



Facultad de Medicina
Escuela de Medicina

“ Rol de disferlina en el remodelamiento de la F-actina cortical en células musculares: Implicancia en modelos in vitro de disferlinopatías ”

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

NOMBRE TESI STA: Ximena Beatriz Báez Matus

Director de Tesis: Dra. Ana María Cárdenas Díaz

Codirector de Tesis: Dra. Arlek Marion González Jamett

Abril / 2017



Facultad de Medicina
Escuela de Medicina

“ Rol de disferlina en el
remodelamiento de la F-actina
cortical en células musculares:
Implicancia en modelos in vitro de
disferlinopatías”

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

NOMBRE TESI STA Ximena Beatriz Báez Matus

Director de Tesis: Dra. Ana María Cárdenas Díaz
Codirector de Tesis: Dra. Arlek Marion González Jamett

Abril 2017



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“Rol de disferlina en el remodelamiento de la F-actina cortical en células musculares: Implicancia en modelos in vitro de disferlinopatías”

Alumno Ximena Beatriz Báez Matus

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

Dr. Mario Párraga
Presidente Comisión

Dr. Agustín Martínez
Profesor Informante

Dr. Nelson Osses
Profesor Informante

Dra. Ana María Cárdenas
Directora de Tesis

Valparaíso, Chile
2017

AGRADECIMIENTOS.

Quisiera agradecer a la Dra. Ana María Cárdenas por todos estos años que he trabajado en su laboratorio. La verdad han sido 9 años en los que he aprendido y crecido como profesional, ha sido mi tutora tanto en mi tesis de pregrado como de magister y me ha traspasado sus enseñanzas, lo que me ha permitido ser un mejor profesional. Muchas gracias por sus consejos en lo laboral y también en lo personal.

También quiero agradecer a la Dra. Arlek González, la que ha sido cotutora en esta tesis. Con Arlek es una relación especial ya que la conocí cuando ella era estudiante de doctorado del laboratorio. Arlek siempre ha tenido una gran disposición para apoyarnos en temas académicos en el laboratorio, y en el transcurso de esta tesis no ha sido la excepción, siempre dispuesta a responder y a enseñar. Hoy ya es una investigadora postdoctoral y junto con darle miles de gracias le deseo un éxito rotundo en lo personal y profesional.

También quisiera agradecer a mis compañeras y compañero de laboratorio María José, Jacqueline, Fernando, Cindel, Jaime, Oscar, Ricardo y Carolina, por su apoyo, amistad y por todos los buenos los buenos momentos vividos dentro y fuera del laboratorio.

A Ignacio mi gran amigo y compañero de vida por ayudarme a plasmar mis ideas, por el apoyo intelectual y por estar ahí conmigo siempre.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurosecreción del Centro Interdisciplinario de Neurociencias de la Universidad de Valparaíso y fue financiado por los proyectos Milenio ICM-economía P09-022F, proyecto anillo ACT-1121 y proyecto FONDECYT 1160495.

A mis abuelos, que siempre
estarán en mis recuerdos.
A mi compañero de vida, aventuras y
desafíos, mi mejor amigo, mi esposo Ignacio.
A mi hijo Andrés, por ser
mi motor en la vida.
Sin ustedes no lo hubiese logrado.

ABREVIATURAS

Dysf	Disferlina
CK	Creatina Kinasa
LGMD 2B	Distrofia muscular de cintura tipo 2B
KDa	Kilo Dalton
Ca ²⁺	Calcio libre
MG53	Mitsugumin 53
ANXA6	Anexina A6
α -SMA	Alfa actina musculo liso
γ -SMA	Gama actina musculo liso
α -CAA	Alfa actina cardiaca
α -SKA	Alfa actina esquelética
β -CYA	Beta actina citoplasmática
γ -CYA	Gama actina citoplasmática
KO	Knock-Out
RCMH	Raúl Caviedes mioblastos humanos
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
PFA	Paraformaldehído
PBS	Tampón fosfato salino
FDB	Musculo flexor digitorum brevis

Índice

1.-RESUMEN	6
2.1.-Disferlinopatías	7
2.2.-Disferlina.....	8
2.3.-Rol fisiológico de Dysf en tejido muscular	11
2.4.-Disferlina y el remodelamiento de actina	13
3.-HIPÓTESIS	15
3.1.-OBJETIVO GENERAL.....	15
3.2.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4.-METODOLOGÍA.....	16
4.1.- Evaluar en mioblastos RCMH controles y en las líneas celulares 107, 379, AB320, ER que poseen diferentes mutaciones en Dysf, la formación de filamentos de F-actina y la expresión de α -, β - y γ -actina.....	16
4.1.1.- Cultivos de líneas celulares	16
4.1.2.- Polimerización de novo de actina en líneas celulares	17
4.1.3.- Marcaje de la red de actina cortical.....	18
4.1.4.- Evaluar los niveles de expresión de α -, β - y γ -actina en líneas celulares.	18
4.1.5.- Lisis celular no denaturante para extracción de proteínas.	18
4.1.6.- Determinación de la concentración de proteínas.	19
4.1.7.- Análisis electroforético de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS.....	19
4.1.8.- Western Blot.....	19
4.2.- Evaluar la formación y organización de F-actina en cultivos primarios de mioblastos de ratones WT y deficientes de Dysf.	20
4.2.1.- Ratones silvestres y ratones deficientes de Dysf.	20
4.2.2.- Cultivos primarios de mioblastos de ratón	21
4.2.3.- Polimerización de actina de novo en cultivos primarios de mioblastos de ratones silvestres y deficientes de Dysf.....	21
4.2.4.- Polimerización de actina de novo en fibras musculares de ratones silvestres y deficientes de Dysf.	21
4.3.- Evaluar niveles de expresión de α -, β - y γ - actina y en extractos de músculos de ratones WT y deficientes de Dysf.	22
4.3.1.- Evaluación de las isoformas α -, β -, γ - actina en extractos de músculos de ratones WT y deficientes de Dysf.	22
5.-RESULTADOS	23
5.1.-Expresión y formación de F-actina en mioblastos RCMH y en las líneas celulares 107, 379, AB320 y ER.....	23
5.2-Niveles de expresión de las isoformas α -, β -, γ - actina en las líneas celulares RCMH 107, 379, AB320 y ER.	30

5.3.- Formación de F-actina en cultivos primarios de mioblastos de ratones silvestres y deficientes de Dysf.	32
5.4.- Niveles de expresión de , y actina en extractos de músculos de ratones WT y deficientes de Dysf.	36
6.-DISCUSIÓN.	38
6.1.-Expresión de Dysf en líneas celulares con mutación de Dysf.....	38
6.2.-Mioblastos de pacientes con disferlinopatía presentan alteraciones en la dinámica de F-actina.	39
6.3.-Mutaciones de Dysf causantes de disferlinopatías modifican los niveles de expresión de las isoformas de actina.....	40
6.4.-Papel de Dysf en la formación de actina y expresión de sus isoformas en células de músculo esquelético de ratón.	44
7.-BIBLIOGRAFÍA	46
8.-ANEXOS	53

1.-RESUMEN

Las disferlinopatías son un grupo de distrofias musculares causadas por mutaciones en el gen de disferlina que afectan la expresión y/o función de la proteína. Disferlina (Dysf) se expresa mayoritariamente en el músculo esquelético donde participa en el proceso de reparación del sarcolema.

Modelos animales de disferlinopatías muestran una expresión desregulada de proteínas implicadas en el remodelamiento de actina lo que sugiere que Dysf modula la dinámica del citoesqueleto de actina. Para abordar esta idea utilizamos mioblastos de líneas celulares derivadas de músculo esquelético de pacientes con mutaciones en Dysf (107, 379, AB320, ER) y como control la línea celular RCMH derivada de un individuo sano. Se utilizaron además cultivos primarios de mioblastos y fibras musculares maduras de un ratón deficiente de Dysf (ratón B6.A/J Dysf^{prmd}), modelo animal de disferlinopatías. Tanto en las líneas celulares como en los mioblastos obtenidos del ratón deficiente en Dysf se evaluó la capacidad de remodelamiento de F-actina y la expresión de las isoformas alfa, beta y gama de actina.

Según nuestros resultados las líneas celulares deficientes en Dysf presentan una menor capacidad de polimerización de F-actina comparado con los mioblastos RCMH y además exhiben un aumento significativo en la expresión de la isoforma alfa-actina. Por el contrario, cultivos primarios de mioblastos de ratón deficiente de Dysf mostraron un aumento significativo en la polimerización de F-actina comparado con mioblastos de ratón silvestre. Estos datos sugieren que algunas mutaciones de Dysf alteran el remodelamiento de la red de actina en células musculares.

2.-INTRODUCCIÓN

2.1.-Disferlinopatías

Las disferlinopatías son un grupo de distrofias musculares de tipo autosómico recesivo, causadas por mutaciones que afectan la expresión y/o funcionalidad de la proteína disferlina (Dysf). Estas enfermedades se caracterizan por debilidad muscular progresiva, aumentos séricos de la enzima creatina kinasa (CK), presencia de infiltraciones inflamatorias en biopsias de músculo y pérdida progresiva de masa muscular (1), lo que se asocia a una reducida capacidad de reparación del sarcolema ante microrupturas. Los síntomas comienzan a aparecer en la adolescencia, teniendo un avance progresivo lento. Al cabo de 20 años de edad, los pacientes pueden llegar a perder la capacidad de caminar (2-4).

Las disferlinopatías se clasifican en dos tipos dependiendo de los músculos afectados: distrofia muscular de cintura tipo 2B (LGMD 2B), la cual comienza afectando a la musculatura esquelética próxima a caderas y hombros (5) y miopatías distales, que afectan la musculatura de extremidades superiores e inferiores, siendo la miopatía de Miyoshi una de las más frecuentes (6). El diagnóstico clínico específico para disferlinopatías depende básicamente de los músculos afectados al momento del diagnóstico, aunque existe gran variabilidad respecto del inicio y agresividad con que se manifiestan. Se ha descrito incluso la aparición de diferentes fenotipos dentro de una misma familia y en presencia de una misma mutación (7,8). Cada una de estas distintas clasificaciones de disferlinopatías se relaciona a mutaciones específicas en el gen de Dysf. Por ejemplo, mutaciones en el exón 44, en el exón 32 y en los exones 8 y 9 (que generan versiones truncadas de la proteína (9), y mutaciones en el exón 16 y 55 (que producen la ausencia de Dysf en mioblastos) son causantes de distrofia muscular tipo LGMD 2B (9).

Hasta la fecha no existen tratamientos definitivos ni paliativos para disferlinopatías, a pesar de representar hasta un 30% de las distrofias musculares autosómicas recesivas en algunos países (10), por lo que es importante entender los procesos celulares en los que Dysf participa y cómo éstos se ven desregulados durante el desarrollo de la enfermedad. En Chile las disferlinopatías no fueron reconocidas clínicamente sino hasta el 2009 (11). Hoy en día se han descrito 31 pacientes

provenientes de 24 familias no relacionadas (12) que presentan mutaciones en Dysf, conformando hasta ahora el grupo más grande de pacientes con disferlinopatías en Latinoamérica (3).

2.2.-Disferlina

El gen de Dysf se localiza en el cromosoma 2p13 y está formado por 55 exones que codifican para una proteína de 237 KDa (5,13). Dysf es una proteína transmembrana con un extremo C-terminal corto que se orienta hacia el espacio extracelular. Dysf forma parte de una familia de proteínas llamada ferlinas, las cuales poseen varios sitios de unión a Ca^{2+} del tipo C2 (14,15). Dysf posee 7 dominios C2 (C2A a C2G) los cuales parecen estar involucrados en la capacidad de Dysf para formar dímeros (16). Dada su estructura, los dominios C2D, C2F y C2G pueden unir también fosfolípidos (17). Estudios in vitro mostraron que además mutaciones en el dominio C2A afectan la capacidad de unión de Dysf a fosfolípidos (17,18), lo que sugiere que estos dominios podrían estar involucrados en la capacidad de Dysf de anclarse a membranas. Abdullah y cols. (19) determinaron que el dominio C2A de Dysf actuaría como sensor de Ca^{2+} durante eventos de tráfico de membranas. Dysf presenta además tres dominios Fer (FerA, FerB y FerI) en homología a ferlina y dos dominios estructurales Dysf (Fig. 1) (20).

Dysf es una proteína de expresión ubicua, aunque se localiza mayoritariamente en músculo esquelético (21), cardiomiocitos (13) y monocitos (22,23). Su distribución sub-celular está enriquecida en la membrana superficial de células musculares (21) y asociada a vesículas citoplasmáticas (24). Se ha descrito que tiene un rol crítico en la reparación post-daño de la membrana del músculo, a través de un mecanismo que involucra la fusión de vesículas con el sarcolema (25). Además de la reparación del sarcolema, Dysf participa en otros procesos celulares, entre los que se incluyen el tráfico de vesículas, endocitosis, reciclaje de receptores de membrana y recambio de los componentes de membrana (26,27). Evidencia más reciente sugiere que Dysf participa en la organización de los túbulos transversales en las fibras musculares (28–30), formación de adhesiones focales en monocitos (31) y en la fusión célula-célula durante la regeneración muscular (28). De manera interesante, diversos estudios muestran que proteínas involucradas en la reparación del sarcolema como caveolina-3

(32), calpaina 3 (33), mitsugumin 53 (MG53) (34), AHNAK (35), y anexinas A1 y A2 (36) interactúan con Dysf, apoyando la idea que Dysf participa en la reparación muscular.

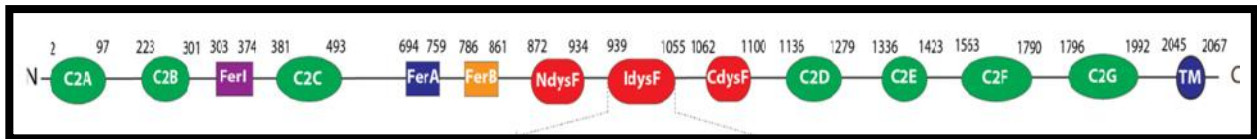


Figura 1: Dominios de Dysf. El esquema muestra los diferentes dominios de Dysf, entre ellos se destacan los dominios de unión a Ca^{2+} C2 A-G, los dominios de homología a ferlina Fer A, B, I y los dominios estructurales Dysf (20).

2.3.-Rol fisiológico de Dysf en tejido muscular

Bajo condiciones fisiológicas normales, la membrana plasmática de las fibras musculares está sometida a un constante estrés mecánico, lo que la hace susceptible de sufrir microrrupturas (37). Al generarse una ruptura de la membrana plasmática, el miocito comienza un proceso de reparación dependiente de la entrada de Ca^{2+} al espacio intracelular. En la reparación del daño, MG53 y Dysf localizadas en la cara interior del sarcolema, oligomerizan con otras unidades de estas mismas proteínas, las cuales están localizadas en vesículas cercanas a la membrana plasmática. Simultáneamente, pero de manera independiente, anexina 6 también se acumula en la lesión (38). Tanto Dysf como anexina 6 favorecen el reclutamiento al sitio del daño de anexina A1 y A2 y otras proteínas como AHNAK. La presencia de estas proteínas más las elevadas concentraciones de Ca^{2+} intracelular, facilitan la fusión de las vesículas con la membrana plasmática, generando un "parche" que impide el ingreso de otras moléculas desde el espacio extracelular y finalmente permite la reparación del sarcolema (39). Mutaciones en la proteína Dysf interrumpen la reparación de la membrana debido a que las vesículas de reparación no logran unirse entre sí, ni asociarse al sarcolema, desencadenando procesos de infiltración, inflamación y finalmente la degradación de la fibra muscular (3,28,40,41). También se ha descrito que mutaciones en Dysf desregulan el ensamblaje del complejo proteico de reparación, afectando la localización y distribución de anexina A1 y A2 hacia el sitio del daño muscular (36) (Fig. 2). En biopsias de músculos de pacientes con disferlinopatías se observa una reducida expresión de Dysf en el sarcolema junto con fibras inmaduras y células inflamatorias infiltradas (3,28,40,41). En tanto, en ratones deficientes de Dysf se ha observado pérdida de la integridad de la membrana plasmática y acumulación de vesículas bajo la cara interna del sarcolema (24,42).

En conjunto, estas evidencias indican que la unión de Dysf a distintas proteínas en la cara interna del sarcolema, es necesaria para la reparación del daño muscular y, mutaciones causantes de disferlinopatías, pueden afectar la asociación y ensamblaje de Dysf a estas proteínas del complejo de reparación, comprometiendo finalmente la integridad de las fibras musculares.

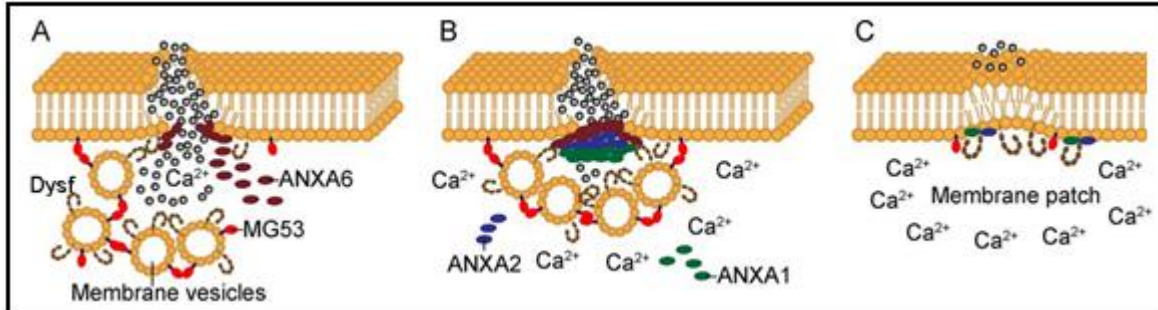


Figura 2: Esquema de la reparación ante daño muscular. En el panel A se muestra como ante un daño en la membrana del sarcolema parte de las moléculas del complejo reparador, entre ellas MG53, anexina A6 (ANXA6) y Dysf, comienza a interactuar. En el panel B se muestra el reclutamiento de las vesículas reparadoras del daño a la zona cercana a la membrana plasmática. En el panel C se observa la fusión de las vesículas con la membrana plasmática formando un parche que repara a la membrana plasmática. Este mecanismo requiere de elevadas concentraciones de Ca²⁺ intracelular (Adaptado de (43)).

2.4.-Disferlina y el remodelamiento de actina

Actina es una proteína que participa en una gran gama de funciones celulares tales como la división celular, la migración celular, la formación de uniones celulares, el remodelamiento de la cromatina, el tráfico de vesículas y la regulación de la forma celular entre otros (21,44,45). Existen 6 isoformas distintas de actina: alfa actina del músculo liso (α -SMA), gama actina del músculo liso (γ -SMA), alfa actina cardiaca (α -CAA), alfa actina esquelética (α -SKA), beta actina citoplasmática (β -CYA) y gama actina citoplasmática (γ -CYA), estas últimas dos de expresión ubicua (46,47). Todas estas isoformas de actina poseen un alto grado de identidad (47,48).

El citoesqueleto de actina es una estructura de vital importancia para la arquitectura y función celular. Está formado por F-actina, es decir filamentos compuestos por monómeros de G-actina, proteína globular que se une e hidroliza ATP durante la formación de polímeros de F-actina (49,50). El citoesqueleto de actina es constantemente remodelado durante los distintos procesos celulares en los que participa y existe un gran número de factores que modulan tanto la polimerización, como la despolimerización de F-actina. Se ha observado que ratones knock-out (KO) para la isoforma de actina alfa esquelética (α -SKA) nacen sin problemas, pero con el pasar de los días presentan debilidad de los músculos muriendo después de 9 días de nacidos (51). Sin embargo, debido al alto grado de similitud entre las diferentes isoformas de actina se ha reportado casos en donde la ausencia de α -SKA induce la sobreexpresión de la isoforma α -CAA generando la recuperación y eliminando el riesgo de muerte del ratón (52). Adicionalmente, Bergeron y cols. (53) demostraron que en la línea celular Sf21 de ovarios del gusano del maíz *Spodoptera frugiperda*, la velocidad de polimerización y despolimerización de actina varía de acuerdo a la proporción de α -SKA y α -CAA actina, lo que sugiere que la polimerización de la red de actina depende de las cantidades relativas de sus distintas isoformas.

En las fibras musculares, actina participa activamente en el proceso de contracción muscular al interactuar, de un modo dependiente de Ca^{2+} , con miosina en el sarcómero (54). Además del rol clave que cumple la actina sarcomérica en el aparato contráctil, una organizada y dinámica red de actina cortical modula el tráfico de vesículas hacia y desde el sarcolema, permitiendo el recambio de componentes de membrana, así como la regeneración y reparación del sarcolema post-daño. Se ha descrito que la formación de "zonas activas de actina" en regiones dañadas de la

membrana plasmática, son necesarias para que ocurran los procesos que llevan a la reparación de la ruptura membranal (55,56). Recientemente se demostró que el tráfico y arribo de vesículas de Dysf al sarcolema en fibras musculares de ratón sometidas a daño, es dependiente de la dinámica del citoesqueleto de actina (56). De manera interesante, se ha demostrado que Dysf interactúa con proteínas reguladoras de la polimerización de actina, tales como, alfa-actinina y anexina A2 (57), lo que sugiere que Dysf podría coordinar el remodelamiento del citoesqueleto de actina, favoreciendo el tráfico y la fusión de vesículas durante la reparación de membranas. De ser así, las mutaciones en Dysf causantes de disferlinopatías podrían afectar la capacidad de reparación del sarcolema, contribuyendo a la progresiva degeneración de las fibras musculares. En el año 2008 Nagaraju y colaboradores (23) demostraron que en ratones KO de Dysf, un modelo animal para el estudio de disferlinopatías, existía un aumento en la expresión de proteínas como la Rho-GTP-asa pequeña Cdc42, que es un importante activador de diversos factores nucleadores de actina (23), lo que sugiere fuertemente que Dysf podría estar involucrada en la dinámica de actina, durante procesos celulares asociados a la reparación de membrana. De ser así, es factible suponer que mutaciones en Dysf asociadas a disferlinopatías pueden desregular la dinámica de actina cortical, y en consecuencia el tráfico de vesículas y la formación del complejo proteico de reparación en células musculares. Con esto en mente nos preguntamos si efectivamente las ¿mutaciones causantes de disferlinopatías afectan el remodelamiento de la red de actina en estas células? Para abordar estas preguntas, utilizamos 4 líneas de mioblastos derivadas de biopsias de músculo esquelético de pacientes adultos con disferlinopatías de tipo LGMD 2B: la línea 107 con mutación en los exones 8 y 9, la línea celular 379 con mutación en los exones 16 y 55, la línea AB320 con mutación en el exón 32 y la línea ER que presenta una mutación en el exón 44 (9,40). Además, utilizamos la línea celular control RCMH (Raúl Caviedes Mioblastos Humanos) derivada de músculo esquelético de un individuo sano (58). En este estudio también utilizamos un modelo animal de disferlinopatías, el ratón B6.A/J Dysf^{prmd} el cual, presenta una inserción de un retrotransposón ETn (5-6kb) en el intrón 4 de disferlina (59) que da como resultado una deficiencia en la expresión de la proteína, el cual se comparó con ratones silvestres de la cepa C57BL/6J.

3.-HIPÓTESIS

La organización y remodelamiento de actina es un mecanismo afectado en modelos celulares y animales con disferlinopatías.

3.1.-OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de las mutaciones de Dysf en la organización y formación de F-actina y en la expresión relativa de las isoformas de actina en líneas celulares derivadas de pacientes con disferlinopatía y en un modelo animal deficiente de Dysf.

3.2.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Evaluar en mioblastos RCMH controles y en las líneas celulares 107, 379, AB320 y ER que poseen diferentes mutaciones en Dysf, la organización y formación de F-actina y la expresión de isoformas α -, β - y γ -actina.

2.- Evaluar la formación y organización de F-actina en cultivos primarios de mioblastos de ratones WT y deficientes de Dysf.

3.- Evaluar los niveles de expresión de α -, β - y γ -actina y analizar las cantidades relativas de F- y G-actina midiendo la razón F/G en extractos de músculo esquelético de ratones WT y deficientes de Dysf.

4.-METODOLOGÍA

4.1.- Evaluación en mioblastos RCMH controles y en las líneas celulares 107, 379, AB320 y ER que poseen diferentes mutaciones en *Dysf*, la organización y formación de filamentos de F-actina y la expresión de las isoformas α -, β - y γ -actina.

Para el cumplimiento del presente objetivo, se desarrollaron los siguientes procedimientos experimentales

4.1.1.- Cultivos de líneas celulares

Para este estudio se utilizaron 4 líneas celulares provenientes de biopsias de pacientes, con diferentes mutaciones en *Dysf* (107, 379, AB320 y ER), además de mioblastos de la línea control RCMH.

La línea celular 107 proviene del músculo vasto lateral de un paciente de sexo masculino de 46 años de edad, presenta la mutación c.855+1delG en el exón 8 y la mutación c.895G>A p.G299R en el exón 9. Estas mutaciones generan un cambio de sentido provocando una reducción severa en la expresión de *Dysf* (9). La línea celular 379 proviene del músculo vasto lateral de un paciente de sexo femenino de 43 años de edad, presenta la mutación c.1448C>A p.S483X en el exón 16 y la mutación c.*107T>A, 3'UTR en el exón 55. Estas mutaciones generan una mutación sin sentido y un codón de termino provocando ausencia de la proteína *Dysf* (9). La línea celular AB320 proviene del músculo cuádriceps de un paciente de sexo femenino de 29 años de edad, presenta la mutación c.342-1G>A en el intron 4 y la mutación 32:c.3516-3517 delTT p.Ser1173X en el exón. Estas mutaciones generan un marco de lectura corrido provocando una reducción severa en la expresión de *Dysf* (60). La línea celular ER proviene del músculo cuádriceps de un paciente de sexo masculino de 17 años de edad, presenta la mutación c.4882G>A p.G1628R en el exón 44. Esta mutación genera un cambio de sentido provocando una expresión variable de *Dysf* (40). La línea celular control RCMH proviene del músculo cuádriceps de un individuo sano (58).

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en botellas de cultivo utilizando medio de cultivo compuesto por 320 ml de DMEM (Gibco BRL), 80 ml de medio 199

(Sigma Aldrich), 100 ml de suero bovino fetal (Gibco BRL), suplementado con 25 µg/ml fetuina (Life technologies), 0,5 ng/ml bFGF (Factor de crecimiento de fibroblastos) (Life technologies), 5 ng/ml EGF (Factor de crecimiento epidérmico) (Life technologies), 5 µg/ml insulina (Sigma), 0,2 µg/ml dexametasona (Choongwae Pharma Corp.), 100 U/ml de penicilina (Opko) y 100 µg/ml de gentamicina (Gibco BRL), ajustado a un pH 7.4. Los cultivos fueron mantenidos en incubador a una temperatura de 37°C, 95% humedad y con atmósfera de 5% de CO₂.

4.1.2.- Polimerización de novo de actina en líneas celulares

Se evaluó la formación de nuevos filamentos de actina en células permeabilizadas en presencia de monómeros de actina marcados con una sonda fluorescente (G-actina-Alexa fluor 488), para esto se utilizó el ensayo descrito por González-Jamett y colaboradores (61).

Todas las células fueron cultivadas en cubreobjetos de 12 mm tratados con poli-L-lysina (Sigma Aldrich Co.). Al menos 48 horas post-cultivo las células fueron permeabilizadas con 20µM digitonina (Sigma Aldrich Co.) en buffer KGEP (K-glutamato 139mM; PIPES 20mM, EGTA 5 mM; ATP-Mg⁺² 2mM a pH 6.6 y 10 µM de Ca²⁺ libre) en presencia de 0.3 µM G-actina unida a la sonda Alexa fluor 488 (Life technologies) durante 6 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% por 15 min a 4°C. Posteriormente se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) (mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 10 Na₂HPO₄, 1.8 KH₂PO₄, pH 7.4) 2 veces por 5 min y se marcó el núcleo con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Finalmente se montaron en portaobjetos con 6 µl de medio de montaje fluorescente DAKO (DAKO) y mediante microscopía confocal utilizando un microscopio Eclipse Nikon80i (el que posee 3 láser de excitación, 408 nm, 488 nm y 543 nm) se visualizaron los filamentos de actina recientemente formados.

Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ midiendo la intensidad de fluorescencia total de F-actina normalizada respecto al área de la célula. Para el análisis estadístico se utilizó un test ANOVA de una vía comparando cada línea celular con mutación o ausencia de Dysf con la célula RCMH control. Se consideró diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de p<0.05.

4.1.3.- Marcaje de la red de actina cortical.

Se evaluó el patrón de organización de la red de actina en las distintas líneas celulares, las células fueron sembradas en cubreobjetos de 12 mm y mantenidas en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% humedad a 37 °C. Posteriormente las células fueron fijadas con PFA al 4% por 15 min a 4°C. Las células se lavaron con PBS, luego fueron permeabilizadas por 10 minutos con PBS 0.2% TritónX-100; se incubaron durante 1 hora con 1 µM de la toxina de unión a F-actina faloidina (Sigma Aldrich) unida a la sonda fluorescente rodamina-B. Posteriormente se tiñó el núcleo con DAPI por 8 min. Finalmente se montaron en portaobjetos con 6 µl de medio de montaje fluorescente DAKO (GIBCO) y mediante microscopia confocal, se visualizó el patrón de la red de actina cortical. Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ midiendo la intensidad de fluorescencia total de F-actina normalizada respecto al área de la célula. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía comparando cada línea celular con mutación de Dysf respecto al control RCMH (p<0.05).

4.1.4.- Evaluación de los niveles de -, - y -actina en líneas celulares.

Para el cumplimiento del presente objetivo, se desarrollaron los siguientes procedimientos experimentales

4.1.5.- Lisis celular no denaturante para extracción de proteínas.

Las células fueron lisadas mediante el método descrito en Current Protocol in Cell Biology (62) pero modificado en nuestro laboratorio. En breve, las células fueron despegadas de la placa con el medio de cultivo y depositadas en tubos de centrifuga, completando volumen hasta 15 ml con PBS frío (NaCl 137mM; KCl 2,28mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,76 mM). Posteriormente se centrifugó a 2500 g por 4 min. El sobrenadante se eliminó y se agregaron 5 ml de PBS frío, para lavar las células, se centrifugó nuevamente a 2500 g por 4 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 150 µl de tampón de lisis no denaturante (Tris-Hcl 50 mM; NaCl 300 mM; EDTA 5 mM; Tritón X-100 1%; cóctel inhibidor de

proteasas 0,1% a pH 7,4) por 10 min en hielo, posteriormente se sometieron a dos pulsos de sonicación de 10 seg. cada uno.

4.1.6.- Determinación de la concentración de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas obtenida de la lisis celular se realizó utilizando el Kit Quant-it protein assay de acuerdo a su manual de instrucciones.

4.1.7.- Análisis electroforético de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS.

A los extractos lisados se agregó 30 µl de tampón de carga (Tris-base; DTT 0,5 M; SDS 10%; glicerol 50%; azul de bromofenol 0,05%), se calentaron a 95°C, en placa térmica, por 5 min. y posteriormente, las muestras fueron sometidas a electroforesis en condición denaturante.

Las proteínas fueron separadas en un gel de poli-acrilamida al 10%. Para preparar el gel separador se disolvieron 3,3 ml de acrilamida:bis-acrilamida al 30% en 4 ml de agua milli Q, en amortiguador Tris-HCl (1.5M pH 8,8), SDS 10% y se polimerizó adicionando persulfato de amonio 10% y TEMED como agentes catalizadores redox. El gel concentrador se preparó al 5 % y contenía poliacrilamida al 30%, 2,1 ml de agua milli Q, en amortiguador Tris-HCl (1,0 M pH 6,8), con SDS 10% y se polimerizó en las mismas condiciones anteriores.

4.1.8.- Western Blot.

Una vez que las proteínas fueron separadas por tamaño molecular en el gel de poliacrilamida al 10%, se transfirieron a una membrana de PVDF, por transferencia húmeda, toda la noche a 4°C con un voltaje constante de 35 V. Posteriormente la membrana fue incubada por 1 hora a temperatura ambiente en agitación en solución de bloqueo, 5% de leche descremada disuelta en TBS (NaCl 150mM; KCl 2,8 mM; Tris-Base 25 mM). Luego las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS por 5 min. en agitación e incubadas con anticuerpos primarios específicos para Dysf (NCL-Hamlet

Synthetic peptide exon 53), las isoformas de actina alfa (Anti Alpha skeletal muscle actin antibody ab28052), beta (Anti Beta skeletal muscle actin antibody ab8226) o gama (Anti Gama skeletal muscle actin antibody sc-65635), o para tubulina (Anti tubulina CKATN02 cytoskeleton) como control de carga. Los anticuerpos fueron diluidos en solución de bloqueo a una concentración de 1:500, y utilizados durante toda la noche a 4°C en con agitación. Al día siguiente las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS por 5 min en agitación y luego incubadas con anticuerpo secundario anti mouse conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) para las isoformas de actina y anticuerpo secundario anti sheep para tubulina todos a una concentración de 1:2500 diluido en solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Por último, las membranas fueron reveladas con el kit de quimioluminiscencia (ECL prime western blotting detection reagent, Amersham). Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ midiendo la intensidad de fluorescencia total de la banda de cada isoforma de actina normalizada respecto a su control de carga. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía comparando cada línea celular con mutación de Dysf respecto al control RCMH ($p < 0.05$).

4.2.- Evaluación de la formación y organización de F-actina en cultivos primarios de mioblastos de ratones WT y deficientes de Dysf.

Para el cumplimiento del presente objetivo, se desarrollaron los siguientes procedimientos experimentales.

4.2.1.- Ratones silvestres y ratones deficientes de Dysf.

Se ocuparon ratones silvestres de la cepa C57BL/6J como control y de la cepa B6.A7J Dysfprmd (deficientes de proteína Disferlina) donado por la Fundación Jain. Estos ratones se mantienen en el bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, agua y comida ad libitum. Los protocolos de mantención fueron aprobados por el comité de bioética y bioseguridad de la Universidad de Valparaíso.

4.2.2.- Cultivos primarios de mioblastos de ratón

Se utilizaron ratones machos de 2 meses tanto de la cepa silvestre como de la cepa deficiente de Dysf. Antes de extraer los músculos se preparó la colagenasa tipo B (Worthington) en DMEM-F12 (Gibco), se filtró y se mantuvo a 37°C. De los ratones se extrajeron los músculos tibiales, lo que se dejaron en colagenasa por 3 horas a 37°C. Pasado el tiempo se disgregó el tejido al máximo utilizando una pipeta Pasteur. Posteriormente se centrifugó el tejido disgregado a 2000 rpm por 1 min., se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 3 ml de medio F-10 con 10% SBF. La suspensión de células se sembró en una placa de cultivo de 60 mm, y se mantuvo con el mismo medio en el incubador por 2 a 3 días. Transcurrido este tiempo se cambió el medio de cultivo por DMEM F-12 completo suplementado con 10% SFB.

4.2.3.- Polimerización de actina de novo en cultivos primarios de mioblastos de ratones silvestres y deficientes de Dysf.

Los ensayos de polimerización de novo de actina se realizaron utilizando el mismo protocolo descrito para las líneas celulares (ver sección 4.1.2). Además, los cultivos primarios fueron marcados con anticuerpos específicos contra desmina (Anti desmin [Y66] ab32362) como marcador de células musculares, utilizando un anticuerpo secundario unido a CY3 (Jackson Immuno Research).

4.2.4.- Polimerización de actina de novo en fibras musculares de ratones silvestres y deficientes de Dysf.

Los ensayos de polimerización de novo de actina se realizaron en fibras maduras aisladas del músculo Flexor Digitorum Brevis (FDB) de ratones de 2, 4 y 6 meses silvestres y deficientes de Dysf. Las fibras fueron estimuladas con insulina 1X durante 10 min a 37°C para promover el remodelamiento de actina. Posteriormente, el ensayo de polimerización de novo de actina se desarrolló utilizando el mismo protocolo descrito en la sección 4.1.2.

4.3.- Evaluación de los niveles de α -, β - y γ -actina en extractos de músculos de ratones WT y deficientes de Dysf.

Para el cumplimiento del presente objetivo, se desarrollaron los siguientes procedimientos experimentales

4.3.1.- Evaluación de la expresión de las isoformas α , β y γ actina en extractos de músculos de ratones WT y deficientes de Dysf.

Para estos ensayos utilizamos músculo gastrocnemio de ratones silvestres y deficientes de Dysf de 2, 4 y 6 meses, los cuales una vez extraídos fueron congelados a -80°C y posteriormente triturados con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana. Se utilizó buffer de lisis RIPA (25mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS). Para evaluar los niveles de las isoformas α , β y γ actina se utilizó el protocolo descrito anteriormente en las secciones 4.1.6; 4.1.7 y 4.1.8.

5.-RESULTADOS

5.1.-Niveles y formación de F-actina en mioblastos RCMH y en las líneas celulares 107, 379, AB320 y ER.

En primer lugar, evaluamos los niveles de Dysf en las líneas celulares 107, 379, AB320 y, ER obtenidas de pacientes con disferlinopatías, así como en células RCMH obtenidas de músculo esquelético de un paciente sano. Por lo tanto, se realizaron ensayos de WB utilizando un anticuerpo específico que reconoce la región C-terminal de Dysf. Como se observa en la Figura 3, las líneas celulares 107, 379, AB320 y ER presentan niveles de Dysf significativamente menores en comparación con los niveles de la proteína en las células RCMH controles. Así el análisis estadístico (ANOVA DE UNA VÍA) reveló una disminución significativa en los niveles de Dysf ($F_{(4,14)} = 11,10$; $P = 0,0011$, ANOVA de una vía) para las cuatro líneas de células provenientes de pacientes con disferlinopatías. El análisis post-hoc (test de múltiples comparaciones de Dunnett) también reveló una disminución significativa en los niveles de Dysf en las líneas con mutaciones en Dysf comparadas con las células controles RCMH ($p < 0,05$). Estos datos indican que distintas mutaciones en el gen de Dysf afectan los niveles en líneas celulares de mioblastos provenientes de músculo esquelético humano.

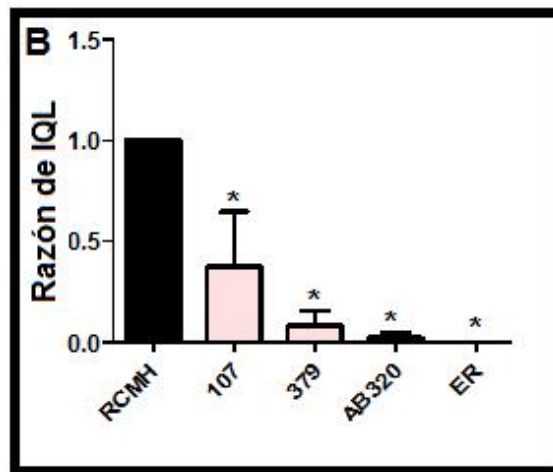
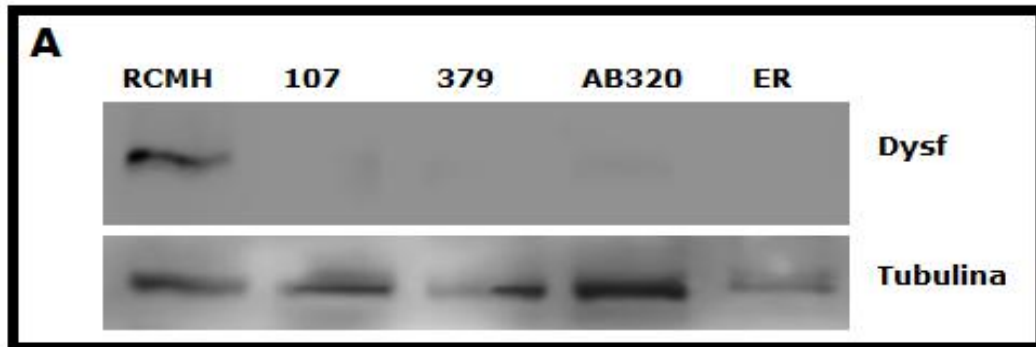


Figura 3: Niveles de Dysf en líneas celulares. En el panel A se muestra un Western blot representativo de proteínas extraídas de las líneas celulares con mutaciones de Dysf, utilizando un anticuerpo específico anti-Dysf. Como control de carga se utilizó un anticuerpo contra tubulina. En el panel B, las barras muestran la razón de quimioluminiscencia (IQL) de la intensidad de las bandas de western blot de las cinco líneas celulares, con respecto a tubulina. (*: $p < 0,05$; ANOVA de una vía; $n=3$). Los datos se expresan como promedio \pm SEM.

También evaluamos si la organización del citoesqueleto de actina se altera en las líneas celulares de pacientes con disferlinopatías. Para ello, se marcaron los filamentos de actina pre-existentes con faloidina-rodamina B y analizamos mediante microscopia confocal la organización de la red de actina. Se analizaron un total de 3 subcultivos para cada línea celular de mioblastos. En la Figura 4 se observan ejemplos de la organización de actina en cada una de las líneas celulares. Para cuantificar la F-actina medimos la intensidad de fluorescencia de las líneas celulares de mioblastos con mutación de Dysf, así como los mioblastos control RCMH. En todos los casos se evidenció una menor intensidad de fluorescencia de faloidina en las líneas con mutación de Dysf, sugerente de una disminución de la cantidad de F-actina total. El test ANOVA reveló una reducción significativa de la fluorescencia total de la F-actina en todas las líneas celulares con mutación en Dysf ($F_{(5,90)} = 12.25$; $P=0.0001$). El análisis de comparaciones múltiples también reveló una menor fluorescencia en las líneas con mutaciones de Dysf comparadas con el control RCMH ($P < 0.05$) (Fig.4). Además, al hacer un análisis cualitativo de las imágenes se observó que las líneas celulares con mutaciones en Dysf y el control RCMH presentaban dos tipos de patrón de distribución de los filamentos de actina: uno n con filamentos en todo el plano focal observado y otro con una marca más intensa de F-actina en la zona cortical del plano focal observado. En la tabla 1 se muestran los datos como porcentaje de células que presentan uno u otro patrón con respecto al total de células analizadas. Nótese que, salvo en la línea celular 379, el patrón de organización de F-actina se modifica en las líneas celulares con mutaciones en Dysf observándose una tendencia a disminuir la marca de actina cortical en comparación a lo observado en los controles RCMH (Tabla 1).

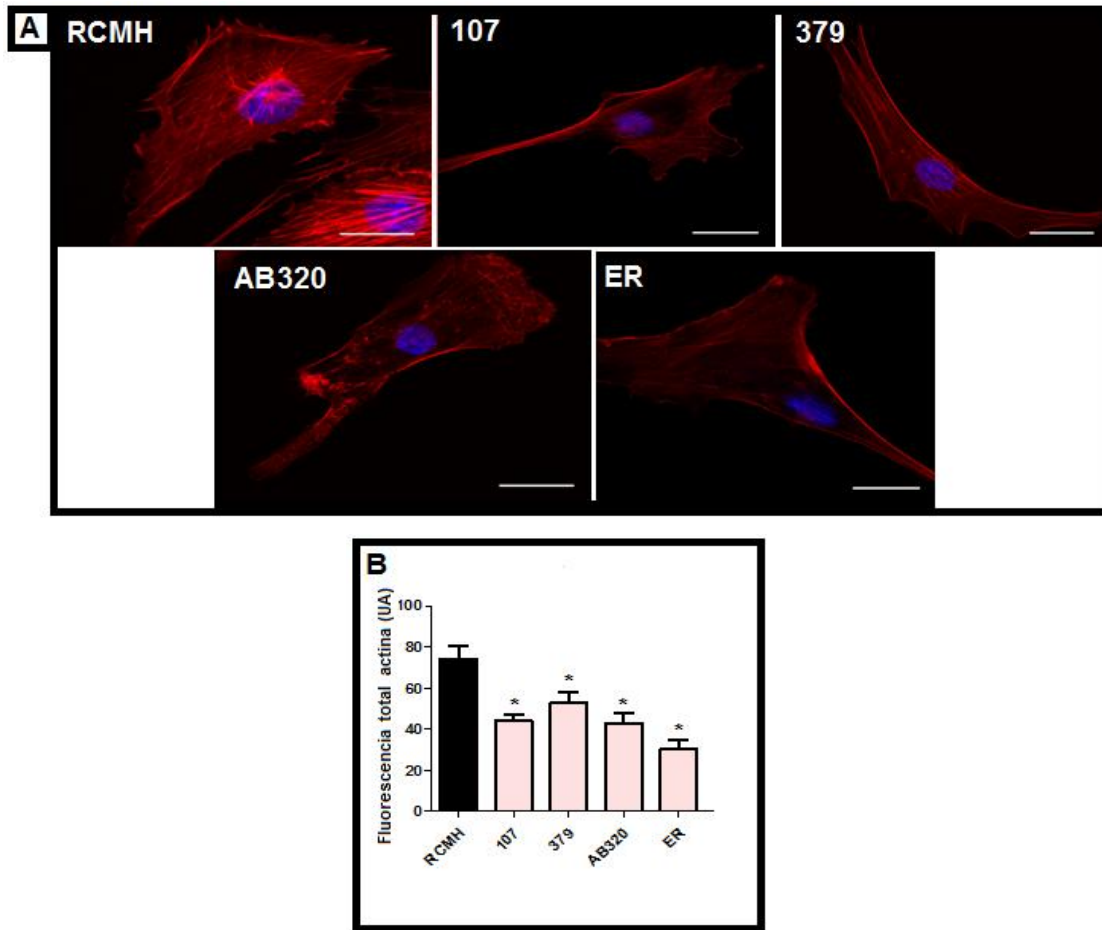


Figura 4: Menor niveles de F-actina en líneas celulares con mutaciones en Dysf. En el panel A se muestran imágenes representativas de microscopía confocal, donde se observan los filamentos de la red de F-actina pre-existente teñidos con 1 μ M de faloidina-rodamina B (rojo) y los núcleos teñidos con DAPI (azul) en las líneas celulares RCMH y en las líneas celulares 107, 379, AB320 y ER (barra de escala 20 μ m). En el panel B se muestra la cuantificación de la fluorescencia total de F-actina para cada línea celular. Para las líneas celulares RCMH se analizaron un total de 39 células, para la línea 107 un total de 21 células, para la línea 379 un total de 30 células, para la línea AB320 un total de 22 células, para la línea ER un total de 19 células. Todas estas células correspondían a 3 subcultivos. Para las líneas 107, 379, AB320 y ER se observa un menor niveles reactividad de faloidina en el plano focal analizado (ecuador celular) en comparación con la línea celular RCMH control. Los datos se expresan como promedio \pm SEM. (* $p < 0,05$ ANOVA de una vía).

	Total Celulas	Con fibras	Cortical
RCMH	39	48.7%	51.3%
107	21	66.6%	33.3 %
379	30	50%	50%
AB320	22	77.3%	22.7%
ER	19	78.9%	21.1%

Tabla 1: Porcentaje de células que presentan fibras de actina y/o actina cortical. Un análisis cualitativo de los patrones de distribución de las fibras de actina sugiere una disminución en la señal de actina cortical en las líneas 107, AB320 y Er respecto al control RCMH.

Para evaluar si las mutaciones de Dysf afectan la polimerización de F-actina, nos propusimos analizar la formación de nuevos filamentos de F-actina a través del ensayo de formación de novo de F-actina. Se analizaron un total de 6 subcultivos para los mioblastos RCMH controles y un total de 4 subcultivos para los mioblastos de las líneas celulares 107, 379, AB379 y ER. El análisis de la fluorescencia total de actina indicó que tanto las líneas 107, 379, AB379 y ER presentaron una formación de filamentos de F-actina significativamente menor a la obtenida en la línea RCMH control ($F_{(5,199)} = 7.195$; $P = 0.0001$; ANOVA de una vía; $P < 0,05$; análisis de comparaciones múltiples de Dunnett) (Fig. 5).

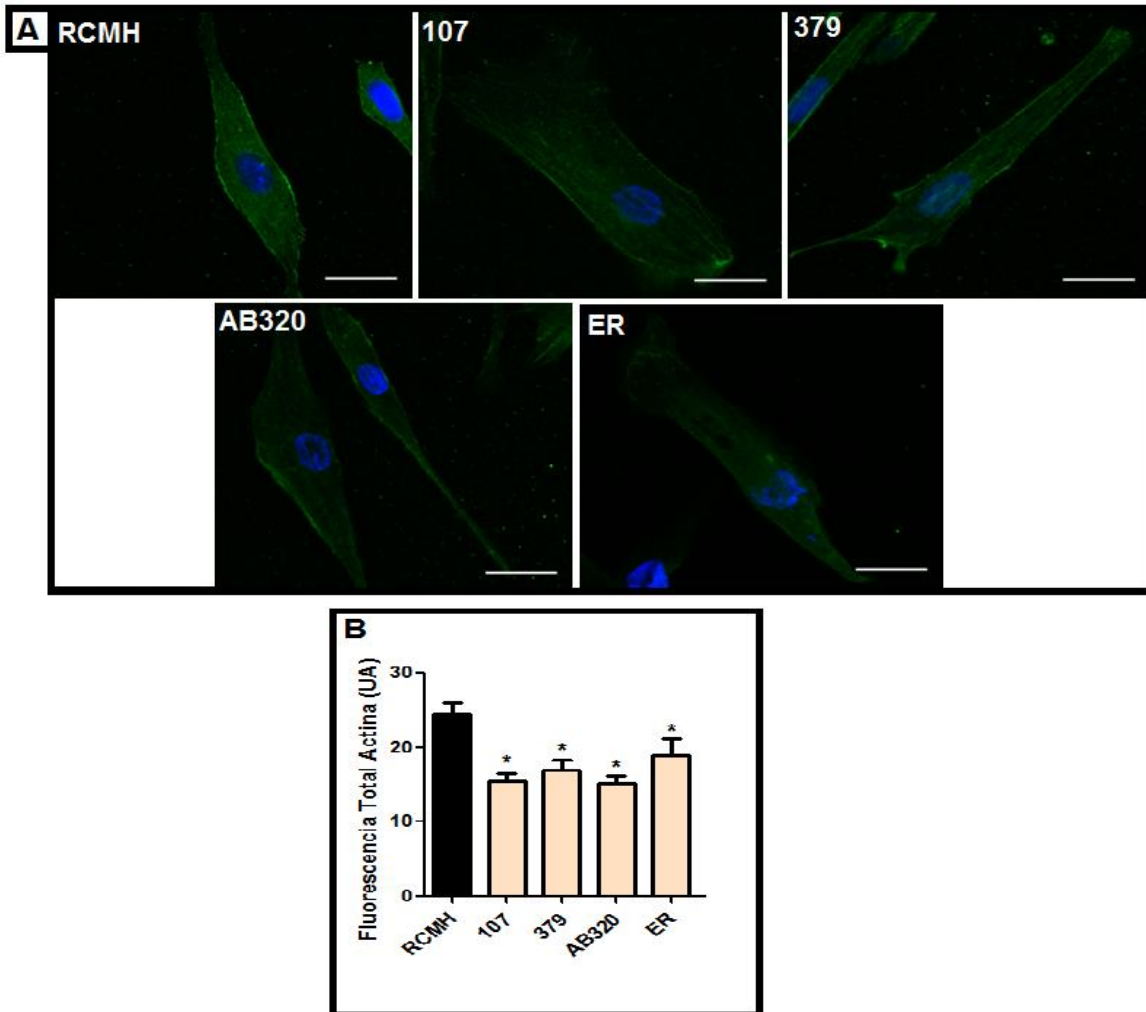


Figura 5: Menor formación de filamentos de F-actina en líneas celulares con mutación de Dysf. En el panel A se muestran imágenes representativas de microscopía confocal, en células RCMH control, 107, 379, AB320 y ER donde se observan los filamentos de F-actina (verde) formados a partir de G-actina-Alexa fluor 488. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) (barra de escala 20 μm). En el panel B se muestra la cuantificación de la fluorescencia total de F-actina para cada línea celular. Para la línea celular RCMH control se analizaron un total de 51 células (6 subcultivos), para la línea 107 un total de 32 células (4 subcultivos), para la línea 379 un total de 31 células (4 subcultivos), para la línea AB320 un total de 33 células (4 subcultivos), para la línea ER un total de 24 células (4 subcultivos) (3 subcultivos). (* $p < 0,05$; ANOVA de una vía). Los datos son presentados como promedio \pm SEM.

5.2.-Niveles de expresión de las isoformas α , β y γ - actina en las líneas celulares RCMH 107, 379, AB320 y ER.

Para evaluar los niveles de las isoformas de actina realizamos ensayos de western blot para las 5 líneas celulares de mioblastos, utilizando anticuerpos específicos para marcar las isoformas α , β , γ - actina y como control de carga se utilizó marcaje para tubulina.

En la Figura 6 se observa que las líneas 107, 379 y AB320 presentan un aumento significativo en los niveles de la isoforma α -actina comparado con la línea RCMH control ($F_{(4,29)} = 5.376$; $P = 0.0029$), pero no sobre beta ($F_{(4,14)} = 0.299$; $P = 0.871$) y gamma actina ($F_{(4,14)} = 0.151$; $P = 0.958$). Por otra parte, la línea de mioblastos ER no presenta diferencia en los niveles de ninguna de las isoformas de actina comparado con RCMH (análisis de comparaciones múltiples de Dunnett). Para las isoformas beta y gama actina no hay diferencia significativa en sus niveles al compararlas con la línea de mioblastos control RCMH ($p > 0,05$; análisis de comparaciones múltiples de Dunnett) (Fig. 6).

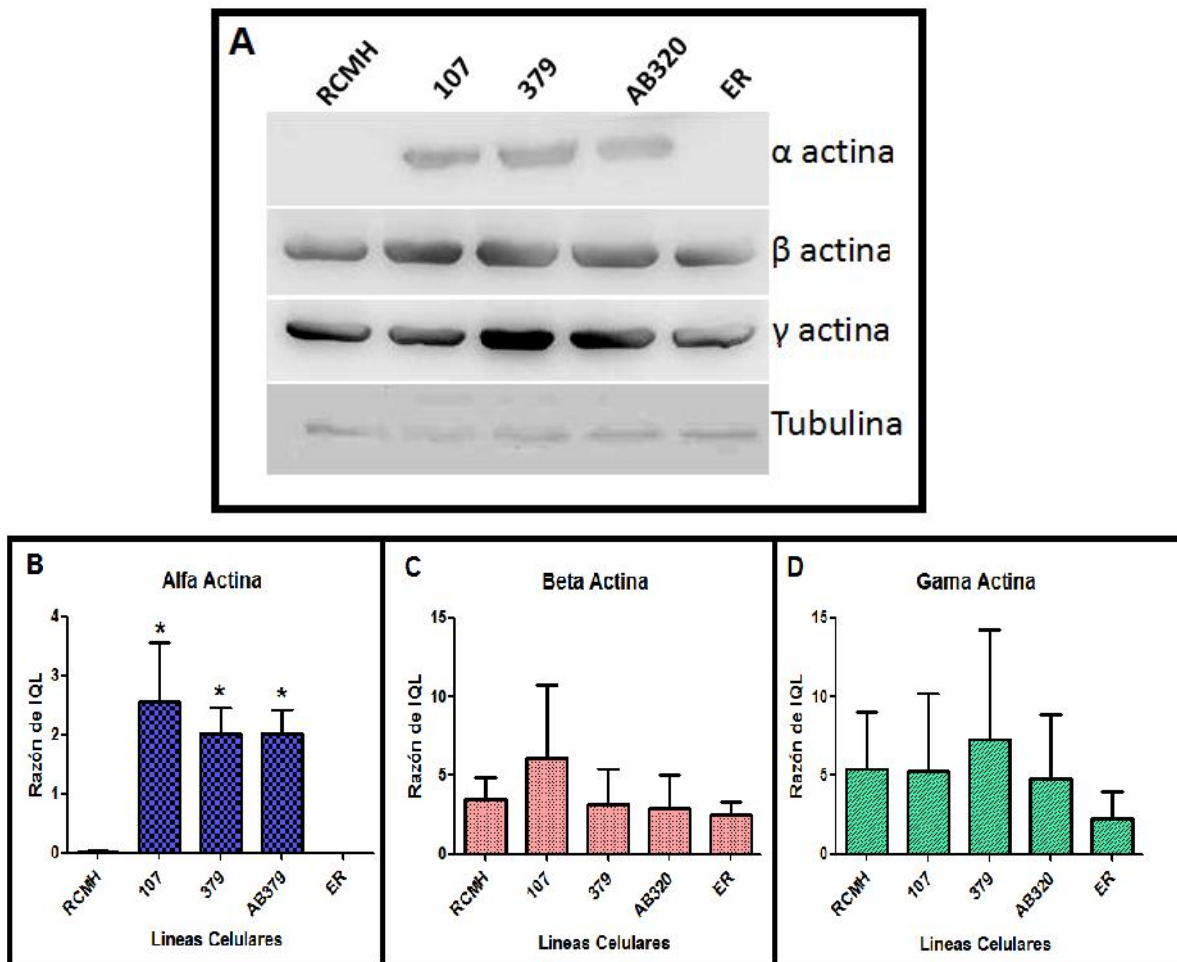


Figura 6: Niveles de las diferentes isoformas de actina en líneas celulares con mutación de Dysf. En el panel A se muestra un Western blots representativos utilizando anticuerpos específicos para las isoformas α , β y γ de actina y tubulina (control de carga). Los paneles B, C y D muestran la razón de quimioluminiscencia (IQL) para α , β y γ actina, respectivamente, con respecto a los niveles de tubulina. Los datos son presentados como promedio \pm SEM. (*: $P < 0,05$; ANOVA de una vía; $n=3$).

5.3.- Formación de F-actina en cultivos primarios de mioblastos de ratones silvestres y deficientes de Dysf.

Para analizar si los resultados obtenidos en los modelos celulares de disferlinopatías eran extrapolables a modelos animales de la enfermedad, evaluamos la formación de novo de F-actina en células musculares de ratones silvestres y deficientes de Dysf. Para esto se utilizaron cultivos primarios de músculo tibial de ratones silvestres y ratones deficientes de Dysf menores de 2 meses, de los cuales se aislaron mioblastos no diferenciados. Esto nos permitió observar los efectos de la deficiencia de Dysf en etapas anteriores a la diferenciación a músculo.

Para reconocer específicamente mioblastos del cultivo primario evaluamos, mediante inmunofluorescencia, la presencia de desmina que es una proteína que se expresa específicamente en células musculares. La Figura 7 muestra filamentos de F-actina formados a partir de G-actina-Alexa fluor 488 en mioblastos de ratones silvestres y de ratones deficientes en Dysf. Al cuantificar la formación de F-actina en tres cultivos primarios, observamos que los mioblastos provenientes de los ratones deficientes de Dysf presentan un aumento significativo en su capacidad de polimerización de actina comparado con los mioblastos primarios provenientes de ratones silvestres (ESTADISTICO: T-student).

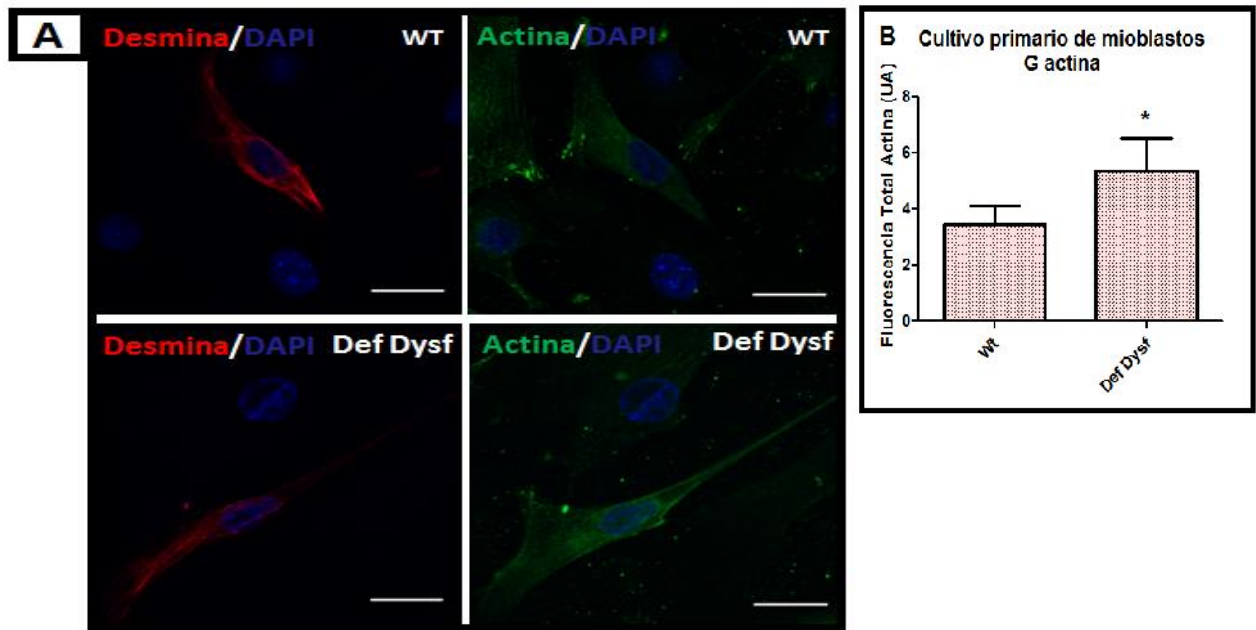


Figura 7: Mioblastos de ratones deficientes de *Dysf* presentan mayor capacidad de formación de filamentos nuevos de F-actina comparados con mioblastos de ratones silvestres. En el panel A se observan imágenes representativas de microscopía confocal, de cultivos primarios de mioblastos de ratones silvestre y deficientes de *Dysf* marcados con un anticuerpo anti-desmina (rojo) y los filamentos de F-actina (verde) formados a partir de G-actina-Alexa fluor 488. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) (barra de escala 20 μm). En el panel B se muestra la cuantificación de la fluorescencia total de F-actina. Los mioblastos de ratones deficientes de *Dysf* presentaron un aumento significativo en la formación de F-actina al compararlo con los cultivos de mioblastos de ratones silvestres (t-student test; $p > 0,05$; $n = 3$). Los datos son presentados como promedio \pm SEM.

Para evaluar si la mayor formación de F-actina en mioblastos de animales deficientes de Dysf se mantiene en el músculo maduro, cuantificamos la formación de F-actina en fibras provenientes del músculo FDB de ratones de 2, 4 y 6 meses. Para esto se analizaron un total de 3 ratones de 2 meses tanto silvestres como deficientes de Dysf, 4 ratones silvestres y deficientes de Dysf de 4 meses y 3 ratones silvestres y deficientes de Dysf de 6 meses. Para la cuantificación de la formación de F-actina extrajimos fibras musculares a las edades indicadas. En las microfotografías de la Figura 8 no se observan diferencias significativas en la formación de actina entre las fibras de ratones deficientes de Dysf comparados con los ratones silvestres a ninguna de las edades estudiadas. ($F_{(5,105)} = 5.097$; $P = 0.0003$). (Fig. 8).

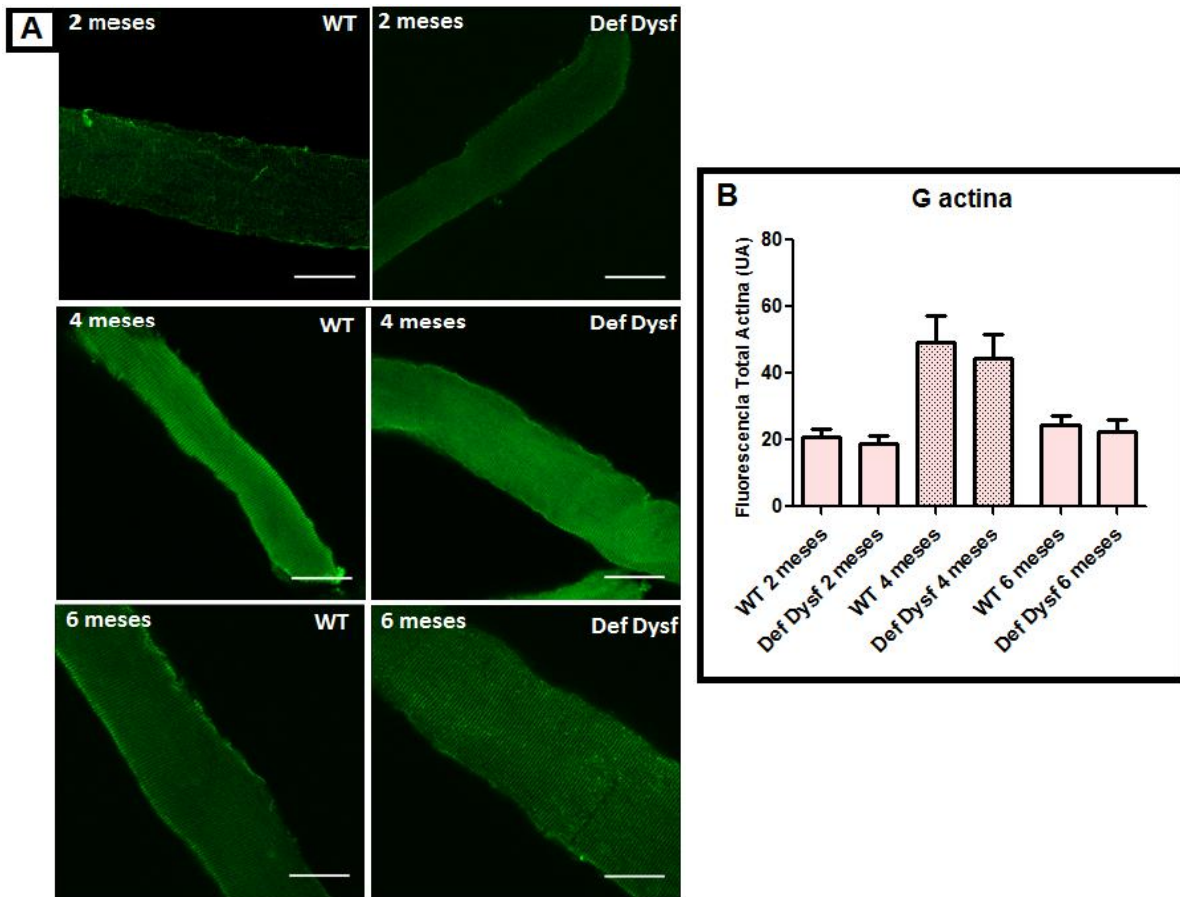


Figura 8: Formación de filamentos de F-actina en fibras de ratones de 2, 4 y 6 meses deficientes de Dysf y silvestres. En el panel A se observan imágenes representativas de microscopia confocal, donde se muestran la formación de los filamentos de F-actina (verde) a partir de G-actina-Alexa fluor 488 en fibras de ratones de 2, 4 y 6 meses silvestre y deficientes de Dysf (barra de escala 20 μ m). En el panel B se muestra la cuantificación de la fluorescencia total de F-actina. Las fibras de ratones deficientes de Dysf no presentaron diferencias significativas en la tasa de formación de F-actina al compararlo con las fibras de ratones silvestres de 2, 4 y 6 meses (ANOVA de una vía; $p > 0,05$; $n=3$ y $n=4$).

5.4.- Niveles de α , β y γ actina en extractos de músculos de ratones WT y deficientes de Dysf.

Finalmente, intentamos evaluar si la deficiencia de Dysf afecta los niveles relativos de las distintas isoformas de actina en músculo esquelético del modelo animal de disferlinopatía. Para ello se realizaron ensayos de western blot utilizando extractos de músculo gastrocnemio de ratones silvestres y deficientes de Dysf de 2, 4 y 6 meses. Se utilizaron anticuerpos específicos para identificar las isoformas α -, β -, y γ -actina. Como control de carga se utilizó tubulina. Este experimento se realizó 3 veces, sin embargo, solo se logró observar los niveles de α -actina, pero no de las isoformas β - y γ , en sólo uno de los ensayos, por lo que no se pudo obtener resultados concluyentes (Fig. 9).

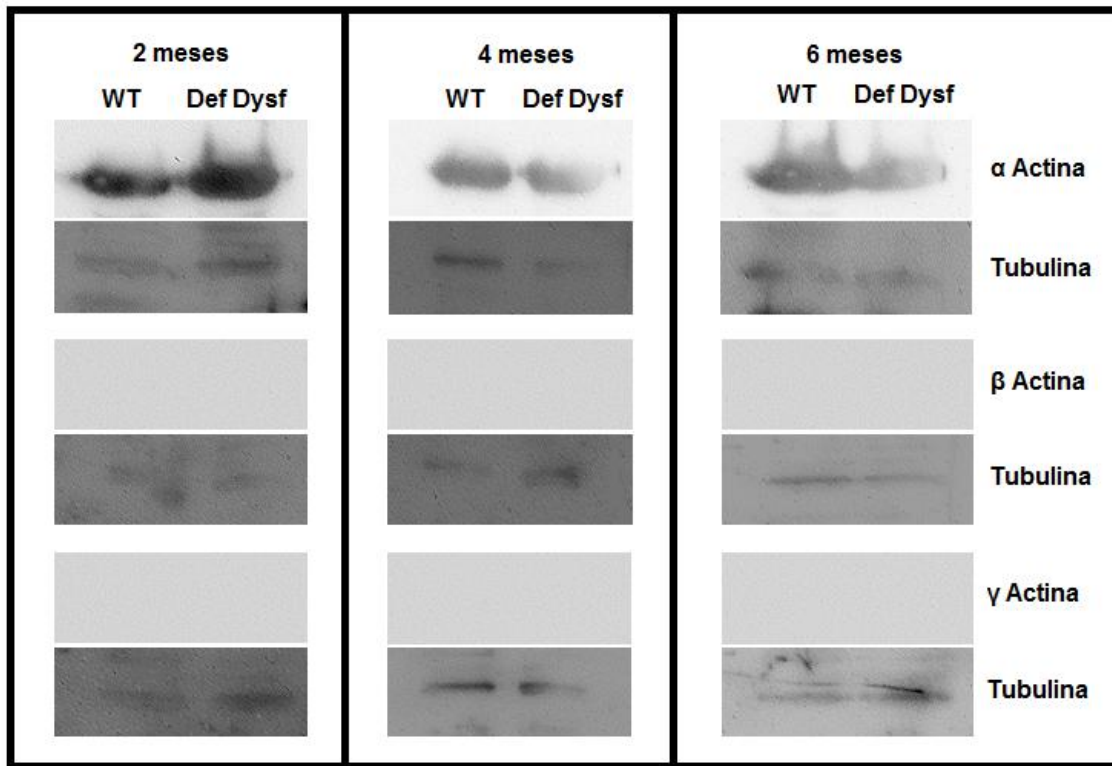


Figura 9: Niveles de las isoformas de actina α , β y γ en extractos de músculo de ratón silvestre y ratón deficiente de Dysf. Western blots representativos utilizando anticuerpos específicos contra las isoformas α -, β - y γ -actina y para tubulina (control de carga) en extractos de músculo gastrocnemio de ratones de 2, 4 y 6 meses silvestres y deficientes de Dysf. No se logró observar los niveles de β y γ actina, probablemente debido a los bajos niveles de estas isoformas en el músculo adulto.

6.-DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se estudió el impacto de mutaciones en *Dysf* causantes de disferlinopatía, o la ausencia de esta proteína, en la dinámica de actina en células de músculo esquelético humano y de ratón. Nuestros resultados sugieren que las líneas celulares, derivadas de pacientes con disferlinopatías, presentan una menor cantidad de filamentos de actina y una disminuida capacidad de formación de nuevos filamentos, al ser comparadas con una línea celular proveniente de un individuo sano. Además, tres de las líneas modelo de disferlinopatías, evidenciaron una robusta expresión de la isoforma β -actina, a diferencia de la nula expresión de esta isoforma observada en las células RCMH obtenidas de un individuo sano. Por el contrario, mioblastos aislados de ratones deficientes en *Dysf*, exhibieron un aumento en la formación de F-actina al ser comparado con mioblastos de ratones silvestres. No obstante, en fibras musculares maduras de ratones deficientes de *Dysf* no se observan diferencias en la polimerización de actina, en ninguna de las edades analizadas (2, 4 y 6 meses de edad), al compararlos con sus controles silvestres.

6.1.-Expresión de *Dysf* en líneas celulares con mutación de *Dysf*.

En esta tesis se demostró que las líneas 107, 379, AB320 y ER presentan niveles significativamente menores de la proteína *Dysf* comparado con su control RCMH (Fig. 3). Estos datos concuerdan con lo encontrado en biopsias de músculo esquelético de los pacientes de los cuales provienen estas líneas celulares (9,40,60), demostrándose así que se mantiene la escasa expresión de disferlina en las líneas celulares.

Hasta la fecha se han descrito una gran variedad de mutaciones en *Dysf* causantes de disferlinopatías (63) y no existe una clara correlación entre el tipo de mutación, su impacto en la expresión y localización de la proteína, el mecanismo molecular afectado y el fenotipo clínico que producen (3,6,8,64–66). Por lo tanto, la existencia de modelos celulares de disferlinopatías podría ser de gran relevancia para la investigación biomédica, permitiendo entender los mecanismos moleculares afectados y ofreciendo una posible ventana para la generación de tratamientos.

6.2.-Mioblastos de pacientes con disferlinopatía presentan alteraciones en la dinámica de F-actina.

Al analizar la red de filamentos de actina encontramos que las líneas celulares 107, 379, AB320 y ER presentaban una menor densidad de filamentos de F-actina (teñida con faloidina), comparadas con la línea control RCMH (Fig. 4). Además, al hacer un análisis cualitativo en el plano de las células, pudimos observar que tanto las líneas 107, AB320 y ER presentan en su mayor cantidad un patrón de F-actina filamentosa y un porcentaje menor de fibras marcando la zona cortical de la célula, indicándonos que al menos las mutaciones en Dysf que presentan estas líneas celulares estarían modificando la organización de actina cortical. En cambio, la línea 379 presenta un 50% de fibras de F-actina y 50% de actina marcando la zona cortical en el plano focal observado. Las diferencias exhibidas por las distintas líneas celulares sobre el patrón de organización de actina pueden explicarse por las distintas mutaciones en Dysf los cuales influyen, entre otras cosas, la capacidad de Dysf de unir Ca^{2+} (14, 15) y formar dímeros (16). Es así como la línea celular 107 presenta mutaciones en el dominio C2B, involucrado en la expresión y tasa endocítica de Dysf en la membrana plasmática (27). La línea AB320 presenta mutaciones en el dominio C2D, mientras que la mutación en la línea ER se localiza en el dominio C2F, ambos involucrados en la capacidad de Dysf de unir fosfolípidos (17) y en el rol que ésta tiene en la reparación de membranas (67). Es esperable que las mutaciones que afectan la capacidad de Dysf de unirse a fosfolípidos de membrana puedan tener mayor influencia en mecanismos corticales como la organización de actina submembrana. Una de las mutaciones presentes en la línea celular 379 afecta el dominio C2C uno de los más sensibles a Ca^{2+} (19) involucrado también en la endocitosis de Dysf. Debido a que la red de filamentos de actina es altamente dinámica y su organización depende de su capacidad de remodelamiento. Evaluamos si la capacidad de polimerización de novo de actina se encontraba también alterada en las líneas celulares con mutaciones en Dysf (Fig.5). Efectivamente observamos que la formación de F-actina se redujo significativamente en las líneas 107, 379, AB320 y ER respecto a lo observado en la línea control RCMH. No obstante, Es importante destacar que, aunque la intensidad de fluorescencia observada en el ensayo de polimerización de novo se corresponde con filamentos de actina recién formados, no podemos descartar que al menos un porcentaje de esa fluorescencia se deba a monómeros de G-actina-AF-488 los que

también son cuantificados. A pesar de esto, observamos diferencias significativas en la intensidad total de la señal de actina nueva lo que sugiere que Dysf podría estar involucrada, directa o indirectamente, en la regulación de la polimerización de F-actina en células musculares no diferenciadas. Cabe destacar, que durante el proceso de reparación muscular Dysf recluta Anexina 1 y 2 al sitio de la lesión (36,38). A su vez, se ha demostrado que tanto anexina 1 y 2 poseen la capacidad de unirse y remodelar filamentos de F-actina (68–70). Por lo tanto, podría especularse que las mutaciones en Dysf modifican la actividad de proteínas involucradas en el remodelamiento de la red de F-actina.

Los filamentos de F-actina son un actor clave en la reparación del sarcolema (56) y se ha observado un alto grado de remodelación del citoesqueleto de F-actina en los sitios en donde se producen los microdaños (71). Se ha observado también que este remodelamiento del citoesqueleto facilita el reclutamiento de vesículas que contienen disferlina (56). Por otra parte, el remodelamiento deficiente de la red de F-actina podría también conducir a una serie de desbalances en la dinámica celular, entre ellos un déficit en el tráfico de proteínas de membrana que trafican al sarcolema por vías actina-dependientes, tales como es el caso del transportador de glucosa GLUT4 (72) o el receptor nicotínico (73). Este desbalance de la red de F-actina podría ser clave en las etapas tempranas de la patología, acentuando el deterioro en la reparación del sarcolema y por lo tanto deteriorando la función muscular.

6.3.-Mutaciones de Dysf causantes de disferlinopatías modifican los niveles de las isoformas de actina.

Se han descrito 6 isoformas de actina (46,47). En el músculo esquelético se expresa β -actina, que es una isoforma exclusiva de este tejido y las isoformas α - y γ -actina, las cuales se expresan de forma ubicua. Bergeron y cols. (53) mostraron que en la línea celular Sf21 (generada a partir de ovario de un tipo de polilla del maíz), la velocidad de polimerización y despolimerización de actina varía de acuerdo a la proporción de α y γ actina, lo que sugiere que la polimerización de la red de actina depende de las cantidades relativas de sus distintas isoformas. Con esto en mente, evaluamos si estas tres isoformas se expresan en los mioblastos control RCMH y si sus

niveles se modifican en las líneas celulares deficientes en Dysf. Según nuestros resultados las isoformas citoplasmáticas β - y γ -actina se expresan en mioblastos RCMH, pero no la isoforma δ que corresponde a la actina enriquecida en el sarcómero (47) (Fig. 6). De manera interesante, encontramos que las isoformas β - y γ - no cambian sus niveles en ninguna de las líneas evaluadas. Sin embargo, observamos niveles cuantificables de la isoforma δ -actina en las líneas 107, 379 y AB320, no así en la línea celular ER (Fig. 6). Estos resultados sugieren primero, que no todas las mutaciones afectan los mismos mecanismos celulares. La presencia de δ -actina sarcomérica en las líneas de mioblastos 107, 379 y AB320 podría corresponder a un mecanismo primario de "defensa" conducente a compensar un deficiente remodelamiento de actina en ausencia de Dysf, aunque esto aún es meramente especulativo. Que este aumento en los niveles de δ -actina no se observe en la línea ER puede deberse a diversos factores. Dado que la mutación en Dysf presente en la línea ER está localizada en el dominio C2F, el cual es importante para la capacidad de Dysf de unir fosfolípidos (17) y de reparar membranas (67), quizás existen otros mecanismos más directamente relacionados con la reparación del sarcolema post-injuria, que son más relevantes que la expresión de esta isoforma de actina en esta línea celular.

Otros autores han observado cambios en los niveles de δ -actina en lesiones musculares. Fuchs y cols. (74) observaron un aumento los niveles de la isoforma de δ -actina y miosina en lesiones de los músculos del manguito rotador de humano. Este aumento fue de la mano con una evidente pérdida en la elasticidad y contractibilidad en la musculatura de esta zona. Sin embargo, esos autores no pudieron determinar si los niveles de esta isoforma de actina decaen cuando el músculo se recupera. Por otro parte, Chaponnier y Gabbiani (75) mostraron que tras generar una lesión en músculo esquelético de rata, durante los primeros días post-injuria no se detectaron cambios en los niveles de δ -actina. Sin embargo, los niveles de δ -actina aumentaron cuando el proceso de regeneración celular se activa y estos niveles vuelven a decaer cuando la regeneración ha terminado. Por esta razón es necesario determinar si el aumento de δ -actina se debe a la activación de algún mecanismo compensatorio de la célula. Otro punto interesante a analizar es el grado de diferenciación en que se encuentran las células. Driesen y cols. (76) mostraron una sobrerregulación de δ -actina en pacientes que presentaron estenosis coronaria. Ellos proponen que esto se debe a que los

cardiomiocitos estaban en una etapa hipertrófica debido a una sobrecarga de presión y volumen, y que este aumento se presentó en cardiomiocitos desdiferenciados, por lo que abre la interrogante a que si el nivel de esta isoforma de actina se debe a la etapa de desarrollo en que se encuentran las células.

Otro mecanismo dependiente de la dinámica de F-actina que es importante para el funcionamiento del músculo, es la reparación del sarcolema post-injuria. Ante cualquier micro-daño en la membrana plasmática de las células musculares, F-actina junto con un cúmulo de otras proteínas, migran hacia el sitio del daño a través de un proceso mediado por anexinas. En el sitio de daño, se forma una "copa" compuesta por un complejo de anexinas A1, A2 y A6 y un "hombro" formado por varias proteínas entre ellas BN1, Dysf, MG53, EHD y en el cual también estaría participando F-actina (77). De esta manera, actina polimerizada participaría en la reparación de la membrana muscular dañada. Estos antecedentes, junto con los resultados obtenidos en el presente trabajo, nos llevan a pensar que las mutaciones que afectan la expresión de Dysf disminuyen la polimerización de F-actina y, por ende, afectarían el remodelamiento de la red de F-actina. Esto podría traducirse en un funcionamiento deficiente de la maquinaria molecular encargada de la reparación del daño en el sarcolema, tal como se observa en las disferlinopatías (Fig. 10).

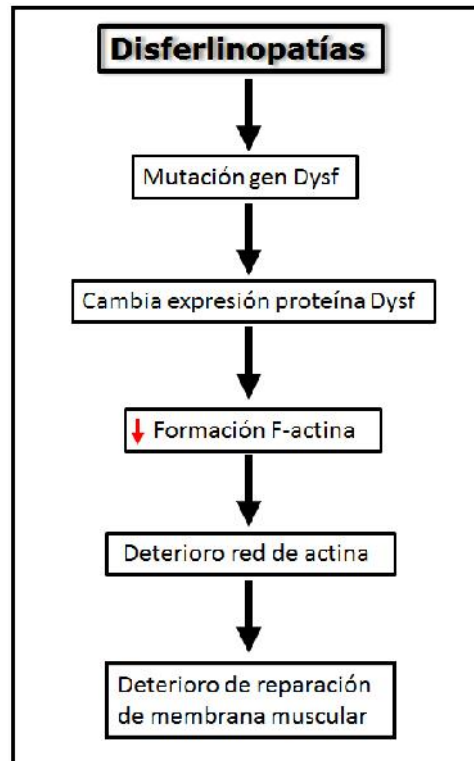


Figura 10: Posible relación entre mutaciones de Dysf y la red de actina en disferlinopatías. Las disferlinopatías se presentan por la mutación del gen de Dysf el cual genera un cambio en la expresión de Dysf (disminución o ausencia de esta). Este cambio en la expresión de Dysf genera una disminución en la formación de F-actina, provocando un deterioro en la red de actina, la cual desencadena una deficiente reparación muscular.

6.4.-Papel de Dysf en la formación de actina y niveles de sus isoformas en células de músculo esquelético de ratón.

Para analizar si los cambios que observamos en el remodelamiento de actina en mioblastos de pacientes se daban también en un modelo animal de disferlinopatía, analizamos la formación de F-actina en cultivos primarios de mioblastos obtenidos de ratones jóvenes deficientes de Dysf. Interesantemente, a diferencia de lo observado con las líneas de mioblastos humanos, los mioblastos obtenidos de ratones deficientes de Dysf presentaron una mayor formación de F-actina, en comparación con los mioblastos obtenidos de ratón silvestre (Fig. 7). Una de las posibles razones para esta diferencia es que los mioblastos de ratón fueron obtenidos de animales jóvenes (antes de cumplir los 2 meses) y que aún no presentan manifestaciones físicas de distrofia muscular, mientras que las biopsias de los pacientes fueron obtenidas cuando estos ya presentaban manifestaciones de la patología, y en donde otros mecanismos secundarios podrían ya estar activados. Esto podría sugerirnos que la disminución de la red de F-actina se desarrolla en etapas más tardías de la enfermedad. Para abordar esta idea evaluamos la formación de filamentos de actina en fibras musculares maduras aisladas de ratones deficientes de Dysf y de ratones silvestres. Inesperadamente, el ensayo no mostró diferencias en la formación de F-actina entre las fibras provenientes de ratones silvestre y deficientes de Dysf a ninguna de las edades estudiadas (2, 4 y 6 meses) (Fig. 8). También es importante destacar que los animales a los 2, 4 y 6 meses aún no han presentado manifestaciones físicas de la patología. Probablemente, en tales edades de los ratones, las fibras musculares aún no han desarrollado cambios en la dinámica de F-actina. Es importante plantearse la posibilidad de replicar estos experimentos en el animal más adulto (sobre 8 meses) que es cuando comienzan a observarse las manifestaciones clínicas y que por ende las desregulaciones comienzan a aparecer de forma más evidente (Datos aun no publicados por Cea y cols.). Otro aspecto interesante de analizar, es lo que sucede con la actina en el musculo de los ratones, durante o después de ser sometidos a ejercicio. Frinchi y cols. (78) mostraron que en ratones mdx, modelo de distrofia muscular de Duchenne, se expresa la proteína conexina 39, no así en ratones silvestres. Estos niveles se redujeron significativamente en músculos de ratones mdx ejercitados durante 30 y 40 días, reduciendo así la degeneración del musculo. Esto y otros antecedentes sugieren que la degeneración y regeneración del musculo esqueletico

desencadenan procesos distintos de los que ocurren en reposo, por lo que no podemos descartar que la organización y el remodelamiento de actina se vean afectados de manera distinta en nuestro modelo animal de disferlinopatía si es que sometemos a los ratones a entrenamiento y/o tratamientos específicos antes de realizar los estudios abordados en este trabajo.

En esta tesis se evaluó también si los niveles de las distintas isoformas de actina se veía alterada en ratones deficientes en Dysf. Para ello se utilizaron ratones de las mismas edades (2, 4 y 6 meses). Lamentablemente, solo pudimos analizar un experimento por condición por lo que no pudimos obtener resultados concluyentes. Esto se debió a que no logramos obtener señal con el anticuerpo para tubulina, el cual es el control de carga (Fig. 9). Una de las razones para esta falla en la señal, es que los músculos una vez extraídos fueron congelados a -80°C y no procesados de inmediato, en este caso puede que durante el proceso de congelamiento y descongelamiento del músculo se hayan degradado proteínas. Otra posibilidad es que nuestro tampón de lisis no sea el adecuado para la detección con nuestros anticuerpos. Por lo tanto, debemos analizar detenidamente nuestros protocolos. Este punto importante de abordar más adelante, ya que es necesario determinar si las isoformas de actina presentan algún grado de desbalance y si este puede ser el hecho por el cual se esté compensando el sistema, y que por esta razón los niveles de formación de F-actina no tengan cambios a las tres edades evaluadas.

6.5.- Conclusión.

En conjunto nuestros resultados sugieren que algunas mutaciones de Dysf causantes de disferlinopatía afectan negativamente el remodelamiento de la red de F-actina en células musculares. Éste podría ser un mecanismo que contribuya a la aparición y progresión de la distrofia muscular, y que posiblemente afectaría el tráfico dependiente de F-actina de proteínas de membrana involucradas en la función y reparación muscular.

7. - BIBLIOGRAFÍA

1. Glover L, Brown RH. Dysferlin in membrane trafficking and patch repair. Vol. 8, Traffic. 2007. p. 785–94.
2. Linssen WHJP, Notermans NC, Van Der Graaf Y, Wokke JHJ, Van Doorn PA, Höweler CJ, et al. Miyoshi-type distal muscular dystrophy. Clinical spectrum in 24 Dutch patients. Brain. 1997;120(11):1989–96.
3. Woudt L, Di Capua GA, Krahn M, Castiglioni C, Hughes R, Campero M, et al. Toward an objective measure of functional disability in dysferlinopathy. Muscle and Nerve. 2016;53(1):49–57.
4. Díaz J, Woudt L, Suazo L, Garrido C, Caviedes P, Cárdenas AM, et al. Broadening the imaging phenotype of dysferlinopathy at different disease stages. Muscle and Nerve. 2016;54(2):203–10.
5. Bashir R, Keers S, Strachan T, Passos-Bueno R, Zatz M, Weissenbach J, et al. Genetic and physical mapping at the limb-girdle muscular dystrophy locus (LGMD2B) on chromosome 2p. Genomics. 1996;33(1):46–52.
6. 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 (Pt 1):31–54.
7. Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Greenberg CR, Nylén E, Sukhorukov VS, Poleshchuk V V, et al. Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy. Neurology. 2000;55(12):1931–3.
8. Ueyama H, Kumamoto T, Horinouchi H, Fujimoto S, Aono H, Tsuda T. Clinical heterogeneity in dysferlinopathy. Intern Med. 2002;41(7):532–6.
9. Philippi S, Bigot A, Marg A, Mouly V, Spuler S, Zacharias U. Dysferlin-deficient immortalized human myoblasts and myotubes as a useful tool to study dysferlinopathy. PLoS Curr. 2012 Feb;4:RRN1298.
10. Urtizberea JA, Bassez G, Leturcq F, Nguyen K, Krahn M, Levy N. Dysferlinopathies. Neurol India. 2008;56(3):289–97.
11. Bevilacqua JA, Krahn M, Pedraza L, Gejman R, Gonzalez S, Levy N. Dysferlinopathy in Chile: evidence of two novel mutations in the first reported cases. Genet Test Mol Biomarkers. 2009 Feb;13(1):105–8.
12. Cardenas AM, Gonzalez-Jamett AM, Cea LA, Bevilacqua JA, Caviedes P. Dysferlin

- function in skeletal muscle: Possible pathological mechanisms and therapeutical targets in dysferlinopathies. *Exp Neurol*. 2016 Sep; 283(Pt A):246–54.
13. Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1998 Sep; 20(1):31–6.
 14. Sutton RB, Davletov BA, Berghuis AM, Sudhof TC, Sprang SR. Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell*. 1995 Mar; 80(6):929–38.
 15. Sudhof TC, Rizo J. Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. *Neuron*. 1996 Sep; 17(3):379–88.
 16. Xu L, Pallikkuth S, Hou Z, Mignery GA, Robia SL, Han R. Dysferlin forms a dimer mediated by the C2 domains and the transmembrane domain in vitro and in living cells. *PLoS One*. 2011; 6(11):e27884.
 17. Therrien C, Di Fulvio S, Pickles S, Sinnreich M. Characterization of lipid binding specificities of dysferlin C2 domains reveals novel interactions with phosphoinositides. *Biochemistry*. 2009 Mar; 48(11):2377–84.
 18. Davis DB, Doherty KR, Delmonte AJ, McNally EM. Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains. *J Biol Chem*. 2002 Jun; 277(25):22883–8.
 19. 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 Jan; 106(2):382–9.
 20. Sula A, Cole AR, Yeats C, Orengo C, Keep NH. Crystal structures of the human Dysferlin inner DysF domain. *BMC Struct Biol*. 2014 Jan; 14:3.
 21. Anderson L V, Davison K, Moss JA, Young C, Cullen MJ, Walsh J, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet*. 1999 May; 8(5):855–61.
 22. Ho M, Gallardo E, McKenna-Yasek D, De Luna N, Illa I, Brown Jr RH. A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Ann Neurol*. 2002 Jan; 51(1):129–33.
 23. 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

- Mar;172(3):774–85.
24. Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen C-C, Williamson R, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature*. 2003 May;423(6936):168–72.
 25. Bansal D, Campbell KP. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol*. 2004 Apr;14(4):206–13.
 26. 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 Feb;20(4):779–89.
 27. 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 Sep;285(37):28529–39.
 28. Chiu Y-H, Hornsey MA, Klinge L, Jorgensen LH, Laval SH, Charlton R, et al. Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2009 Jun;18(11):1976–89.
 29. 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 Nerve*. 2010 Feb;41(2):166–73.
 30. Hofhuis J, Bersch K, Bussenschutt R, Drzymalski M, Liebetanz D, Nikolaev VO, et al. Dysferlin mediates membrane tubulation and links T-tubule biogenesis to muscular dystrophy. *J Cell Sci*. 2017 Mar;130(5):841–52.
 31. de Morree A, Flix B, Bagaric I, Wang J, van den Boogaard M, Grand Moursel L, et al. Dysferlin regulates cell adhesion in human monocytes. *J Biol Chem*. 2013 May;288(20):14147–57.
 32. Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, Nishino I, et al. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet*. 2001 Aug;10(17):1761–6.
 33. Huang Y, Verheesen P, Roussis A, Frankhuizen W, Ginjaar I, Haldane F, et al. Protein studies in dysferlinopathy patients using llama-derived antibody fragments selected by phage display. *Eur J Hum Genet*. 2005 Jun;13(6):721–30.
 34. Cai C, Masumiya H, Weisleder N, Matsuda N, Nishi M, Hwang M, et al. MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nat Cell Biol*. 2009

- Jan;11(1):56–64.
35. Huang Y, Laval SH, van 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 Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2007 Mar;21(3):732–42.
 36. Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, Brown RHJ. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem.* 2003 Dec;278(50):50466–73.
 37. Tidball JG. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol.* 2011 Oct;1(4):2029–62.
 38. Roostalu U, Strahle U. In vivo imaging of molecular interactions at damaged sarcolemma. *Dev Cell.* 2012 Mar;22(3):515–29.
 39. Han R, Rader EP, Levy JR, Bansal D, Campbell KP. Dystrophin deficiency exacerbates skeletal muscle pathology in dysferlin-null mice. *Skelet Muscle.* 2011 Dec;1(1):35.
 40. Gallardo E, de Luna N, Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, Gonzalez-Quereda L, Flix B, et al. Comparison of dysferlin expression in human skeletal muscle with that in monocytes for the diagnosis of dysferlin myopathy. *PLoS One.* 2011;6(12):e29061.
 41. Yin X, Wang Q, Chen T, Niu J, Ban R, Liu J, et al. CD4+ cells, macrophages, MHC-I and C5b-9 involve the pathogenesis of dysferlinopathy. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(3):3069–75.
 42. Hornsey MA, Laval SH, Barresi R, Lochmuller H, Bushby K. Muscular dystrophy in dysferlin-deficient mouse models. *Neuromuscul Disord.* 2013 May;23(5):377–87.
 43. Rahimov F, Kunkel LM. The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *J Cell Biol.* 2013 May;201(4):499–510.
 44. McNeil PL. Repairing a torn cell surface: make way, lysosomes to the rescue. *J Cell Sci.* 2002 Mar;115(Pt 5):873–9.
 45. Corbalan-Garcia S, Gomez-Fernandez JC. Signaling through C2 domains: more than one lipid target. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jun;1838(6):1536–47.
 46. Vandekerckhove J, Weber K. At least six different actins are expressed in a

- higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol.* 1978 Dec;126(4):783–802.
47. Perrin BJ, Ervasti JM. The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2010 Oct;67(10):630–4.
 48. Vandekerckhove J, Bugaisky G, Buckingham M. Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. A quantitative determination of the two actin isoforms. *J Biol Chem.* 1986 Feb;261(4):1838–43.
 49. Welch MD, Mullins RD. Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:247–88.
 50. Disanza A, Steffen A, Hertzog M, Frittoli E, Rottner K, Scita G. Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell Mol Life Sci.* 2005 May;62(9):955–70.
 51. Crawford K, Flick R, Close L, Shelly D, Paul R, Bove K, et al. Mice lacking skeletal muscle actin show reduced muscle strength and growth deficits and die during the neonatal period. *Mol Cell Biol.* 2002 Aug;22(16):5887–96.
 52. Nowak KJ, Ravenscroft G, Jackaman C, Filipovska A, Davies SM, Lim EM, et al. Rescue of skeletal muscle alpha-actin-null mice by cardiac (fetal) alpha-actin. *J Cell Biol.* 2009 Jun;185(5):903–15.
 53. Bergeron SE, Zhu M, Thiem SM, Friderici KH, Rubenstein PA. Ion-dependent polymerization differences between mammalian beta- and gamma-nonmuscle actin isoforms. *J Biol Chem.* 2010 May;285(21):16087–95.
 54. Lauritzen HPMM, Schertzer JD. Measuring GLUT4 translocation in mature muscle fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010 Aug;299(2):E169-79.
 55. Mandato CA, Weber KL, Zandy AJ, Keating TJ, Bement WM. *Xenopus* egg extracts as a model system for analysis of microtubule, actin filament, and intermediate filament interactions. *Methods Mol Biol.* 2001;161:229–39.
 56. 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 Apr;23(7):1677–86.
 57. Assadi M, Schindler T, Muller B, Porter JD, Ruegg MA, Langen H. Identification of Proteins Interacting with Dysferlin Using the Tandem Affinity Purification Method . *Open Cell Dev Biol J .* 2008;1:17–23.

58. Caviedes R, Liberona JL, Hidalgo J, Tascon S, Salas K, Jaimovich E. A human skeletal muscle cell line obtained from an adult donor. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Apr;1134(3):247–55.
59. Lostal W, Bartoli M, Bourg N, Roudaut C, Bentaib A, Miyake K, et al. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum Mol Genet*. 2010 May;19(10):1897–907.
60. Nguyen K, Bassez G, Krahn M, Bernard R, Laforet P, Labelle V, et al. Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Arch Neurol*. 2007 Aug;64(8):1176–82.
61. Gonzalez-Jamett AM, Momboisse F, Guerra MJ, Ory S, Baez-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):e70638.
62. Bonifacino JS, Dell'Angelica EC. *Current Protocols in Cell Biology* 2003. Unit 7.2.1-7.2.21
63. Cacciottolo M, Numitone G, Aurino S, Caserta IR, Fanin M, Politano L, et al. Muscular dystrophy with marked Dysferlin deficiency is consistently caused by primary dysferlin gene mutations. *Eur J Hum Genet*. 2011 Sep;19(9):974–80.
64. Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Tanaka H, Vereshchagin N V, Markova ED, Poleshchuk V V, et al. Clinical and molecular analysis of a large family with three distinct phenotypes of progressive muscular dystrophy. *Brain*. 1996 Dec;119 Pt 6:1895–909.
65. Guglieri M, Straub V, Bushby K, Lochmuller H. Limb-girdle muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol*. 2008 Oct;21(5):576–84.
66. Rosales XQ, Gastier-Foster JM, Lewis S, Vinod M, Thrush DL, Astbury C, et al. Novel diagnostic features of dysferlinopathies. *Muscle Nerve*. 2010 Jul;42(1):14–21.
67. Krahn M, Wein N, Bartoli M, Lostal W, Courrier 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):50ra69-50ra69.
68. Filipenko NR, Waisman DM. The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. *J Biol Chem*. 2001 Feb;276(7):5310–5.
69. Jones PG, Moore GJ, Waisman DM. A nonapeptide to the putative F-actin binding

- site of annexin-II tetramer inhibits its calcium-dependent activation of actin filament bundling. *J Biol Chem*. 1992 Jul;267(20):13993–7.
70. Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE. Annexin-actin interactions. *Traffic*. 2004 Aug;5(8):571–6.
 71. Marg A, Schoewel V, Timmel T, Schulze A, Shah C, Daumke O, et al. Sarcolemmal repair is a slow process and includes EHD2. *Traffic*. 2012 Sep;13(9):1286–94.
 72. Tong P, Khayat ZA, Huang C, Patel N, Ueyama A, Klip A. Insulin-induced cortical actin remodeling promotes GLUT4 insertion at muscle cell membrane ruffles. *J Clin Invest*. 2001 Aug;108(3):371–81.
 73. Lee CW, Han J, Bamberg JR, Han L, Lynn R, Zheng JQ. Regulation of acetylcholine receptor clustering by ADF/cofilin-directed vesicular trafficking. *Nat Neurosci*. 2009 Jul;12(7):848–56.
 74. Fuchs B, Zumstein M, Regenfelder F, Steinmann P, Fuchs T, Husmann K, et al. Upregulation of alpha-skeletal muscle actin and myosin heavy polypeptide gene products in degenerating rotator cuff muscles. *J Orthop Res*. 2008;26(7):1007–11.
 75. Chaponnier C, Gabbiani G. Monoclonal antibodies against muscle actin isoforms: epitope identification and analysis of isoform expression by immunoblot and immunostaining in normal and regenerating skeletal muscle. *F1000Research*. 2016;5:416.
 76. Driesen RB, Verheyen FK, Debie W, Blaauw E, Babiker FA, Cornelussen RNM, et al. Re-expression of alpha skeletal actin as a marker for dedifferentiation in cardiac pathologies. *J Cell Mol Med*. 2009 May;13(5):896–908.
 77. Demonbreun AR, Quattrocelli 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.
 78. Giuseppa Mudò C. Recovery of Damaged Skeletal Muscle in mdx Mice through Low-intensity Endurance Exercise. *Int J Sport Med*. 2014;35(35):19–27.

8.-ANEXOS



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



Clara Guzmán
Presidente
Comité de Bioseguridad
Universidad de Valparaíso

Valparaíso, 12 de abril de 2016.


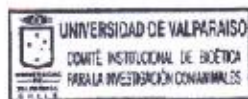
ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA BEA080-2016

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.



Chifa Gulsado Aránguiz

Presidente

Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales

