



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**“EVALUACIÓN DE LAS REGIONES N- Y C- TERMINAL
DE DISFERLINA EN EL PROCESO DE EXOCITOSIS,
EN MIOBLASTOS DE PACIENTES CON
DISFERLINOPATÍAS”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular**

CINDEL CAROLINA FIGUEROA CARES

**Director de Tesis: Dra. Ana María Cárdenas
Codirector de Tesis: Mario Párraga San Román**

AGOSTO / 2020



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**“EVALUACIÓN DE LAS REGIONES N- Y C-TERMINAL
DE DISFERLINA EN EL PROCESO DE EXOCITOSIS,
EN MIOBLASTOS DE PACIENTES CON
DISFERLINOPATÍAS”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular**

CINDEL CAROLINA FIGUEROA CARES

**Director de Tesis: Dra. Ana María Cárdenas
Codirector de Tesis: Mario Párraga San Román**

FECHA: AGOSTO 2020



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“Evaluación de las regiones N- y C- terminal de disferlina en el proceso de exocitosis, en mioblastos de pacientes con disferlinopatías”

Cindel Carolina Figueroa Cares

Este trabajo se realizó bajo la supervisión de Ana María Cárdenas en el laboratorio de Neurosecreción y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. Álvaro Ardilles
Presidente Comisión

Dr. Pablo Caviedes
Profesor Informante

Dr. Agustín Martínez
Profesor Informante

Dra. Ana M. Cárdenas
Director de Tesis

**Valparaíso, Chile
2020**

*Con mucho cariño a mi familia
y seres queridos.
Los amo...*

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar, quiero agradecerles a mis papás y familia, ya que sin su apoyo y ánimos no me habría motivado del todo a dar este nuevo paso. Gracias por siempre estar al tanto de mí y animarme continuamente.

Le agradezco, también, a mi profesora y tutora de tesis, la Dra. Ana María Cárdenas por tomarse su tiempo para corregirme, por su paciencia, sus consejos, su apoyo y por siempre estar ahí cuando la he necesitado.

Agradezco también a Tiare, quien me ha acompañado en esta travesía, por su apoyo, ánimos e incentivos cuando me encontraba desanimada y sin motivación, por escucharme. Por su paciencia constante al soportarme en mis peores momentos. Le agradezco por ayudarme a avanzar y alentarme a seguir cada vez que dudaba.

También quiero agradecerle a Conty por escuchar mis quejas, ensayos y desesperaciones, por calmarme y "cachetearme" desde Alemania en los últimos momentos y por sus ánimos para seguir adelante.

También quiero agradecerles a mis compañeros de magister: Pancho, Maca, Tati, Glo, Juanca, Cami, Debo, Clau y Selwin por hacer más amena esta travesía, por el apoyo, por la preocupación, los ánimos y el alentarnos mutuamente para continuar.

Por último, a los miembros del laboratorio en donde desarrollé la tesis: Xime, Coté, Coni, Dani, Hugo, por oírme con mis problemas y aconsejarme cuando lo necesité.

A todos ustedes les doy las gracias profundamente, ya que sin vuestro aporte habría sido muy difícil sobrellevar la carga que este nuevo paso hacia el mundo profesional trae consigo.

iMuchísimas Gracias!

ABREVIATURAS

AA1 = Anexina A1

AA2 = Anexina A2

MG53 = Mitsugumin 53

Cav 3 = Caveolina 3

LGMD2B = Distrofia muscular de cinturas Tipo 2 B

MM = Miopatía de Miyoshi

PFA = Paraformaldehído

PBS = Buffer fosfato salino

DMSO = Dimetil Sulfóxido

CK = Creatina quinasa

bFGF = Factor de crecimiento de fibroblastos básico

EGF = Factor de crecimiento epidérmico

EGTA = etilenglicol-bis (β -aminoetil éter) -N, N, N', N'-ácido tetraacético o ácido egtazico

DMEM = Acrónimo del inglés Dulbecco's Minimun Essential Medium

Hepes = Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico

SNARE = Complejo receptor de SNAP

SNAP = Proteína soluble de acoplamiento de NSF

NSF = Factor Sensible a N-etilmaleimida

IRAP = Aminopeptidasa Regulada por Insulina

Phluorina = Proteína fluorescente verde sensible a pH

PIPES = ácido piperazín-N,N'-bis(2-etanosulfónico)

PS = Fosfatidilserina

PC = Fosfatidilcolina

PIP2 = Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

PI = Fosfatidilinositol

PG = Fosfatidilglicerol

GM1 = monosialotetrahexosilgangliosido

S100A10 = proteína relacionada a S100.

ÍNDICE

Contenidos	Páginas
1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCIÓN	12
2.1 MIOPATÍAS ASOCIADAS A MÚSCULO ESQUELÉTICO	12
2.2 DISFERLINA	14
2.2.1 Localización y Función.....	16
2.2.2 Proteínas asociadas a disferlina y sus funciones	18
2.2.3 Disferlina y Exocitosis	21
3. HIPÓTESIS.....	24
4. OBJETIVO GENERAL	24
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
6. METODOLOGÍA	25
6.1 ASPECTOS GENERALES	25
6.1.1 Líneas Celulares	25
6.1.2 Constructos y su amplificación	25
6.1.3 Cultivo Celular	26
6.1.4 Transfección de las líneas	27
6.2 METODOLOGÍA SEGÚN OBJETIVOS.	27
6.2.1 Objetivo Específico 1 (O.E.1): Determinar la contribución de las regiones N- y C-terminal de disferlina a los eventos de exocitosis en mioblastos obtenidos de paciente con disferlinopatía.....	27
6.2.2 Objetivo Específico 2 (O.E.2): Estudiar la distribución de anexina A2 en mioblastos humanos disferlinopáticos y sanos.	31
6.2.3 Objetivo Específico 3 (O.E.3): Determinar la contribución de disferlina	

(completa) y de sus regiones N- y C- terminal a la distribución de AA2 en mioblastos de paciente con disferlinopatía.....	32
6.3 ESTADÍSTICA	33
7. RESULTADOS	35
7.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1 (O.E.1): Determinar la contribución de las regiones N- y C-terminal de disferlina en los eventos de exocitosis.....	35
7.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 2 (O.E.2): Estudiar la distribución de Anexina A2 en mioblastos humanos disferlinopáticos y sanos.....	43
7.3 OBJETIVO ESPECÍFICO 3 (O.E.3): Determinar la contribución de disferlina (completa) y de sus regiones N- y C- terminal en la distribución de Anexina A2 de la línea mutante.	45
8. DISCUSIÓN.....	49
8.1 Las regiones N- y C-terminal de disferlina no restauran, por sí solas, la exocitosis en mioblastos DYSF3.	49
8.2 La distribución de AA2 se ve alterada en mioblastos humanos deficientes o con sobreexpresión de disferlina.	51
9. CONCLUSIONES.....	53
10. RESPUESTAS A LOS COMENTARIOS DE LOS REVISORES	54
11. BIBLIOGRAFIA.....	57
12. ANEXOS	69

Lista de Figuras Página

Figura 1.....	13
Figura 2.....	14
Figura 3.....	17
Figura 4.....	20
Figura 5.....	21
Figura 6.....	22
Figura 7.....	28
Figura 8.....	30
Figura 9.....	31
Figura 10.....	32
Figura 11.....	36
Figura 12.....	37
Figura 13.....	38
Figura 14.....	39
Figura 15.....	40
Figura 16.....	41
Figura 17.....	42
Figura 18.....	44
Figura 19.....	46
Figura 20.....	48
Figura 21.....	51

Lista de Tablas Página

Tabla N1.....	25
Tabla N2.....	48

1. RESUMEN

Mutaciones en el gen que codifica para disferlina causan disferlinopatías. Disferlina es una proteína requerida para la reparación del sarcolema, cuya estructura consiste en una región C-terminal transmembranal y 7 dominios C2 citosólicos. Se ha propuesto que la región comprendida entre el dominio C-terminal y los dominios C2F y C2G son suficientes para permitir la reparación del sarcolema. Dicha región presenta semejanza con sinaptotagmina, un sensor de Ca^{2+} en procesos de exocitosis. Además, disferlina interactúa con las proteínas esenciales para la exocitosis: syntaxina-4, SNAP-23 y anexina A2 (AA2), y resultados recientes indican que mioblastos deficientes en disferlina presentan una reducción en el número de eventos de exocitosis. No obstante, no se conoce qué regiones de disferlina son necesarias para ello.

En esta tesis de magister se estudió la contribución de las regiones N- y C-terminal de disferlina al proceso de exocitosis y a la distribución de AA2, utilizando: mioblastos provenientes de individuos sin o con diagnóstico de disferlinopatía, el reportero IRAP-pHluorin junto a microscopía TIRF para visualizar eventos de exocitosis, y microscopía confocal para estudiar la distribución de AA2. Nuestros resultados indican que las regiones N- y C-terminal de disferlina no son suficientes para restituir los eventos de exocitosis ni la distribución de AA2 en mioblastos de paciente con disferlinopatía. Empero, disferlina completa si restaura la distribución de AA2. Por lo anterior, es probable que se requiera de la asociación entre esas regiones y/o la región media de disferlina para restablecer sus funciones.

Palabras clave: Disferlinopatías, disferlina, Anexina A2, Exocitosis, IRAP-pHluorin.

2. INTRODUCCIÓN

Con el fin de mantener la integridad y sobrevivencia de los tejidos, las células han adquirido la capacidad de reparar ciertos daños tales como la ruptura por estrés mecánico del sarcolema en el músculo esquelético (1).

El tejido muscular es un tejido considerado plástico que se adapta a las necesidades del individuo. Sin embargo, hay momentos en los que el estrés mecánico resultante es mayor a la velocidad de adaptación del músculo produciéndose daños en el sarcolema. Cuando esto ocurre, la entrada masiva de Ca^{2+} hacia el interior de las células desencadena una serie de procesos que involucra la activación de una gran maquinaria proteica. Si todo está en orden, esta ruptura es sellada y la célula continúa con su ciclo de vida. Por el contrario, si alguna de las proteínas involucradas en el proceso de reparación no cumple su función, se activan procesos conducentes al estrés oxidativo (2, 3), alteraciones de la permeabilidad del sarcolema, disfunción mitocondrial y degeneración muscular (4 – 6). Esto puede ocurrir cuando mutaciones en las proteínas implicadas en este proceso alteran su expresión y/o función (5, 7).

En esta tesis se estudiarán disferlina y anexina A2 (AA2), dos proteínas implicadas en los procesos de reparación del sarcolema y la excitotoxicidad (4, 8, 9).

A continuación, se presentarán algunos conocimientos obtenidos desde distintas investigaciones relacionadas a las distrofias musculares y a las funciones de disferlina y AA2.

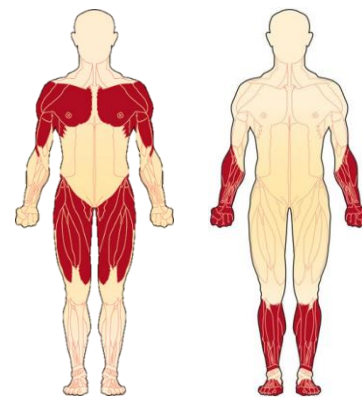
2.1 MIOPATÍAS ASOCIADAS A MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo esquelético es un tejido esencial para el funcionamiento del organismo, no sólo porque permite el movimiento, la respiración, el mantenimiento de la postura y el desarrollo de la fuerza, sino también porque regula los niveles de glucosa plasmática, y secreta mioquinas, moléculas sintetizadas y secretadas por el músculo esquelético que regulan el metabolismo de otros tejidos (10,11). No obstante, el desarrollo del músculo esquelético puede verse afectado por factores genéticos, como es el caso de las miopatías hereditarias (12). Si bien estas afecciones comprenden más de 350 mutaciones en diferentes genes, muchos de los mecanismos que subyacen a estas patologías siguen sin ser conocidos (13). Entre las miopatías

hereditarias se encuentran las distrofias musculares, caracterizadas por una debilidad muscular progresiva que afecta distintos grupos musculares en diferentes grados, entre ellos aquellos de las extremidades, los faciales y/o respiratorios, pudiendo alterar, en algunos casos, órganos como el cerebro (14). Sin embargo, la edad de inicio, la progresión y las complicaciones que conllevan, depende del tipo de proteína que causa la distrofia (15 – 17).

Un tipo de distrofia muscular son las disferlinopatías, las cuales están asociadas a un déficit de disferlina (18). Los tres fenotipos de disferlinopatías conocidos son la distrofia muscular de cinturas tipo 2B (LGMD 2B), la miopatía distal de Miyoshi (MM) y la miopatía distal con inicio tibial anterior (DMAT). LGMD 2B es el fenotipo más común dentro de las disferlinopatías, junto con MM. Los músculos afectados son aquellos proximales a la cintura pélvica, dificultando al paciente a ponerse de pie, caminar o correr. Posteriormente, se ven afectados los músculos de la cintura escapular, pero de una manera más leve (19, 20). En la MM, los músculos afectados al comienzo son los distales a la cintura escapular y pélvica, incluyendo, primeramente, los músculos gastrocnemio y sóleo, lo cual dificulta que el individuo se ponga de puntillas. A medida que progresa la enfermedad además se afectan los músculos de los glúteos y otros proximales a la cintura escapular, entorpeciendo la fuerza de agarre o actividades básicas como caminar, correr o subir escaleras. Junto con LGMD 2B, MM es de progresión lenta (20 – 22). DMAT es un fenotipo mucho menos frecuente, en donde los músculos afectados también son los distales a la cintura escapular y pélvica, sin embargo, la enfermedad progresa rápidamente afectando los músculos tibiales anteriores (23) (Figura 1). La edad media de inicio en los tres fenotipos ronda los 14 – 41 años y son enfermedades autosómicas recesivas (23, 24).

Figura 1. Esquema demostrativo de los músculos afectados en los tres fenotipos de disferlinopatías. A la izquierda se observan los músculos afectados en LGMD 2B y a la derecha los afectados en la MM y MDAT.



Una característica sustancial en todos los tipos de disferlinopatías son los altos niveles séricos de creatina quinasa (CK) los cuales, en un inicio, están elevados entre 10 – 100 veces lo normal, desde la fase asintomática temprana de la enfermedad (24) e indican daño del tejido muscular (25, 26). Sin embargo, el seguimiento de estas patologías a través de la CK no es lo mejor, pues a medida que progresa la enfermedad los niveles de CK tienden a normalizar (27, 28). Otra característica importante de mencionar es que los niveles de CK varían según el tipo de mutación y el fenotipo de la enfermedad, encontrándose niveles menores de CK para el caso de MM que para LGMD2B (26).

2.2 DISFERLINA

Disferlina es una proteína que pesa ~237 kDa, su gen, *DYSF*, se encuentra en el cromosoma 2p13 (29, 30). Disferlina pertenece a la familia de las ferlinas, familia proteica que se caracteriza por poseer múltiples dominios C2 y un dominio C-terminal, transmembranal altamente conservados (31). Es sabido que las proteínas con dominios C2 se unen a Ca^{2+} y fosfolípidos, y están involucradas en la transducción de señales y tráfico de membranas (21). Así, disferlina, está compuesta por un dominio C-terminal transmembrana de paso simple, una región N-terminal citosólica constituida por siete dominios C2, tres dominios Fer y cuatro dominios DysF (Figura 2).

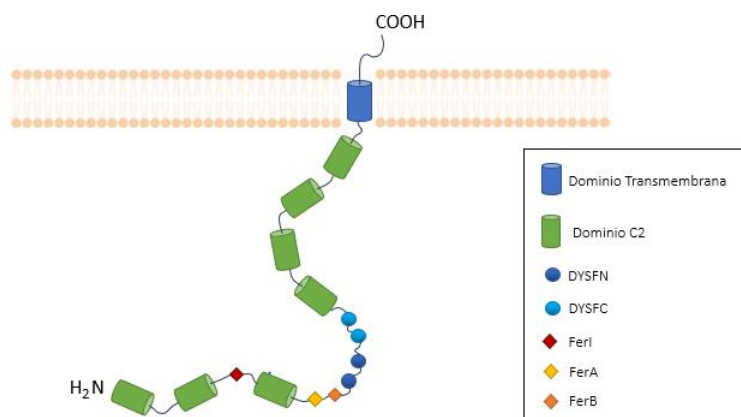


Figura 2. Esquema de la estructura de disferlina y sus dominios C2, DYSFN, DYSFC, FerI, FerA y FerB.

Los dominios C2 de disferlina son independientes entre sí y constan de ~130 aminoácidos (32, 33). Poseen uno o dos sitios de unión a Ca^{2+} con diferentes valores K_d que van entre 1.5 a 1000 μM (34). Con respecto al dominio C2A de disferlina, Davis y colaboradores en 2002, demostraron que en presencia de Ca^{2+} , este dominio se une a liposomas que contienen gran cantidad de fosfatidilserina (PS) (35, 36). Además, Therrien y colaboradores agregaron que el dominio C2A tiene afinidad por 4-fosfatidilinositol (PI) y por fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) (36, 37). Por otro lado, Marty y colaboradores reportaron que los dominios C2B y C2C tienen comportamientos similares al dominio C2A (38). Los otros dominios no presentan afinidad significativa a PS u otros fosfoinositidos, aun en presencia de Ca^{2+} en el medio (35 – 37). No obstante, Abdullah y sus colaboradores demostraron que los dominios C2A, E, F y G son capaces de aumentar su afinidad por fosfolípidos en presencia de Ca^{2+} (34).

A pesar de que estos dominios son conocidos por poseer unión lipídica regulada por Ca^{2+} , no todos ellos son igual de sensibles a Ca^{2+} . Por otro lado, algunos poseen más interacciones proteína–proteína que interacciones proteína–lípidos (34, 39). Incluso se piensa que algunos dominios C2 actúan más como espaciadores entre dominios o simplemente para darle estructura a la proteína (34).

Entre las otras regiones que componen a disferlina, están los cuatro dominios DysF, los que son denominados de acuerdo a su ubicación con respecto al extremo terminal de la proteína, así los dominios DysFN son más cercanos a la región N-terminal y los DysFC están próximos a la región C-terminal. Este último se caracteriza por ser rico en residuos de arginina. También encontramos dominios Fer, los cuales contienen de 60-70 residuos (36). Se debe mencionar que la función de los dominios Fer y DysF aún no es conocida (21, 36, 40). Sin embargo, la presencia de FerA viene de la mano con un motivo DYSF, lo que sugiere que puede existir una relación funcional entre ellos (36). En 2018, Harsini y sus colaboradores demostraron a través de cromatografía de intercambio iónico que el dominio FerA de disferlina posee carga predominantemente negativa a pH fisiológico y que puede unirse a fosfolípidos de membrana y tal vez también podría insertarse en ella, unión que parece ser reforzada en presencia de Ca^{2+} (41).

Como dato adicional, dentro de la familia de las ferlinas, se encuentra

mioferlina, la cual está también ampliamente expresada en músculo esquelético, e involucrada en la fusión de mioblastos y regeneración de este tejido (42, 43). Mioferlina además cumple un rol en la reparación de la membrana en células tumorales (44). Otra ferlina importante es otoferlina, la cual se expresa principalmente en las células ciliadas internas del oído interno, en donde gracias a su función sensora de Ca^{+2} es capaz de regular la exocitosis mediada por el complejo SNARE (Receptor de Proteína de fijación soluble de NSF (Factor Sensible a N-etilmaleimida)) (45). Se sabe que mutaciones en el gen que codifica para otoferlina son causales de sordera no sindrómica (46).

2.2.1 Localización y Función

Disferlina se encuentra ampliamente distribuida en el músculo esquelético, corazón y placenta. También se expresa, pero en menor cantidad, en cerebro, hígado, pulmón, bazo, páncreas, riñones y leucocitos (20, 47). En monocitos se cree que puede modular la quimiotaxis y la adhesión celular (30, 47 - 49).

En el músculo esquelético disferlina se encuentra en sitios específicos según las funciones que realiza:

- a. *Sarcolema y vesículas de transporte:*** Hasta ahora, la función mejor descrita de disferlina es la reparación del sarcolema dañado por lesión mecánica (23, 50, 51). Estas lesiones conllevan a la entrada masiva de Ca^{2+} el cual gatilla el reclutamiento de vesículas ricas en disferlina en el sitio dañado. Estas vesículas se fusionan entre si formando un "parche" que sella la ruptura (Figura 3) (52 - 54). En ausencia de disferlina, el resellado se produce muy lentamente (4, 10).

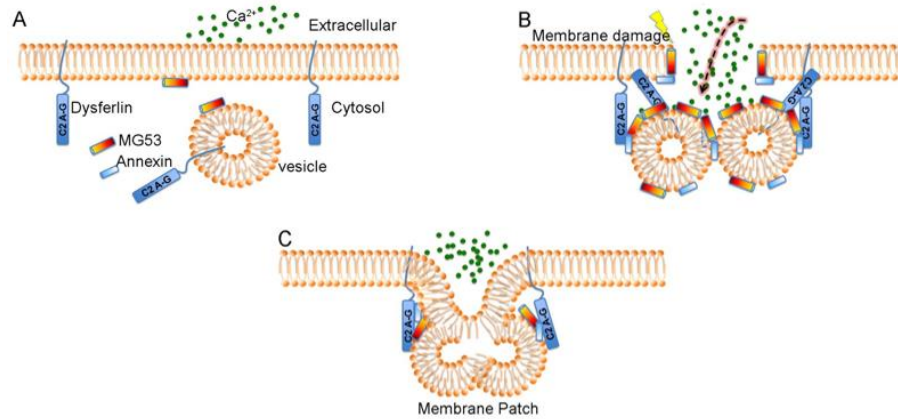


Figura 3. Esquema del mecanismo de reparación de las membranas en el músculo esquelético. A. Sarcolema intacto. B. Un daño en el sarcolema permite la entrada masiva de Ca^{2+} hacia el espacio intracelular, lo que lleva al reclutamiento de vesículas que contienen disferlina. C. La fusión entre vesículas y la membrana que permite el sellado de la disrupción (54).

b. Red de Túbulos T: Disferlina se asocia a los canales de Ca^{2+} tipo L presentes en los túbulos-T y contribuye a la mantención de la homeostasis de Ca^{2+} (15, 21, 51, 55). Esto queda demostrado, cuando se observó que fibras maduras deficientes de disferlina, luego de un estrés mecánico agudo, presentaron una homeostasis de Ca^{2+} alterada, daño en la red de túbulos T (50), y una morfología anormal (56). También se ha demostrado que disferlina participa en el desarrollo y mantenimiento de estas estructuras, pues se ha observado que una deficiencia de disferlina provoca anomalías ultraestructurales en los túbulos T primarios (15, 51, 55, 56).

Disferlina también se expresa altamente en la membrana de monocitos de la sangre periférica, lo que al parecer se correlaciona con los niveles de disferlina en el músculo esquelético, ya sea en pacientes sanos como en pacientes que, por mutaciones causantes de distrofia, presentan deficiencia en esta proteína (57).

También se ha demostrado que disferlina cumple un rol en la estabilidad de la

membrana apical de los sinciotroblastos, sugiriendo una función en el mantenimiento de la placenta humana y en la prevención de la preclamsia (58).

2.2.2 Proteínas asociadas a disferlina y sus funciones

La reparación de las membranas es un proceso bastante complejo y que debe ocurrir rápidamente. Para llevar a cabo la reparación de la membrana, disferlina interactúan con distintas proteínas a través de sus dominios C2. Entre las proteínas que se asocian a disferlina se encuentran:

- a. Mitsugumin 53 (MG53):** Esta proteína está involucrada en la reparación de la membrana plasmática en diferentes tejidos. Ella media el reclutamiento de disferlina y vesículas a los sitios dañados (7). Se ha informado que MG53 se asocia al dominio C2A de disferlina (59). Este dominio C2A también permite la fusión de lisosomas con la membrana plasmática (60).
- b. AHNAK:** Esta proteína está involucrada en la organización del citoesqueleto, regulación de los canales de Ca^{2+} tipo L, reparación de la membrana, tráfico vesicular y en el acoplamiento de la excitación y contracción del músculo esquelético (61 – 64). Se ha demostrado que en ausencia de disferlina, los niveles de AHNAK disminuyen drásticamente (65, 66).
- c. Caveolina-3 (Cav-3):** Se ha descrito que Cav-3 es otra proteína clave para el mantenimiento de un buen resellado de la membrana pues recluta a disferlina hacia los sitios dañados en asociación con MG53 (7, 67 - 69). También permite la endocitosis de disferlina durante el proceso de reparación (68).
- d. Afixina (β parvina):** Se ha sugerido que disferlina también interactúa con afixina, participando en la reorganización de la actina cortical, activando Rac1 a través de los factores de intercambio interactivos α y β PAK (PIX) (70, 71).
- e. Vinculina:** Se ha descrito que junto a afixina permiten la unión de disferlina con integrinas apoyando su función en la reparación de los sarcolemas dañados (66, 72, 73).
- f. α -tubulinas:** Disferlina también interactúa a través de sus dominios C2A y C2B con α -tubulinas, permitiendo su transporte hacia los sitios de lesión del sarcolema (17, 73).

- g. Calpaína:** Esta proteasa escinde a disferlina dando origen al péptido minidisferlina (mDysf) (74), el que está compuesto por los dominios C2F, C2G y la región transmembranal de disferlina. Este péptido restaura la capacidad de reparar las membranas de las fibras dañadas de músculo esquelético en ausencia de disferlina (74, 75). Calpaína induce la proteólisis de disferlina no sólo en el músculo, sino también en células endoteliales y astrocitos, entre otros (76). Si bien mDysf restituye la reparación de las membranas, no corrige el fenotipo propio de la enfermedad. Esto sugiere que los otros dominios de disferlina son claves en otras funciones musculares (75, 77).
- h. Anexinas:** Disferlina interacciona y colocaliza con AA1 y AA2 de una manera dependiente de Ca^{2+} en la membrana plasmática de fibras musculares sanas, acción que no se observa en el músculo deficiente de disferlina (78). Se sugiere que la interacción entre disferlina y AA2 está mediada a través de los dominios C2 N-terminales, sin embargo, se desconoce los dominios específicos que intervienen en esta unión (73, 79 - 81).

Las anexinas son proteínas capaces de unirse a fosfolípidos cargados negativamente de una manera dependiente de Ca^{2+} (79, 82). Son conocidas por ser proteínas multifuncionales debido a que poseen roles en distintos procesos, como son la fusión de vesículas con la membrana dañada, el tráfico de membranas, el remodelamiento del citoesqueleto de actina, procesos de endocitosis y exocitosis, entre otras funciones (23, 79, 82 - 88). Algunas de estas funciones, incluyendo su participación en los procesos de reparación de la membrana plasmática, dependen de la capacidad de algunas anexinas de crear microdominios de membrana que facilitan las interacciones de proteínas con membranas (79, 86). En particular, a través de la formación de un complejo heterotetramérico con la proteína de unión a Ca^{2+} relacionada a S100, S100A10, AA2 es capaz de promover un ambiente lipídico propicio para proteínas del complejo de fusión SNARE al interactuar con los fosfolípidos PIP2, PS, GM1 (monosialotetrahexosilgangliosido) y F-actina, permitiendo el acoplamiento y fusión de las vesículas con la membrana dañada (23, 40, 78, 88) (Figura 4).

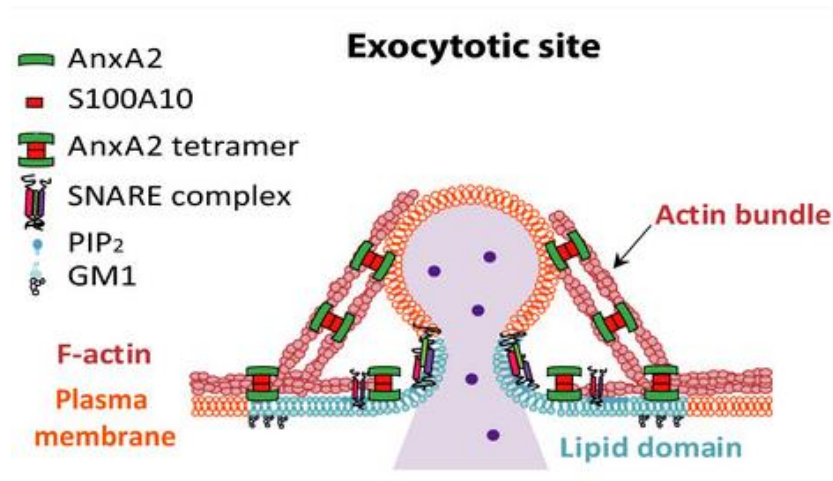


Figura 4. Modelo esquemático de la participación de AA2 (AnxA2) en procesos de exocitosis. Se observa la generación de los dominios lipídicos que permiten el anclaje de la vesícula a la membrana plasmática para permitir la exocitosis. Esto se produce a través del complejo heterotetramérico formado por AA2 y S100A10 y la interacción de proteínas del complejo SNARE, PIP₂ (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato), GM1 (monosialotetrahexosilgangliosido) en conjunto con F-actina (88).

A pesar de que se ha descrito que mDysf, parece suficiente para reparar la membrana dañada e interactúa con AA2 de una manera dependiente de calcio, como ya se mencionó, no corrige el fenotipo distrófico de la enfermedad, sugiriendo que los otros dominios C2 estarían involucrados en otras funciones igualmente importantes. Tales funciones deberían estar mediadas por la interacción con otras proteínas. Por lo tanto, se requieren de más estudios que permitan entender la función de los distintos dominios de disferlina. En la figura 5 se muestra un esquema que resume las funciones e interacciones de los distintos dominios C2.

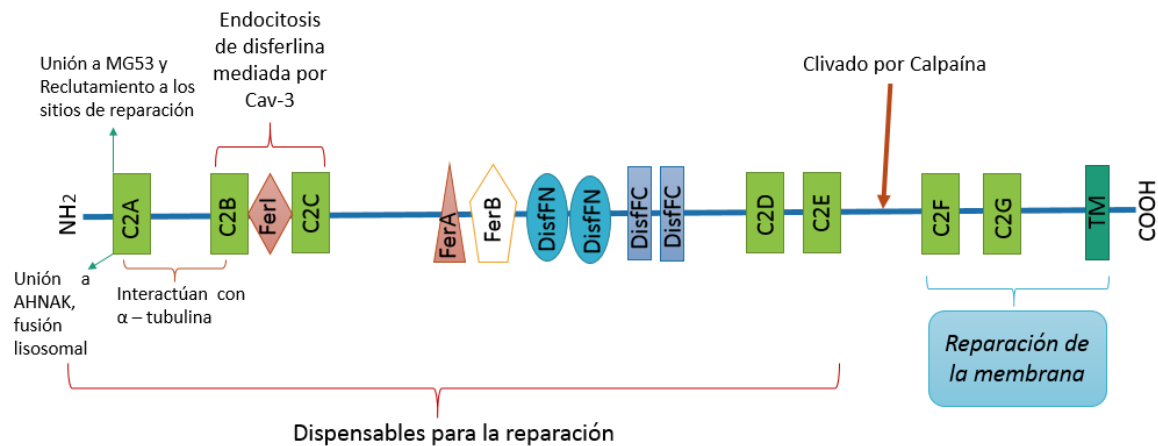


Figura 5. Esquema que muestra los posibles roles de los dominios de disferlina y su asociación con otras proteínas (Adaptada de 41).

2.2.3 Disferlina y Exocitosis

La exocitosis es el proceso clave por el cual las células se comunican entre ellas y con los demás sistemas en un organismo. En el músculo esquelético, este proceso es esencial para la inserción de proteínas en la membrana plasmática, como es el caso del transportador de glucosa GLUT4 (89, 90), y la secreción de mioquinas (10, 11).

La exocitosis requiere varias etapas, las que incluyen la generación de vesículas que envuelven las moléculas que serán secretadas, la movilización de estas hasta la membrana plasmática, el remodelamiento del citoesqueleto y de lípidos que permite su anclaje con la membrana, la fusión de las bicapas de la membrana de la vesícula y la membrana plasmática, la formación de un poro de fusión y su expansión que permite la exposición del lumen de la vesícula al exterior de la célula (91). De manera interesante, se han reportado algunos hallazgos que sugieren la participación de disferlina en el proceso de exocitosis. En este contexto, se ha observado que la deficiencia de esta proteína genera una acumulación de vesículas en áreas subsarcolémicas (18, 92, 93), lo cual podría deberse a vesículas que no se fusionaron con la membrana plasmática. Por otro lado, se ha reportado que disferlina se asocia a syntaxina-4 y SNAP-23, dos proteínas del complejo SNARE que forman parte de la maquinaria de exocitosis de vesículas que transportan GLUT4 (94 - 97) y de lisosomas

(60, 98) en el músculo esquelético. Con relación a ello, se ha observado que miocitos carentes de disferlina exhiben una menor exocitosis de lisosomas (98), una secreción disminuida de citoquinas (99) y un tráfico defectuoso de receptores (100). Más recientemente, Báez y colaboradores demostraron que la formación de filamentos de actina citoesqueletal, proceso necesario para la exocitosis de GLUT-4 en células del músculo esquelético (101), está disminuida en mioblastos deficientes de disferlina (102).

Es digno también de mencionar que mDysf se asemeja estructuralmente a sinaptotagmina, el sensor de Ca^{2+} para la exocitosis de vesículas secretoras en neuronas y células endocrinas (77). Al igual que sinaptotagmina, mDysf posee dos dominios C2 y una región transmembrana. La Figura 6 esquematiza la estructura de sinaptotagmina y su interacción con proteínas SNARE.

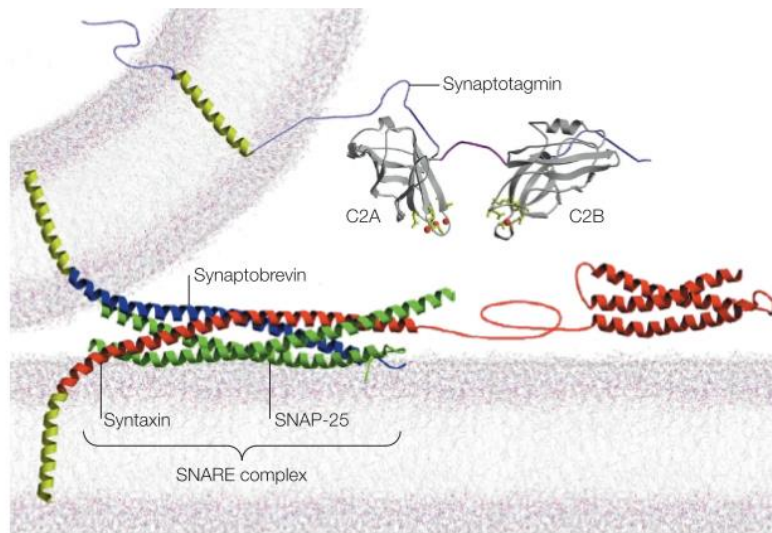


Figura 6. Interacción de sinaptotagmina con proteínas del complejo SNARE. En la figura se evidencian sus dos dominios C2 citosólicos y un dominio transmembrana ubicado en una vesícula sináptica (103).

En apoyo a todo lo antes expuesto, se ha demostrado recientemente en nuestro

laboratorio que mioblastos inmortalizados obtenidos de biopsias de pacientes con disferlinopatías, presentan una reducción significativa del número de eventos de exocitosis, al ser comparados con una línea celular control, C25, proveniente de músculo esquelético de un individuo sin miopatía declarada. No obstante, no se conoce que región de disferlina es necesaria para restituir la exocitosis. De acuerdo con datos de Coddling y colaboradores (98) tanto las regiones N- y C- terminal de disferlina interactúan con las proteínas SNARE SNAP-23 y syntaxina-4, y promueven la fusión entre vesículas de una manera dependiente de Ca^{2+} . Por lo tanto, en esta tesis de magister se propone determinar la contribución de dos regiones de disferlina, el N-terminal (constituido por los dominios C2A, C2B, FerI y C2C) y el C-terminal (compuesto por los dominios C2D, C2E, C2F, C2G y la región transmembranal) en el proceso de exocitosis en mioblastos humanos deficientes en disferlina.

Bajo la premisa de que disferlina cumple un rol en los procesos de exocitosis, es que pretendemos resolver la siguiente pregunta: ***“¿Son las regiones N- y C-terminal de disferlina capaces de restituir el proceso exocitosis y la distribución de AA2 en células del músculo esquelético deficientes de esta proteína?”***.

3. HIPÓTESIS

Tanto la región N-terminal, que contienen los dominios C2A, C2B, FerI y C2C, como la región C-terminal que incluye la región transmembranal más los dominios C2D, C2E, C2F y C2G de disferlina son capaces de restaurar la exocitosis y la distribución de AA2 en mioblastos derivados de un paciente con disferlinopatía.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar si las regiones N- y C-terminal de disferlina contribuyen al proceso de exocitosis y la distribución de AA2 en mioblastos obtenidos de biopsia de músculo esquelético de un paciente con disferlinopatía.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la contribución de las regiones N- y C-terminal de disferlina a los eventos de exocitosis en mioblastos obtenidos de paciente con disferlinopatía.
2. Estudiar la distribución de AA2 en mioblastos humanos disferlinopáticos y sanos.
3. Determinar la contribución de disferlina (completa) y sus regiones N- y C- terminal a la distribución de AA2 en mioblastos de paciente con disferlinopatía.

6. METODOLOGÍA

Para un mayor entendimiento de cómo se realizó esta tesis, la metodología se subdividió de acuerdo a cada objetivo específico. Sin embargo, los aspectos generales se detallan al comienzo.

6.1 ASPECTOS GENERALES

6.1.1 Líneas Celulares

Para este estudio, se utilizó como control la línea celular C25 (células donadas por el Dr. Marc Bitoun, CNRS, Francia) correspondiente a mioblastos aislados desde biopsias del músculo semitendinoso de un individuo sano de 25 años. También se utilizó la línea celular DYSF3 (donada por el Dr. Vincent Mouly de Institute de Myologie, Hôpital de la Salpêtrière, Paris) que corresponde a mioblastos aislados desde el músculo vasto lateral de una mujer de 36 años que presenta la disferlinopatía LGMD2B. Ambas líneas fueron inmortalizadas en el Instituto de Miología de la Universidad de París.

Las especificaciones de las líneas celulares que se utilizarán para este estudio se detallan a continuación (Tabla N1):

Tabla N1. Líneas celulares utilizadas y sus características.

Línea Celular	Músculo	Paciente	Mutación	Nivel de Expresión de Disferlina
C25	Semitendinoso	Hombre 25	Músculo sano	Expresión Normal
DYSF3	Vasto Lateral	Mujer 36	Exón 16: c.1448C>A, p.S483X Exón 55: c.*107T>A, 3'UTR	Ausencia (104)

6.1.2 Constructos y su amplificación

Las líneas celulares (C25 y DYSF3) fueron transfectadas como se indica, con la sonda IRAP-pHluorin y con uno de los siguientes constructos, según correspondiera en

cada objetivo planteado:

- Un constructo que contiene sólo la proteína GFP mCherry utilizada como control (denominado mCherry),
- Un constructo que contiene la región N-terminal de disferlina que corresponde a los dominios C2A, C2B, FerI y C2C de disferlina fusionada a mCherry a través de su extremo C-terminal (denominado C-Terminal).
- Un constructo que contiene la región C-terminal de disferlina, que corresponde a los dominios C2D, C2E, C2F, C2G y transmembrana (TM) de disferlina fusionada a mCherry a través de su extremo N-terminal (denominado N-Terminal).

Los constructos C- y N-terminal fueron diseñados en el laboratorio, y los ADN fueron sintetizados por GenScript.

Por otra parte, se utilizó un plásmido que contiene disferlina completa, la cual tiene unido el tag HA en el extremo C-terminal (plásmido 29767 de Addgene), donado por la fundación Jain (www.jainfoundation.org) (denominado Dysf-full).

La amplificación de los ADN se realizó a través de transformación bacteriana, utilizando la bacteria *E. coli*, cepa XL1-Blue. La purificación se realizó a través del Kit E.Z.N.A. Endo – Free Plasmid DNA Mini Kit II – Spin protocol. Finalmente, la medición de la concentración y pureza de los ADN se realizó a través de espectrofotometría UV-Vis.

6.1.3 Cultivo Celular

Las líneas celulares DYSF3 y C25 se mantuvieron en medio de cultivo KMEM compuesto por medio 199/DMEM (Life Technologies) y 20% de Suero Bovino Fetal (SBF)(Gibco), fetuina a 25 µg/mL (Life Technologies), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) a 0,5 ng/mL (Life Technologies), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Life Technologies) a 5 ng/mL, insulina 5 µg/mL (Sigma), y dexametasona (Choongwae Pharma Corp) a 0,2 µg/mL, ajustado a un pH de 7,4. Los cultivos celulares fueron mantenidos en una incubadora a 37°C, 100% de humedad y a

una presión atmosférica de 5% de CO₂.

6.1.4 Transfección de las líneas

Las células se sembraron en cubreobjetos tratados previamente con polilisina al 1% (Sigma), en medio de cultivo KMEM y se mantuvieron en una incubadora a 37°C, 100% de humedad y a una presión atmosférica de 5% de CO₂.

Se realizó una transfección doble para los experimentos de medición de exocitosis y una transfección simple para los objetivos que involucran la distribución de AA2. Para medir la exocitosis se utilizó el constructo IRAP-pHluorina (donado por la Dra. Jennifer Lippincott-Schwartz, Howard Hughes Medical Institute, Janelia Research Campus Joshua Zimmerberg (National Instituted of Health, (USA)), junto con los constructos que contienen la región N- o C-terminal de disferlina. Para los experimentos de AA2 se utilizaron los constructos N- o C-terminal y disferlina completa. Para llevar a cabo estos procedimientos, se utilizó Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.2 METODOLOGÍA SEGÚN OBJETIVOS.

6.2.1 Objetivo Específico 1 (O.E.1): Determinar la contribución de las regiones N- y C-terminal de disferlina a los eventos de exocitosis en mioblastos obtenidos de paciente con disferlinopatía.

Para llevar a cabo este objetivo, se procedió a visualizar los eventos de exocitosis que presentaba la línea celular DYSF3 a través de una doble transfección. Se utilizó como reportero de exocitosis la aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP) fusionada a pHluorin. IRAP es una proteína que se encuentra en la membrana de vesículas de transporte (105 - 109), mientras que pHluorin, es una proteína fluorescente verde (GFP) sensible a pH. Así, cuando el lumen de la vesícula que tienen un pH de ~5.0-6.0, entra en contacto con el medio extracelular y aumenta el pH, IRAP-pHluorin emite la fluorescencia (109) (Figura 7).

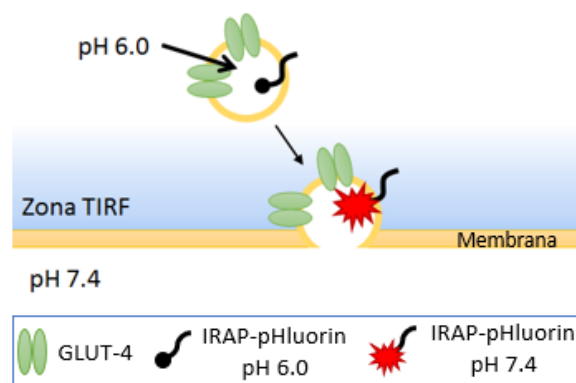


Figura 7. Esquema explicativo que ilustra el comportamiento del reportero IRAP-pHluorin, que al entrar en contacto con el medio extracelular de pH 7.4 emite fluorescencia (109).

Para monitorear la exocitosis, las células fueron mantenidas a temperatura ambiente en solución Tyrode, la cual contiene NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 1.8 mM, Na₂HPO₄ 0.2 mM, NaHCO₃ 12 mM, Glucosa 5.5 mM, 310 mOsm. Luego, la exocitosis fue inducida con ionomicina 1 μM, el cual fue agregado a los 30 segundos de comenzado el registro. Las muestras fueron observadas en un microscopio invertido (Eclipse Ti-E, Nikon, Tokio, Japón) que posee acoplado un sistema de adquisición de epifluorescencia, y un objetivo de inmersión en aceite TIRF APO 60x/1.49 A.N. (Nikon, Tokyo, Japón) para reflexión interna total (TIRF). Para la excitación del fluoróforo del constructo IRAP-pHluorin se utilizó un láser de 488 nm (Coherent, Santa Clara, CA) y para la excitación de los constructos que contienen mCherry se utilizó un láser de 545 nm (Coherent, Santa Clara, CA).

Para los registros, se obtuvieron videos de 3 minutos de duración con adquisición de imágenes cada 300 ms con una cámara digital C11440 (ORCA-FLASH 2.0; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) y el programa NIS-Element viewer 4.3 (Nikon, Tokyo, Japan). Los videos se exportaron en formato AVI y se analizaron con el software ImageJ.

El análisis de los videos se llevó a cabo a través de un software personalizado, Anaconda, que discrimina las señales fluorescentes de los eventos de exocitosis de aquellos que no lo son, eliminando el background y el ruido (con 8 DS). De esta

manera, los eventos fueron seleccionados a través de una región de interés (ROI) que tuviesen un tamaño de 2 píxeles de diámetro, obteniéndose los perfiles de fluorescencia correspondientes (Figura 8), desde los cuales se recogieron 5 parámetros distintos:

1. *Número de Eventos.*
2. *Tiempo de latencia:* Corresponde al tiempo en que se llega al punto máximo de fluorescencia; indica el tiempo que demora la vesícula en fusionarse con la membrana después del estímulo (Figura 8B. ▲ - a).
3. *Amplitud:* Corresponde a la altura de la espiga, y está determinada por la intensidad máxima de fluorescencia del evento. Por tanto, este dato se encuentra normalizado con respecto a la fluorescencia basal del registro. Este parámetro puede indicar la cantidad de IRAP-pHluorin presente en la vesícula y/o qué tan expuesta al medio extracelular esta sonda queda frente al estímulo (Figura 8B. a - b).
4. *Tiempo de permanencia (dwell-time):* Se refiere al tiempo en que la membrana interna de la vesícula permanece expuesta al medio extracelular antes de su internalización (110, 111). En la espiga corresponde al tiempo que va desde la máxima intensidad de fluorescencia hasta antes de la fase de caída (Figura 8B.b.).
5. *Duración:* Tiempo en el cual la fluorescencia está por sobre el nivel basal (Figura 8B. a - c).

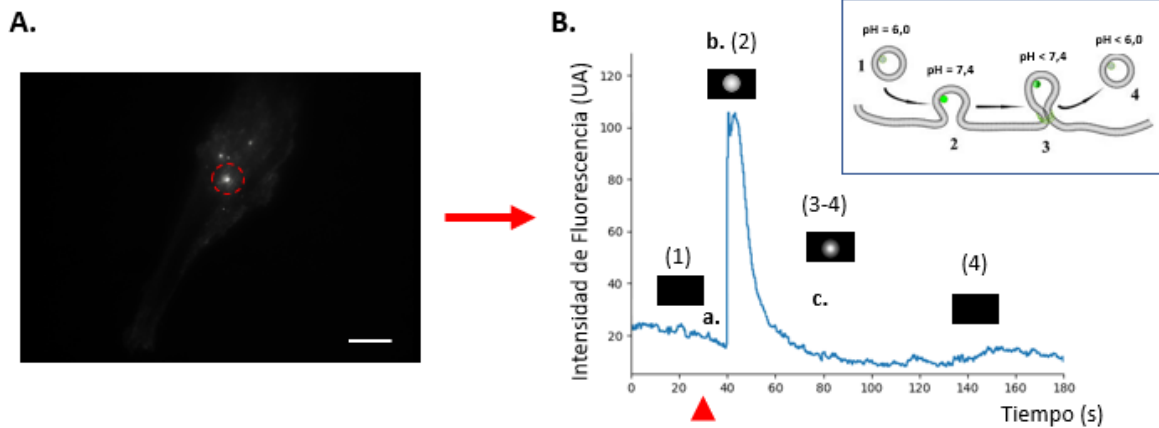


Figura 8. Esquema explicativo de la sección metodológica 6.2.1. A. Captura en microscopía TIRF de la fluorescencia de una célula *DYSF3* en la cual se indujo exocitosis. Barra=10 μm . **B.** Perfil de fluorescencia representativo obtenido desde la circunferencia de A. La cabeza de flecha roja indica el momento en que la célula fue estimulada. **a.** Se observa un aumento abrupto en la fluorescencia, lo que indica la fusión de la vesícula con la membrana plasmática y la apertura del poro de fusión. Esto produce el punto máximo de fluorescencia del reportero IRAP-pHluorin. **b.** El lumen de la vesícula se encuentra expuesto al medio extracelular. **c.** La caída de la fluorescencia refleja la recaptura y reacidificación de la vesícula. Desde la cabeza de flecha roja hasta **a.** se obtiene el parámetro "Tiempo de latencia". Durante **b.** se calcula el parámetro "Tiempo de permanencia", tiempo que la membrana interna de la vesícula permanece expuesta al medio extracelular (110, 111). La "amplitud" corresponde a la intensidad máxima de fluorescencia del evento. **b.** La duración se obtiene desde **a.** hasta que finaliza **c.** Los esquemas pequeños en **B** indican el estado del evento de exocitosis registrado en A. El recuadro en el panel B ilustra las distintas etapas en un evento de exocitosis y los cambios de pH en la vesícula.

6.2.2 Objetivo Específico 2 (O.E.2): Estudiar la distribución de anexina A2 en mioblastos humanos disferlinopáticos y sanos.

Para determinar la colocalización de AA2 con actina se realizaron ensayos de inmunofluorescencia incubando los mioblastos en tampón KGEP (Glutamato K⁺ 139 mM (Sigma-Aldrich), pipes 20 mM (Sigma-Aldrich), EGTA 5mM (Sigma-Aldrich), y ATP Mg²⁺ 2 mM (Sigma-Aldrich), pH 6,6 en presencia de G-actina conjugada con Alexa Fluor 488 0,3 μM (Thermo Fisher Scientific), digitonina 20 μM (Sigma-Aldrich) y 10 μM de Ca²⁺ libre (112, 113), junto a un anticuerpo anti-AA2 (Santa Cruz Biotechnology) y el anticuerpo secundario conjugado CY3 goat anti-rabbit (H+L) (Jackson ImmunoResearch) (Figura 9).



Figura 9. Esquema de la metodología utilizada en O.E.2. Se muestra el procedimiento experimental llevado a cabo, en donde las células son permeabilizadas con tampón KGEP con la utilización de G-actina en verde, para posteriormente realizarles una inmunotinción con un anticuerpo fluorescente rojo para AA2. Luego, las muestras son fotografiadas para finalmente llevar a cabo los análisis pertinentes.

6.2.3 Objetivo Específico 3 (O.E.3): Determinar la contribución de disferlina (completa) y de sus regiones N- y C- terminal a la distribución de AA2 en mioblastos de paciente con disferlinopatía.

La línea celular DYSF3 fue transfectada con los constructos Dysf-full, N-terminal y C-terminal con el fin de estudiar la distribución de AA2. Las células transfectadas, fueron permeabilizadas con digitonina 20 μM en tampón KGEP en presencia de 10 μM de Ca^{2+} junto al anticuerpo primario anti-AA2 y la utilización del anticuerpo secundario conjugado CY2 goat anti-rabbit (H+L) (Jackson Immunoresearch) (Figura 10).

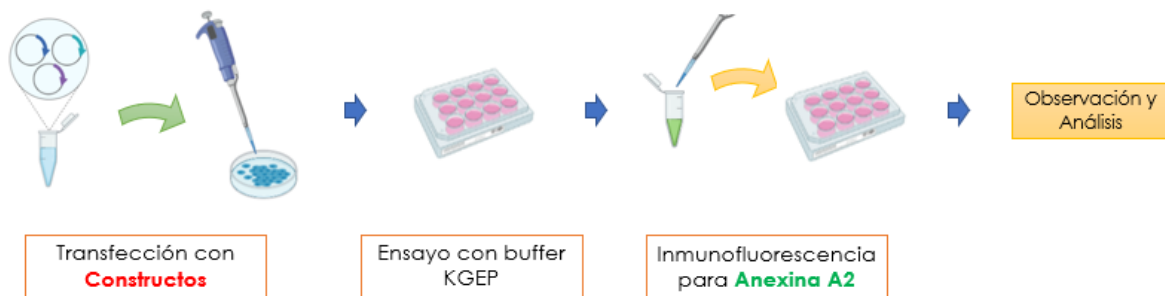


Figura 10. Esquema de la metodología experimental utilizada en O.E.3. Se observa el procedimiento llevado a cabo, en donde las células en una primera instancia son transfectadas con los distintos constructos (en rojo debido a la etiqueta mCherry), tratadas con solución KGEP, para posteriormente realizar una inmunotinción para AA2. Las muestras son fotografiadas para su posterior análisis.

Las observaciones de estos dos objetivos específicos se llevaron a cabo a través de la toma de microfotografías adquiridas desde un microscopio confocal, capturadas en el plano ecuatorial, analizadas y procesadas a través del software Image J (NIH, USA). La colocalización, ya sea entre AA2 y actina o AA2 y los distintos constructos utilizados, se llevó a cabo a través del coeficiente de correlación de Pearson obtenido mediante el plugin "coloc2" del mismo software. El análisis de colocalización entre las proteínas de interés, se realizó a través de 3 regiones celulares: membrana plasmática, citoplasma y núcleo, y se comparó a través de la construcción de un gráfico que indica el coeficiente de correlación de Pearson en cada caso. El análisis de

distribución de AA2 se realizó mediante el marcaje del área total de la célula versus el área citoplasmática y se graficó la razón de la fluorescencia emitida por AA2 en dicha área.

6.3 ESTADÍSTICA

Para los análisis estadísticos de los datos, se utilizó el software GraphPad Prism 6.0. Para ello, se hizo un muestreo aleatorio de las células en cada cultivo:

- a. Análisis de distribución y colocación de AA2:* Se utilizó un mínimo de 10 células por cada condición de al menos tres cultivos diferentes. Se aplicó la prueba estadística de normalidad Shapiro Wilk. Para los datos con distribución paramétrica se utilizó el test de ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Turkey, como post-hoc. La prueba paramétrica t-test fue utilizada cuando se compararon dos poblaciones independientes. Para los datos con distribución no paramétrica se utilizó el test Kruskal Wallis, seguido del test de comparaciones múltiples de Dunn. La prueba no paramétrica Mann Whitney se empleó para comparar dos poblaciones independientes. Los datos se presentan como medias \pm el error estándar.

- b. Análisis de los eventos de exocitosis:* Debido a que solo puede utilizarse una célula por cubreobjeto, se analizaron por lo menos 10 células de tres cultivos diferentes. En ellas se estudiaron distintos parámetros de los eventos de exocitosis. Al igual que en el caso anterior, se aplicaron las mismas pruebas de normalidad y análisis según fuese necesario. Los datos se presentan como medias \pm el error estándar.

El presente proyecto de tesis se encuentra enmarcado bajo el proyecto FONDECYT N°1160495 titulado "Rol de disferlina en el Remodelamiento del Citoesqueleto de Actina y su impacto en el Tráfico de vesículas y Reparación Muscular en distrofia muscular asociada a mutaciones en disferlina" de la Dra. Ana María Cárdenas D., el cual cuenta con la aprobación del Comité Institucional de Bioética para la investigación con animales de la Universidad de Valparaíso, según se encuentra estipulado en el acta de evaluación bioética BEA080-2016. Además, también cuenta con la aprobación del Comité de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso según se estipula en el certificado de bioseguridad BS002/2016. Ambos documentos se encuentran adjuntos al presente trabajo en el apartado "Anexo".

7. RESULTADOS

7.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1 (O.E.1): Determinar la contribución de las regiones N- y C-terminal de disferlina en los eventos de exocitosis.

En estudios anteriores del laboratorio de la Dra. Ana María Cárdenas, se observó una disminución en el número de eventos de exocitosis en distintas líneas celulares musculares provenientes de pacientes con disferlinopatía, en comparación a una línea celular control, proveniente de músculo esquelético de un paciente sano (datos no publicados). Por lo tanto, nos propusimos determinar si la transfección con los constructos de disferlina ya mencionados (N y C-terminal) eran capaces de restituir la exocitosis en la línea celular DYSF3. Utilizando IRAP-pHluorin como reportero, se adquirieron videos de 180 segundos, en los cuales los primeros 30 segundos corresponden a un estado de reposo (utilizado para la normalización de los eventos inducidos por el estímulo) y los 150 segundos restantes a un estado de estimulación con ionomicina 1 μM . A partir de estos videos se analizó el patrón de los eventos y distintos parámetros incluyendo el número de eventos de exocitosis, el tiempo de latencia, la amplitud de las espigas de fluorescencia, el tiempo de permanencia y la duración de cada evento. Los último cuatro parámetros analizados, se midieron solo en eventos del tipo transitorio. Experimentos controles incluyeron estimulación con DMSO (vehículo de ionomicina).

La línea celular DYSF3 presenta 2 patrones de eventos de exocitosis: transitorios y persistentes. Los eventos del tipo transitorios son aquellos que poseen un aumento abrupto de la fluorescencia el que vuelve rápidamente a niveles de fluorescencia basales; al parecer la membrana de la vesícula es rápidamente internalizada después de la exocitosis (114 - 116) (Figura 11A). En los eventos del tipo persistente el nivel de fluorescencia aumenta, y se mantienen altos a lo largo del registro, se ha propuesto que la membrana de la vesícula permanece en la membrana plasmática sin ser internalizada, al menos durante el registro (116) (Figura 11B).

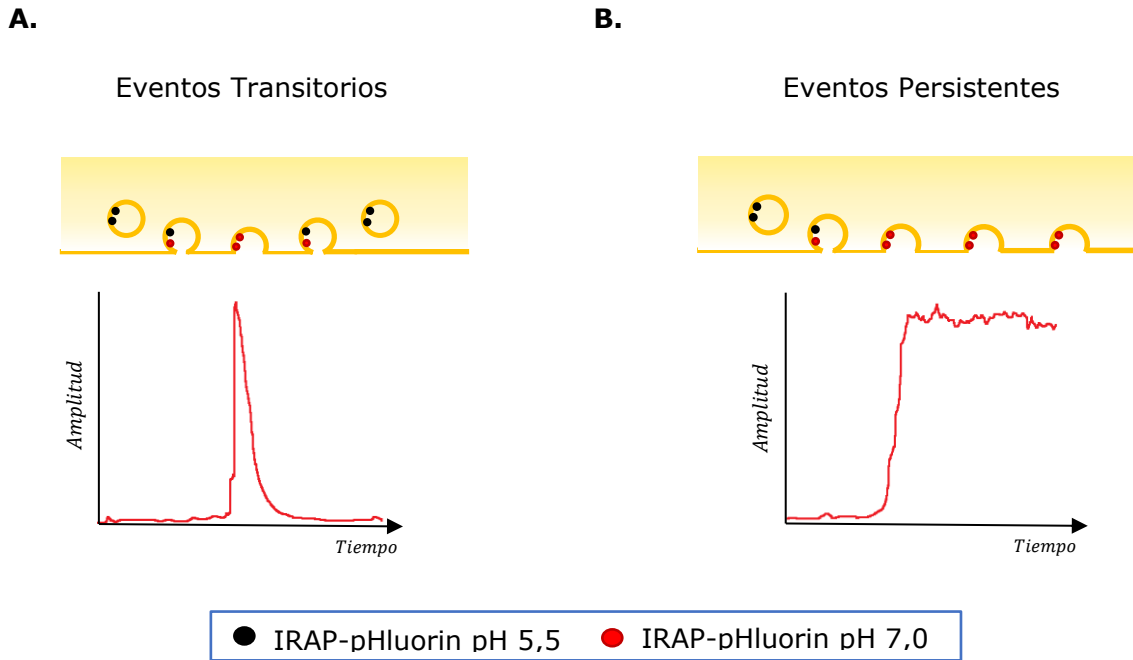
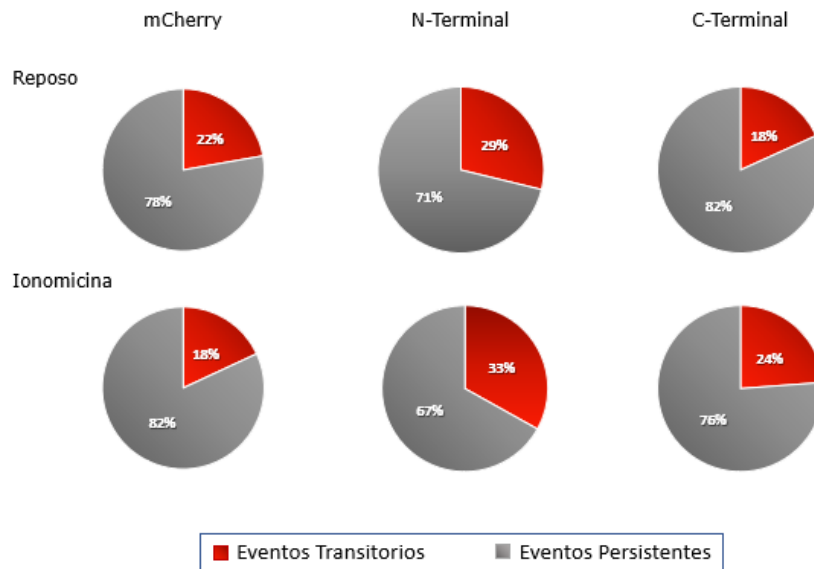


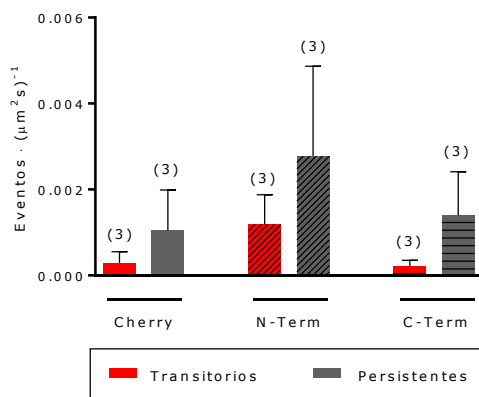
Figura 11. Patrones de eventos de exocitosis observados en mioblastos DYSF3. A. Eventos del tipo transitorios. **B.** Eventos del tipo persistentes. Ambos se muestran junto con su perfil de fluorescencia característico.

En la Figura 12A se muestran, en gráficos de torta, el porcentaje de eventos transitorios y persistentes en las condiciones de reposo y de estimulación con ionomicina, según los distintos constructos utilizados. Los mioblastos no presentan diferencias significativas entre el número de eventos transitorios o persistentes bajo una condición de reposo o de estimulación con ionomicina (Figura 12B y 12C, respectivamente). Tampoco se observan diferencias significativas entre los constructos.

A.



B.



C.

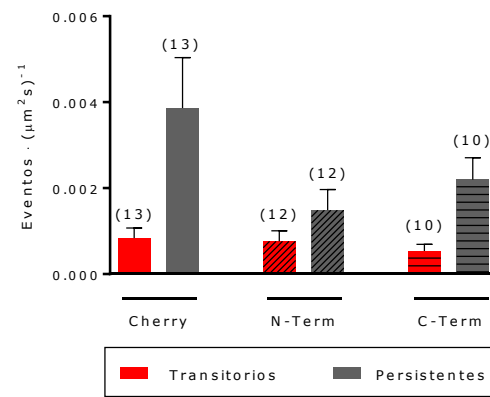


Figura 12. Comparación de los eventos transitorios y persistentes de mioblastos DYSF3. **A.** Cuantificación en porcentajes de los eventos del tipo transitorios y persistentes por μm^2 cuando son o no estimuladas con ionomicina. **B.** Comparación de los eventos transitorios y persistentes en las células DYSF3 que expresan los distintos constructos, en reposo (* $p < 0.05$; test ANOVA de una vía y test de Turkey como post-hoc). **C.** Comparación de los eventos transitorios y persistentes en las células DYSF3 que expresan los distintos constructos, estimuladas con ionomicina (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$; test Kruskal Wallis y test de Dunn como post-hoc). El número de células analizadas se muestran sobre las barras.

a) Número de Eventos:

Al comparar la exocitosis antes versus durante la estimulación en las células DYSF3, se encontró que ionomicina 1 μM aumenta significativamente el número de eventos en células que expresan los constructos mCherry y C-terminal ($p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente;), pero no en aquellas transfectadas con el constructo N-terminal ($p < 0.05$) (Figura 13). Estos resultados indican que el N-terminal y el C-terminal de disferlina no son suficientes para restaurar la exocitosis en los mioblastos DYSF3, incluso el constructo N-terminal parece disminuirla.

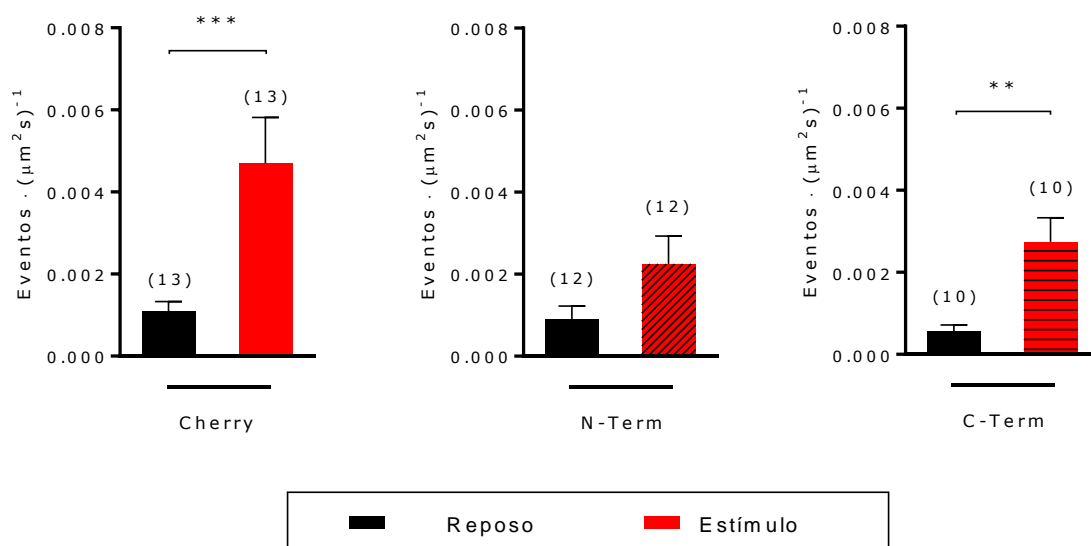


Figura 13. Número de eventos de exocitosis totales antes y durante el estímulo con Ionomicina 1 μM . Las barras negras corresponden a la condición de reposo (antes del estímulo) y las barras rojas a la condición de estimulación. El número de células analizadas se muestran sobre las barras. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$; test de Mann Whitney.

b) Tiempo de latencia:

Al comparar los tiempos de latencia en las células DYSF3 en las diferentes condiciones de transfección o estimulación no se observan diferencias significativas (Figura 14). De esta manera, los constructos de disferlina parecen no influir en el tiempo requerido para que se active la excitosis.

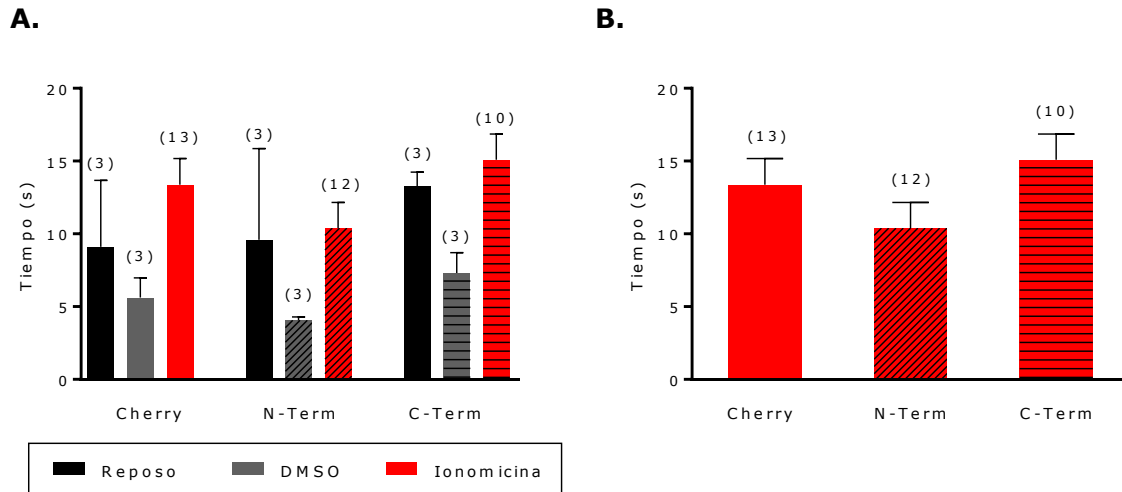


Figura 14. Tiempo de latencia de los eventos de excitosis del tipo transitorios. **A.** Tiempos latencia de células expresando los distintos constructos en condiciones de reposo (barras negras), control DMSO (barras grises) o estimulación con ionomicina (barras rojas). **B.** Comparación del tiempo de latencia en células estimuladas con ionomicina. El número de células analizadas se muestran sobre las barras. No se encontró diferencias significativas (test ANOVA de una vía seguida de test de comparaciones múltiples de Turkey como post-hoc).

c) Amplitud de las espigas de fluorescencia:

Con respecto a este parámetro, no se observan diferencias significativas en ninguna de las condiciones estudiadas en mioblastos que expresan los distintos constructos (Figura 15). Por lo tanto, los constructos de disferlina no afectan la amplitud de las espigas.

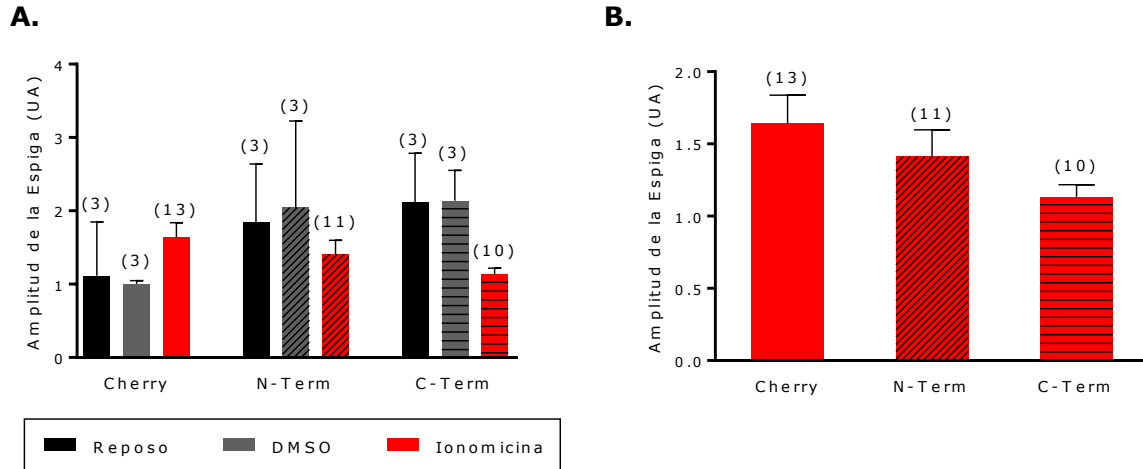


Figura 15. Amplitud de las espigas de fluorescencia. **A.** Amplitud de las espigas en células expresando los distintos constructos en condiciones de reposo (barras negras), control DMSO (barras grises) o estimulación con ionomicina (barras rojas). **B.** Comparación de la amplitud de las espigas en células estimuladas con ionomicina. El número de células analizadas se muestran sobre las barras. No se encontraron diferencias significativas (test ANOVA de una vía seguida por el test de comparaciones múltiples de Turkey).

d) *Tiempo de permanencia:*

No se observan diferencias significativas en el tiempo de permanencia al comparar las situaciones de reposo, DMSO o estimulación con Ionomicina (Figura 16A) en mioblastos que expresan los distintos constructos. Al comparar mioblastos que expresan mCherry, N-terminal o C-terminal sólo en la condición de estimulación tampoco se observa diferencias significativas (Figura 16B). Por lo tanto, los constructos de disferlina no tuvieron efectos sobre el tiempo de permanencia de las vesículas en la membrana plasmática.

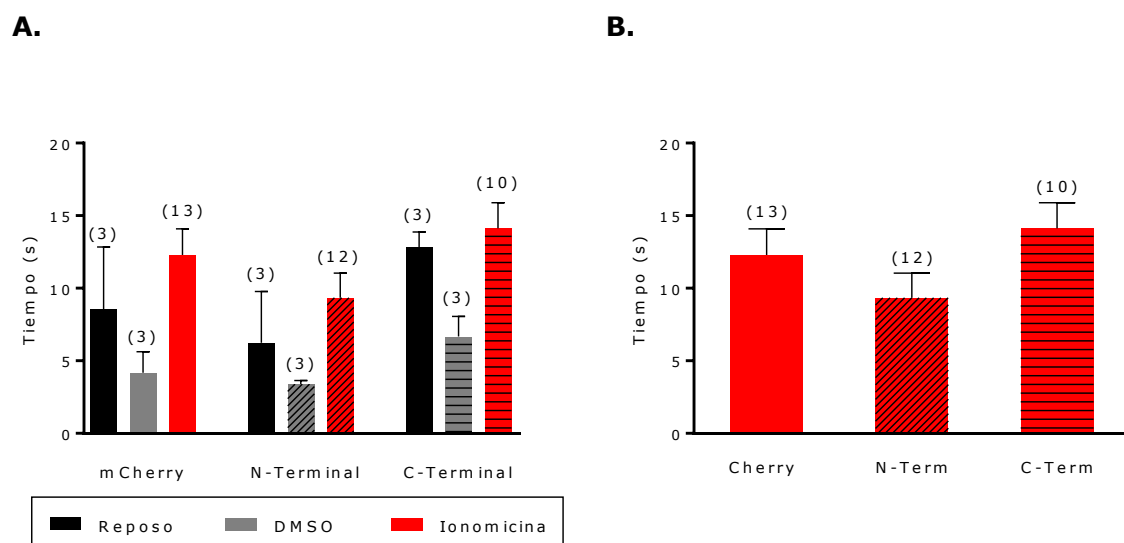


Figura 16. *Tiempo de permanencia. A. Tiempos de permanencia en células expresando los distintos constructos en condiciones de reposo (barras negras), control DMSO (barras grises) o estimulación con ionomicina (barras rojas). No se observan diferencias significativas en ninguno de los casos. B. Comparación del tiempo de permanencia en células estimuladas con ionomicina. El número de células analizadas se muestran sobre las barras. No se encontraron diferencias significativas (Test ANOVA de una vía seguido del test post-hoc comparaciones múltiples de Turkey).*

e) Duración de los eventos:

Los constructos mCherry y N-terminal de disferlina no afectan de manera significativa la duración de los eventos al compararlos con las condiciones de reposo o DMSO (Figura 17A). Sin embargo, la duración de los eventos en mioblastos que expresan C-terminal aumenta cuando son estimulados con ionomicina con respecto al control DMSO. No se observan diferencias significativas en la duración de los eventos inducidos por ionomicina entre mioblastos que expresan mCherry, N-terminal y C-terminal (Figura 17B). Se concluye que los constructos de disferlina no provocan cambios en la duración que tuvieron los eventos de exocitosis.

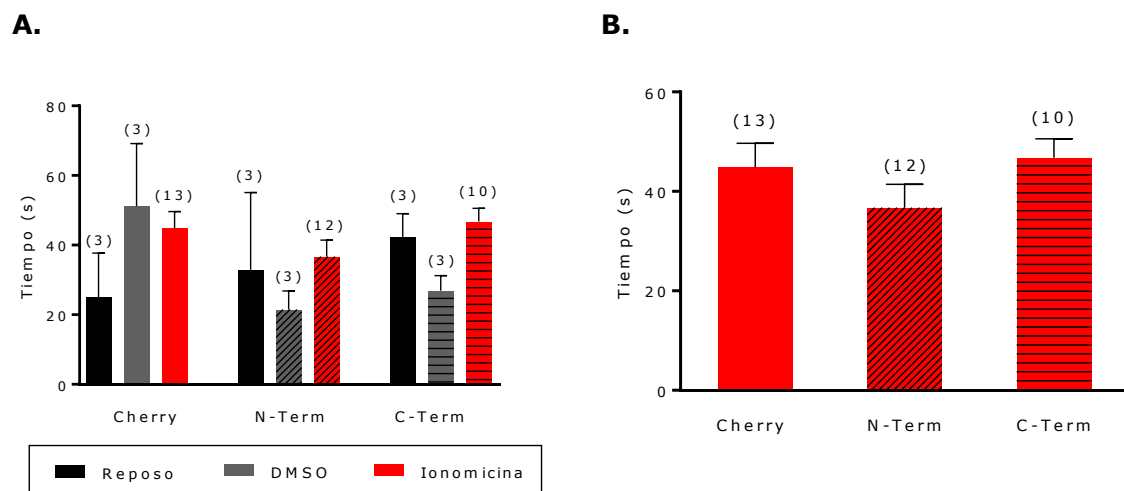


Figura 17. Duración de los Eventos de Exocitosis. **A.** Duración de los eventos transitorios en células expresando los distintos constructos en condiciones de reposo (barras negras), control DMSO (barras grises) o estimulación con ionomicina (barras rojas). **B.** Comparación de la duración de los eventos en células estimuladas con ionomicina. El número de células analizadas se muestran sobre las barras. No se encontraron diferencias significativas (test ANOVA de una vía seguido de test de comparaciones múltiples de Turkey como post-hoc).

7.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 2 (O.E.2): Estudiar la distribución de Anexina A2 en mioblastos humanos disferlinopáticos y sanos.

El remodelamiento del citoesqueleto de actina es un proceso clave para la exocitosis (117), y AA2 es una proteína implicada en este proceso (79, 81, 83, 85). Por esto se propuso comparar los cambios en la distribución de esta anexina en los mioblastos C25 y DYSF3. Para llevar a cabo este objetivo, se analizó la distribución del inmunomarcaje de AA2 y su colocalización con filamentos de actina formados en presencia de $10 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} en las células permeabilizadas.

En la figura 18A se observa una imagen, adquirida en microscopia confocal, del inmunomarcaje de AA2 (en rojo) y de filamentos de actina (en verde). La fusión de las imágenes muestra colocalización de AA2 con filamentos de actina en mioblastos C25, pero no en los mioblastos DYSF3, en donde AA2 posee una mayor localización nuclear y perinuclear que citoplasmática. Esta observación se complementa con los perfiles de fluorescencia de la figura 18B. El análisis de correlación de Pearson también indica colocalización entre AA2 y filamentos actina en los mioblastos C25, pero no en los mioblastos DYSF3 (C25: 0.65 ± 0.04 ; DYSF3: 0.34 ± 0.03) (Figura 18C).

Con la finalidad de identificar la región de la célula con mayor colocalización de AA2 con filamentos de actina, se realizó un análisis por regiones (membrana plasmática, citoplasma y núcleo) en una muestra representativa compuesta por el 30% de las células utilizando una elección aleatoria de células (118). En base a este análisis se encontró una colocalización significativa de AA2 con filamentos de actina en la región que comprende la membrana plasmática de los mioblastos C25 (Coef. Pearson = 0.63). No obstante, este análisis indica que no hay colocalización en el citoplasma y núcleo (Coef. Pearson: 0.43 y 0.35 respectivamente). En los mioblastos DYSF3, no se observa correlación en ninguna de las regiones, con coeficientes de Pearson de 0.50, 0.38 y 0 para la membrana plasmática, citoplasma y núcleo, respectivamente (Figura 18D). Con este análisis se concluye que AA2 colocaliza con filamentos de actina en los mioblastos C25, pero no en los mioblastos DYSF3 (Figura 18D). Por otra parte, comparamos la razón de distribución de AA2 en citoplasma versus el área total celular. Se encontró una razón citoplasma/área total de 0.80 ± 0.02 en los mioblastos C25, y de

0.60±0.03 en los mioblastos DYSF3 (Figura 18E). De esta manera se puede concluir que los mioblastos humanos disferlinopáticos DYSF3 presentan una menor distribución citosólica de AA2 y menor colocalización con filamentos de actina, en comparación a los mioblastos control C25.

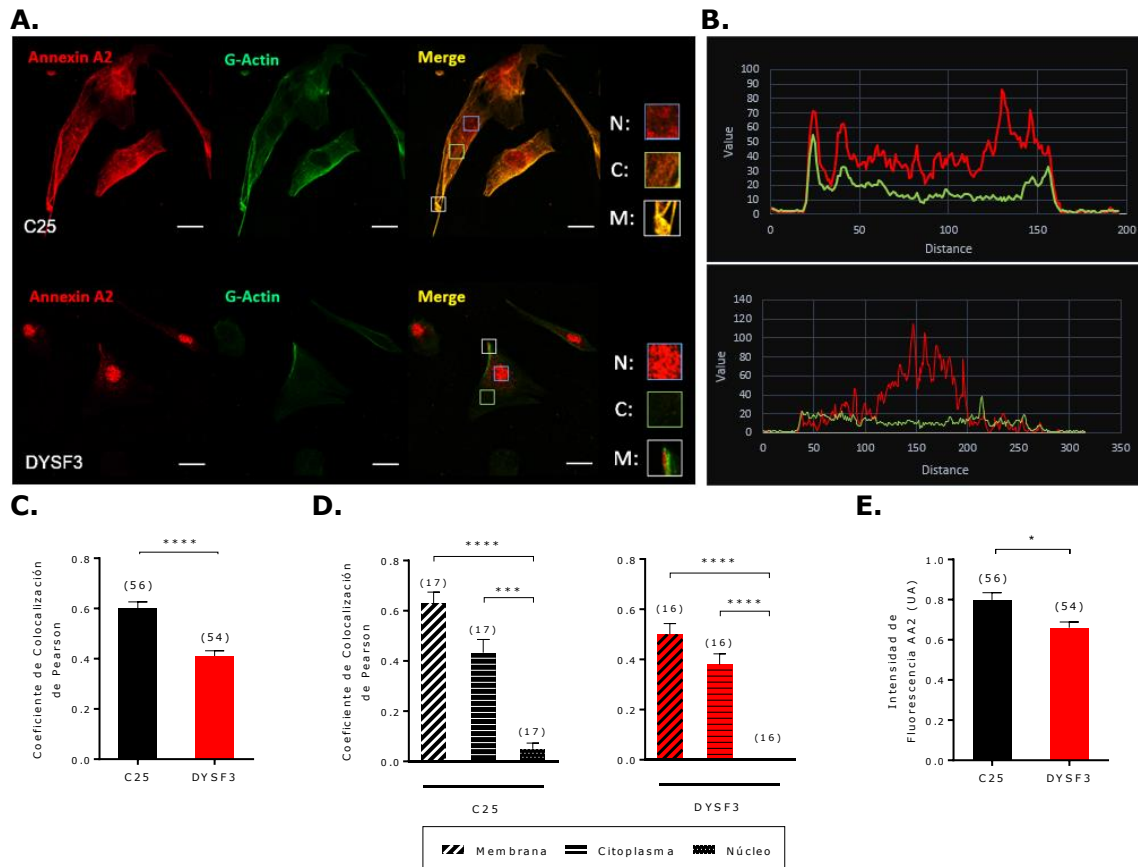


Figura 18. Distribución de AA2 en mioblastos deficientes de disferlina versus mioblastos control. **A.** Inmunofluorescencia de AA2 (rojo) y filamentos de actina (verde) en mioblastos controles C25 y deficientes en disferlina DYSF3. Los paneles de la derecha muestran la fusión de ambas fluorescencias. Los recuadros más pequeños muestran un enfoque cercano en distintas zonas: N: Núcleo, C: Citoplasma y M: Membrana plasmática. Barra = 20 μm. **B.** Perfiles de fluorescencia en las células C25 (panel superior) y DYSF3 (panel inferior) correspondiente a la línea blanca punteada mostrada en los paneles de la derecha en el panel A. **C.** Coeficiente de correlación de Pearson realizado en 56 células C25 y 54 células DYSF3 (****p<0.0001; t- test). **D.**

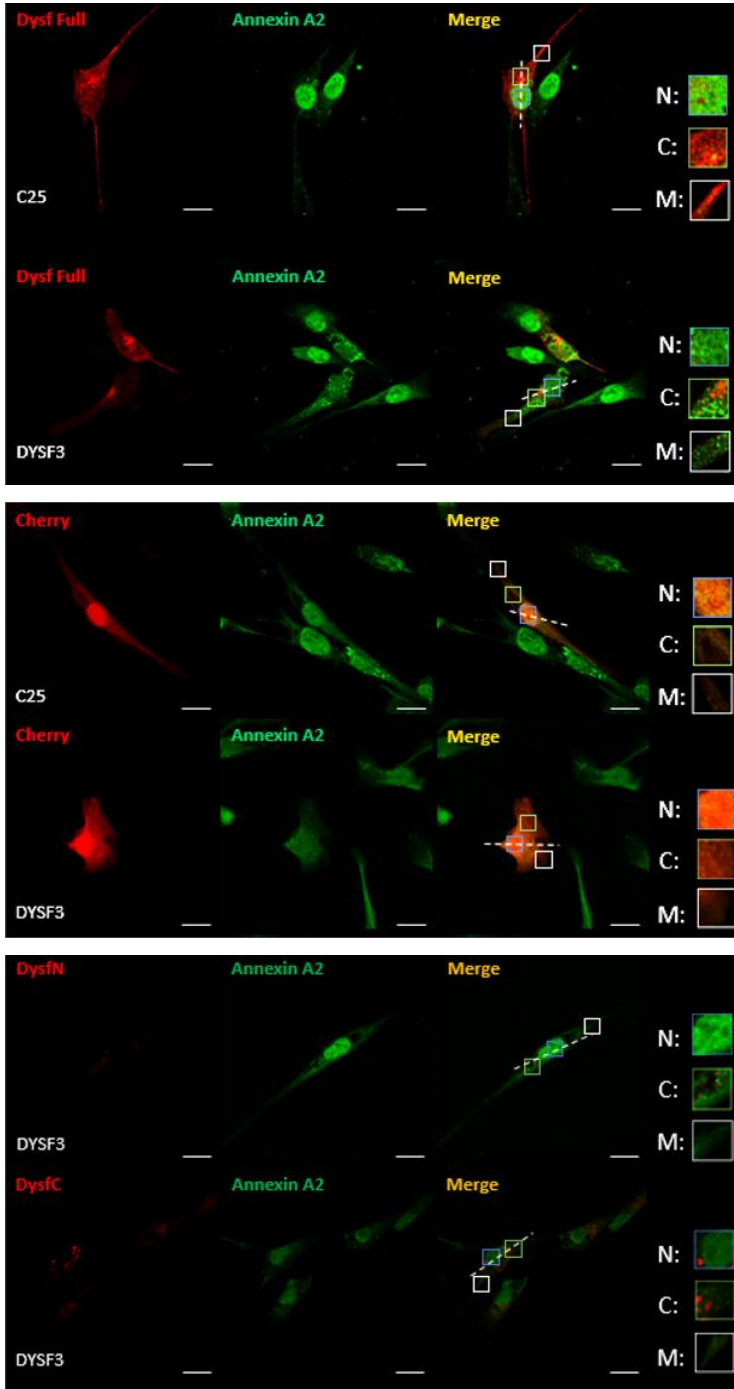
*Coefficiente de correlación de Pearson por regiones: Membrana plasmática, citoplasma, y núcleo celular en 17 células C25 y 16 células DYSF3 (**** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; test de Kruskal Wallis, post-hoc test de Dunn). E. Razón de distribución de AA2 en citoplasma versus el total celular en 56 células C25 y 54 células DYSF3 (* $p < 0.05$; t-test).*

7.3 OBJETIVO ESPECÍFICO 3 (O.E.3): Determinar la contribución de disferlina (completa) y de sus regiones N- y C- terminal en la distribución de Anexina A2 de la línea mutante.

En este objetivo investigamos si disferlina restablecía la distribución de AA2 en las células DYSF3. También se analizó la contribución de las regiones N- y C- terminal en este proceso. Para ello, las líneas celulares fueron transfectadas con el plásmido Dysf-full y con los constructos N- y C- terminal. Posteriormente se repitió la inmunofluorescencia en presencia de 10 μM de Ca^{2+} .

En la Figura 19A se muestran imágenes de la inmunofluorescencia realizada luego de las transfecciones. La Figura 19B muestra los correspondientes perfiles de fluorescencia. Se puede observar que la expresión de Dysf-Full en DYSF3 cambia el patrón de distribución de AA2 apreciándose en menor cantidad en el área nuclear y pequeñas acumulaciones perinucleares. Por otro lado, al transfectar los mioblastos C25 con Dysf-Full también cambia la distribución de AA2, siendo similar a la observada en la línea deficiente de disferlina (Figura 19, paneles Dysf-Full). La expresión de los constructos N- y C- terminal de disferlina no provocan cambios visibles en la distribución de AA2, con respecto a la expresión de mCherry (Figura 19A, paneles DysfN y DysfC).

A.



B.

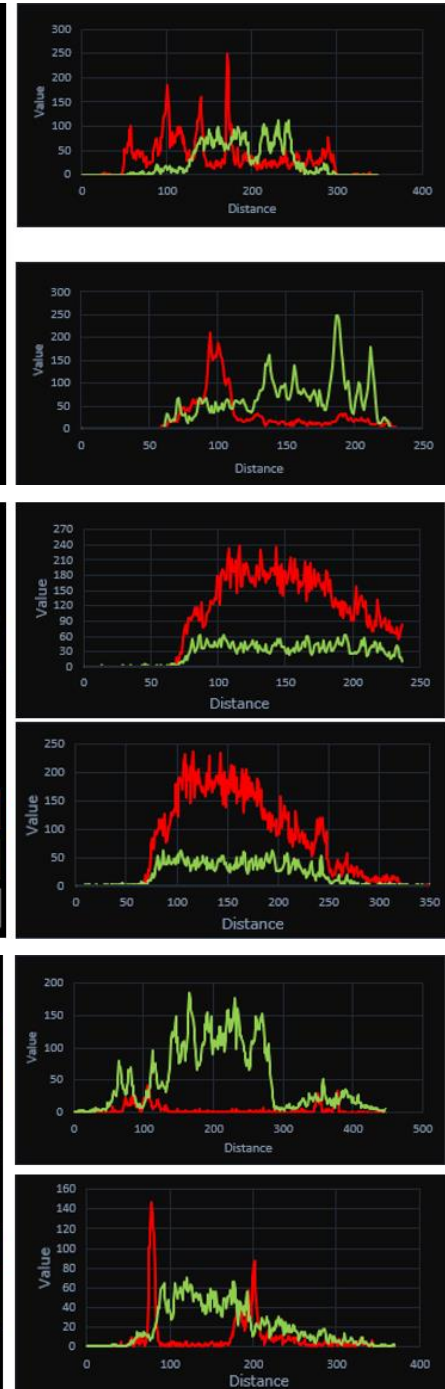


Figura 19. Distribución de AA2 en mioblastos que expresan los diferentes constructos de disferlina. A. Inmunofluorescencia de AA2 (verde) con los

constructos *Dysf-full*, *mCherry*, *N-* y *C-terminal* (*DysfN* y *DysfC*) (en rojo) en mioblastos C25 y DYSF3. Los paneles de la derecha muestran la fusión de ambas fluorescencias. Los recuadros más pequeños muestran un acercamiento de las zonas indicadas en el panel de la derecha (N: núcleo, C: citoplasma, M: membrana plasmática). Barra = 20 μ m. **B.** Perfiles de fluorescencia correspondientes a línea segmentada en **A.**

Para cuantificar estos resultados, se incluyó una situación control, MOCK, que corresponde a células que fueron tratadas con los reactivos de transfección, pero en ausencia de los constructos. Como se muestra en Figura 20, se analizó la distribución de AA2 en el citoplasma con respecto a su distribución en toda la célula (razón citoplasma/área total celular de la intensidad de fluorescencia que emitía AA2). La razón citoplasma/área total de AA2 en mioblastos DYSF3 fue de 0.64 ± 0.03 (Figura 20A). Esta razón aumenta significativamente en los mioblastos DYSF3 que expresan *Dysf-Full* (0.76 ± 0.03), llegando a niveles similares a los observados en las células C25 (0.81 ± 0.02). Por el contrario, y de manera interesante, la sobreexpresión de *Dysf-Full* en las células C25 disminuye significativamente la razón citoplasma/área total celular de AA2 (0.46 ± 0.03). Por otra parte, la expresión de los constructos *N-* y *C-terminal* de *disferlina* no cambian significativamente la distribución de AA2 (razón citoplasma/área total de AA2 de 0.68 ± 0.02 , 0.70 ± 0.04 , 0.74 ± 0.05 y 0.77 ± 0.02 para MOCK, *mCherry*, *N-terminal* y *C-terminal*, respectivamente) (Figura 20B). Por lo tanto, a diferencia de la *disferlina* completa, las regiones *N-terminal* y *C-terminal* de *disferlina* no restauran la distribución de AA2 en los mioblastos DYSF3.

Por otro lado, no se observa colocalización de los constructos *mCherry*, *N-terminal* y *C-terminal* con AA2; los valores del coeficiente de correlación de Pearson fueron todos menor a 0.5 (Tabla N2).

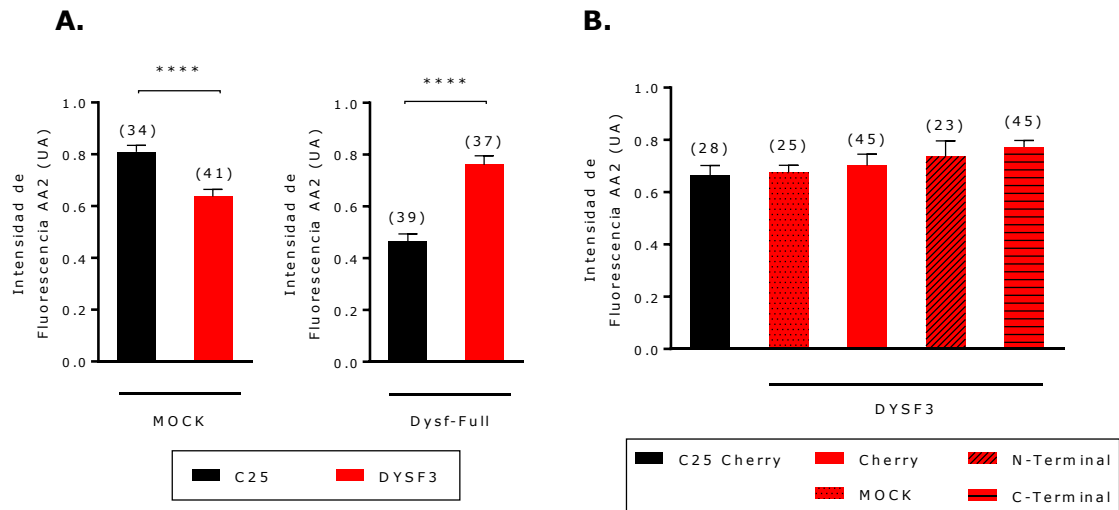


Figura 20. Distribución de AA2 en mioblastos que expresan los distintos constructos de disferlina. A. Comparación de la distribución de AA2 en células que no expresan (MOCK) o expresan Dysf-Full (**** $p < 0.0001$, t-test). **B.** Comparación de la distribución de AA2 en mioblastos que no expresan o expresan los constructos N- o C-terminal. No se encontraron diferencias significativas (Test ANOVA de una vía seguido de test de Turkey como post-hoc).

Tabla N2. Tabla que indica los coeficientes de correlación de Pearson de los distintos constructos utilizados en este estudio versus la AA2.

	C25		DYSF3			
	Dysf Full	Cherry	Dysf Full	Cherry	N-Terminal	C-Terminal
C. Pearson	0.402	0.366	0.202	0.376	0.287	0.178
n	39	17	37	45	22	45

8. DISCUSIÓN

Las disferlinopatías son un grupo de distrofias musculares de carácter hereditarias causadas por mutaciones en el gen que codifica para disferlina, proteína localizada en el sarcolema de células del músculo esquelético, en donde posee una función reparadora de esta estructura debido a los daños mecánicos de origen natural (51, 52). Dos fenotipos de estas distrofias son la miopatía distal de Miyoshi y la distrofia muscular de cinturas tipo 2B. La calidad de vida de los pacientes que padecen esta enfermedad se afecta a una edad temprana. Muchos de ellos terminan postrados, y deben depender por completo del cuidado de otras personas debido a que para estas afecciones no hay una cura establecida. Desentrañar el mecanismo que subyace a esta enfermedad y la identificación de regiones de la proteína implicadas permitirá no sólo esclarecer las funciones de esta proteína, sino también dará pista para encontrar nuevas estrategias terapéuticas.

En esta tesis de magister se propuso estudiar los efectos que poseen 2 dominios N- y C- terminal de disferlina, y la disferlina completa (Dysf-full), en la línea celular DYSF3 obtenida de músculo esquelético de un paciente con disferlinopatía (104). Considerando el hallazgo de nuestro laboratorio, el cual indica que los mioblastos DYSF3 presentan una disminución en el número de eventos de exocitosis (datos no publicados) se decidió investigar si los dominios N- y C- terminal eran capaces de revertir este defecto. Además, se estudió como tales regiones de disferlina contribuían a la distribución de AA2, proteína que juega un rol importante en la exocitosis (85), y que presenta una distribución alterada en los mioblastos DYSF3 (101).

8.1 Las regiones N- y C-terminal de disferlina no restauran, por sí solas, la exocitosis en mioblastos DYSF3.

En esta tesis se esperaba que las regiones N- y/o C-terminal de disferlina tuviesen una contribución en la recuperación de la exocitosis disminuida en la línea celular DYSF3. Nuestra hipótesis se basaba en la capacidad de estas regiones de

favorecer la fusión de liposomas *in vitro* (93). Sin embargo, nuestra hipótesis no se cumplió. Por el contrario, la expresión de la región N-terminal en los mioblastos DYSF3 parece disminuir la exocitosis dependiente de Ca^{2+} , ya que a diferencia de la expresión de mCherry o de la región C-terminal, no aumenta el número de eventos inducidos por ionomicina, con respecto a la situación de reposo (Figura 13). Una explicación para estos resultados podría ser que estas regiones requieran estar asociadas para restablecer la exocitosis. Por ejemplo, el constructo N-terminal de disferlina está compuesta por los dominios C2A, C2B, FerI y C2C de disferlina sin poseer un dominio de transmembrana, a diferencia del constructo C-terminal, el cual sí lo posee. Se sabe que los distintos dominios C2 de disferlina exhiben diferentes afinidades por Ca^{2+} , con valores de K_d que van de 1.5 a 1000 μM (35). La concentración de Ca^{2+} citosólico en reposo varía de 50 a 100 nM, y puede aumentar 20 veces frente a un estímulo en el músculo esquelético (119). El dominio C2B de sinaptotagmina-1, el sensor de Ca^{+2} para la exocitosis sincrónica en neuronas, tiene una K_d por Ca^{+2} cercana a los 200 μM (120). El dominio C2A de disferlina presenta dos sitios unión a Ca^{2+} con K_d de 3.7 ± 0.7 y 80 ± 2 μM , y el dominio C2C también posee dos sitios de unión Ca^{2+} con K_d de 1.5 μM y 178.2 ± 12.2 μM . Los otros dominios C2 de disferlina tienen sitios que sensan Ca^{2+} a mayores concentraciones (35). Por otra parte, el dominio C2A, a diferencia de los otros dominios, presenta alta afinidad por PS y PIP2 (36, 37, 38), fosfolípidos que juega un papel importante en la exocitosis (121, 122). Por lo tanto, los dominios C2A y C2C podría jugar un papel importante en la exocitosis, pero quizás ellos deben estar asociado a una región de membrana.

En sus estudios Coddling y colaboradores (98) demostraron que constructos de disferlina similares a los utilizados en esta tesis eran capaces de acelerar la fusión de liposomas de una manera dependiente de SNAREs y Ca^{2+} . Sin embargo, esos experimentos fueron realizados en presencia de Ca^{2+} en una concentración de 500 μM . Por lo tanto, habría que estudiar la contribución de los diferentes dominios C2 a la exocitosis inducida por diferentes concentraciones de Ca^{2+} citosólico.

8.2 La distribución de AA2 se ve alterada en mioblastos humanos deficientes o con sobreexpresión de disferlina.

Existe una relación funcional entre AA2, disferlina y filamentos de actina durante la restauración del sarcolema (4, 41, 52, 75, 79, 81, 123, 124). En nuestro objetivo específico 2 se demostró que los mioblastos DYSF3 y C25 exhiben diferencias importantes en la distribución de AA2, coincidente con lo reportado por Lennon y colaboradores en 2003 (79). La importancia de disferlina en la distribución de AA2 se ve reforzada al expresar disferlina completa (Dysf-full) en los mioblastos DYSF3, observándose un aumento en la distribución citosólica de AA2 (Figura 20A). En cambio, la expresión de disferlina completa en la línea control C25 disminuyó significativamente la distribución citosólica de AA2. Estos resultados nos indican que un aumento en el nivel de expresión de disferlina también es capaz de alterar la distribución de AA2 y acercarla al patrón aberrante observado en la condición de disferlinopatía. Glover y colaboradores en el año 2010 (125) reportaron que una sobreexpresión de disferlina en ratones produce una distrofia progresiva no necrótica. En esos animales transgénicos hDYSF Tg la expresión de disferlina está aumentada por sobre 30 veces. A nivel celular, los análisis ultraestructurales indican que la integridad de la membrana plasmática se conserva, sin embargo, la expresión de AA2 está aumentada 5.6 veces por sobre lo observado en una condición normal (Figura 21) (125).

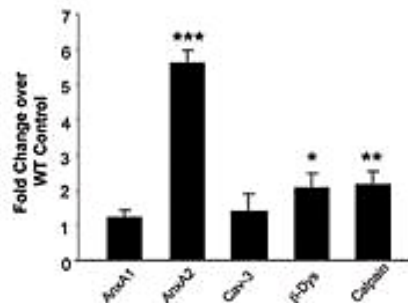


Figura 21. Análisis densitométrico de la intensidad de las bandas de proteínas obtenidas de músculo esquelético y analizadas mediante Western Blot normalizadas a β -tubulina. Los valores están expresados con respecto a los niveles de expresión de proteínas del ratón salvaje (WT). Los datos corresponden a las medias

± error estándar (* $p < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, prueba t no emparejada). Adaptación de la figura 4C del estudio de Glover y colaboradores (125).

Se ha sugerido que los dominios C2 N-terminales de disferlina interactúan con AA2 para promover la reparación de la membrana plasmática dañada (73, 79 – 81). Cuando determinamos qué región de disferlina estaba implicada en la reorganización de la distribución de AA2, no se observaron diferencias significativas entre mioblastos que expresaban las regiones N- o C- terminal de disferlina, con mCherry o el control MOCK. Sin embargo, al comparar con la prueba de t -test se pudo observar que la razón de distribución de AA2 en mioblastos que expresaban la región C-terminal, era significativamente diferente a la situación MOCK perteneciente a la situación deficiente de disferlina ($p < 0.05$). Por lo tanto, no se puede descartar que el dominio C-terminal podría contribuir en algún grado a la regulación de la distribución de AA2 y requerir de algún dominio de la región media de disferlina, la cual no fue incluida en este estudio. Sin embargo, tampoco podemos descartar que los distintos dominios C2 de disferlina actúan de manera cooperativa y complementaria y que por ello no se observaron cambios en la distribución de AA2 al utilizar el dominio N-terminal, como se podría esperar dada la interacción sugerida en otros trabajos (73, 79 – 81). Por lo tanto, más estudios deberían realizarse para poder esclarecer este mecanismo.

Por otro lado, también se observó que en los mioblastos C25 había una colocalización entre AA2 y filamentos de actina, que no era observada en los mioblastos DYSF3, evento que se producía mayoritariamente en las zonas correspondientes con la membrana plasmática (Figura 18D). Nuestros resultados se correlacionan con lo anteriormente reportado por Hayes y colaboradores en el año 2006, pues ellos indican que AA2 colocaliza con actina en zonas de remodelamiento activo del citoesqueleto (126). En la membrana plasmática se encuentra el citoesqueleto cortical celular que está activamente remodelándose para desempeñar importantes funciones celulares como lo son la exocitosis y el tráfico vesicular, entre otros (127 – 129). El hecho que en mioblastos DYSF3 no se observe dicha colocalización, podría explicar una asociación de los roles de disferlina en el remodelamiento del citoesqueleto de actina (101) y la distribución de AA2. Sin embargo, se requieren investigaciones adicionales para demostrar este mecanismo.

9. CONCLUSIONES

Como conclusiones de este trabajo, se tiene lo siguiente:

1. Las regiones N- o C- terminal de disferlina, por sí solas, no restablecen la excitosis de mioblastos DYSF3. No obstante, estudios adicionales son requeridos para determinar su contribución a este proceso celular.
2. La distribución de AA2 está alterada en mioblastos provenientes de músculo esquelético de paciente con disferlinopatía.
3. Las regiones N-terminal y C-terminal, por sí solas, no restauran la distribución anormal de AA2 en los mioblastos DYSF3.

10. RESPUESTAS A LOS COMENTARIOS DE LOS REVISORES

En este apartado se detalla la inclusión o rechazo de las correcciones realizadas por cada uno de los miembros de la comisión evaluadora de esta tesis de magister. Se agradece desde ya el tiempo y dedicación aportados por cada uno de ellos en este trabajo.

A continuación, se informará sobre los cambios se efectuados:

1. Correcciones realizadas por el Profesor Pablo Caviedes:

- Se aceptan los cambios mediante control de cambios de las páginas 11, 15, 20, 22, 44 y 50.
- Se corrige el tamaño de los insets de la Figura 8.
- Se corrige contraste y tamaño de la Figura 18 A y B.
- Se acepta comentario acerca del artículo científico mencionado sobre interacciones entre AA2 y disferlina y se agrega a la discusión del trabajo.

2. Correcciones realizadas por el Profesor Álvaro Ardiles:

- Se acepta comentario y se añade información sobre la interacción de los dominios de C2 de disferlina con AA2, en la página 18.
- Se acepta comentario y se añade información acerca del parámetro de amplitud en la página 28 del escrito.
- Se acepta corrección realizada mediante control de cambios en las páginas 35, 43, 45, 50 y 51
- Se acepta comentario de las Figuras 12 y 13 y se corrige el nombre del eje y números.
- Se corrige error en página 40, acerca del nivel de significancia.
- Se cambia imagen a una más representativa en Figura 19A, panel DysfN.
- No se logra incorporar imagen del inmunomarcaje de disferlina endógena en C25 para comparar con el marcate con mCherry en Figura 19, debido a que esos datos se encuentran en computadores del laboratorio en la región de Valparaíso y yo me encuentro en Rancagua. Viajar en su búsqueda o solicitar que me las envíen no es

posible en estos momentos, dadas las condiciones sanitarias y de cuarentena en que nos encontramos por la pandemia, Covid-19.

3. Correcciones realizadas por el Profesor Agustín Martínez:

- Se indica: *Creo que se explicó poco el fenotipo de los distintos tipos de disferlinopatías, en particular de la del paciente de la línea celular DYSF3.* Se acepta comentario y se agrega más información sobre las disferlinopatías y acerca de la disferlinopatía que padece el paciente de la línea celular DYSF3 (ver último párrafo en página 13 y en sección de metodología).
- Se indica por el profesor lo siguiente: *En el objetivo 1 se hace mención al efecto de los constructos del NT y CT de la disferlina sobre la línea celular DYSF3, pero no se hace comparación con la línea celular control, por lo que no se puede contestar la pregunta de si los tratamientos recuperan la exocitosis.* Al respecto, debe aclararse que anteriormente en el laboratorio de la profesora Ana María Cárdenas, ya se había realizado un estudio, tesis de Hugo Almarza (datos aún no publicados), en donde se demostró que distintas líneas celulares deficientes de disferlina presentaban una disminución significativa en el número de eventos de exocitosis al ser comparadas con la misma línea celular control C25, utilizada en este estudio y los mioblastos pertenecientes a la línea DYSF3 fueron los que presentaron mayor disminución. En base a esto, en esta tesis de magister se utilizó como control el constructo mCherry en la línea DYSF3, de manera de observar si el número de eventos pueden aumentar de manera significativa al utilizar los constructos N- y C-terminal de disferlina. Es por ello que no se utilizó nuevamente la línea C25, pues ese dato ya es conocido con anterioridad.
- El profesor indica lo siguiente: *El gráfico 18D parece inconsistente con las imágenes ya que en las imágenes DYSF3 se ve más marca nuclear de AA2 y el gráfico no lo representa.* Al respecto se debe señalar que el gráfico 18D no muestra el análisis de distribución de AA2, si no que muestra el análisis de colocalización que existe entre AA2 y G-Actina en las regiones de membrana, citoplasma y núcleo. En el trabajo se explica y muestra que las proteínas se ubican en regiones distintas y por ello no hay colocalización.

- Se indica por el profesor: *En la Figura 19 se habla en la descripción de densidad de marca, pero para hablar de densidad se requiere medir la intensidad de la marca por área nuclear, el perfil solo muestra una línea a través de la célula.* Se acepta comentario y se corrige el texto referido a la Figura 19, en la página 45 del escrito.
- El profesor indica: *En la discusión eliminar o precisar el subtítulo ya que los resultados de la tesis no lo sustentan; "La distribución de AA2 en mioblastos humanos depende del nivel de expresión de disferlina".* Al respecto, se acepta corrección y se cambia el subtítulo por "La distribución de AA2 se ve alterada en mioblastos humanos deficientes o con sobreexpresión de disferlina".

11. BIBLIOGRAFIA

- 1 Bischofberger M, Iacovache I, Gisou Van Der Goot F. Pathogenic pore-forming proteins: Function and host response. *Cell Host Microbe*. 2012;12(3):266–75.
- 2 Terrill JR, Radley-Crabb HG, Iwasaki T, Lemckert FA, Arthur PG, Grounds MD. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: Focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *FEBS J*. 2013;280(17):4149–64.
- 3 Rando TA, Alto P, Diseases N, Diego S, Program EB. Oxidative Stress and the. 2002;(November):175–86.
- 4 Han R, Campbell KP. Dysferlin and muscle membrane repair. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(4):409–16
- 5 Liu F, Lou J, Zhao D, Li W, Zhao Y, Sun X, et al. Dysferlinopathy: Mitochondrial abnormalities in human skeletal muscle. *Int J Neurosci*. 2016;126(6):499–509.
- 6 Gayathri N, Alefia R, Nalini A, Yasha T C, Anita M, Santosh V, Shankar S K. Dysferlinopathy: Spectrum of pathological changes in skeletal muscle tissue. *Indian J Pathol Microbiol* 2011;54:350-4
- 7 Cai C, Weisleder N, Ko JK, Komazaki S, Sunada Y, Nishi M, et al. Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. *J Biol Chem*. 2009;284(23):15894–902.
- 8 Koerdt SN, Ashraf APK, Gerke V. Annexins and plasma membrane repair. 1a ed. Vol. 84, *Current Topics in Membranes*. Elsevier Inc.; 2019. 43–65 p.
- 9 Creutz CE. The annexins and exocytosis. *Science* (80-). 1992;258(5084):924–31.
- 10 Pedersen BK. Muscles and their myokines. *J Exp Biol*. 2011;214(2):337–46
- 11 Trayhurn P, Drevon CA, Eckel J. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - Adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch Physiol Biochem*. 2011;117(2):47–56.
- 12 Hoppeler H. Molecular networks in skeletal muscle plasticity. *J Exp Biol*. 2016;219(2):205–13.
- 13 González-Jamett AM, Bevilacqua JA, Cárdenas AM. Hereditary Miopathies. En: Kunihiro Sakuma, editor. *Muscle Cells and Tissue Current Status of Research Field*. Rijeka, Croatia: IntechOpen; 2018. 252–268

- 14 Mercuri E, Muntoni F. Muscular dystrophies. *Lancet* [Internet]. 2013;381(9869):845-60.
- 15 Klinge L, Harris J, Sewry C, Charlton R, Anderson L, Laval S, et al. Dysferlin associates with the developing T-tubule system in rodent and human skeletal muscle. *Muscle and Nerve*. 2010;41(2):166-73.
- 16 Miyoshi K, Kawai H, Iwasa M, Kusaka K, Nishino H. Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case. *Brain*. 1986; 109 (1):31-54.
- 17 Manera JD. Disferlinopatías: Nuevos Aspectos Diagnósticos Y Terapéuticos. [Tesis Doctoral]: Universidad Autónoma de Barcelona; 2013.
- 18 Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, McNeil PL, Campbell KP. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature*. 2003; 8;423 (6936):168-72.
- 19 Xu C, Degree M, Chen J, Zhang Y, Degree M, Li J. Limb-girdle muscular dystrophy type 2B misdiagnosed as polymyositis at the early stage Case report and literature review. *Med (United States)*. 2018;97(21):1-5.
- 20 Biondi O, Villemeur M, Marchand A, Chretien F, Bourg N, Gherardi RK, et al. Dual effects of exercise in dysferlinopathy. *Am J Pathol* [Internet]. 2013;182(6):2298-309.
- 21 Bakir, Hadil. Studies on muscular dystrophy associated genes. [Tesis Doctoral]. Durham: Universidad de Durham; 2007
- 22 Aoki M, Liu J, Richard I, Bashir R, Britton S, Keers SM, Oeltjen J, et al. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. *Neurology*. 2001, 57(2) 271-8.
- 23 Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-García R, Palmer J, Gallano P, Baiget M, Matsuda C, Brown RH. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol*. 2001;49(1):130-4.
- 24 Takahashi T, Aoki M, Tateyama M, Onodera Y, Kondo E, Sato H, Ito M, Yoshioka M, Konno K, Brown RH Jr, Saito H, Itoyama Y. Mutational and clinical features of Japanese patients with dysferlinopathy. *Neurology*. 2003b;60 A:233.

- 25 Fanin M, Angelini C. Progress and challenges in diagnosis of dysferlinopathy. *Muscle & nerve*. 2016; 54(5), 821-835.
- 26 Galassi G, Rowland LP, Hays AP, Dimauro S, Hopkins LC. High serum levels of creatine kinase: Asymptomatic prelude to distal myopathy. *Muscle Nerve*. 1987;10(4):346-50.
- 27 Okahashi S, Ogawa G, Suzuki M, Ogata K, Nishino I, Kawai M. Asymptomatic sporadic dysferlinopathy presenting with elevation of serum creatine kinase. Typical distribution of muscle involvement shown by MRI but not by CT. *Intern Med*. 2008;47(4):305-7.
- 28 Harris E, Bladen CL, Mayhew A, James M, Bettinson K, Moore U, et al. The clinical outcome study for dysferlinopathy an international multicenter study. *Neurol Genet*. 2016;2(4).
- 29 Takahashi T, Aoki M, Suzuki N, Tateyama M, Yaginuma C, Sato H, et al. Clinical features and a mutation with late onset of limb girdle muscular dystrophy 2B. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(4):433-9.
- 30 Escobar H, Schöwel V, Spuler S, Marg A, Izsvák Z. Full-length Dysferlin Transfer by the Hyperactive Sleeping Beauty Transposase Restores Dysferlin-deficient Muscle. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2016;5(January): e277.
- 31 Bulankina A V., Thoms S. Functions of Vertebrate Ferlins. Vol. 9, *Cells*. 2020. 534 p.
- 32 Bansal D, Campbell KP. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol*. 2004;14(4):206-13.
- 33 Cho W, Stahelin R V. Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. 2006; 1761:838-49.
- 34 Corbalan-Garcia S, Gómez-Fernández JC. Signaling through C2 domains: More than one lipid target. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2014;1838(6):1536-47.
- 35 Abdullah N, Padmanarayana M, Marty NJ, Johnson CP. Quantitation of the calcium and membrane binding properties of the C2 domains of dysferlin. *Biophys J*. 2014;106(2):382-9.
- 36 Davis DB, Doherty KR, Delmonte AJ, McNally EM. Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains. *J Biol Chem*. 2002;277(25):22883-8.

- 37 Lek A, Evesson FJ, Sutton RB, North KN, Cooper ST. Ferlins: Regulators of Vesicle Fusion for Auditory Neurotransmission, Receptor Trafficking and Membrane Repair. *Traffic*. 2012;13(2):185–94.
- 38 Therrien C, Fulvio S Di, Pickles S, Sinnreich M. Characterization of lipid binding specificities of dysferlin C2 domains reveals novel interactions with phosphoinositides. *Biochemistry*. 2009;48(11):2377–84.
- 39 Marty NJ, Holman CL, Abdullah N, Johnson CP. The C2 domains of otoferlin, dysferlin, and myoferlin alter the packing of lipid bilayers. *Biochemistry*. 2013;52(33):5585–92.
- 40 Cooper ST, Head SI. Membrane Injury and Repair in the Muscular Dystrophies. *Neuroscientist*. 2015;21(6):653–68.
- 41 Cárdenas AM, González-Jamett AM, Cea LA, Bevilacqua JA, Caviedes P. Dysferlin function in skeletal muscle: Possible pathological mechanisms and therapeutical targets in dysferlinopathies. *Exp Neurol* [Internet]. 2016; 283:246–54.
- 42 Harsini FM, Chebrolu S, Fuson KL, White MA, Rice AM, Sutton RB. FerA is a Membrane-Associating Four-Helix Bundle Domain in the Ferlin Family of Membrane-Fusion Proteins. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1-11
- 43 Davis DB. Myoferlin, a candidate gene and potential modifier of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2000;9(2):217–26.
- 44 Doherty KR, Cave A, Davis DB, Delmonte AJ, Posey A, Early JU, et al. Normal myoblast fusion requires myoferlin. *Development*. 2005;132(24):5565–75.
- 45 Leung C, Yu C, Lin MI, Tognon C, Bernatchez P. Expression of myoferlin in human and murine carcinoma tumors: Role in membrane repair, cell proliferation, and tumorigenesis. *Am J Pathol*. 2013;182(5):1900–9.
- 46 Johnson CP, Chapman ER. Otoferlin is a calcium sensor that directly regulates SNARE-mediated membrane fusion. *J Cell Biol*. 2010;191(1):187–97.
- 47 Pangršič T, Reisinger E, Moser T. Otoferlin: A multi-C 2 domain protein essential for hearing. *Trends Neurosci*. 2012;35(11):671–80.
- 48 Anderson LVB, Davison K, Moss JA, Young C, Cullen MJ, Walsh J, et al. Corrigendum: Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development (*Human Molecular Genetics* (1999) 8 (855-861)). *Hum Mol Genet*. 1999;8(6):1141.

- 49 De Luna N, Freixas A, Gallano P, Caselles L, Rojas-García R, Paradas C, et al. Dysferlin expression in monocytes: A source of mRNA for mutation analysis. *Neuromuscul Disord.* 2007;17(1):69–76.
- 50 Nagaraju K, Rawat R, Veszelszky E, Thapliyal R, Kesari A, Sparks S, et al. Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: A model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B. *Am J Pathol.* 2008;172(3):774–85.
- 51 Kerr JP, Ward CW, Bloch RJ. Dysferlin at transverse tubules regulates Ca²⁺ homeostasis in skeletal muscle. *Front Physiol.* 2014;5 MAR(March).
- 52 Glover L, Brown RH. Dysferlin in membrane trafficking and patch repair. *Traffic.* 2007;8(7):785–94.
- 53 McDade JR, Michele DE. Membrane damage-induced vesicle-vesicle fusion of dysferlin-containing vesicles in muscle cells requires microtubules and kinesin. *Hum Mol Genet.* 2014;23(7):1677–86.
- 54 Barthélémy F, Defour A, Lévy N, Krahn M, Bartoli M. Muscle Cells Fix Breaches by Orchestrating a Membrane Repair Ballet. *J Neuromuscul Dis.* 2018;5(1):21–8.
- 55 Han R. Muscle membrane repair and inflammatory attack in dysferlinopathy. *Skelet Muscle.* 2011;1(1):10.
- 56 Lloyd EM, Xu H, Murphy RM, Grounds MD, Pinniger GJ. Dysferlin-deficiency has greater impact on function of slow muscles, compared with fast, in aged BLAJ mice. *PLoS One.* 2019;14(4):1–20.
- 57 Klinge L, Laval S, Keers S, Haldane F, Straub V, Barresi R, et al. From T-tubule to sarcolemma: damage-induced dysferlin translocation in early myogenesis. *FASEB J.* 2007;21(8):1768–76.
- 58 Ho M, Gallardo E, McKenna-Yasek D, et al. A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Annals of Neurology.* 2002 Jan;51(1):129-133.
- 59 Lang CT, Markham KB, Behrendt NJ, Suarez AA, Samuels P, Vandre DD, et al. Placental Dysferlin Expression is Reduced in Severe Preeclampsia. *Placenta.* 2009;30(8):711–8.

- 60 Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Keduka E, Takeshima H, Imamura T, et al. The C2A domain in dysferlin is important for association with MG53 (TRIM72). *PLoS Curr.* 2012;53(NOVEMBER 2012):1–8.
- 61 Han WQ, Xia M, Xu M, Boini KM, Ritter JK, Li NJ, et al. Lysosome fusion to the cell membrane is mediated by the dysferlin C2A domain in coronary arterial endothelial cells. *J Cell Sci.* 2012;125(5):1225–34.
- 62 Haase H, Podzuweit T, Lutsch G, Hohaus A, Kostka S, Lindschau C, et al. Signaling from β -adrenoceptor to L-type calcium channel: identification of a novel cardiac protein kinase A target possessing similarities to AHNAK. *FASEB J.* 1999;13(15):2161–72.
- 63 Borgonovo B, Cocucci E, Racchetti G, Podini P, Bachi A, Meldolesi J. Regulated exocytosis: A novel, widely expressed system. *Nat Cell Biol.* 2002;4(12):955–62.
- 64 Huang Y, Laval SH, Remoortere A, Baudier J, Benaud C, Anderson LVB, et al. AHNAK a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. *FASEB J.* 2007;21(3):732–42.
- 65 Davis TA, Loos B, Engelbrecht AM. AHNAK: The giant jack of all trades. *Cell Signal [Internet].* 2014;26(12):2683–93.
- 66 Zacharias U, Purfürst B, Schöwel V, Morano I, Spuler S, Haase H. Ahnak1 abnormally localizes in muscular dystrophies and contributes to muscle vesicle release. *J Muscle Res Cell Motil.* 2011;32(4–5):271–80.
- 67 Flix B, De La Torre C, Castillo J, Casal C, Illa I, Gallardo E. Dysferlin interacts with calsequestrin-1, myomesin-2 and dynein in human skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(8):1927–38.
- 68 Matsuda C. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet.* 2001;10(17):1761–6.
- 69 Hernández-Deviez DJ, Howes MT, Laval SH, Bushby K, Hancock JF, Parton RG. Caveolin regulates endocytosis of the muscle repair protein, dysferlin. *J Biol Chem.* 2008;283(10):6476–88.
- 70 Dewulf M, Köster DV, Sinha B, Viaris de Lesegno C, Chambon V, Bigot A, et al. Dystrophy-associated caveolin-3 mutations reveal that caveolae couple

- IL6/STAT3 signaling with mechanosensing in human muscle cells. *Nat Commun.* 2019;10(1):1–13.
- 71 Mariano A, Henning A, Han R. Dysferlin-deficient muscular dystrophy and innate immune activation. *FEBS J.* 2013;280(17):4165–76.
- 72 Matsuda C, Kameyama K, Tagawa K, Ogawa M, Suzuki A, Yamaji S, et al. Dysferlin interacts with affixin (β -parvin) at the sarcolemma. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64(4):334–40.
- 73 de Morrée A, Hensbergen PJ, van Haagen HHHBM, Dragan I, Deelder AM, 't Hoen PAC, et al. Proteomic analysis of the dysferlin protein complex unveils its importance for sarcolemmal maintenance and integrity. *PLoS One.* 2010;5(11).
- 74 Azakir BA, Fulvio S Di, Therrien C, Sinnreich M. Dysferlin interacts with tubulin and microtubules in mouse skeletal muscle. *PLoS One.* 2010;5(4):1–10.
- 75 Lek A, Evesson FJ, Lemckert FA, Redpath GMI, Lueders AK, Turnbull L, et al. Calpains, cleaved mini-dysferlin72, and L-type channels underpin calcium-dependent muscle membrane repair. *J Neurosci.* 2013;33(12):5085–94.
- 76 Krahn M, Wein N, Bartoli M, Lostal W, Courier S, Bourg-Alibert N, et al. A naturally occurring human minidysferlin protein repairs sarcolemmal lesions in a mouse model of dysferlinopathy. *Sci Transl Med.* 2010;2(50).
- 77 Redpath GMI, Woolger N, Piper AK, Lemckert FA, Lek A, Greer PA, et al. Calpain cleavage within dysferlin exon 40a releases a synaptotagmin-like module for membrane repair. *Mol Biol Cell.* 2014;25(19):3037–48.
- 78 Lostal W, Bartoli M, Roudaut C, Bourg N, Krahn M, Pryadkina M, et al. Lack of correlation between outcomes of membrane repair assay and correction of dystrophic changes in experimental therapeutic strategy in dysferlinopathy. *PLoS One.* 2012;7(5).
- 79 Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, Brown RH. Dysferlin Interacts with Annexins A1 and A2 and Mediates Sarcolemmal Wound-healing. *J Biol Chem.* 2003;278(50):50466–73.
- 80 Leung C, Utokaparch S, Sharma A, Yu C, Abraham T, Borchers C, et al. Proteomic identification of dysferlin-interacting protein complexes in human vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;415(2):263–9.

- 81 Bittel DC, Chandra G, Tirunagri LMS, Deora AB, Medikayala S, Scheffer L, et al. Annexin A2 Mediates Dysferlin Accumulation and Muscle Cell Membrane Repair. *Cells*. 2020;9(9):1919.
- 82 Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE. Annexin-Actin interactions. *Traffic*. 2004;5(8):571–6.
- 83 Grindheim AK, Vedeler A. Extracellular vesicles released from cells exposed to reactive oxygen species increase annexin A2 expression and survival of target cells exposed to the same conditions. *Commun Integr Biol*. 2016;9(4):1–7.
- 84 McNeil AK, Rescher U, Gerke V, McNeil PL. Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. *J Biol Chem*. 2006;281(46):35202–7.
- 85 Gerke V, Moss SE. Annexins: From structure to function. *Physiol Rev*. 2002;82(2):331–71.
- 86 Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: Linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(6):449–61.
- 87 Hitchcock JK, Katz AA, Schäfer G. Dynamic reciprocity: The role of annexin A2 in tissue integrity. *J Cell Commun Signal*. 2014;8(2):125–33.
- 88 Gabel M, Chasserot-Golaz S. Annexin A2, an essential partner of the exocytotic process in chromaffin cells. *J Neurochem*. 2016;890–6.
- 89 Zhou X, Shentu P, Xu Y. Spatiotemporal Regulators for Insulin-Stimulated GLUT4 Vesicle Exocytosis. *J Diabetes Res*. 2017;2017.
- 90 Richter EA, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev*. 2013;93(3):993–1017.
- 91 Lindau M, Alvarez De Toledo G. The fusion pore. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2003;1641(2–3):167–73.
- 92 Ho M, Post CM, Donahue LR, Lidov HGW, Bronson RT, Goolsby H, et al. Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency. *Hum Mol Genet*. 2004;13(18):1999–2010.
- 93 Hornsey MA, Laval SH, Barresi R, Lochmüller H, Bushby K. Muscular dystrophy in dysferlin-deficient mouse models. *Neuromuscul Disord*. 2013;23(5):377–87.
- 94 St-Denis JF, Cabaniols JP, Cushman SW, Roche PA. SNAP-23 participates in SNARE complex assembly in rat adipose cells. *Biochem J*. 1999;338(3):709–15.

- 95 Kawanishi M, Tamori Y, Okazawa H, Araki S, Shinoda H, Kasuga M. Role of SNAP23 in insulin-induced translocation of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes: Mediation of complex formation between syntaxin4 and VAMP2. *J Biol Chem.* 2000;275(11):8240–7.
- 96 Kawaguchi T, Tamori Y, Kanda H, Yoshikawa M, Tateya S, Nishino N, et al. The t-SNAREs syntaxin4 and SNAP23 but not v-SNARE VAMP2 are indispensable to tether GLUT4 vesicles at the plasma membrane in adipocyte. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391(3):1336–41.
- 97 Evesson FJ, Peat RA, Lek A, Brilot F, Lo HP, Dale RC, et al. Reduced plasma membrane expression of dysferlin mutants is attributed to accelerated endocytosis via a syntaxin-4-associated pathway. *J Biol Chem.* 2010;285(37):28529–39.
- 98 Coddling SJ, Marty N, Abdullah N, Johnson CP. Dysferlin binds SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptors) and stimulates membrane fusion in a calcium-sensitive manner. *J Biol Chem.* 2016;291(28):14575–84.
- 99 Chiu YH, Hornsey MA, Klinge L, Jørgensen LH, Laval SH, Charlton R, et al. Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2009;18(11):1976–89.
- 100 Demonbreun AR, Fahrenbach JP, Deveaux K, Earley JU, Pytel P, McNally EM. Impaired muscle growth and response to insulin-like growth factor 1 in dysferlin-mediated muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2011;20(4):779–89.
- 101 Báez-Matus X, Figueroa-Cares C, González-Jamett AM, Almarza-Salazar H, Arriagada C, et al. Defects in g-actin incorporation into filaments in myoblasts derived from dysferlinopathy patients are restored by dysferlin C2 domains. *Int J Mol Sci.* 2020;21(1):1–16.
- 102 González-Jamett AM, Baez-Matus X, Olivares MJ, Hinostroza F, Guerra-Fernández MJ, Vasquez-Navarrete J, et al. Dynamin-2 mutations linked to Centronuclear Myopathy impair actin-dependent trafficking in muscle cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–16.
- 103 Chapman ER. Synaptotagmin: A Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(7):498–508.

- 104 Philippi S, Bigot A, Marg A, Vincent M, Spuler S, Zacharias U. Dysferlin-deficient immortalized human myoblasts and myotubes as a useful tool to study dysferlinopathy. *PLoS Curr.* 2012;1–8.
- 105 Martin LB, Shewan A, Millar CA, Gould GW, James DE. Vesicle-associated membrane protein 2 plays a specific role in the insulin-dependent trafficking of the facilitative glucose transporter GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 1998;273(3):1444–52.
- 106 Kupriyanova TA, Kandror V, Kandror K V. Isolation and characterization of the two major intracellular Glut4 storage compartments. *J Biol Chem.* 2002;277(11):9133–8.
- 107 Hosaka T, Brooks CC, Eleonora Presman E, Kim S, Zhang Z, Breen M, Gross DN, Sztul E, Pilch PF. p115 Interacts with the GLUT4 Vesicle Protein, IRAP, and Plays a Critical Role in Insulin-stimulated GLUT4 Translocation. *Molecular Biology of the Cell* 2005; 16(6):2882-90.
- 108 Xu Y, Rubin BR, Orme CM, Karpikov A, Yu C, Bogan JS, et al. Dual-mode of insulin action controls GLUT4 vesicle exocytosis. *J Cell Biol.* 2011;193(4):643–53.
- 109 Chen Y, Lippincott-Schwartz J. Selective visualization of GLUT4 storage vesicles and associated rab proteins using IRAP-phluorin. *Methods Mol Biol.* 2015; 1298:173–9.
- 110 Balaji J, Ryan TA. Single-vesicle imaging reveals that synaptic vesicle exocytosis and endocytosis are coupled by a single stochastic mode. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(51):20576–81.
- 111 Sokoll S, Tönnies K, Heine M. Detection of spontaneous vesicle release at individual synapses using multiple wavelets in a CWT-based algorithm. *Lect Notes Comput Sci (including Subser Lect Notes Artif Intell Lect Notes Bioinformatics).* 2012;7510 LNCS(October):165–72.
- 112 Olivares MJ, González-Jamett AM, Guerra MJ, Baez-Matus X, Haro-Acuña V, Martínez-Quiles N, et al. Src kinases regulate de novo actin polymerization during exocytosis in neuroendocrine chromaffin cells. *PLoS One.* 2014;9(6):1–14.
- 113 González-Jamett AM, Momboisse F, Guerra MJ, Ory S, Báez-Matus X, Barraza N, et al. Dynamin-2 Regulates Fusion Pore Expansion and Quantal Release through

- a Mechanism that Involves Actin Dynamics in Neuroendocrine Chromaffin Cells. *PLoS One*. 2013;8(8):1–10.
- 114 Ren L, Mellander LJ, Keighron J, Cans AS, Kurczy ME, Svir I, et al. The evidence for open and closed exocytosis as the primary release mechanism. *Q Rev Biophys*. 2016;49:1–27.
- 115 Kreft M, Jorgačevski J, Vardjan N, Zorec R. Unproductive exocytosis. *J Neurochem*. 2016;880–9.
- 116 Yu YJ, Dhavan R, Chevalier MW, Yudowski GA, Von Zastrow M. Rapid delivery of internalized signaling receptors to the somatodendritic surface by sequence-specific local insertion. *J Neurosci*. 2010;30(35):11703–14.
- 117 Marengo FD, Cárdenas AM. How does the stimulus define exocytosis in adrenal chromaffin cells? *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2018;470(1):155–67.
- 118 Números aleatorios y números al azar [Internet]. Disponible en: <http://www.alazar.info/generador-de-numeros-aleatorios-sin-repeticion>
- 119 Gómez J, Ñeco P, DiFranco M, Vergara JL. Calcium release domains in mammalian skeletal muscle studied with two-photon imaging and spot detection techniques. *J Gen Physiol*. 2006;127(6):623–37.
- 120 Radhakrishnan A, Stein A, Jahn R, Fasshauer D. The Ca²⁺ affinity of synaptotagmin 1 is markedly increased by a specific interaction of its C2B domain with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem*. 2009;284(38):25749–60.
- 121 Martin TFJ, Balla T, Wymann M, York J. Phosphoinositides II: The Diverse Biological Functions. *Subcell Biochem* [Internet]. 2012;59:111–30.
- 122 Zhang Z, Hui E, Chapman ER, Jackson MB. Phosphatidylserine regulation of Ca²⁺-triggered exocytosis and fusion pores in PC12 cells. *Mol Biol Cell*. 2009 Dec;20(24):5086–95.
- 123 Demonbreun AR, Quattrocchi M, Barefield DY, Allen M V., Swanson KE, McNally EM. An actin-dependent annexin complex mediates plasma membrane repair in muscle. *J Cell Biol*. 2016;213(6):705–18.
- 124 Koerdt SN, Gerke V. Annexin A2 is involved in Ca²⁺-dependent plasma membrane repair in primary human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2017;1864(6):1046–53.

- 125 Glover LE, Newton K, Krishnan G, Bronson R, Boyle A, Krivickas LS, et al. Dysferlin overexpression in skeletal muscle produces a progressive myopathy. *Ann Neurol.* 2010;67(3):384–93.
- 126 Hayes MJ, Shao D, Bailly M, Moss SE. Regulation of actin dynamics by annexin 2. *EMBO J.* 2006;25(9):1816–26.
- 127 Trifaró JM, Gasman S, Gutiérrez LM. Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol.* 2008;192(2):165–72.
- 128 Trifaró JM, Rosé SD, Lejen T, Elzagallaai A. Two pathways control chromaffin cell cortical F-actin dynamics during exocytosis. *Biochimie.* 2000;82(4):339–52.
- 129 Porat-Shliom N, Milberg O, Masedunskas A, Weigert R. Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(12):2099–121.

12. ANEXOS

A continuación, se adjuntan las Actas de aprobación del Comité de Bioética animal, y del Comité de Bioseguridad según corresponde a este proyecto.



CIBICA
Comité Institucional de Bioética para
la Investigación con Animales

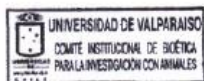
ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA BEA080-2016

I. El Comité Institucional de Bioética para la investigación con Animales de la Universidad de Valparaíso, en su sesión del 29 de abril de 2016, declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto BEA058-2016 titulado "Rol de disferlina en el remodelamiento del citoesqueleto de actina y su impacto en el tráfico de vesículas y reparación muscular en distrofia muscular asociada a mutaciones en disferlina", de la investigadora responsable Ana María Cárdenas, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso y que se presentó a concurso Fondecyt regular 2016 de Conicyt.

II. Para su evaluación el Comité de Bioética revisó los antecedentes presentados en el formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN".

III. En la valoración bioética del proyecto, el Comité consideró adecuado los aspectos bioéticos indicados en el segundo punto Valoración de Aspectos Éticos del formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN" y que se señalan en las páginas anexas a esta acta.

IV. Por lo anterior, el Comité Institucional de Bioética aprueba el protocolo experimental.




Chita Gulsada Aránguiz
Presidente
Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales



Dirección de Investigación
Comité de Bioseguridad

CERTIFICADO DE BIOSEGURIDAD

BS002/2016


I. El Comité de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso, declara que en su sesión del 31 de marzo de 2016, evaluó el protocolo experimental del proyecto "Rol de disferlina en el remodelamiento del citoesqueleto de actina y su impacto en el tráfico de vesículas y reparación muscular en distrofia muscular asociada a mutaciones en disferlina" presentado por la Dra. Ana María Cárdenas F. de la Facultad de Ciencias.

II. Para su evaluación el Comité de Bioseguridad revisó los antecedentes presentados por el interesado en relación a los riesgos y medidas preventivas de las actividades planteadas en el proyecto referido, en aquellas actividades que se realizarán en la Facultad de Ciencias (Laboratorio de Neurosecreción).

III. En la valoración de bioseguridad del proyecto, el Comité consideró apropiados el control de riesgos, las medidas preventivas, la gestión de residuos y el resguardo de la comunidad y del medio ambiente.

IV. Por lo anterior, el Comité de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso certifica que este protocolo experimental contempla las medidas de bioseguridad definidas en el Reglamento de Higiene y Seguridad de la UV y en el Manual de Bioseguridad de CONICYT.

V. Se extiende este certificado para ser presentado al concurso Fondecyt Regular 2016 de Conicyt



Chilo Guisado
Presidente
Comité de Bioseguridad
Universidad de Valparaíso

Valparaíso, 12 de abril de 2016.