



**FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
MENCION NEUROCIENCIAS**

**ALTERACIONES EN LA EXOCITOSIS EN LINEAS CELULARES DE  
PACIENTES PORTADORES DE DISFERLINOPATÍA**

Tesis para optar al grado académico de  
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia

**Hugo Alcester Almarza Salazar**

**Director de Tesis**

Dra. Ana María Cárdenas Díaz

**Co- Director Tesis**

Dra. Arlek González Jamett

**2019**

## **FINANCIAMIENTOS**

Esta tesis fue realizada gracias a las siguientes fuentes de financiamiento.

- FONDECYT REGULAR #1160495
- Instituto Científico Milenio, CINV-UV, ICM-ECONOMIA P09-022F.
- Beca CONICYT Magister Nacional, Periodos académicos 2017 al 2019.
- Programa de Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencias. Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso.

## INDICE

Abreviaturas .....	9 pág.
Lista de figuras, tablas y anexos .....	10 pág.
Resumen .....	12 pág.
Abstrac .....	14 pág.
1.-Marco Teorico .....	15 pág.
4.1 Disferlinopatía .....	15 pág.
1.2 Disferlina .....	17 pág.
1.3 Mecanismo molecular de disferlina en la reparación del tejido muscular .....	19 pág.
1.4 Disferlina y su rol en el tráfico vesicular .....	22 pág.
2.- Hipótesis y Objetivos .....	25 pág.
3.- Materiales y Métodos .....	26 pág.
3.1 Técnicas de cultivo celular .....	26 pág.
3.2 Transfección celular .....	27 pág.
3.3 Inmuncitoquímica y Western blot.....	29 pág.
3.4 Registro de monitoreo de eventos de exocitosis .....	32 pág.
4.- Resultados .....	35 pág.
4.1 Evaluación del fenotipo de mioblasto en líneas celulares C25 y portadores de disferlinopatía .....	35 pág.
4.2 Expresión del cosntructo IRAP-pHluorina en líneas celulares C25 y portadores de disferlinopatía .....	37 pág.
4.3 Colocalización del constructo IRAP-pHluorina con vesículas contenedoras GLUT4 en línea celular de mioblasto humano C25 .....	39 pág.

4.4 Caracterización de los eventos de exocitosis espontáneos en líneas celulares de mioblastos humanos C25 y portadores de disferlinopatía .....	40 pág.
4.5 Caracterización de los eventos de exocitosis inducidos con 1 $\mu$ M Ionomicina en líneas celulares de mioblastos humanos C25 y portadores de disferlinopatía .....	44 pág.
5.- Discusión .....	52 pág.
6.- Conclusiones .....	57 pág.
7.- Anexos .....	59 pág.
8.- Bibliografía .....	60 pág.

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
BSA	Suero fetal bovino.
Ca <sup>2+</sup>	Calcio Libre.
CK	Creatina Kinasa.
CO <sub>2</sub>	Doxido de Carbono.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DYSF	Disferlina.
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
GLUT4	Transportador de Glucosa 4.
GSV	Vesículas Contenedoras de GLUT4.
IH	Inmunohistoquímica.
IRAP	Aminopectidasa Regulado por Insulina.
KDa	Kilodalton.
MG53	Mitsugumin 53
MM	Miopatía de Myoshi
MP	Membrana Plasmática.
PBS	Buffer fosfato salino.
PFA	Parafolmaldeido.
SNAP-23	Proteína sinaptosomal asociada 23
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive.
TIRF	Microscopio de fluorescencia de reflexión interna total.
WB	Western Blot.

## LISTA DE FIGURAS, TABLAS Y ANEXOS

<b>Figura 1.</b> Aspectos clínicos de la disferlinopatía .....	16 pág.
<b>Figura 2.</b> Estructura de las ferlinas .....	18 pág.
<b>Figura 3.</b> Función e interacción de los distintos dominios de disferlina .....	19 pág.
<b>Figura 4.</b> Modelo de reparación de membrana plasmática por disferlina .....	21pág.
<b>Figura 5.</b> Alteraciones en el tráfico vesicular del receptor IGFR-1 en mioblastos nulos de Disferlina .....	24 pág.
<b>Figura 6.</b> Esquema de la estrategia experimental para el monitoreo de eventos de exocitosis en mioblastos portadores de disferlinopatía y control .....	33 pág.
<b>Figura 7.</b> Expresión del marcador miogénico desmina en líneas celulares C25 y con mutaciones en el gen de disferlina .....	36 pág.
<b>Figura 8.</b> pHluorina como reportero de exocitosis .....	37 pág.
<b>Figura 9.</b> Expresión del constructo IRAP-pHluorina .....	38 pág.
<b>Figura 10.</b> Colocalización de GLUT4 endógeno respecto al constructo IRAP-pHluorina en la línea celular de mioblastos humanos C25 .....	39 pág.
<b>Figura 11.</b> Caracterización de eventos de exocitosis en línea celular C25 y mioblastos portadores de disferlinopatía .....	41 pág.
<b>Figura 12.</b> Número de eventos de exocitosis espontáneos en mioblastos huamnos C25 y con mutaciones en disferlina .....	42 pág.
<b>Figura 13.</b> Tipos de eventos de exocitosis espontaneos en mioblastos huamnos C25 y con mutaciones en disferlina .....	43 pág.
<b>Figura 14.</b> Número de eventos de exocitosis inducidos con 1 $\mu$ M de ionomicina en mioblastos huamnos C25 y con mutaciones en disferlina .....	45 pág.

<b>Figura 15.</b> Caracterización de eventos de exocitosis inducidos con estímulo de 1 $\mu$ M ionomicina en línea celular C25 y mioblastos portadores de disferlinopatía .....	47 pág.
<b>Figura 16.</b> Tipos de eventos de exocitosis inducidos con estímulo de 1 $\mu$ M ionomicina en mioblastos huamnos C25 y con mutaciones en disferlina .....	48 pág.
<b>Figura 17.</b> Tiempo de inicio de los eventos de exocitosis registrados con estímulo de 1 $\mu$ M ionomicina en mioblastos huamnos C25 y con mutaciones en disferlina .....	49 pág.
<b>Figura 18.</b> Duraciones de eventos de exocitosis inducidos con estímulo de 1 $\mu$ M ionomicina en mioblastos huamnos C25 y con mutaciones en disferlina .....	50 pág.
<b>Figura 19.</b> Tiempo de decaimiento de los eventos de exocitosis inducidos con estímulo de 1 $\mu$ M ionomicina en mioblastos huamnos C25 y con mutaciones en disferlina .....	51 pág.
<b>Tabla 1.</b> Antecedentes de las líneas celulares de mioblastos humanos portadores de disferlinopatía y línea celular de mioblastos humano sano.....	26 pág.
<b>Tabla 2.</b> Número de eventos con modo de difusión lateral y sin difusión lateral en líneas celulares de mioblastos humanos en condición de estímulo con 1 $\mu$ M ionomicina .....	46 pág.
<b>Anexo 1.</b> Eventos de exocitosis bajo condición de reposo en líneas celulares de mioblastos humanos sanos C25 y con mutaciones en disferlina .....	59 pág.
<b>Anexo 2.</b> Efectos del estímulo con 1 $\mu$ M ionomicina en líneas celulares de mioblastos humanos sanos C25 y con mutaciones en disferlina .....	59 pág.
<b>Anexo 3.</b> Expresión de disferlina en líneas celulares de mioblastos C25 y portadores de disferlinopatía.....	59 pág.

Disferlina es una proteína altamente expresada en la membrana plasmática de células musculares. Se ha demostrado que la principal función de esta proteína es la reparación de membranas, por lo que su rol es fundamental para el mantenimiento de la integridad muscular. Mutaciones en el gen que codifica para disferlina (*DYSF*) son causantes de disferlinopatías, una enfermedad muscular congénita que incluye la distrofia muscular tipo 2B (LGMD2B) la miopatía de Miyoshi (MM) y la Miopatía distal. Disferlina posee siete dominios C2 con afinidad variable a  $\text{Ca}^{2+}$  y a fosfolípidos, los que están implicados en procesos de fusión de membranas mediados por proteínas SNARE. Esto último, sumado a que el tráfico de proteínas hacia la membrana plasmática se ve afectado en mioblastos de ratones deficientes de disferlina hace plausible suponer que disferlina podría jugar un papel en la exocitosis-dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el presente trabajo se estudió el proceso de exocitosis en líneas celulares de mioblastos provenientes de pacientes portadores de mutaciones en disferlina. Para monitorear la exocitosis se transfectaron los mioblastos con la Aminopeptidasa Regulada por Insulina (IRAP) fusionada a la sonda pHluorina, una proteína fluorescente verde sensible a pH. IRAP es ampliamente utilizada como reportero del tráfico del transportador de glucosa GLUT4, una ruta clave para el funcionamiento y el metabolismo de las células musculares. El constructo IRAP-pHluorina sobre-expresado en las líneas musculares fue visualizado mediante microscopía de reflexión total interna de la fluorescencia (TIRF) bajo distintas condiciones experimentales. Nuestros resultados muestran que la estimulación con el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$  ionomicina promueve abundantes eventos de exocitosis en la línea celular C25, correspondientes a mioblastos provenientes de un individuo sano. Sin embargo, el número de eventos inducidos por ionomicina en los mioblastos 379, 107, AB320 y ER, provenientes de músculo esquelético de pacientes con disferlinopatía, fue significativamente menor sugiriendo que defectos en el tráfico y/o en la exocitosis de vesículas contenedoras de GLUT4 podría ser un mecanismo afectado en células musculares con mutaciones en el gen *DYSF*.