeris, et al., Sarcoglycan complex: implications for metabolic defects in muscular dystrophies, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 19178–82
- [14] J. Romo-Yáñez, C. Montañez, L. A. Salazar-Olivo, Dystrophins and DAPs are expressed in adipose tissue and are regulated by adipogenesis and extracellular matrix, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404 (2011) 717–22
- [15] M. L. Herrera-Herrera, R. Zapata-Bustos, L. A. Salazar-Olivo, Simplified culture techniques for growth and differentiation of murine and human pre-adipocytes for translational applications, *Cytotherapy* 11(2009) 52-60
- [16] K. J. Livak, T. D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods* 25 (2001) 402–8
- [17] K. Sarjeant, J. M. Stephens, Adipogenesis, *Cold Spring Harb. Perspec. Biol.* 4, (2012) a0084171-19
- [18] E. C. M. Mariman, P. Wang, Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity, *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (2010) 1277–92

- [19] R. Tadayoni, A. Rendon, L. E. Soria-Jasso, et. al. Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene, *Mol. Neurobiol.* 45 (2012) 43–60
- [20] B. Constantin, Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins, *Biochim. Biophysica Acta*, 1838 (2014) 635–42
- [21] L. A. Liu, E. Engvall, Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 38171–176

Pies de Figuras

Fig. 1. Expresión del complejo de proteínas asociado a distrofina en tejidos adiposos humanos. RNA total de tejido adiposo subcutáneo y visceral de los donantes (D) se analizó por RT-PCR usando oligonucleótidos específicos para mRNA de las distrofinas Dp427 y Dp71, α - y β -distrobrevina (Dbn), distroglicano (Dg), α I-, β I y β II-sintrofina (Snt) y de los sarcoglicanos (Scg) α , β , γ , δ y ϵ . GAPDH se usó como gen constitutivo. (+) Control positivo, músculo esquelético humano o células HEK293. (-) Control negativo, sin transcripción reversa. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 2.0% y se tiñeron con bromuro de etidio para su análisis.

Fig. 2. Expresión del DAPC durante la adipogénesis subcutánea y visceral humana. El RNA total de preadipocitos preconfluentes (A1, B1), preadipocitos quiescentes (A2, B1), células inducidas a adipogénesis terminal (A3, B1) y adipocitos maduros (A4, B1) se analizó por RT-PCR usando oligonucleótidos específicos para distrofinas Dp427 y Dp71, α - y β -distrobrevina (Dbn), distroglicano (Dg), α I-, β I y β II-sintrofina (Snt) y sarcoglicanos (Scg) α , β , γ , δ y ϵ . PPAR γ se usó como control de diferenciación adiposa y GAPDH como gen constitutivo. (+) Control positivo, músculo esquelético humano o células HEK293. (-) Control positivo, sin transcripción reversa. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 2.0% y se tiñeron con bromuro de etidio para su análisis.

Fig. 3. Cuantificación de la expresión de componentes del DAPC durante la adipogénesis subcutánea y visceral humana. La expresión de las distrofinas Dp427 y Dp71, las distrobrevinas (Dbn) α y β , y el sarcoglicano α (α -Scg) se cuantificó empleando RNA total extraído de preadipocitos confluentes, preadipocitos quiescentes, células inducidas a diferenciación terminal y adipocitos maduros de tejido adiposo subcutáneo (barras claras) o visceral (barras oscuras) de dos donantes (D4, barras azules; D6, barras moradas). Como gen constitutivo empleamos GAPDH. Las barras son el promedio \pm la desviación estándar. Las letras minúsculas (a), (b), (c) y (d) indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a una prueba ANOVA ($P \leq 0.05$).

Fig. 1

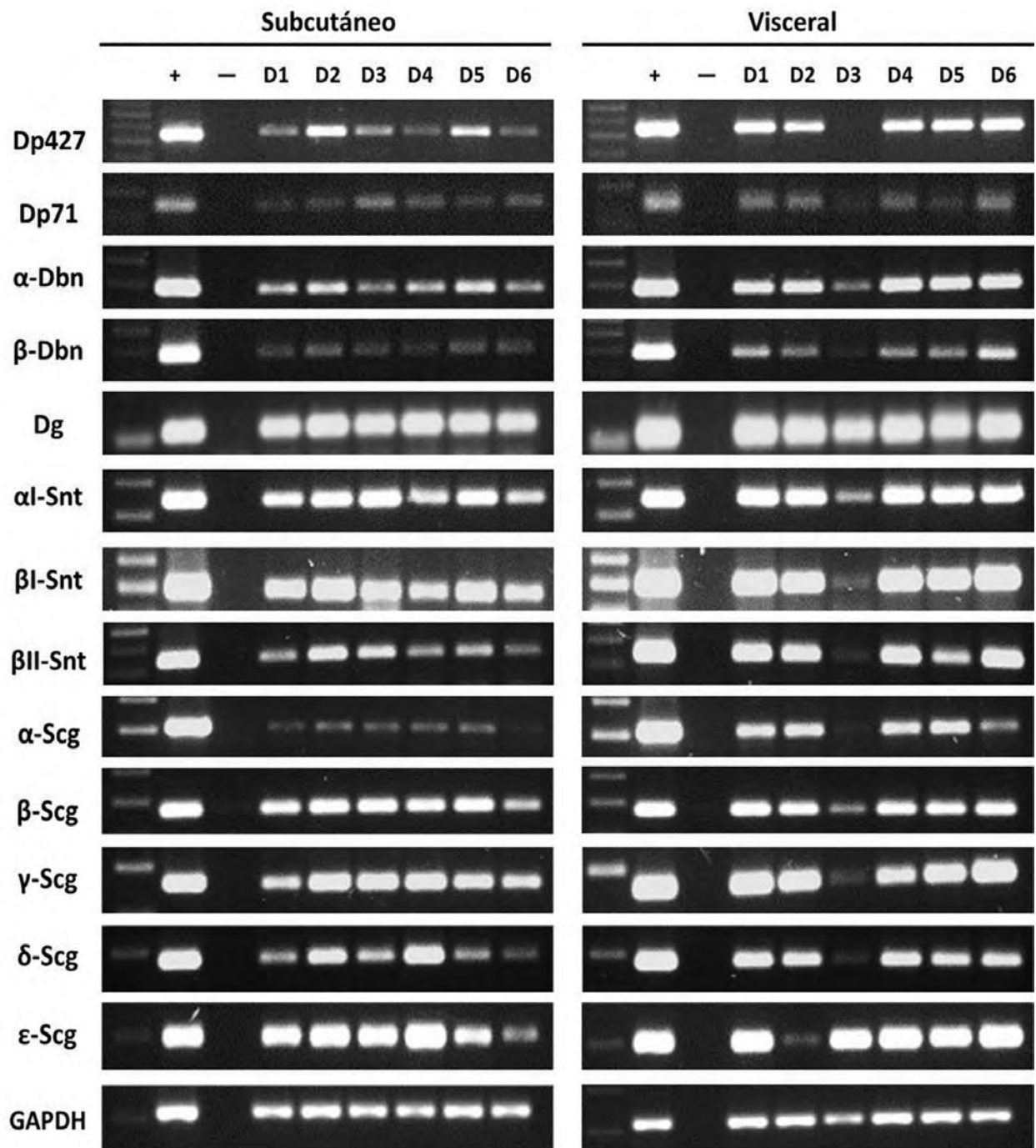


Fig. 2

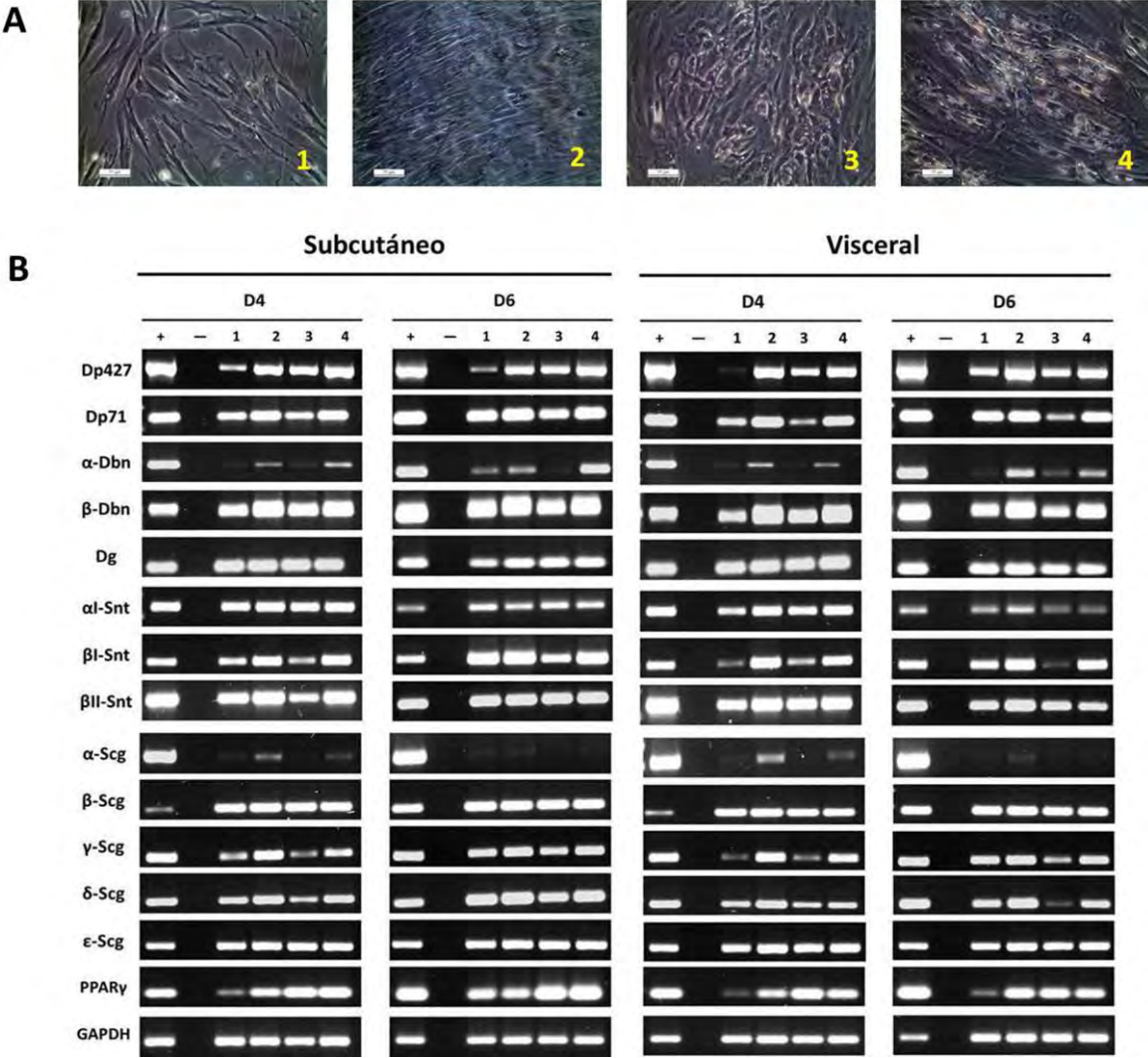


Fig. 3

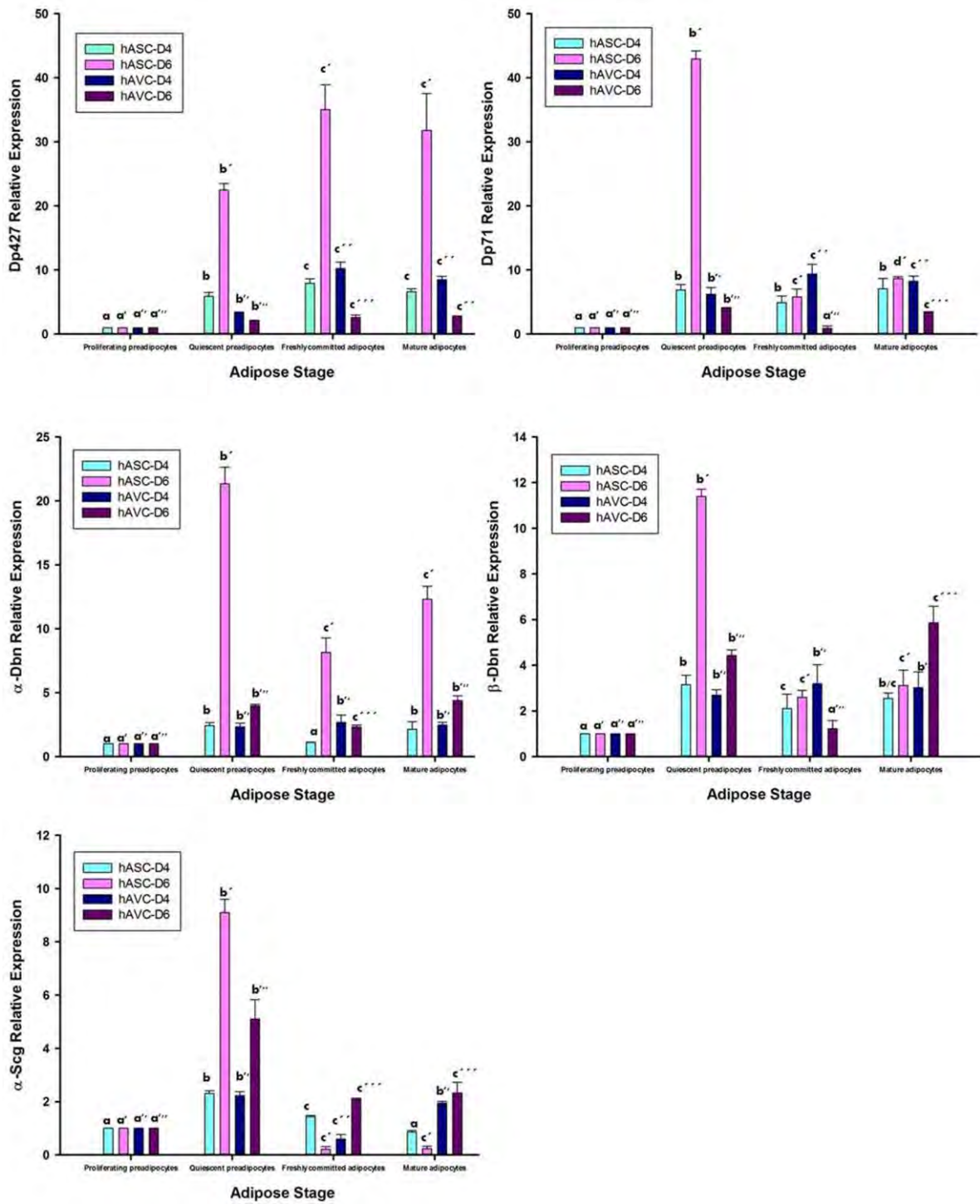


Tabla 1. Características de los donantes

ID	Sexo	Edad	Masa (kg)	Estatura (m)	IMC (kg/m ²)
1	M	36	68.0	1.65	25.0
2	M	32	52.0	1.55	21.6
3	M	22	66.5	1.70	23.0
4	M	27	72.0	1.68	25.5
5	M	23	75.0	1.65	27.5
6	M	36	91.0	1.85	26.6

Los donantes 2 y 3 tienen normopeso y los donantes 1, 4, 5 y 6 sobrepeso. El índice de masa corporal (IMC) igual o superior a 25 indica sobrepeso y el igual o superior a 30 obesidad (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>).

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos

mRNA	Secuencias	Tamaño amplicón (pb)
Dp427	Fw. AGCACAAGGAGAGATTTCTAATGA Rv. CCATCTACAGATGTTTGCCCATCG	550
Dp71	Fw. ATGAGGGAACAGCTCAAAGGCCACG Rv. TCTGCAGTCTTCGGAGTTTC	145
α-Dbn	Fw. TCTTCGTCTCAGCCACCTCAGCA Rv. TGCTGTGCCTTCTCTGGCGT	185
β-Dbn	Fw. GCGGCTGCTGAGGCAAAGGA Rv. AGCGCACTGGCATGGGCATT	203
Dg	Fw. TTGGCATTCTGATGGCACGGC Rv. CCTTCCCTGCCGCTGATACCTTGA	111
αI-Snt	Fw. AGCCCGTACTGCCCCACTCA Rv. ATTCCACGTGCAGGCTGTAGACAC	241
βI-Snt	Fw. GCTGGCTTGCAGAAAAGGTGCC Rv. CACCAGCCTGGGGTGATCCCT	201
βII-Snt	Fw. TGGCTGGCAGAACAGGCAAAC Rv. GCCCTGTGAGAGCCTGTCCT	243
α-Scg	Fw. GCGGGAGGGAAGGCTGAAGAGAGAC Rv. TCCAGAATGAGGGGCACCTGGG	210
β-Scg	Fw. TGGGCCGTGATTCGCATTGGA Rv. AAACAATAGGCTGGTTGTTGCCAGT	178
γ-Scg	Fw. AGTAACTGGGCCTGAAGGGGCT Rv. AGCGCCTCAATTTCCAGCGT	165
δ-Scg	Fw. ACGAGTTTTAGGAGCGGAGGGCA Rv. AGCTCTGTCCTGCAGGTGGCTT	183
ϵ-Scg	Fw. CCACCTTACCCAAAACCTGGCGA Rv. GGTGCGCCTGTTGTAGGCAGT	201
GAPDH	Fw. GAAGGTGGTGAAGCAGGCGT Rv. ATGTGGGCCATGAGGTCCACCA	216