

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“MUTACIONES PATOGENICAS EN EL GEN *CAPN3* EN PACIENTES CON
FENOTIPO INESPECÍFICO DE LGMD2”**

ALEJANDRA IRENE TRANGULAO ESPINOSA

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN GENÉTICA**

Directores de Tesis: Dr. Patricio González Hormazábal.
Prof. Dr. Jorge A. Bevilacqua Rivas.

2018

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

ALEJANDRA IRENE TRANGULAO ESPINOSA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Genética en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 27/04/2018

Dr. Patricio González Hormazábal
Director de Tesis
Universidad de Chile

Prof. Dr. Jorge A. Bevilacqua Rivas
Director de Tesis
Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Pablo A. Caviedes Fernández

Prof. Dr. Patricio Olguín Aguilera

Prof. Dra. Teresa Aravena Cerda

Prof. Dra. Luisa Herrera Cisterna
Presidente Comisión

DEDICATORIA

A mi familia y amigos.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas aquellas personas que se involucraron de algún modo en el desarrollo de esta investigación, especialmente a quienes estuvieron constantemente presentes como mi director de tesis Dr. Patricio González-Hormazábal por ser un referente, por brindarme su tiempo, guiarme y formarme en este aprendizaje. Al Dr. Jorge A. Bevilacqua Rivas por ser uno de mis principales impulsores a la inquietud académica y laboral, por la dedicación y comprensión en mi formación profesional, además de acompañarme y guiarme en el desarrollo de este trabajo.

Gracias a mis amigos, compañeros de laboratorio y de trabajo que se dieron el tiempo de escucharme y de corregirme cuando se los pedí.

Gracias a los profesores y a la comisión revisora quienes me entregaron las herramientas, conocimientos y sugerencias pertinentes al desarrollo de la tesis.

Finalmente, a mi familia que siempre ha sido un pilar fundamental cada etapa en mi vida.

Esta tesis fue financiada por

Fondecyt 1151383

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 12 |
| ABSTRACT | 13 |
| INTRODUCCIÓN..... | 14 |
| Dificultades para establecer el fenotipo clínico en calpainopatía | 15 |
| Proteína calpaína-3..... | 17 |
| a. Estructura de calpaína-3..... | 18 |
| b. Activación y autólisis de calpaína-3..... | 19 |
| c. Interacciones de calpaína-3 con otras proteínas..... | 22 |
| Diagnóstico molecular y genético de la calpainopatía..... | 26 |
| HIPÓTESIS | 29 |
| OBJETIVOS..... | 29 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 30 |
| RESULTADOS | 36 |
| 1) Datos clínicos: | 36 |
| 2) Análisis genético: | 36 |
| 3) Ensayo funcional en paciente P14..... | 43 |
| DISCUSIÓN..... | 46 |
| 1. Efectos en la proteína CAPN3 de las mutaciones detectadas..... | 46 |
| a) Mutación c.107delG..... | 46 |
| b) Mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT | 48 |
| c) Mutación c.2105C>T..... | 50 |
| 2. Correlación genotipo-fenotipo..... | 51 |
| a) Paciente P12 y mutación c.107delG. | 51 |
| b) Paciente P12 y mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT..... | 52 |
| c) Paciente P14 y mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT..... | 53 |
| d) Paciente P14 y mutación c.2105C>T..... | 54 |
| 3. Ensayo funcional de paciente P14..... | 54 |
| 4. Modelo de patogenicidad de CAPN3 | 56 |

| | |
|-------------------|----|
| CONCLUSIÓN | 59 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 61 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura de calpaína-3..... | 19 |
| Figura 2. Modelo del mecanismo de activación de CAPN3 propuesto por García Díaz et al | 20 |
| Figura 3. Modelo del ciclo autocatalítico de CAPN3 sugerido por Yasuko Ono et al, 2016..... | 22 |
| Figura 4. Esquema del sarcómero y de la proteína titina | 23 |
| Figura 5. Modelo de ubicación y traslado de calpaína-3 en el sarcómero durante contracción y relajación muscular..... | 24 |
| Figura 6. Modelo del complejo de reparación de membrana en músculo esquelético de Glover y Brown | 25 |
| Figura 7. Distribución de las mutaciones missense patogénicas a lo largo de la región codificante del gen <i>CAPN3</i> y sus dominios proteicos..... | 27 |
| Figura 8. Electroforetograma de las mutaciones encontradas por secuenciación masiva presentes en P12 y P14 | 42 |
| Figura 9. Análisis de conservación aminoacídica inter-especies del cambio proteico p.Ala702Val..... | 43 |
| Figura 10. Ensayo funcional de <i>CAPN3</i> utilizando los anticuerpos CALP12A2 y 2C4 (Novocastra) | 44 |
| Figura 11. Esquema de la región de <i>CAPN3</i> que contiene la mutación c.107delG | 47 |
| Figura 12. Esquema de la región de <i>CAPN3</i> que contiene la mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT | 48 |
| Figura 13. Esquema de la región <i>CAPN3</i> que contiene la mutación c.2105C>T..... | 51 |
| Figura 14. Modelo normal de funcionamiento de calpaína-3 en músculo esquelético | 56 |

Figura 15. Modelo de patogenicidad de la proteína mutada del paciente P14.....57

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Mutaciones en el gen <i>CAPN3</i> encontradas en pacientes chilenos..... | 28 |
| Tabla 2. Genes incluidos en el panel de secuenciación relacionados con LGMD | 33 |
| Tabla 3. Partidores utilizados para secuenciar por Sanger las mutaciones encontradas..... | 34 |
| Tabla 4. Características clínicas más importantes de los pacientes estudiados por secuenciación masiva..... | 37 |
| Tabla 5. Variantes encontradas en los genes incluidos en el panel de secuenciación y de las posibles mutaciones patogénicas en los genes disferlina (<i>DYSF</i>), calpaína-3 (<i>CAPN3</i>) y anoctamina 5 (<i>ANO5</i>)..... | 39 |
| Tabla 6. Variantes posiblemente patogénicas en gen <i>CAPN3</i> encontradas en los individuos P12 y P14 mediante secuenciación masiva..... | 41 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|--|
| ANO5 | : Anoctamina 5. |
| CAPN3 | : Calpaína-3. |
| CK | : Creatina kinasa. |
| DM | : Distrofia muscular. |
| DMB | : Distrofia muscular de Becker. |
| DMD | : Distrofia muscular de Duchenne. |
| DYSF | : Disferlina. |
| ECC | : Electrocardiograma. |
| EDMD | : Distrofia de Emery-Dreifus. |
| eM | : Activación extra. |
| EMG | : Electromiografía. |
| F | : Femenino. |
| FSHD | : Distrofia facioescápulo humeral. |
| HT | : Heterocigoto. |
| HZ | : Homocigoto. |
| iM | : Activación intramolecular. |
| IS1 | : Secuencia de inserción 1. |
| IS2 | : Secuencia de inserción 2. |
| LGMD | : Limb-girdle muscular dystrophies (distrofia muscular de cintura) |
| M | : Masculino. |
| RM | : Resonancia magnética. |
| WB | : Western Blot. |

RESUMEN

Las distrofias de cintura (LGMD) son un grupo de distrofias musculares caracterizadas por presentar un deterioro progresivo de los músculos de las cinturas escapular, pélvica y proximales de las extremidades. La LGMD2A es causada por mutaciones en el gen *CAPN3*, que codifica la proteína calpaína-3, y su diagnóstico se basa principalmente en el análisis de la proteína mediante Western Blot (WB) en tejido muscular y análisis genético. Sin embargo, alrededor del 20-30% de los pacientes con LGMD2A muestra cuantificación normal de la proteína, pero funcionalmente inactiva, debido a mutaciones que afectan su capacidad autocatalítica. **Objetivo:** Detectar mutaciones en el gen *CAPN3* en pacientes con fenotipo de LGMD2 indeterminado y comprobar su efecto sobre actividad autocatalítica. **Metodología:** Se estudió genéticamente un grupo de 13 pacientes chilenos con características clínicas de LGMD2 que, luego de la evaluación clínica, radiológica y/o histopatológica, no pudieron ser subclasificados en una forma específica de LGMD. El análisis genético se realizó mediante secuenciación masiva de 15 genes causales de LGMD y el análisis proteico se realizó mediante ensayo funcional observado por WB. **Resultado:** En 2 pacientes se encontraron 3 mutaciones posiblemente patogénicas en el gen *CAPN3*, cuyos pacientes son portadores de los genotipos heterocigotos compuestos c.107delG/c.2362_2363delAGinsTCATCT y c.2105C>T/c.2362_2363delAGinsTCATCT. En el análisis proteico del paciente portador de la mutación *missense* c.2105C>T, se observaron las bandas de degradación autocatalítica a los 60 y 30 kDa. **Discusión:** La mutación c.107delG del gen *CAPN3* no ha sido reportada previamente, a diferencia de la mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT, que ha sido reportada y encontrada en otros pacientes chilenos. La mutación *missense* c.2105C>T ha sido reportada como posiblemente patogénica; sin embargo la actividad autocatalítica de *CAPN3* se encuentra conservada. **Conclusión:** Los resultados permiten concluir que las mutaciones encontradas no ejercerían su efecto patogénico a través de la alteración de la función autocatalítica de *CAPN3*.

ABSTRACT

The limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) are a group of muscular dystrophies characterized by progressive weakness and wasting of pelvic and shoulder girdles, and proximal limb muscles. LGMD2A is caused by mutations in the *CAPN3* gene, that encodes the protein calpain-3, and its diagnosis is mainly based on Western Blot (WB) analysis of the protein in muscular tissue and genetic analysis. Nevertheless, around 20-30% of patients with LGMD2A diagnosis show a normal protein quantification, but functionally deficient due mutations that affect its autocatalytic properties. **Aims:** To detect *CAPN3* gene mutations in patients with undetermined LGMD2 phenotype and to assess the autocatalytic activity. **Methods:** A group of 13 Chileans patients with clinical features of LGMD2 that, after the clinical, radiological and/or histopathological evaluation could not be subclassified in a specific form of LGMD was genetically studied. The genetic analysis was done by massive sequencing of 15 genes causative of LGMD, and the protein analysis was done by WB. **Results:** In two patients 3 possibly pathogenic mutations were found in the *CAPN3* gene, patients showing compound heterozygous genotypes c.107delG/c.2362_2363delAGinsTCATCT and c.2105C>T/c.2362_2363delAGinsTCATCT were found. Protein analysis by WB of the patient carrying the missense mutation c.2105C>T, the autocatalytic degradation bands were observed at 60 and 30 kDa. **Discussion:** The c.107delG mutations of the *CAPN3* gene has not been previously reported, unlike the c.2362_2363delAGinsTCATCT mutation, that has been previously reported, in addition to having been found in other Chilean patients. The missense c.2105C>T mutation has been reported as possibly pathogenic; however the autocatalytic activity of *CAPN3* is conserved. **Conclusion:** These results allow us to conclude that the pathogenic mutations described would not exert their pathogenic effect through the alteration of the autocatalytic function of *CAPN3*.

INTRODUCCIÓN

Las distrofias musculares (DM) son un grupo heterogéneo de enfermedades causadas por la ausencia o disfunción de proteínas esenciales para la estabilidad estructural y funcional de las fibras musculares esqueléticas, lo que conduce a la destrucción y debilidad muscular de forma progresiva. Todas las distrofias musculares caen dentro de la categoría de enfermedades raras por su baja prevalencia (1)

Si bien las DM presentan una serie de características comunes, por ejemplo la destrucción progresiva del músculo estriado esquelético, y en algunas, del músculo cardíaco, cada distrofia tiene a su vez particularidades que permiten diferenciarlas unas de otras; ya sea por su modo de herencia, la afectación diferencial de grupos musculares, la edad de presentación, entre otras. Las características diferenciales de cada distrofia dependen del defecto molecular o de la proteína afectada en cada condición (2).

Entre las DM más comunes se encuentran las distrofinopatías (distrofia muscular de Duchenne/Becker (DMD/DMB)), la distrofia miotónica tipos 1 y 2 (DM1, DM2), la distrofia de Emery–Dreifuss (EDMD), la distrofia facioescápulo humeral (FSHD), la distrofia muscular oculofaríngea (OPMD), las distrofias musculares congénitas; así como un grupo de unas 30 distrofias musculares que afectan predominantemente las cinturas pélvica y escapular, y que han sido agrupadas bajo la denominación de distrofia muscular de cintura o LGMD, por su sigla en inglés (*limbgirdle muscular dystrophies*) (3)

Las LGMD se caracterizan habitualmente por un deterioro progresivo predominante de los músculos de las cinturas escapular y pélvica, y proximales de las extremidades (4). Se clasifican en dos grupos según su patrón de herencia, las LGMD tipo 1 (LGMD1) son dominantes y las de tipo 2 (LGMD2) tienen un patrón de herencia recesivo. A su vez, por convención, se las denomina en orden alfabético de acuerdo a la cronología del descubrimiento del gen causal. Así, hasta el presente se han identificado ocho formas dominantes de LGMD desde LGMD1A a la LGMD1H, mientras que las recesivas, van desde la LGMD2A hasta la LGMD2X (1).

El avance en el estudio de las enfermedades neuromusculares ha permitido, en las últimas décadas, la identificación de muchos de los genes subyacentes a las distintas formas de

distrofia muscular, constatando una gran convergencia y divergencia fenotípicas dentro de las miopatías hereditarias (5). Es decir, mutaciones de distintos genes que generan un fenotipo similar (convergencia), así como también mutaciones en un gen particular determinan distintas formas fenotípicas de la misma condición genética (divergencia) (6).

No hay estimaciones precisas de la prevalencia e incidencia de las distintas formas de LGMD en diferentes regiones del mundo. Algunos trabajos han intentado estimar la prevalencia de las LGMD en distintas poblaciones incluyendo Latinoamérica. Por ejemplo, en Brasil se ha reportado que entre las LGMD, las más comunes son la LGMD2A (calpainopatía) en un 32% y la LGMD2B (disferlinopatía) en un 22%, entre otras (7). En comunidades aisladas genéticamente, como por ejemplo en Isla Reunión, se ha podido estimar una mayor prevalencia de algunas formas de LGMD, llegando a establecerse prevalencias de hasta 48 por un millón de individuos y 69 por millón en el país Vasco (8,9). En Chile no hay estudios de prevalencia y sólo se han detectado grupos de pacientes afectados por algunas formas particulares de LGMD (10). Los resultados de nuestro laboratorio, obtenidos a través de los proyectos FONDECYT #1110159 y #1151383 han permitido identificar más de 51 pacientes, pertenecientes a 31 familias chilenas no relacionadas, afectados por mutaciones en el gen *DYSF*, lo que indica una prevalencia estimada en Chile mayor a la estimada a nivel mundial (1 por un millón de individuos) (11). Interesantemente, cuatro mutaciones recurrentes en *DYSF* dan cuenta del 80% de los pacientes de la serie chilena (10). De forma similar, estudios preliminares han permitido identificar un grupo de pacientes con calpainopatía y la mutación más recurrente encontrada en Chile no está descrita en las bases de datos (12). El hecho de que exista un bajo número de individuos diagnosticados con calpainopatía es de interés ya que ésta es universalmente la más frecuente de las LGMD (4). Es en este contexto que nos interesa identificar y profundizar el estudio, además del diagnóstico genético-molecular de pacientes afectados por calpainopatía en Chile, con el fin de optimizar el algoritmo diagnóstico.

Dificultades para establecer el fenotipo clínico en calpainopatía.

Todas las formas de LGMD comparten características fenotípicas comunes (convergencia), en particular la debilidad y el deterioro progresivo de los músculos de la cintura

pélvica y escapular; pero los genes causales pueden tener asimismo una expresión fenotípica variable (divergencia), incluso entre personas de una misma familia. Por otra parte, las LGMD difieren, de acuerdo al gen causal de la enfermedad, en aspectos fenotípicos clínicos (Ej. compromiso cardíaco, formas leves vs. formas severas), fisiopatológicos (Ej. afección de proteínas de membrana vs. proteínas nucleares, etc.) y genéticos (Ej. modo de herencia, tipos de mutaciones causales, etc.) (1). En conjunto, esta variabilidad de las LGMD representa un obstáculo mayor para un diagnóstico certero, con la consecuente dificultad de establecer un pronóstico, tratamiento y asesoría genética adecuados para cada paciente (4,5). Así, se requiere de un análisis genético molecular para establecer el diagnóstico definitivo en cada caso. Sin embargo, a pesar de la variabilidad fenotípica de los pacientes afectados por LGMD, es posible agruparlos de acuerdo a ciertos rasgos clínicos comunes, lo que permite estrechar el espectro de posibles genes causales a investigar en un grupo determinado de pacientes (1)

La LGMD2A tiene un fenotipo clínico que en algunos pacientes no es fácil de diferenciar de pacientes afectados por LGMD2B o LGMD2L. Más aún, se han reportado casos en que mutaciones en *DYSF* podrían producir una reducción secundaria de calpaína-3 y viceversa, dando origen a fenotipos confusos (13–15). Esto se produce debido a que ambas, disferlina y calpaína-3, serían parte de un mismo complejo funcional proteico (13).

En estos pacientes la calpaína-3 disfuncional se expresa en cantidades normales en el tejido muscular distrófico, de forma que no se detecta su reducción o ausencia si se la evalúa a través de Western Blot (WB), pero sí se podría observar una disminución de disferlina, lo que conduciría a un error en la interpretación del resultado (14). De forma similar, algunos pacientes que tienen una presentación fenotípica de LGMD similar a LGMD2A o LGMD2B, pero con expresión normal de calpaína-3 mediante WB o de disferlina a través de inmunohistoquímica o WB, se ha encontrado que son portadores de mutaciones en el gen *ANO5* (LGMD2L) (16)(17), de modo que no es posible distinguir entre un paciente afectado con LGMD2A de uno con LGMD2L a partir de hallazgos clínicos e histopatológico. De esta forma, este subgrupo particular de pacientes que son fenotípicamente similares, entre LGMD2A, LGMD2B y LGMD2L, puede ser afectado por mutaciones en *CAPN3*, *DYSF* o *ANO5*, sin que el fenotipo clínico e histopatológico sean suficientes para establecer el diagnóstico con certeza entre las distintas LGMD2, requiriendo de un análisis genético para establecerlo.

La calpainopatía (LGMD2A) en particular, se caracteriza por el compromiso selectivo y progresivo de músculos proximales de la cintura pélvica y de las extremidades (8). El fenotipo típico y más frecuente es la forma *pelvifemoral de Leide-Möbius*, que primero se presenta con debilidad en la cintura pélvica y luego involucra a los hombros; pero también puede presentarse como la forma *escapulohumeral de Erb*, donde primero hay debilidad en los hombros y posteriormente en la cintura pélvica (8). Los signos clínicos más frecuentes son dificultad para correr, tendencia a caminar en puntillas y la debilidad escapular. En los muslos, es característica la debilidad y atrofia más marcadas de los aductores e isquiotibiales, además de los cuádriceps, lo que se observa claramente tanto en la valoración clínica como en imágenes de resonancia magnética, que son útiles para orientar el diagnóstico (18). Los pacientes pueden presentar pseudohipertrofia de pantorrillas de forma variable. La afectación es usualmente simétrica, y no compromete los músculos faciales ni del cuello (8,15). Los pacientes pueden presentar niveles de creatina kinasa (CK) elevadas o normales, o en ocasiones éste puede ser el único hallazgo en pacientes asintomáticos (8,15). El nivel de CK es un parámetro sensible de daño muscular (14), pero es inespecífico.

El curso de la enfermedad es variable, llevando a la pérdida de la ambulación entre los 10 y los 30 años desde el inicio de los síntomas (15). En etapas avanzadas, puede observarse una deficiencia de la función del diafragma. El compromiso cardíaco se ha descrito ocasionalmente, y los pacientes con calpainopatía no presentan discapacidad intelectual (8,15).

Proteína calpaína-3

El gen *CAPN3* se encuentra en la región cromosómica 15q15.2, abarca 53 kilobases, contiene 24 exones y codifica la proteína calpaína-3 que pesa 94 kDa. Esta proteína se expresa en el músculo esquelético y se encuentra regulando múltiples procesos fisiológicos, tales como diferenciación muscular, formación sarcomérica, remodelamiento muscular y regulación del citoesquelético. Mutaciones en gen *CAPN3* causa LGMD2A (4).

a. Estructura de calpaína-3.

Las calpaínas, en general, son una gran familia de cisteína-proteasas dependientes de iones de calcio no lisosomales e intracelulares (4,13,15). Actualmente la conforman una decena de distintos tipos de calpains con expresión variable en los diferentes tejidos del organismo (19,20). Dentro de este grupo de proteínas se encuentra la calpaína-3, que posee 4 dominios definidos: el dominio I se encuentra desde el aminoácido 1 hasta el 73 e incluye un dominio regulatorio “NS”. El dominio CysPC o dominio II corresponde al dominio catalítico; el cual posee dos subdominios PC1 y PC2 abarcando desde los residuos 74 al 417. El dominio III o CBSW anteriormente denominado “dominio C2” comprende desde el residuo 418 hasta el 586 y es capaz de interactuar con Ca^{+2} y fosfolípidos. Finalmente un dominio IV o también llamado PEF, desde el aminoácido 650 hasta el 821, tiene diversos sitios de unión a calcio iónico (20,21). El dominio IV o dominio PEF está compuesto por 5 motivos EF: El EF 1 incluye desde el aminoácido 649 al 683, EF 2 desde 692 hasta el 725, EF 3 desde 722 al 757, EF 4 del 761 al 790, EF 5 desde el aminoácido 791 al 821 (20) (Figura 1).

Se ha propuesto que las uniones de Ca^{+2} a determinados dominios EF podrían promover un cambio en la conformación de la región NS, lo que podría acelerar su clivaje. Sin embargo aún se desconoce la estructura de otras regiones importantes de la proteína como por ejemplo su secuencia de inserción (IS1) que podría ser necesaria para el entendimiento de su función. (20)

La proteína calpaína-3 se diferencia de las otras calpaínas en que posee 3 regiones que las otras carecen. Estas regiones son la región NS ubicada en el extremo N-terminal que abarca desde el residuo 1 hasta el 47. Dentro del dominio II se encuentra la región IS1 que según la literatura podría cumplir una función propeptídica interna que controla el acceso al sitio activo y se encuentra entre los aminoácidos 268 al 315 (22). Entre el dominio CBSW (dominio III) y dominio PEF (dominio IV) se ubica la región IS2 que se ha visto que interactúa uniéndose a la proteína titina abarcando entre los aminoácidos 587 y 649. (19,20)(Figura 1).

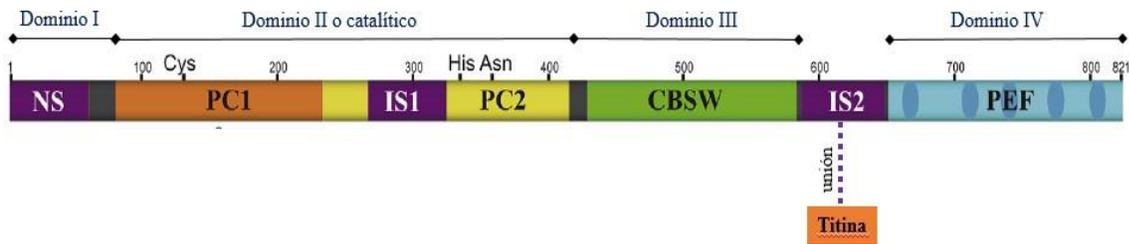


Figura 1: Estructura de calpaína-3. Se indica la posición de cada uno de los dominios, los residuos de la triada catalítica Cys129, His334 y Asn358. Además del sitio de unión a titina a través de la región IS2.

b. Activación y autólisis de calpaína-3.

La activación de calpaína-3 no se encuentra completamente descrita en la literatura, sin embargo se han propuesto algunos modelos funcionales que comparten criterios que se deben cumplir para que la proteína sea activa.

En el trabajo de Kramerova y colaboradores (15) describen que en calpaína-2 cuenta con 3 residuos activos catalíticamente, Cys105, His262 y Asn286, los cuales en conjunto forman la triada catalítica. Estos residuos en calpaína-3 corresponden a Cys129, His 334 y Asn358 (15). El dominio II o cuerpo catalítico de calpaína-3 es común para todas las calpaínas y los residuos críticos de unión a Ca^{+2} están bien conservados (22), lo que sugiere que el alineamiento dependiente de Ca^{+2} a los sitios activos es una parte intrínseca del mecanismo de activación de la familia de las calpaínas (22)

De esta forma, se propone un modelo de activación basándose en dos etapas (15,22)

(Figura 2):

1) Unión de iones de Ca^{+2} a calpaína-3 y clivaje intramolecular: Primero se unen iones de Ca^{+2} a los dominios III y IV para romper la fuerza electrostática de la proteína. También se unen a los residuos Cys129, His334 y Asn358, con el fin de provocar cambios conformacionales tendientes a disminuir la distancia entre los residuos catalíticos desde 10.5 Å a 3.7 Å, de esta manera se forma apropiadamente la triada catalítica. Seguido de la unión de los

iones de Ca^{+2} y la formación del sitio de activo, ocurre el clivaje intramolecular en los extremos N-terminal de las regiones NS e IS1 (15,22) .

2) Clivaje intermolecular: Este clivaje ocurre en los extremos C-terminal de las regiones NS e IS1. Lo que sugiere que calpaína-3 quedaría totalmente activa después del clivaje (15,22).(Figura 2)

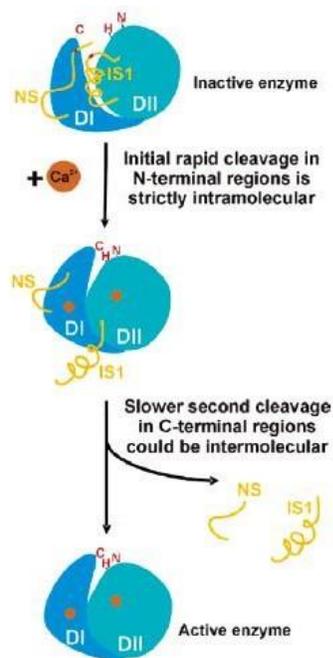


Figura 2: Modelo del mecanismo de activación de CAPN3 propuesto por García Diaz et al (22). La primera etapa consta de la unión de iones de Ca^{+2} (esfera color naranja) a ambas subunidades del cuerpo catalítico de la proteína (DII), seguido del movimiento y formación de la triada catalítica (residuos de color rojo) continuando con el clivaje intramolecular de los extremos N-terminal de las regiones NS e IS1. En la segunda etapa ocurre el clivaje intermolecular de los extremos C-terminal de las regiones NS e IS1, finalmente obteniendo una enzima totalmente activa.

Posteriormente, Yasuko Ono y colaboradores (23) propusieron otro modelo de activación de calpaína-3 (**Figura 3**), donde calpaína-3 se activaría a través de la autólisis de la misma (19). Tiene dos tipos de activación, la intramolecular (iM) y la extramolecular (eM) las

que son detalladas a continuación. Primero ocurre una activación intramolecular (iM) que depende de la unión de iones de Ca^{+2} en una concentración aproximada de 0,1mM. Para continuar con la activación de calpaína-3 se debe realizar la activación extramolecular (eM) que permite a calpaína entrar en contacto con el sustrato (19). La región IS1 tiene los sitios catalíticos en los residuos G275, S297 y Q323 (23).

La regulación de la actividad de calpaína-3 en general consta de las siguientes etapas:

(Figura 3) (23,19)

- a) El fragmento pre-autolítico, identificado como FL-CAPN3 en **figura 3**, es regulado por distintos factores, como por ejemplo una concentración fisiológica de Ca^{+2} intracelular. Al activarse la iM produce la autólisis o “corte” de la región IS1, sin embargo no causa una inmediata disociación de los fragmentos de la proteína, formando la proteína nFL-CAPN3.
- b) Cada fragmento nFL-CAPN3 se activa a través de eM. Esto permite que calpaína-3 sea capaz de funcionar como proteasa sin la necesidad de la disociación de la proteína y entre en contacto con sus sustratos.
- c) nFL-CAPN3 se inactiva ya sea por la disociación de sus componentes N31K y C58K, y/o una predominante reacción degradativa de la autólisis de IS2 y de otros sitios con la ayuda de otras proteasas.
- d) Los fragmentos N31K y C58K recuperan su actividad por un complejo de complementación intermolecular *de novo* (iMOC CAPN3). Específicamente el complejo iMOC1 regula la actividad entre ambos fragmentos, e iMOC2 regula la actividad entre FL-CAPN3 y uno de los fragmentos, ya sea N31K o C58K. Al mismo tiempo, cada fragmento autolítico es capaz de acelerar la autólisis de FL-CAPN3 por iMOC2-N e iMOC2-C. Esto aumenta la autólisis produciendo finalmente la inactivación. Actualmente se desconoce el mecanismo molecular por el cual actúa iMOC CAPN3.

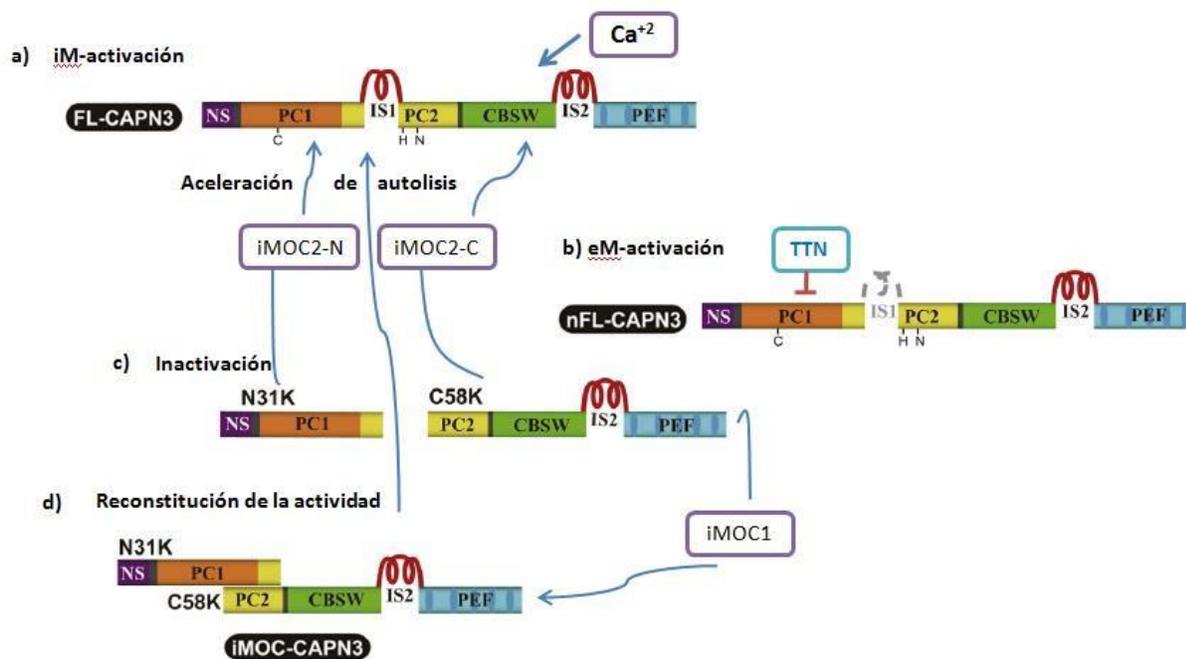


Figura 3: Modelo del ciclo autocatalítico de CAPN3 sugerido por Yasuko Ono et al, 2016 (19)

Experimentos en cultivos primarios de músculo estriado se evaluó la localización celular de los fragmentos producidos por la autólisis de calpaína-3. Se encontró que estos fragmentos se localizaban predominantemente distribuidos de forma difusa en la fibra muscular esquelética, a diferencia de lo que ocurría con la proteína completa de calpaína-3 que se localiza en la línea M del sarcómero (23).

c. Interacciones de calpaína-3 con otras proteínas.

Titina: Es una proteína de 3.960 kDa que actúa como proteína de andamiaje ayudando el ensamblaje miofibrilar durante la miogénesis, como un “resorte” determinando la elasticidad pasiva del músculo y como un sensor mecánico cubriendo varias funciones de señalización (24). Calpaína-3 se une específicamente en las regiones N2A y línea-M de titina cumpliendo un rol de vía de transducción mecanosensorial (**Figura 4**). Durante el estiramiento del sarcómero, calpaína-3 se acumula en la región N2A, donde se forma un complejo proteico en respuesta a la

estimulación mecánica. El fragmento de titina ubicado en la región de la banda I se estira en forma de “resorte” a medida que el sarcómero se extiende, por lo que es una “escala” ideal para sentir la extensión/contracción del sarcómero, en cuyo proceso participan varias moléculas (19). La interacción entre titina y calpaína-3 hace que ésta última se estabilice evitando su autólisis de forma rápida, por lo tanto, titina podría regular la función proteolítica de CAPN3 (25).

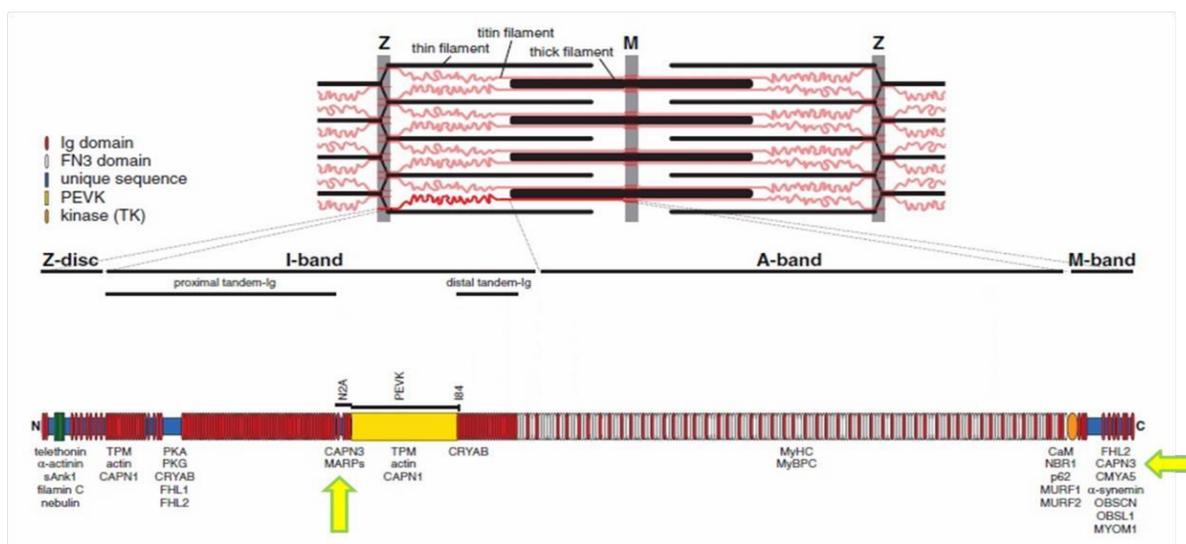


Figura 4: Esquema del sarcómero y de proteína titina. La proteína titina se identifica en color rojo. Los sitios de unión de calpaína-3 a titina, la región N2A y línea-M se encuentran señalados con una flecha color amarillo (Savarese M, et al, 2016) (24)

Proteínas de la línea-Z: Calpaína-3 también se localiza en la línea-Z modificando su posición dependiendo de la longitud del sarcómero. En caso que se extienda el sarcómero, CAPN3 se vuelve menos abundante en las líneas M y más abundante en la región N2A (25) (**Figura 5**).

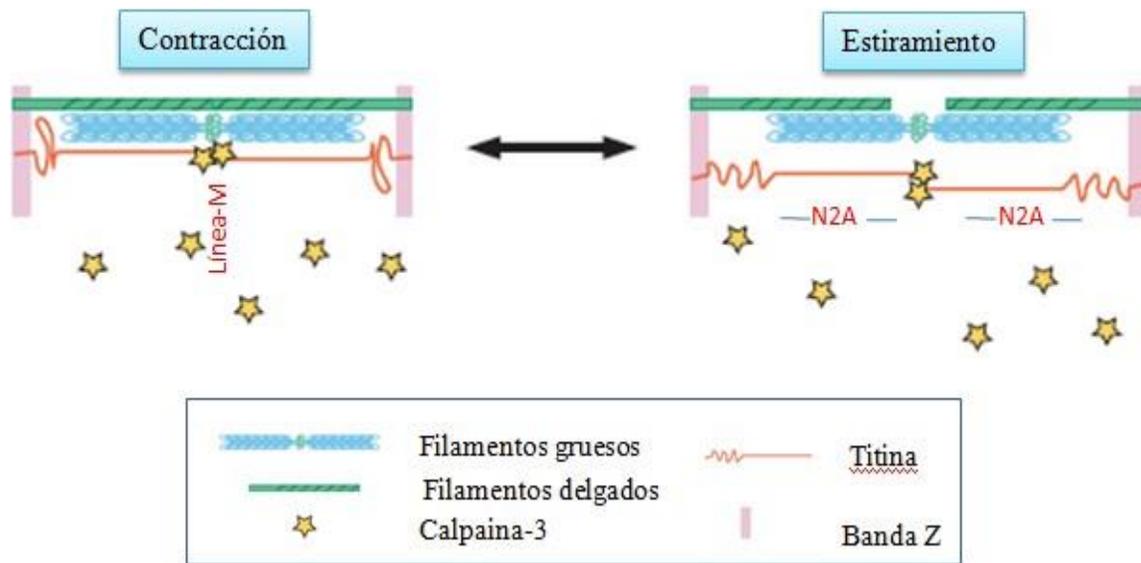


Figura 5: Modelo de ubicación y traslado de calpaína-3 en el sarcómero durante la contracción y relajación muscular. En caso de una extensión o sobre-extensión sarcomérica, calpaína-3 se acumula en las regiones N2A de titina, siendo liberado de las líneas M y/o reclutado desde el citosol. (Ojima K., et al, 2007) (25)

Se ha descrito que la actividad proteasa de calpaína-3 se necesita durante el ejercicio muscular más que después de éste (26). La activación de calpaína-3 durante e inmediatamente después del ejercicio desencadena transducciones mecano sensoriales, mientras que la autólisis después del ejercicio sugiere que cumple funciones tales como remodelamiento sarcomérico (19)

Disferlina: En estudios previos se confirmó la asociación entre las proteínas disferlina, calpaína-3, además de anexina A, A2 y otras proteínas. Éstas forman un complejo proteico de reparación de membrana que se observa en el modelo propuesto por Glover y Brown (27)(Figura 6)

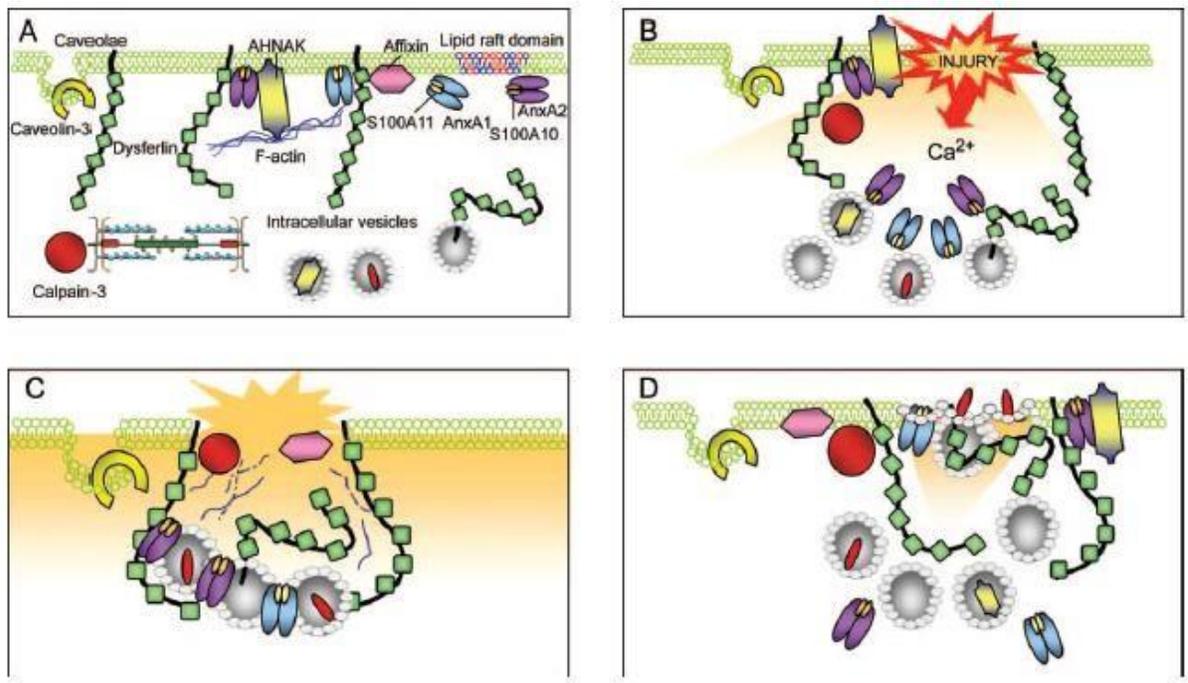


Figura 6: Modelo del complejo de reparación de membrana en músculo esquelético de Glover y Brown (27): A) En una fibra muscular normal, disferlina se localiza por su dominio transmembrana C-terminal a las vesículas citoplasmáticas y el sarcolema donde se asocia con AnxA1 y AnxA2, AHNAK, affinixina y caveolina-3. Calpaína-3 se mantiene inactiva mientras mantenga la interacción con la línea N2A de titina. Las proteínas anexinas A2 y A1 se encuentran en los dominios de membrana de lípidos raft y no raft, respectivamente. Además estas proteínas forman un complejo heterotetramérico unidas a sus respectivas proteínas S100. Anexina A2 también forma un complejo multimérico junto a AHNAK y actina con el fin de unirse a la membrana plasmática, cuyo proceso está regulado por iones de Ca^{+2} . Afixina se encuentra tanto en el sarcolema como en citoplasma donde se une a disferlina. Caveolina-3 es un componente principal de la membrana caveolar en músculo esquelético. B) Injuria en la membrana, la entrada de Ca^{+2} aumenta la concentración local de Ca^{+2} , desencadenando la respuesta de reparación de membrana. El flujo de Ca^{+2} es la primera señal de activación para calpaína-3. Calpaína-3 puede contribuir a la respuesta de la reparación de membrana mediante la escisión de las proteínas anexinas en su región N-terminal, o clivando proteínas del citoesqueleto tales como talina y vimentina para mediar el desensamblaje de actina del

citoesqueleto dañado. C) AnxA1 y Anx2 agregan las vesículas intracelulares para formar un parche de endomembrana que es transportado al sitio de la injuria. Afixina facilita el tráfico vesicular, a través de la reorganización desde el borde de la injuria. D) Las moléculas de disferlina presentes en las vesículas de reparación y en la membrana plasmática median el acoplamiento y la fusión del parche sellando la brecha de la membrana evitando el flujo adicional de iones de Ca^{+2} .

Diagnóstico molecular y genético de la calpainopatía.

El diagnóstico molecular de LGMD2A se establece principalmente a través del análisis de la proteína por WB en músculo y análisis genéticos (8,14). Sin embargo, alrededor del 20-30% de los pacientes con LGMD2A muestra una cuantificación normal de la proteína, pero que es funcionalmente inactiva debido a mutaciones que no afectan su síntesis, sino que la actividad autocatalítica o proteolítica de la proteína (8), lo que puede inducir a un diagnóstico erróneo al sólo identificar la expresión de la proteína.

Las mutaciones que han sido encontradas en *CAPN3* son de distintos tipos. Estas pueden ser sustituciones, conduciendo a un codón de término prematuro (*stop*) en un 5,6%; sustituciones en sitios de splicing (*splice*) en un 12,7% ; mutaciones con corrimiento del marco de lectura (*frameshift*) en un 19,4%, deleciones sin corrimiento del marco de lectura (*in frame deletion*) en un 4,2% o mutaciones sin sentido (*missense*) en un 58,1% (15).

Las mutaciones *missense* a menudo producen pérdida de la actividad proteolítica de calpaína-3 (9), aunque no siempre es lo que ocurre (15). Distintas mutaciones *missense* localizadas en los dominios III y IV de calpaína-3 afectan su actividad enzimática (8), en consecuencia se produce un funcionamiento ineficiente de la fibra muscular (15).

Las mutaciones en *CAPN3* abarcan casi toda la longitud del gen de una manera heterogénea. En algunos exones las mutaciones son escasas mientras que se observan agrupamientos de mutaciones en subconjuntos de exones. Con respecto a las mutaciones *missense*, parecen formar grupos con mayor densidad cerca de los dominios II y III, mientras que en las regiones IS1 e IS2 se observan una baja densidad de recurrencia de mutaciones *missense* (15)(Figura 7)

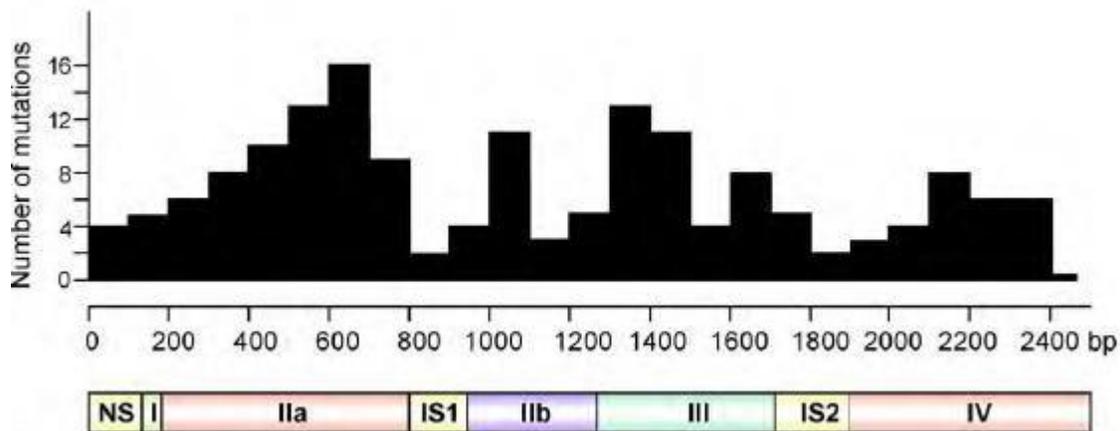


Figura 7: Distribución de las mutaciones *missense* patogénicas a lo largo de la región codificante del gen *CAPN3* y sus dominios proteicos. Las mutaciones en *CAPN3* ocurren predominantemente en los dominios II y III (Kramerova, et al, 2006) (15)

A partir del año 2009 se han identificado en Chile mutaciones en *DYSF* en pacientes con sospecha clínica de LGMD2B (10,28), sin embargo se han encontrado relativamente pocos pacientes con mutaciones en *CAPN3*, posiblemente debido a lo dificultoso de su diagnóstico. Más recientemente se ha comunicado el hallazgo de la mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT y c.107delG en el gen *CAPN3* (12). La mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT se identificó en dos hermanas con genotipo homocigoto (12) y se encuentra ampliamente reportada en la literatura(29), mientras que c.107delG no ha sido descrita previamente. La mutación c.107delG produce el cambio p.Gly36Valfs*21 provocando un corrimiento del marco de lectura (*frameshift*). La mutación fue encontrada en estado homocigoto en un paciente, mientras que en otro, se encuentra en estado heterocigoto compuesto, junto a la variante p.Arg748Gln que es producida por el cambio nucleotídico c.2243G>A provocando una mutación sin sentido (*missense*) (12). Estas dos últimas mutaciones han sido reportadas anteriormente (**Tabla 1**)

Tabla 1: Mutaciones en el gen *CAPN3* encontradas en pacientes chilenos. La mutación p.Gly36Valfs*21 no ha sido descrita anteriormente (12).

| Pacientes | Mutación 1 | | Mutación 2 | | Genotipos |
|------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|
| | Cambio en DNA | Cambio en proteína | Cambio en DNA | Cambio en proteína | |
| P 1 | c.107delG | p.Gly36Valfs*21 | c.2243G>A | p.Arg748Gln | Heterocigoto compuesto |
| P 2 | c.107delG | p.Gly36Valfs*21 | c.107delG | p.Gly36Valfs*21 | Homocigoto |
| P3 y P3.1 | c.2362_ ^(a) | p.Arg788Serfs*14 | c.2362_ ^(a) | p.Arg788Serfs*14 | Homocigoto |

(a): c.2362_2363delAGinsTCATCT

La mutación c.2243G>A ha sido comunicada en numerosos reportes, pero no se ha realizado una evaluación funcional de calpaína-3 en los pacientes portadores de esa mutación (21,29,30). El ensayo funcional de calpaína-3 es una herramienta complementaria al diagnóstico en aquellos pacientes en que se sospecha que las mutaciones en *CAPN3* afectan a la funcionalidad de la proteína (8).

En este contexto, esta tesis tiene dos objetivos principales. Primero, realizar la pesquisa de mutaciones en *CAPN3* en los pacientes chilenos de nuestra cohorte con fenotipo de LGMD recesiva orientado a pacientes con sospecha de LGMD2A; y segundo, en aquellos pacientes con mutaciones en *CAPN3*, se evaluará la potencial patogenicidad de las mutaciones *missense* encontradas a través modelos teóricos de predicción de patogenicidad, la que será finalmente corroborada a través de un ensayo enzimático funcional de la proteína calpaína-3. Secundariamente, se describirá la presencia de otras eventuales mutaciones causales de LGMD diferentes a las de *CAPN3*, pesquisadas en los 13 pacientes chilenos incluidos en el estudio.

HIPÓTESIS

Algunos pacientes chilenos con LGMD2 cuyo fenotipo clínico-patológico es inespecífico, presentan mutaciones patogénicas en el gen *CAPN3*, las que resultan en una disminución de la actividad autocatalítica de la proteína calpaína-3.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Detectar mutaciones en el gen *CAPN3* en pacientes con fenotipo inespecífico de LGMD2 y comprobar su efecto sobre la actividad autocatalítica.

Objetivos Específicos:

1. Identificar sujetos homocigotos o heterocigotos compuestos para variantes genéticas del gen *CAPN3* en una cohorte de pacientes con diagnóstico sugerente de LGMD2.
2. Evaluar el efecto de las mutaciones patogénicas de tipo “*missense*” sobre la actividad autocatalítica de *CAPN3* mediante un ensayo funcional de la proteína calpaína-3.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de pacientes.

Se seleccionaron 13 pacientes con características clínicas sugerentes de LGMD2 basándose en los siguientes criterios:

a) **Criterios de inclusión:**

- Pacientes con diagnóstico clínico de LGMD2 dado por debilidad proximal a nivel escapular y pélvico.
- Niveles plasmáticos de creatina quinasa (CK) cuyo rango sea compatible con el diagnóstico.
- Biopsia muscular con alteraciones distróficas inespecíficas y/o patrón radiológico de resonancia magnética (RM) muscular no concluyente.

b) **Criterios de exclusión:**

- Pacientes con debilidad de predominio distal, compromiso facial, mental y cardíaco.
- Pacientes con diagnóstico histopatológico concluyente para otra forma de LGMD2, en caso que se cuente con ello.

Los 13 pacientes fueron seleccionados de la cohorte del proyecto Fondecyt N°1151383 que se lleva a cabo en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH), Santiago, Chile, y que se enfoca en el estudio de las distrofias musculares de cinturas en Chile.

La evaluación clínica fue realizada por el especialista Dr. Jorge Bevilacqua Rivas, neurólogo del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Los pacientes fueron evaluados a través de la Medición de la Función Motora (M.F.M) que evalúa la capacidad funcional de los pacientes a nivel de cabeza, tronco y extremidades.

El comité ético de HCUCH y la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) aprobaron este estudio.

2. Toma de muestra:

a. Análisis genético.

Se extrajo sangre periférica y se recolectó en tubos Vacutainer™ con anticoagulante EDTA K2 en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Las muestras fueron transportadas al laboratorio del Dr. Patricio González-Hormazábal en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

b. Análisis proteico:

Dependiendo de la evaluación clínica, se realizó una biopsia muscular abierta de músculo deltoides o cuádriceps en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile. La biopsia consistió en varios fragmentos de músculo esquelético de un tamaño aproximado de 0,8 x 0,4 x 0,3 cm. Los fragmentos extraídos fueron mantenidos en hielo y trasladados hasta el laboratorio de metabolismo celular y bioenergética en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile donde fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C.

3. Extracción de DNA.

La extracción de DNA se realizó utilizando el método SaltingOut a partir de sangre periférica. Posteriormente la muestra de DNA se resuspendió en Buffer Tris-EDTA. El DNA se cuantificó a 260 nm usando un espectrofotómetro de microvolumen. Se preparó una dilución aproximada de 20 ng/ul, cuya cuantificación se confirmó a través de una cuantificación fluorométrica con el kit Qubit® ds DNA HS Assay de Thermo Fisher Scientific.

4. Secuenciación del gen *CAPN3* y 14 genes relacionados.

Se secuenció el gen *CAPN3* junto a 14 otros genes relaciones mediante secuenciación masiva. La secuenciación masiva se realizó en tres etapas: enriquecimiento de exones y preparación de librerías, PCR emulsión y secuenciación de librerías. El método de enriquecimiento se realizó mediante PCR múltiplex, cuyos partidores (panel de secuenciación) fueron diseñados con la herramienta Ion Ampliseq Designer 5.6.3 (Thermo Fisher). El diseño consideró amplificar los exones del gen y >10 pb de regiones intrónicas circundantes, con

amplicones de un rango entre 125 – 375 pb. El panel de secuenciación además contiene partidores para enriquecer secuencias exónicas de 14 genes causales de las formas más frecuentes de LGMD y que son parte de los diagnósticos diferenciales más probables para calpainopatía (**Tabla 2**). El enriquecimiento por PCR multiplex y preparación de librería se realizó con el kit Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher). El PCR emulsión para la amplificación clonal de DNA en esferas se realizó con Ion PGM OT2 Hi-Q view kit (Thermo Fisher) en un equipo OneTouch 2. Finalmente se realizó la secuenciación en un secuenciador Ion Personal Genome Machine con el kit de secuenciación Ion PGM Hi-Q view (Thermo Fisher). La cantidad de muestras a secuenciar por corrida se calculó para lograr una profundidad de cobertura mínima de 100X. El llamado de variantes se realizó con la rutina TorrentVariantCaller, implementada en Torrent Suite Software.

El panel de secuenciación permitió abordar las distrofias de cinturas que se estudian en la cohorte del proyecto Fondecyt N°1151383. Si bien el objetivo principal de la aplicación del panel de secuenciación para esta tesis es identificar los pacientes con mutaciones en *CAPN3*, dicho panel permite además abarcar otros posibles diagnósticos que potencialmente podrían encontrarse en nuestro grupo de pacientes.

Se seleccionaron como potencialmente patogénicas las variantes con un MAF (*Minor Allele Frequency*) inferior a 0,01 para continuar en el análisis; las variantes con un MAF superior a 0,01 fueron consideradas no patogénicas. La significancia clínica y patogenicidad fue evaluada en las bases de datos dbSNP y ClinVar (32). Además la patogenicidad de las variantes *missense* fue analizada por SIFT (<http://sift.jcvi.org>) y Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

Las secuencias de referencia utilizadas para el gen *DYSF* fue NM_001130987, para *CAPN3*, NM_000070.2 y para el gen *ANO5* fue la secuencia NM_213599.2.

Tabla 2: Genes incluidos en el panel de secuenciación relacionados con LGMD. Para cada gen se indica la proteína que codifica y la patología producida en caso de mutación. Los mismos corresponden a las formas más frecuentes de LGMD.

| Gen | Proteína | Patología |
|---------------|---|---|
| <i>LMNA</i> | Lamina A/C | LGMD 1B |
| <i>CAV3</i> | Caveolina 3 | LGMD1C |
| <i>DNAJB6</i> | Homologo DnaJ/Hsp40 miembro 6, subfamilia B | LGMD1D |
| <i>CAPN3</i> | Calpaina-3 | LGMD2A |
| <i>DYSF</i> | Disferlina | LGMD2B |
| <i>SGCG</i> | γ - Sarcoglicano | LGMD2C |
| <i>SGCA</i> | α - Sarcoglicano | LGMD2D |
| <i>SGCB</i> | β - Sarcoglicano | LGMD2E |
| <i>SGCD</i> | δ - Sarcoglicano | LGMD2F |
| <i>FKRP</i> | Proteína relacionada a Fukutina | LGMD2I |
| <i>ANO5</i> | Anoctamina 5 | LGMD2L |
| <i>FKTN</i> | Fukutina | LGMD2M |
| <i>EMD</i> | Emerina | Distrofia muscular Emery-Dreifuss, ligada a X |
| <i>FHL1</i> | four and a half LIM domains 1 | Distrofia muscular N°6 Emery-Dreifuss, ligada a X |
| <i>DES</i> | Desmina | LGMD2R/LGMD1E |

Las mutaciones c.2362_2363delAGinsTCATCT, c.107delG, c.2105C>T en el gen *CAPN3* fueron confirmadas a través de secuenciación por Sanger. Se diseñaron partidores utilizando la plataforma <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>, para amplificar la región del gen que contiene las mutaciones encontradas (**Tabla 3**). Lo partidores CAPN3_2362insTC, CAPN3_107delG, CAPN3_2105 identifican, respectivamente, las mutaciones c.2362_2363delAGinsTCATCT, c.107delG y c.2105C>T.

Tabla 3: Partidores utilizados para secuenciar por Sanger las mutaciones encontradas.

| Nombre de partidor | Partidor Directo (5' - 3') | Tamaño amplicón (pb) |
|--------------------|----------------------------|----------------------|
| | Partidor Reverso (5' - 3') | |
| CAPN3_2362insTC | GGCTTCTCACTTTCCCTTCC | 440 |
| | TGGGCCTAAAGAGGTCATTG | |
| CAPN3_107delG | ATCTGTGGCTCCAAGGACAG | 545 |
| | CTCTCCTCCCTGCTTCACAC | |
| CAPN3_2105 | TGAACCATGACCCTCCTCTC | 461 |
| | GAGAAGCACAGGGGTTAGGG | |

En el protocolo de PCR se utilizó la enzima RBC Taq DNA Polymerase. Se realizó un programa Touch Down (TD= 72°C – 63°C /-1° por ciclo): Denaturación inicial a 94°C x 3:00; con 10 ciclos de denaturación a 94°C x 0:10, alineamiento a (TD x 00:10) y elongación a 72°C x 0:20. Además de 20 ciclos con denaturación a 94°C x 0:10, elongación a 62°C x 0:10 y elongación a 72°C x 0:20). Elongación final a 72°C x 1:00 y detención de reacción a 10°C por 2:00 minutos.

El tamaño de los fragmentos y la especificidad de la reacción se efectuó mediante electroforesis de los productos de PCR se realizó un gel al 1,5% de agarosa, se tiñó con SYBR™ Gold nucleic acid gel stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), 5X DNA loading buffer blue, marca BioLine y un estándar de pares de bases AccuRuler 100 pb Plus DNA RTU Ladder marca Maestrogen. Se corrió a 120 Volt en una fuente de poder POWER PAC1000 marca Bio-Rad en cámara de electroforesis AAHOEFER®.

La purificación de los productos de PCR se realizó con Favor Prep®, PCR Clean-Up Mini kit, BIOTECH CORP y posteriormente enviado a secuenciar a Macrogen.

5. Ensayo funcional.

En el caso de una mutación de tipo *missense*, el cambio de aminoácido puede sólo alterar la función de la proteína y no su peso molecular al mantener intacta la cadena aminoacídica. Para detectar el mal funcionamiento de CAPN3 es necesario realizar un ensayo funcional. Uno de los ensayos funcionales propuestos es evaluar la capacidad autocatalítica de la proteína, cuya función se ha encontrado ausente en algunos pacientes con mutación *missense* en el gen *CAPN3* (21).

Para realizar el ensayo funcional, se incubó un fragmento de músculo de 15 a 20 mg por 10 min en suero fisiológico a temperatura ambiente y luego se homogenizó en buffer de lisis de manera mecánica y con sonicador de vástago teniendo la precaución de mantener la muestra siempre en hielo. El buffer de lisis contiene 20mM Tris (pH 7,8), 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1% Triton-X-100, 10% Glicerol, 1mM EDTA, 1mM ditietreitol, inhibidor de proteasas y fosfatasas. Luego de la incubación de la muestra muscular a temperatura ambiente se realizó un WB convencional.

La electroforesis se realizó a 120 Volt en un gel de poliacrilamida (acrilamina 40%: bis-acrilamida 29:1). El gel separador se preparó al 10% de poliacrilamida en buffer 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% SDS, 0,4% Glicerol y gel concentrador al 4% de poliacrilamida en buffer 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% Glicerol.

La transferencia se realizó a una membrana de PDVF en una cámara semi-húmeda TRANS-BLOT® SD SEM –DRY TRANSFER CELL. Se evaluó la transferencia con solución Rojo Ponceau S. Una vez comprobada la transferencia de proteínas se incubó con los anticuerpos anti-calpaina-3 mouse CALP12A2 y CALP2C4 (Novocastra, Leica) en una dilución 1:800 toda la noche a 4°C. Para control de carga se utilizó GAPDH rabbit dilución 1:1000 (Cell Signaling). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anticuerpo goat anti-rabbit IgG y anticuerpo anti-mouse IgG (Thermo Scientific) en una dilución de 1:2000. Finalmente se realizó el revelado a un film a través de la detección de sustrato quimioluminiscente con Kit Super Signal® West Pico Chemiluminiscent Substrate.

RESULTADOS.

1) Datos clínicos:

En Tabla 4 se resumen las características clínicas de los pacientes, tales como edad actual, sexo, edad de inicio de los signos, síntomas y niveles de CK que presentó el paciente al momento de realizar la consulta (**Tabla 4**).

2) Análisis genético:

Se realizó la secuenciación masiva para el gen *CAPN3* y los 14 genes relacionados (*LMNA, CAV3, DNAJB4, CAPN3, DYSF, SGCG, SGCA, SGCB, SGCD, FKRP, ANO5, FKTN, EMD, FHL1, DES*) en los 13 pacientes estudiados. Las mutaciones probablemente patogénicas y el número de polimorfismos encontrados en los genes del panel se describen en **Tabla 5**.

Las mutaciones clasificadas como patogénicas encontradas en los genes distintos a *CAPN3*, hasta el momento no han sido confirmadas por secuenciación de Sanger, sin embargo se analizó su significancia clínica.

En el gen *DYSF* se encontraron 4 mutaciones posiblemente patogénicas en los pacientes P5 y P10. En el paciente P5 se encontró la variante no descrita c.5959delG en estado heterocigoto compuesto que sería posiblemente patogénica junto a la variante c.4621C>T de tipo sinónimo cuya significancia clínica está descrita por ClinVar como “patogenicidad de interpretación conflictiva” con 5 registros como “benigna”, 1 como “posiblemente benigna” y 2 como “significado incierto”. En el paciente P10 se encontraron en estado heterocigoto compuesto, las mutaciones c.386G>A y c.3002A>C. La variante c.386G>A está descrita en ClinVar con una significancia clínica de “posiblemente patogénica” patogenicidad de interpretación conflictiva con 5 registros como benigna, 1 como posiblemente benigna y 1 registro como posiblemente patogénica, mientras que c.3002A>C está descrita en ClinVar con 4 registros como “significado incierto”.

Tabla 4: Características clínicas más importantes de los pacientes estudiados por secuenciación masiva.

| Paciente | Edad actual | Sexo | Edad de inicio | Síntomas | CK | Otros hallazgos |
|----------|-------------|------|--------------------|--|---------------|--|
| P4 | 66 a | M | 49 años | Pérdida progresiva de fuerza a nivel proximal en cintura escapular y pélvica | 894 U/l | Desde 2012 camina con apoyo de un bastón ortopédico. Persiste debilidad y fatigabilidad muscular. EMG: Potenciales miopáticos en músculos de la cintura escapular. |
| P5 | 46 a | F | 30 años | Debilidad al subir escaleras | 900 U/l | EMG: Probable DM proximal a nivel extremidades inferiores |
| P6 | 36 a | F | 28 años | Debilidad en extremidades inferiores, luego superiores. | 3000/4000 U/l | En 2013 no logra caminar, se incorpora con apoyo. RM: Hallazgos superpuestos de LGMD sin poder descartar miopatía inflamatoria. Biopsia: normal. |
| P7 | 44 a | M | 32 años | Intolerancia al ejercicio y mialgias progresivas | 900-2000 U/l | EMG: Miopatía de predominio proximal |
| P8 | 54 a | M | Adulthood (>45 a) | Debilidad progresiva con un año de evolución | 8419 U/l | EMG: Miopatía asociada a neuropatía de grado leve |
| P9 | 35 a | F | Infancia | Debilidad progresiva de extremidades inferiores con 20 años de evolución | 3558 U/l | EMG: miopático |
| P10 | 46 a | F | Adulthood (>35 a) | Debilidad muscular generalizada. Calambres | 417 U/l | EMG: miopático; RM: compatible con LGMD |
| P11 | 54 a | F | 50 a | Debilidad al subir escaleras, lentamente progresivo | 466 U/l | RM con signos miopáticos. EMG compatible con miopatía. |
| P12 | 25 a | M | Infancia (10 años) | Comienza a marchar en puntas de pie, fatigabilidad al ejercicio, dolor en zonas posteriores de las pantorrillas durante actividad física | 4.100 U/l | RM: Por su patrón impresiona disferlinopatía |

Continuación de Tabla 4.

| Pacientes | Edad | Sexo | Edad de inicio | Síntomas | CK | Otros hallazgos |
|-----------|------|------|---------------------|--|-----------|--|
| P13 | 30a | F | Infancia (8 años) | Debilidad y dolor en pantorrillas, debilidad subir escaleras. | 322 U/l | Progresión generalizada, sin afección facial. Padres consanguíneos (primo-hermanos) RM: Severa infiltración grasa en todos los músculos estudiados. ECC: Normal |
| P14 | 45 a | M | Adulthood (23 años) | Dificultad para caminar, correr, subir escaleras, levantarse de la cama o silla. | - | Hace dos años usa bastón para caminar. Hermano mayor de 52 años en silla de ruedas desde los 26 años. |
| P15 | 45 a | M | Adulthood | Dolor lumbar, Debilidad proximal de cintura y peroneal | - | RM: Signos de miopatía en todos los segmentos estudiados. Sospecha de miopatía miofibrilar (Desminopatía) |
| P16 | 33 a | M | Adulthood (29 años) | Debilidad proximal en extremidades inferiores de forma progresiva. | 5.379 U/l | Sin antecedentes familiares RM: Signos de miopatía en extremidades inferiores, sospecha de LGMD2A. ECC: Normal EMG: Algunos elementos miopáticos de predominio proximal en ambas extremidades de preferencia superior. |

F: Femenino; M: Masculino; DM: Distrofia muscular; EMG: Electromiografía; RM: Resonancia Magnética de cuerpo completo; ECC: Electrocardiograma; - : datos no disponible; CK normal <200 U/l

Tabla 5: Variantes encontradas en los genes incluidos en el panel de secuenciación y de las posibles mutaciones patogénicas en los genes disferlina (*DYSF*), calpaina-3 (*CAPN3*) y anoctamina 5 (*ANO5*).

| Paciente | Polimorfismos (Gen/(Número de SNPs)) | Mutaciones posiblemente patogénicas (Gen) | |
|----------|---|--|-----------------------------|
| | | Cambio en DNA | Cambio en proteína |
| P 4 | <i>LMNA</i> (0), <i>DYSF</i> (3), <i>DES</i> (1), <i>CAV3</i> (0), <i>SGCB</i> (0), <i>SGCD</i> (0), <i>DNAJB6</i> (2), <i>FKTN</i> (0), <i>ANO5</i> (1), <i>SGCG</i> (1), <i>CAPN3</i> (2), <i>SGCA</i> (1), <i>FKRP</i> (0), <i>FHL1</i> (0), <i>EMD</i> (0) | Ninguna | |
| P 5 | <i>LMNA</i> (0), <i>DYSF</i> (2), <i>DES</i> (2), <i>CAV3</i> (1), <i>SGCB</i> (2), <i>SGCD</i> (1), <i>DNAJB6</i> (0), <i>FKTN</i> (2), <i>ANO5</i> (4), <i>SGCG</i> (0), <i>CAPN3</i> (1), <i>SGCA</i> (1), <i>FKRP</i> (1), <i>FHL1</i> (0), <i>EMD</i> (0) | <i>DYSF</i> | |
| | | c.4621C>T c.5959delG | p.Leu1502 = p.Asp1987fs |
| P 6 | <i>LMNA</i> (0), <i>DYSF</i> (2), <i>DES</i> (1), <i>CAV3</i> (2), <i>SGCB</i> (0), <i>SGCD</i> (1), <i>DNAJB6</i> (1), <i>FKTN</i> (0), <i>ANO5</i> (1), <i>SGCG</i> (0), <i>CAPN3</i> (1), <i>SGCA</i> (1), <i>FKRP</i> (0), <i>FHL1</i> (0), <i>EMD</i> (0) | Ninguna | |
| P 7 | <i>LMNA</i> (2), <i>DYSF</i> (4), <i>DES</i> (1), <i>CAV3</i> (0), <i>SGCB</i> (0), <i>SGCD</i> (0), <i>DNAJB6</i> (1), <i>FKTN</i> (0), <i>ANO5</i> (0), <i>SGCG</i> (0), <i>CAPN3</i> (2), <i>SGCA</i> (1), <i>FKRP</i> (0), <i>FHL1</i> (0), <i>EMD</i> (0) | Ninguna | |
| P 8 | <i>LMNA</i> (1), <i>DYSF</i> (0), <i>DES</i> (1), <i>CAV3</i> (0), <i>SGCB</i> (0), <i>SGCD</i> (0), <i>DNAJB6</i> (3), <i>FKTN</i> (0), <i>ANO5</i> (1), <i>SGCG</i> (1), <i>CAPN3</i> (2), <i>SGCA</i> (1), <i>FKRP</i> (0), <i>FHL1</i> (0), <i>EMD</i> (0) | Ninguna | |
| P 9 | <i>LMNA</i> (0), <i>DYSF</i> (0), <i>DES</i> (1), <i>CAV3</i> (1), <i>SGCB</i> (0), <i>SGCD</i> (0), <i>DNAJB6</i> (1), <i>FKTN</i> (0), <i>ANO5</i> (1), <i>SGCG</i> (1), <i>CAPN3</i> (2), <i>SGCA</i> (1), <i>FKRP</i> (0), <i>FHL1</i> (0), <i>EMD</i> (0) | Ninguna | |
| P 10 | <i>LMNA</i> (6), <i>DYSF</i> (23), <i>DES</i> (7), <i>CAV3</i> (1), <i>SGCB</i> (0), <i>SGCD</i> (3), <i>DNAJB6</i> (4), <i>FKTN</i> (4), <i>ANO5</i> (5), <i>SGCG</i> (7), <i>CAPN3</i> (2), <i>SGCA</i> (4), <i>FKRP</i> (0), <i>FHL1</i> (2), <i>EMD</i> (1) | <i>DYSF</i> | |
| | | c.386G>A c.3002A>C | p.Gly129Glu p.Lys1001Thr |

Continuación de Tabla 5

| Paciente | Polimorfismos (Gen/(Número de SNPs)) | Mutaciones posiblemente patogénicas (Gen) | |
|----------|---|--|-------------------------------------|
| | | Cambio en DNA | Cambio en proteína |
| P 11 | <i>LMNA</i> (1), <i>DYSF</i> (23), <i>DES</i> (7), <i>CAV3</i> (3), <i>SGCB</i> (5), <i>SGCD</i> (2), <i>DNAJB6</i> (6), <i>FKTN</i> (7), <i>ANO5</i> (9), <i>SGCG</i> (9), <i>CAPN3</i> (2), <i>SGCA</i> (2), <i>FKRP</i> (0), <i>FHL1</i> (2), <i>EMD</i> (1) | Ninguna | |
| P 12 | <i>LMNA</i> (0), <i>DYSF</i> (23), <i>DES</i> (4), <i>CAV3</i> (6), <i>SGCB</i> (5), <i>SGCD</i> (7), <i>DNAJB6</i> (6), <i>FKTN</i> (4), <i>ANO5</i> (4), <i>SGCG</i> (5), <i>CAPN3</i> (3), <i>SGCA</i> (6), <i>FKRP</i> (1), <i>FHL1</i> (2), <i>EMD</i> (0) | <i>CAPN3</i> | |
| | | c.107delG c.2362_2363delAG ^(a) | p.Gly36Valfs*21 p.Arg788Serfs*14 |
| P 13 | <i>LMNA</i> (0), <i>DYSF</i> (25), <i>DES</i> (7), <i>CAV3</i> (6), <i>SGCB</i> (5), <i>SGCD</i> (6), <i>DNAJB6</i> (4), <i>FKTN</i> (4), <i>ANO5</i> (9), <i>SGCG</i> (9), <i>CAPN3</i> (4), <i>SGCA</i> (5), <i>FKRP</i> (0), <i>FHL1</i> (3), <i>EMD</i> (2) | Ninguna | |
| P 14 | <i>LMNA</i> (1), <i>DYSF</i> (18), <i>DES</i> (7), <i>CAV3</i> (4), <i>SGCB</i> (0), <i>SGCD</i> (7), <i>DNAJB6</i> (4), <i>FKTN</i> (8), <i>ANO5</i> (1), <i>SGCG</i> (6), <i>CAPN3</i> (3), <i>SGCA</i> (4), <i>FKRP</i> (1), <i>FHL1</i> (1), <i>EMD</i> (0) | <i>CAPN3</i> | |
| | | c.2105C>T c.2362_2362delAG ^(a) | p.Ala702Val p.Arg788Serfs*14 |
| P 15 | <i>LMNA</i> (0), <i>DYSF</i> (7), <i>DES</i> (1), <i>CAV3</i> (0), <i>SGCB</i> (2), <i>SGCD</i> (0), <i>DNAJB6</i> (1), <i>FKTN</i> (0), <i>ANO5</i> (1), <i>SGCG</i> (0), <i>CAPN3</i> (1), <i>SGCA</i> (1), <i>FKRP</i> (0), <i>FHL1</i> (0), <i>EMD</i> (0) | Ninguna | |
| P 16 | <i>LMNA</i> (0), <i>DYSF</i> (31), <i>DES</i> (4), <i>CAV3</i> (6), <i>SGCB</i> (5), <i>SGCD</i> (6), <i>DNAJB6</i> (4), <i>FKTN</i> (7), <i>ANO5</i> (1), <i>SGCG</i> (6), <i>CAPN3</i> (3), <i>SGCA</i> (4), <i>FKRP</i> (1), <i>FHL1</i> (1), <i>EMD</i> (0) | <i>ANO5</i> | |
| | | c.2201T>C (HZ) c.191_192insA (HT) | p.Leu734Pro p.Asn64fs |

HZ: Homocigoto; HT: Heterocigoto; (a): c.2362_2363delAGinsTCATCT.

Secuencias de referencia: *DYSF*: NM_001130987; *CAPN3*: NM_000070.2; *ANO5*: NM_213599.2

En el gen *ANO5* se encontraron 2 mutaciones en el paciente P16. La mutación homocigota c.2201T>C no ha sido reportada en ClinVar ni en dbSNP y la variante heterocigota c.191_192insA que ha sido descrita en ClinVar como patogénica de acuerdo a 8 registros.

En el gen de interés, *CAPN3*, se identificaron 3 mutaciones: c.107delG, c.2362_2363delAGinsTCATCT y c.2105C>T en estado heterocigoto compuesto en los pacientes P12 y P14 descritas en **Tabla 6**. Las tres mutaciones mencionadas se secuenciaron por Sanger para confirmar las mutaciones detectadas en NGS (**Figura 8**)

Tabla 6: Variantes posiblemente patogénicas en gen *CAPN3* encontradas en los individuos P12 y P14 mediante secuenciación masiva.

| Pacientes | Cambio en el gen | Cambio en la proteína | Genotipo |
|------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|
| P12 | c.107delG | p.Gly36Valfs*21 | Heterocigoto compuesto |
| | c.2362_2363delAGinsTCATCT | p.Arg788Serfs*14 | |
| P14 | c.2105C>T | p.Ala702Val | Heterocigoto compuesto |
| | c.2362_2363delAGinsTCATCT | p.Arg788Serfs*14 | |

Secuencia de referencia: *CAPN3*: NM_000070.2

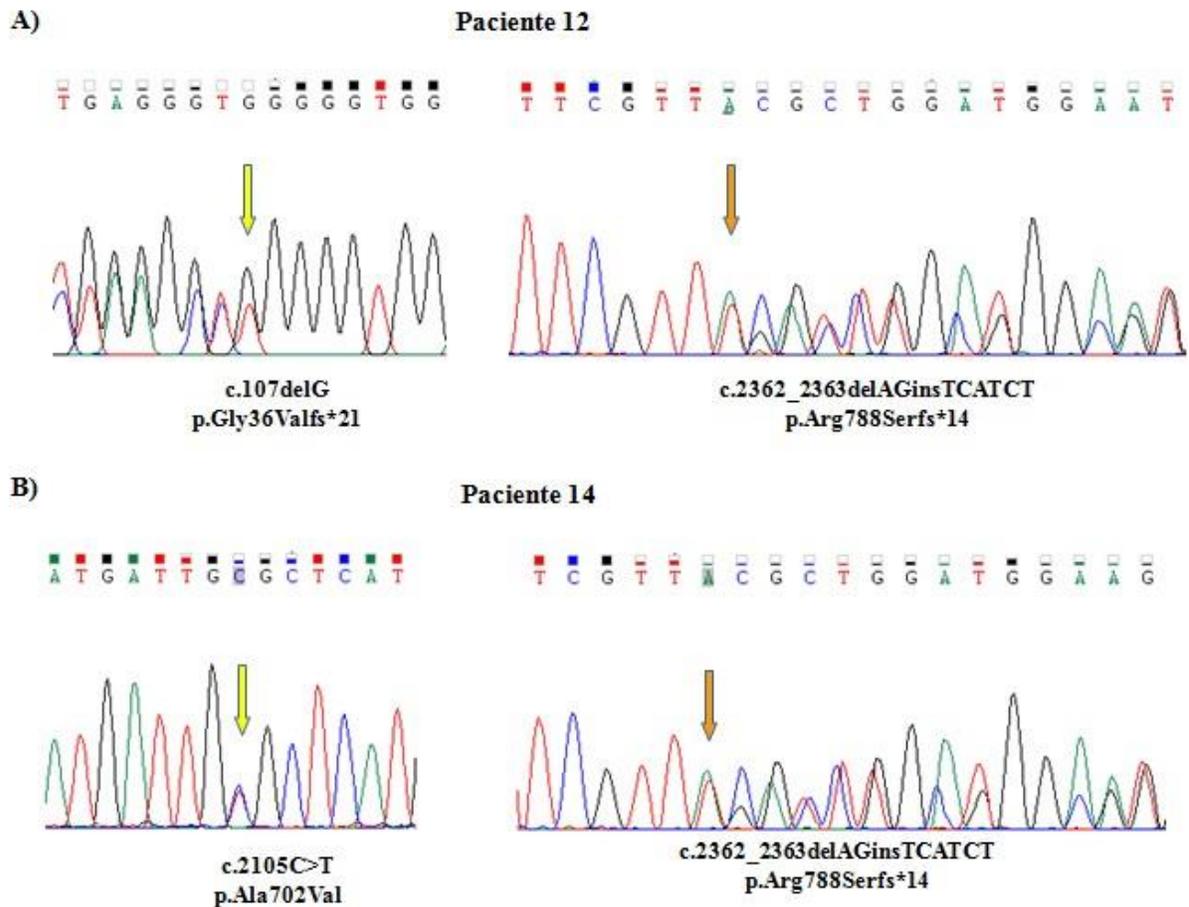


Figura 8: Electroforetograma de las mutaciones encontradas por secuenciación masiva presentes en P12 y P14. **A)** P12 heterocigoto compuesto con las mutaciones c.107delG y c.2362_2363delAGinsTCATCT. La flecha amarilla muestra el sitio de la delección del nucleótido guanina en el gen *CAPN3* **B)** P14 heterocigoto compuesto para las mutaciones c.2105C>T y c.2362_2363delAGinsTCATCT. La flecha naranja indica el sitio donde se deletan los nucleótidos "AG" y se inserta "TCATCT" en *CAPN3*. La mutación c.107delG fue analizada con un partidor reverso, mientras que los restantes con partidor directo.

La mutación c.107delG indica que en la posición número 107 del gen *CAPN3* ocurre una delección de 1 nucleótido guanina. Este cambio produce una proteína trunca.

La mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT en el gen *CAPN3* en las posiciones 2362 y 2363 ocurre la delección de 2 nucleótidos “AG”, y a la vez, la inserción de “TCATCT”, también produciendo una proteína trunca.

La mutación de tipo *missense* c.2105C>T implica la sustitución de una citosina por timina en la posición 2105 del gen *CAPN3*. Esto produce el cambio del aminoácido alanina por valina en la posición 702 de la proteína calpaína-3.

La mutación *missense* c.2105C>T fue analizada en SIFT y PolyPhen-2, dando una predicción de “dañina” y “posiblemente dañina”, respectivamente. También se puede inferir la naturaleza patogénica evaluando si involucra cambios de aminoácidos que están estrictamente conservados entre las secuencias de *CAPN3* de diferentes mamíferos (29). Se observó una conservación del aminoácido alanina entre las distintas especies comparadas (**Figura 9**)

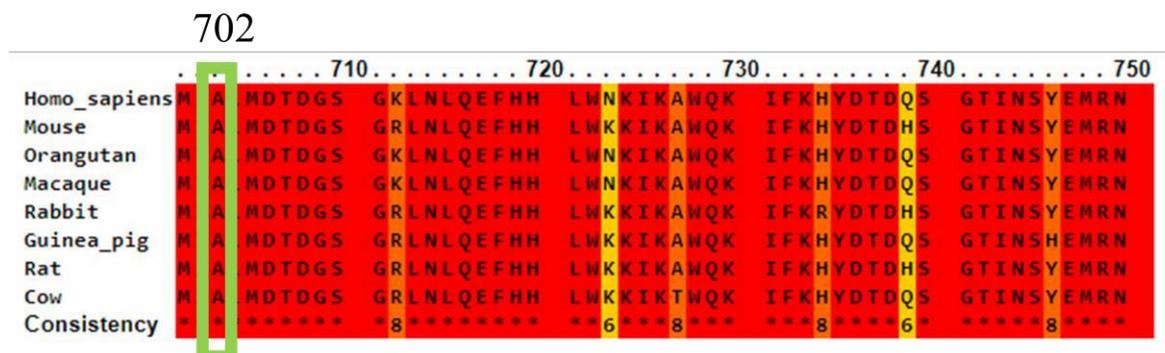


Figura 9: Análisis de conservación aminoacídica inter-especies del cambio proteico p.Ala702Val.

3) Ensayo funcional en paciente P14.

El ensayo funcional se realizó para evaluar la capacidad autocatalítica de *CAPN3* que puede ser alterada por mutaciones *missense* en el gen *CAPN3*. De los pacientes encontrados con mutación en *CAPN3*, P14 es el único portador de una mutación *missense*, de la cual se

desconoce el efecto funcional en la proteína, por lo que se realizó un estudio funcional en muestra de tejido muscular de este paciente, sometiéndola a una incubación por 10 minutos en suero fisiológico a temperatura ambiente, las cuales posteriormente se lisaron para observar las muestras a través de un WB. En la **Figura 10** se muestra el resultado del ensayo funcional de la proteína CAPN3 del paciente P14, cuyo genotipo es c.2362_2363delAGinsTCATCT/c.2105C>T, en el cual se observan las bandas que son producto de la autólisis de CAPN3 ubicadas a los 60 kDa y 30 kDa. En el tiempo de incubación utilizado no fue posible observar la banda a los 94 kDa correspondiente al peso molecular de la proteína completa.

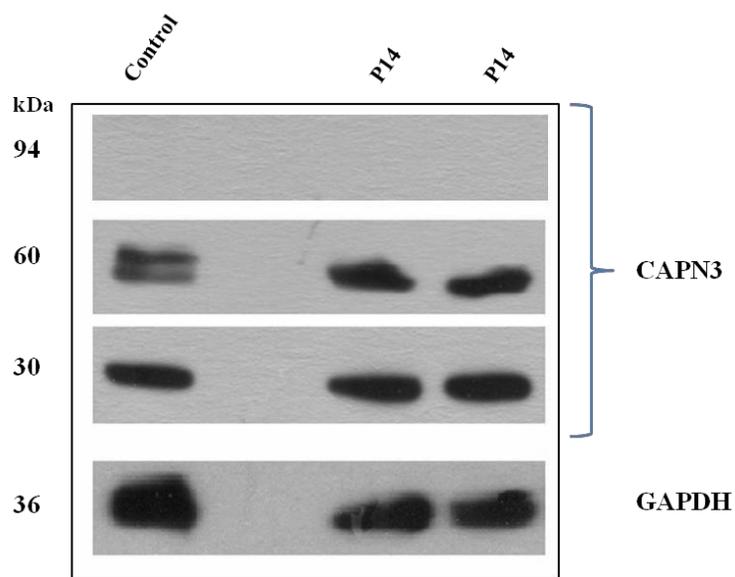


Figura 10: Ensayo funcional de CAPN3 utilizando los anticuerpos CALP12A2 y 2C4 (Novocastra). La proteína calpaína-3 posee un peso molecular de 94 kDa, el cual no fue identificado en el ensayo funcional, sin embargo se detectó los fragmentos producidos por la autólisis de CAPN3 a los 60 kDa y 30 kDa, identificados por los anticuerpos CALP 12A2 y CALP 2C4 respectivamente. Control de carga GAPDH con un peso molecular de 36 kDa.

En el ensayo funcional de calpaína-3, la banda que se ubica a los 60 kDa puede variar de un paciente a otro, ya sea entre distintos controles o en diferentes pacientes, como se ha observado en los experimentos en Fanin y colaboradores (21), es decir, puede observarse una banda clara y nítida o pueden observarse varias bandas que se ubican entre los 55 kDa, 58 kDa o 60 kDa (21).

Mediante el análisis del ensayo funcional se puede concluir que la muestra del paciente P14 conserva la actividad autocatalítica de CAPN3 debido a que las bandas observadas a los 60 kDa y 30 kDa corresponden a los fragmentos proteicos producidos por la autólisis de CAPN3 (21).

DISCUSIÓN

El gen *CAPN3* codifica para la proteína calpaína-3, una cisteína proteasa-dependiente de iones de calcio que se expresa preferentemente en el músculo esquelético (4,19). Mutaciones en este gen producen LGMD2A (4), que presenta un fenotipo clínico difícil de identificar y similar a otras distrofias de cinturas (13,14,15). La forma más certera para confirmar el diagnóstico de esta patología es principalmente a través del análisis proteico mediante WB en tejido muscular y análisis genético (8,14). Entre un 20-30% de los pacientes con LGMD2A muestran una expresión cuantitativamente normal de *CAPN3* en el análisis por WB, pero que es funcionalmente inactiva debido a las mutaciones que afectan su actividad autocatalítica o proteolítica pero no su síntesis (8). Este hecho hace que el análisis genético sea importante.

En este trabajo se identificaron dos pacientes con mutación en *CAPN3*, los pacientes P12 y P14 (**Figura 8**) que poseen respectivamente los genotipos heterocigotos compuestos c.107delG/c.2362_2363delAGinsTCATCT y c.2105C>T/c.2362_2363delAGinsTCATCT.

1. Efectos en la proteína *CAPN3* de las mutaciones detectadas.

a) Mutación c.107delG.

La mutación c.107delG a nivel proteico produce un corrimiento en el marco de lectura resultando en un codón de término p.Gly36Valfs*21 (**Figura 11**).

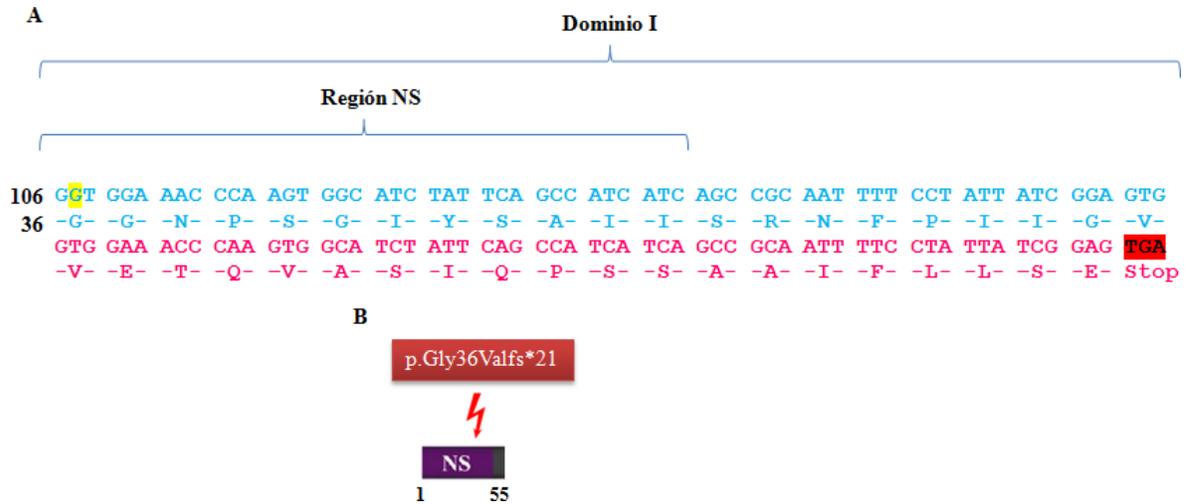


Figura 11: Esquema de la región de *CAPN3* que contiene la mutación c.107delG. A) Muestra los cambios en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos producidos por la delección de guanina (seleccionado en amarillo). Las secuencias sin mutación están en color celeste y en rosado las portadoras de la mutación. Nucleótidos seleccionados en rojo corresponde a un codón de término. B) Esquema de *CAPN3* identificando la región donde se ubica la mutación y su resultado a nivel proteico de un péptido de 55 aminoácidos

En **Figura 11** se esquematiza los cambios involucrados en la mutación c.107delG que da como resultado un codón de término luego de 21 aminoácidos desde el lugar de la mutación, en consecuencia se forma una proteína trunca. Al carecer de los aminoácidos que forman la triada catalítica, sería un fragmento proteico sin actividad enzimática lo que determinaría su degradación vía proteosoma.

Esta mutación encontrada en el paciente P12, además fue identificada por nuestro equipo de trabajo previamente en un paciente con genotipo homocigoto para la mutación, y en otro como heterocigoto compuesto (12). Sin embargo aún no se encuentra reportada en bases de mutaciones de *CAPN3*.

b) Mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT

La mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT (**Figura 12**) se encuentra registrada en dbSNP como rs 80338804, que produce un codón de término a 14 aminoácidos después del sitio de la mutación, produciendo una proteína trunca que carece de parte de la región EF5 del dominio IV de CAPN3. En dos trabajos se ha estudiado la proteína en sujetos homocigotos para la mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT, obteniendo resultados contradictorios (33)(34). En un trabajo se encontró la proteína CAPN3 ausente y sin actividad autocatalítica (33), mientras que en el otro estudio sí se observó la proteína a través de WB (34). En los pacientes de nuestra cohorte, esta mutación se encontró en los pacientes P12 y P14 en estado heterocigoto compuesto (**Figura 8**).

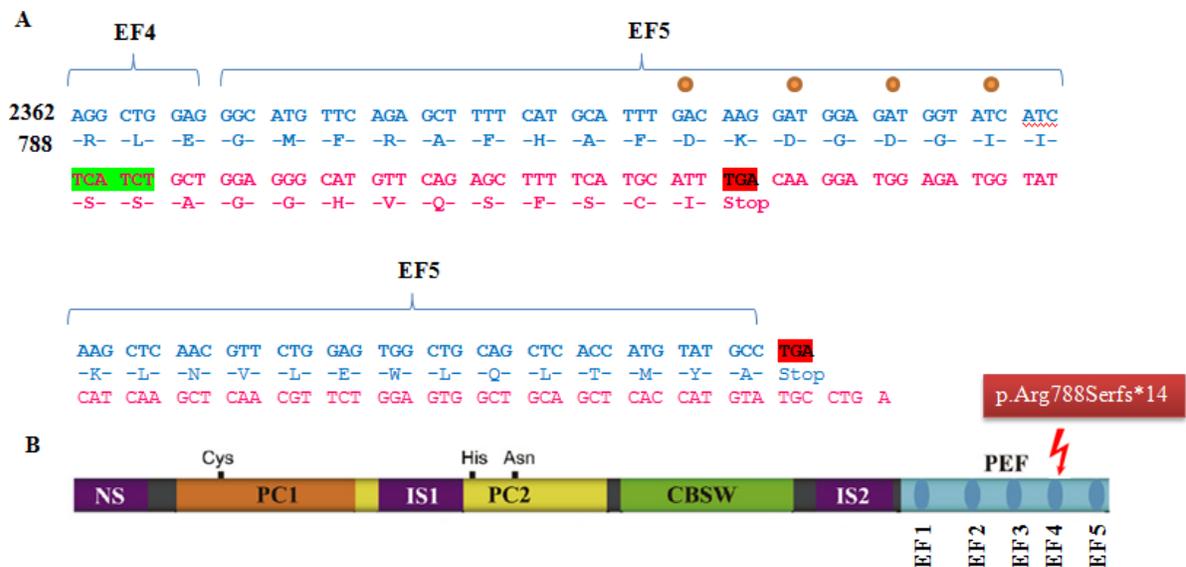


Figura 12: Esquema de la región de *CAPN3* que contiene la mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT. A) Muestra los cambios en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos producidos por la delección de “AG” e inserción de “TCATCT” (seleccionado en verde). Las secuencias sin mutación están en color celeste y en rosado las portadoras de la mutación. Nucleótidos seleccionados en rojo corresponden a un codón de término. Los círculos naranjos identifican sitios de unión a Ca⁺². B) Esquema de *CAPN3* completa identificando la región donde se ubica la mutación.

En nuestro estudio se encontró la mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT en los pacientes P12 y P14 en estado heterocigoto compuesto. Además previamente en Chile se encontró a dos hermanas, con genotipo homocigoto para c.2362_2363delAGinsTCATCT (12). Ambas pacientes son hijas de padres que eran primos en segundo grado y de abuelos paternos que también eran primos en primer grado. En consecuencia, esta mutación podría ser prevalente en casos de LGMD2 de nuestro país. La mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT se ha encontrado frecuentemente en algunas poblaciones específicas, particularmente en España (29) (9). En un estudio se resumió los reportes realizados sobre los hallazgos de mutaciones en *CAPN3* en pacientes con fenotipo sugerente de LGMD2. Los datos se obtuvieron de dos laboratorios ubicados en España, uno en Francia, otro en los Países bajos e Inglaterra, que trabajaron en familias con diverso origen étnico o lugar geográfico, tales como Brasil, España, Inglaterra, Estados Unidos y Francia, entre otros (29). De un total de 180 familias con mutación en *CAPN3*, la más prevalente fue la mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT observada en alrededor de 47 familias, de las cuales 39 resultaron ser originarias de la provincia Vasca y 8 de Cataluña (29). En un estudio previo, Urtasun y colaboradores (9) estudiaron un total de 61 pacientes con posible diagnóstico de LGMD, entre 1994 y 1996, dentro de los cuales encontraron 25 con la mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT en población española de la región Vasca, siendo la más prevalente entre los pacientes con mutaciones en *CAPN3* (9).

El hecho que la mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT sea la más prevalente en casos de LGMD en la región Vasca, puede explicar que también sea la más prevalente en casos de LGMD2 en Chile. Esto considerando que las olas migratorias españolas en la época de la conquista de Chile fueron principalmente castellanos, extremeños, andaluces, vascos, catalanes y gallegos (35). Particularmente la inmigración vasca a Chile ha ocurrido constantemente hasta el siglo XX. Tuvo lugar minoritariamente durante los siglos XVI y XVII y mayormente en el siglo XVIII. Posteriormente por conflictos bélicos en España hubo un aumento en las migraciones de vascos en los siglos XIX y XX (36).

c) Mutación c.2105C>T.

La mutación c.2105C>T ha sido descrita anteriormente por otros grupos de trabajo (37) y en dbSNP está registrada como rs886042557. A nivel proteico este cambio de nucleótidos produce una sustitución del aminoácido alanina por valina en la posición 702, ubicándose en el motivo EF2 del dominio IV de la proteína calpaína-3 (p.Ala702Val) (**Figura 13**). Ambos aminoácidos son apolares, por lo que en la estructura de la proteína no involucraría una modificación significativa en cuanto a la carga de los aminoácidos.

Según ClinVar, la mutación c.2105C>T está reportada como probablemente patogénica de acuerdo a 4 registros. El trabajo de Piluso y colaboradores, encontró a dos individuos con genotipos heterocigoto y homocigoto respectivamente, pero no se dan detalles clínicos de los pacientes (37). En Krahn y colaboradores, 2006 (38) se reportó a un individuo con genotipo homocigoto y en Richard y colaboradores (30) (29) reportaron a otro individuo homocigoto para c.2105C>T e indican que los signos clínicos se iniciaron en la primera década de vida.

La predicción de patogenicidad en análisis realizados en SIFT (<http://sift.jcvi.org>) y PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), da como resultado “dañina” y “posiblemente dañina”, respectivamente. Además el análisis de conservación aminoacídica inter-especies indica que el aminoácido alanina se encuentra altamente conservado (**Figura 9**).

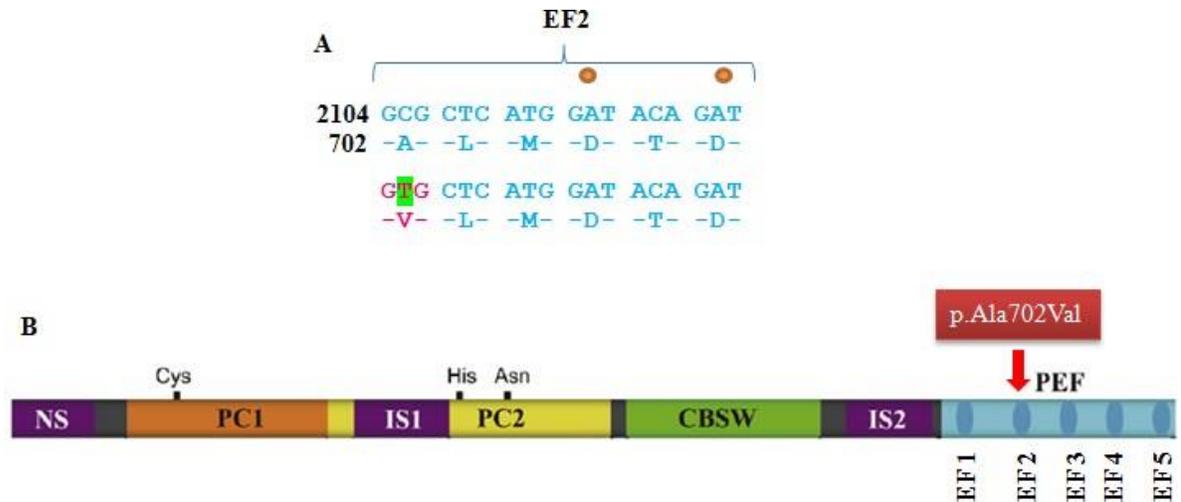


Figura 13: Esquema de la región de *CAPN3* que contiene la mutación c.2105C>T. A) Muestra los cambios en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos producidos por el cambio nucleotídico de citosina por timina (seleccionado en verde) produciendo una sustitución del aminoácido alanina por valina en la posición 702, ubicándose en el segmento EF2 del dominio IV de *CAPN3*. Las secuencias sin mutación están en color celeste y en rosado las portadoras de la mutación. Los círculos naranjos identifican sitios de unión a Ca^{+2} . B) Esquema de *CAPN3* completa identificando la región del cambio aminoacídico p.Ala702Val.

2. Correlación genotipo-fenotipo.

a) Paciente P12 y mutación c.107delG.

Al evaluar los datos clínicos del paciente P12 (**Tabla 4**) da la impresión de cierta similitud al compararlos con el paciente P2, homocigoto para la mutación c.107delG en *CAPN3*, el cual fue estudiado previamente por nuestro equipo de trabajo. P2 es de sexo femenino, de 22 años de edad, cuyos síntomas iniciaron a los 12 años. A los 15 años presentó dificultad para correr, para incorporarse desde una silla, saltar, subir y bajar escaleras. Se sugirió dermatomiositis como posible diagnóstico, solicitándose una nueva biopsia que concluyó con un diagnóstico de disferlinopatía, por observar ausencia de disferlina en inmunohistoquímica. Los exámenes cardíacos fueron normales y al examen físico presenta

debilidad en cintura pélvica y en menor grado en cintura escapular. Posee una segunda biopsia sin hallazgos patológicos, una electromiografía miogénica y niveles de CK en el rango de 6000 U/l en diferentes registros. Actualmente debe movilizarse en silla de ruedas. Por último, de acuerdo al resultado del estudio genético, se observó que es portadora de un genotipo homocigoto para la mutación c.107delG en el gen *CAPN3*.

El fenotipo detallado anteriormente del paciente P2 y del paciente P12 que se encuentra descrito en Tabla 4 está dentro del espectro de calpainopatía. Ambos presentan niveles séricos elevados de CK, dificultad de marcha en su presentación clínica, y debilidad en cintura pélvica y escapular. Sin embargo se pueden confundir con otras distrofias de cintura como por ejemplo una disferlinopatía, que se presenta con fenotipo similar. En estos pacientes el diagnóstico sólo fue posible una vez realizado el estudio genético.

b) Paciente P12 y mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT.

Nuestro grupo de trabajo describió una paciente (P3) homocigota para la mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT. P3 tuvo un comienzo tardío de la enfermedad, alrededor de los 25 años de edad, con debilidad proximal en cintura pélvica y escapular presentando dificultad para subir escaleras e incorporarse desde una silla (12) Sin embargo tiene una hermana, la paciente P3.1, del mismo genotipo pero de inicio temprano, marcha en puntas de pie con una severa debilidad proximal escapular y pélvica desde los 7 años de edad. Los niveles de CK entre ambas hermanas son contrastantes, la paciente P3 tiene un aumento de 1.5 veces sobre el valor normal, mientras que la paciente P3.1 es de 5 sobre el nivel normal de niveles de CK (12)

El paciente P12 también es portador de la mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT de manera heterocigoto compuesto cuyos signos clínicos son más similares a los de la paciente P3.1 por tener un inicio temprano, marcha en puntas de pie y elevados niveles de CK.

En la literatura la mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT fue reportada por Krahn y colaboradores (38), en 3 pacientes en estado heterocigoto compuesto. Una de estas pacientes es portadora de esta mutación con un genotipo c.2362_2363delAGinsTCATCT/c.1250C>T y con un fenotipo inicial de LGMD. Los síntomas iniciaron durante su infancia y en su última

evaluación clínica realizada a los 55 años se encontraba en silla de ruedas. El segundo caso es un varón con un genotipo c.2362_2363delAGinsTCATCT/c.1069C>T, del cual no se entregaron sus datos clínicos. Finalmente una tercera paciente con genotipo c.2362_2363delAGinsTCATCT/c.133G>A, presentaba un fenotipo inicial de distrofia muscular progresiva, los síntomas iniciaron durante la infancia y además, tiene un hermano afectado.

En otro estudio se reportaron tres individuos de origen estadounidense con esta mutación (30). Un paciente con genotipo c.2362_2363delAGinsTCATCT/c.643_663del21, con una edad de inicio de los síntomas a los 10-14 años, perdió la capacidad de caminar alrededor de los 28-29 años de edad y tenía niveles de CK de 5.000 U/l. Otro paciente con genotipo c.2362_2363delAGinsTCATCT/?, inició sus síntomas a los 12 años, perdiendo su capacidad para caminar a los 32 años, con niveles de CK de 1.300 U/l. El último paciente con genotipo c.2362_2363delAGinsTCATCT/?, inició los síntomas a los 13 años, perdió la capacidad de ambular a los 34 años y tenía niveles séricos de CK de 1.600 U/l. Estos dos últimos individuos son familiares y no se encontró la segunda mutación para poder explicar el fenotipo. El primer individuo inicialmente presentó debilidad en pantorrillas seguido de períodos de fiebre alta. El diagnóstico inicial fue de polimiositis, cuya biopsia muscular, a los 25 años, mostró una severa miopatía inflamatoria necrotizante (30). De acuerdo a la histología, los autores indican que la miopatía inflamatoria necrotizante se puede observar tanto en polimiositis como en etapas iniciales de una distrofia. En síntesis la historia clínica de los pacientes reportados en la literatura (38)(30), es semejante a los encontrados en este trabajo. Todos presentan un inicio de síntomas temprano, generalmente, durante la infancia, presentan niveles de CK elevados; además de dificultad para caminar que progresa lentamente a la dependencia de una silla de rueda (38)(30).

c) Paciente P14 y mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT.

Los datos clínicos del paciente P14 que se detallan en **Tabla 4**, son similares a los observados en la paciente P3 con genotipo homocigoto para la mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT, cuyos datos clínicos fueron anteriormente mencionados.

d) Paciente P14 y mutación c.2105C>T

En la literatura, no se discute mayormente las características clínicas de pacientes portadores de la mutación c.2105C>T ya sea en individuos homocigotos o heterocigotos. Sólo en un trabajo se reporta los datos clínicos generales de un paciente homocigoto para la mutación c.2105C>T indicando que posee elevados niveles de CK, 4000 U/L, y una edad de inicio temprano (30). Sin embargo, el paciente P14 tiene un inicio tardío de los síntomas.

3. Ensayo funcional de paciente P14.

El paciente P14, con genotipo heterocigoto compuesto c.2362_2363delAGinsTCATCT/c.2105C>T, cuya clínica y genotipo se detallan respectivamente en **Tabla 4 y 6**; fue estudiado para observar si la mutación *missense* que porta el paciente afecta la actividad autocatalítica de la CAPN3.

Milic y cols (33) testearon la actividad de CAPN3 muscular en pacientes con diferentes mutaciones en CAPN3 de manera in vitro. Usaron como sustrato calpaína-3^{C129S}, la cual es inactiva y no puede ser activada por autólisis ni activar a otras moléculas de calpaína-3; sin embargo puede cortarse en 3 sitios específicos a través de proteínas calpaína-3 activas. En pacientes homocigotos para la mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT encontraron que la proteína está ausente y sin actividad autolítica (33). Al analizar un individuo homocigoto para c.2105C>T, conserva la expresión de la proteína al igual que su capacidad de clivar calpaína-3^{C129S} (33). Contradictoriamente, en el trabajo de Sacconi y colaboradores (34), identificaron a 4 pacientes con mutación en CAPN3, de ellos, uno es homocigoto para la mutación c.2362_2363delAGinsTCATCT cuyo estudio de la proteína calpaína-3 en WB resultó normal.

Con el fin de evaluar la actividad autocatalítica, se realizó un ensayo funcional para CAPN3 de tejido muscular del paciente P14 (**Figura 10**). Como resultado se observaron bandas de 60 kDa y 30 kDa marcadas con los anticuerpos CALP12A2 y CALP2C4, que de acuerdo a la literatura éstas son producidas por la autólisis de la proteína (21). De éstos resultados podemos concluir que el genotipo c.2362_2363delAGinsTCATCT/c.2105C>T no

afecta la actividad autocatalítica de CAPN3, ya que en los estudios proteicos del tejido muscular del paciente P14, se observaron bandas producidas por procesos autocatalíticos.

En general existen 5 estados defectuosos de calpaina-3 relacionadas tanto con las propiedades autocatalíticas, como con otras funciones (19): CAPN3 se puede encontrar completamente inactiva producida por la pérdida de la activación intramolecular. La proteína puede tener inactividad de la activación eM causadas por mutaciones que pueden afectar el corte de IS1. La proteína puede tener una autólisis acelerada causada por mutaciones en el dominio IV. CAPN3 puede tener un deficiente o ausente reconocimiento de sustrato y finalmente podría afectar otras propiedades por mutaciones en regiones que no están involucradas directamente en la función proteolítica de la proteína (19). Dado que la mutación missense c.2105C>T no presenta su patogenicidad a nivel de la actividad autocatalítica de la proteína (33), los estados defectuosos de CAPN3 que explicarían la patogenicidad de la mutación podría ser una probable autólisis acelerada de la proteína o deficiencia/ausencia de reconocimiento del sustrato como cualquier otra propiedad de CAPN3 que no involucre directamente la función autolítica (19).

Las mutaciones encontradas en el gen *CAPN3* del paciente P14 se ubican en el dominio IV de CAPN3. En general, mutaciones en este dominio se le atribuye que podría desencadenar una autólisis acelerada por lo que la proteína perdería su función antes de ejercerla completamente (19). Por otra parte, Partha y colaboradores (20) propusieron que la unión de iones de Ca^{+2} a los motivos EF2 y EF5 podría promover un cambio en la conformación de NS por lo que aceleraría el clivaje de CAPN3 (20). El cambio aminoacídico, producido por la mutación *missense*, ocurre en el dominio IV de la proteína, específicamente en el motivo EF2 que se encuentra cercano a sitios de unión a Ca^{+2} , tales como los residuos Asp705 y Asp707 que son los aminoácidos que se unen a Ca^{+2} más próximos al sitio de la mutación. Así, es posible que el cambio aminoacídico podría afectar la interacción del motivo EF2 con los iones de Ca^{+2} , pudiendo alterar la velocidad de autólisis de CAPN3, en consecuencia, también podría modificar el tiempo de acción con sus sustratos.

4. Modelo de patogenicidad de CAPN3

Normalmente calpaína-3 participa en diferentes procesos en la fibra muscular como remodelamiento sarcomérico y en la reparación de membrana plasmática (**Figura 14**). Calpaína-3 se mantiene inactiva mientras se encuentre unida a titina, proteína que se ubica en el sarcómero, y una vez activada por el aumento de la concentración de Ca^{+2} intracelular, se ha visto que participa en el remodelamiento sarcomérico. Durante la contracción y estiramiento sarcomérico calpaína-3 migra hacia distintas las zonas del sarcómero. Adicionalmente, ante una injuria de la membrana plasmática, calpaína-3 podría migrar hacia la zona requerida y cortar proteínas relacionadas con el complejo de reparación de membrana, como las proteínas anexinas y proteínas del citoesqueleto, produciendo la activación de las mismas.

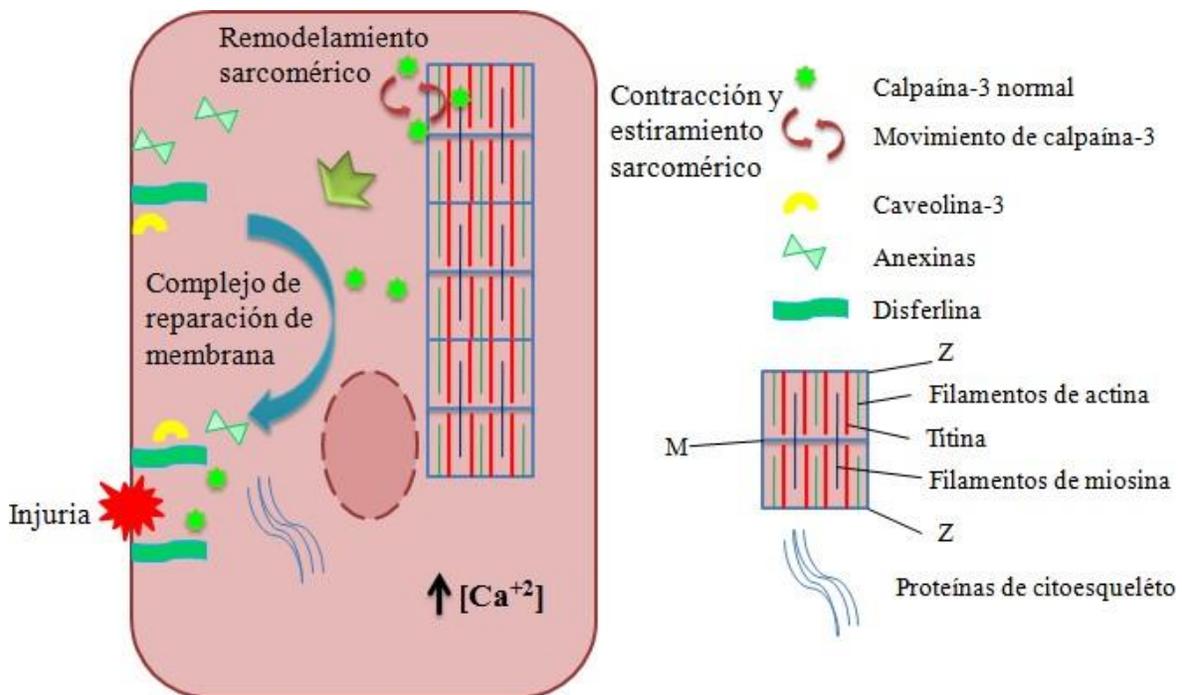


Figura 14: Modelo normal de funcionamiento de calpaína-3 en músculo esquelético.

En el paciente P14, con genotipo c.2105C>T y c.2362_2363delAGinsTCATCT en *CAPN3*, los mecanismos que se encontrarían afectados y que explicarían la patogenicidad de las mutaciones en *CAPN3* podría ser un inadecuado reconocimiento de sustrato o una autólisis

acelerada de calpaína-3 (**Figura 15**). Las proteínas truncas podrían ser degradadas por proteosoma o bien, podría ejercer parcialmente las funciones de calpaína-3 de acuerdo a la estructura y conformación que adquiera la proteína (**Figura 15.a**). Al existir un inadecuado reconocimiento de sustrato, los procesos en los cuales participa calpaína-3 se verían afectados, tales como el remodelamiento sarcomérico y el proceso de reparación de membrana (**Figura 15.b**). La autólisis acelerada de calpaína-3 podría disminuir el tiempo de acción de la proteína sobre sus sustratos (**Figura 15.c**).

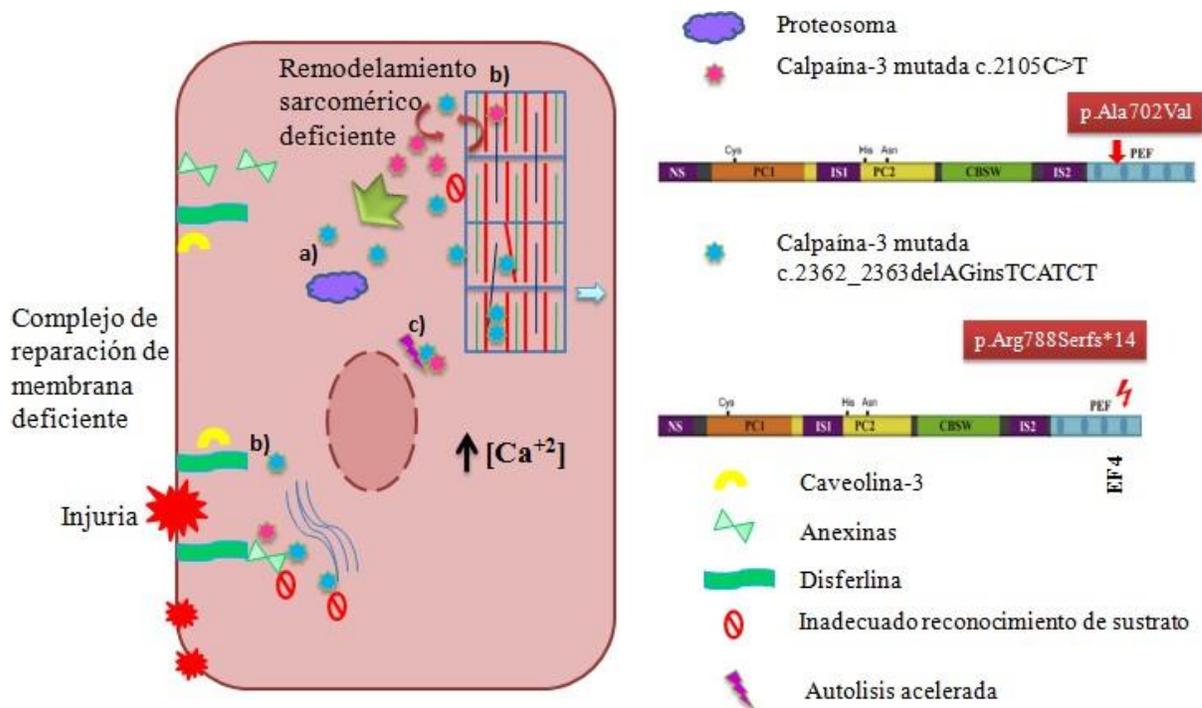


Figura 15: Modelo de patogenicidad de la proteína mutada del paciente P14. a) Degradación por proteosoma de proteínas truncas de calpaína-3. b) Disminución o ausencia de reconocimiento de calpaína-3 por el sustrato. c) Autólisis acelerada de calpaína-3.

En general no existe información sobre los sitios de reconocimiento de los sustratos de CAPN3 ni tampoco de la identificación de todos sus sustratos, por lo que es un área aún por descubrir. Sin embargo, teniendo el antecedente que en calpains convencionales los dominios IV y III son importantes para el reconocimiento del sustrato, estas regiones también podrían ser cruciales para CAPN3 (19). Si se suma el hecho que la mutación *missense* en el dominio IV, no afecta la actividad autocatalítica, se podría sugerir que la patogenicidad se explicaría por un reconocimiento de sustrato ausente o deficiente (19). De esta manera se podrían alterar funciones vitales como el remodelamiento sarcomérico o la reparación de membrana, produciendo signos y síntomas distróficos (19).

CONCLUSIÓN

1. De los 13 pacientes estudiados, en los sujetos P12 y P14 se encontraron mutaciones en *CAPN3* y presentan cierto grado de variabilidad fenotípica. El paciente P12 presenta un inicio temprano y el paciente P14 un inicio tardío; pero ambos presentan una importante debilidad muscular. A pesar de estas diferencias, P12 y P14 se encuentran dentro del espectro fenotípico de calpainopatía. Además, existe una convergencia fenotípica entre individuos con mutaciones en distintos genes, como se observó en el paciente P5 y P10 en quienes se encontraron mutaciones en *DYSF* y en el paciente P16 se identificaron mutaciones el gen *ANO5*.
2. El paciente P12 tiene un genotipo heterocigoto compuesto entre dos mutaciones *frameshift* y el paciente P14 es portador de una mutación *missense* y otra *frameshift*. La mutación *frameshift* identificada en ambos pacientes corresponde a la mutación, c.2362_2363delAGinsTCATCT. Esta mutación se ha encontrado en regiones específicas, especialmente en población española (29). En Chile, ésta mutación se encontró en un estudio previo en dos hermanas chilenas con genotipo homocigoto para c.2362_2363delAGinsTCATCT (12). De tal manera esta mutación podría ser prevalente en casos de LGMD2 de nuestro país, explicado por la importante inmigración española a lo largo de la historia de Chile. La detección de esta mutación previa a la identificación por el panel genético mediante secuenciación masiva, sería importante para pacientes con fenotipos sugerentes de LGMD2A. Por ejemplo, podría identificarse a través de secuenciación por Sanger, un método más económico comparado al panel genético. De esta manera es posible disminuir la complejidad y el costo del estudio genético.
3. En el paciente P14, al ser portador de una mutación *missense* se estudió la actividad autocatalítica de la proteína a través de un ensayo funcional. Este estudio evidenció la conservación de la actividad autolítica de *CAPN3*. Es decir, no se pudo demostrar que la patogenicidad de la mutación *missense* sea por una pérdida de función autocatalítica de la proteína. Sin embargo, con el hallazgo de individuos homocigotos para la mutación c.2105C>T en pacientes con fenotipo clínico sugerente de LGMD (37) y con los análisis de predicción de patogenicidad realizados en SIFT y PolyPhen, es posible afirmar un el rol

patogénico que ejerce ésta mutación. Sin embargo el mecanismo por el cual esta mutación es deletérea no se ha podido precisar.

Podemos sugerir que la mutación c.2105C>T pueda producir una interrupción o anulación de otras propiedades de CAPN3, diferentes de la función autocatalítica, como por ejemplo el reconocimiento de sustratos. Así se podrían alterar funciones vitales como el remodelamiento sarcomérico o la reparación de membrana, produciendo daño muscular (19).

En conclusión, es importante identificar clínica y genéticamente a los pacientes con LGMD2A que se encuentran sin diagnóstico en nuestro país. Una manera de simplificar a futuro la confirmación diagnóstica es detectar mutaciones recurrentes en nuestra población, junto con la implementación de un panel de genes para LGMD2. Sin embargo, aún queda mucho por dilucidar sobre los mecanismos de acción de CAPN3, cuya información sería beneficiosa para el entendimiento de LGMD2A

BIBLIOGRAFÍA

1. Thompson R, Straub V. Limb-girdle muscular dystrophies - international collaborations for translational research. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2016;12(5):294–309. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2016.35>
2. Narayanaswami P, Weiss M, Selcen D, David W, Raynor E, Carter G, et al. Evidence-based guideline summary: Diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies. *Neurology*. 2014;83:1453–63.
3. Pegoraro E HE. Limb-Girdle Muscular Dystrophy Overview. [Internet]. GeneReviews®, editor. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2012. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1408/>
4. Nigro V, Savarese M. Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta Myol*. 2014;33(1):1–12.
5. Monies D, Alhindi HN, Almuhazea MA, Abouelhoda M, Alazami AM, Goljan E, et al. A first-line diagnostic assay for limb-girdle muscular dystrophy and other myopathies. *Hum Genomics* [Internet]. 2016;10(1):32. Available from: <http://humgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40246-016-0089-8>
6. Kaplan JC, Hamroun D. The 2015 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul Disord*. 2014;24(12):1123–53.
7. Cotta A, Carvalho E, da-Cunha-Júnior AL, Paim JF, Navarro MM, Valicek J, et al. Common recessive limb girdle muscular dystrophies differential diagnosis: why and how? *Arq Neuropsiquiatr* [Internet]. 2014;72(9):721–34. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2014000900721&lng=en&tlng=en
8. Fanin M, Angelini C. Protein and genetic diagnosis of limb girdle muscular dystrophy type 2A: The yield and the pitfalls. *Muscle and Nerve*. 2015;52(2):163–73.
9. Urtasun M, Sa A, Roudaut C, Poza JJ, Urtizbera JA, Cobo AM, et al. Limb-girdle muscular dystrophy in Guipuzcoa (Basque Country , Spain). 1998;1735–47.
10. 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 Nerve* [Internet]. 2016 Jan;53(1):49–57. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mus.24685>
11. Urtizbera JA, Bassez G, Leturcq F, Nguyen K, Krahn M, Levy N. Dysferlinopathies. *Neurol India* [Internet]. 56(3):289–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18974555>
 12. Bevilacqua J, Mathieu Y, Krahn M, Bartoli M, Castiglioni C, Kleinsteuber K, et al. Calpainopathy in Chile, first cases reported. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2016;26:S91. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960896616303169>
 13. Remoortere A Van, Bushby K, Huang Y, Morre A De. Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle. 2008;17(12):1855–66.
 14. Barresi R, Gasper M, Gilchrist J, Mercuri EM, Bushby K, Ricci E, et al. From proteins to genes: immunoanalysis in the diagnosis of muscular dystrophies. *Skelet Muscle* [Internet]. 2011;1(1):24. Available from: <http://skeletalmusclejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2044-5040-1-24>
 15. Kramerova I, Beckmann JS, Spencer MJ. Molecular and cellular basis of calpainopathy (limb girdle muscular dystrophy type 2A). 2007;1772:128–44.
 16. Marlow G, Boycott KM, Saleki K, Inoue H, Kroon J, Itakura M, et al. Recessive Mutations in the Putative Calcium-Activated Chloride Channel Anoctamin 5 Cause Proximal LGMD2L and Distal MMD3 Muscular Dystrophies. 2010;213–21.
 17. Hicks D, Sarkozy A, Muelas N, Köehler K, Huebner A, Chinnery PF, et al. Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts A founder mutation in Anoctamin 5 is a major cause of limb girdle muscular dystrophy. 2014;134(0 1):171–82.
 18. Fardeau M, Hillaire D, Mignard C, Feingold N, Feingold J, Mignard D, et al. Juvenile limb-girdle muscular dystrophy Clinical, histopathological and genetic data from a small community living in the Reunion Island. *Brain*. 1996;119:295–308.
 19. Ono Y, Ojima K, Shinkai-Ouchi F, Hata S, Sorimachi H. An eccentric calpain, CAPN3/p94/calpain-3. *Biochimie* [Internet]. 2016;122:169–87. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.010>

20. Partha SK, Ravulapalli R, Allingham JS, Campbell RL, Davies PL. Crystal structure of calpain-3 penta-EF-hand (PEF) domain - A homodimerized PEF family member with calcium bound at the fifth EF-hand. *FEBS J.* 2014;281(14):3138–49.
21. Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Trevisan C Pietro, Meznaric-petrusa M, Angelini C. Loss of Calpain-3 Autocatalytic Activity in LGMD2A Patients with Normal Protein Expression. 2003;163(5):1929–36.
22. García Díaz BE, Gauthier S, Davies PL. Ca²⁺ dependency of calpain 3 (p94) activation. *Biochemistry.* 2006;45(11):3714–22.
23. Ono Y, Shindo M, Doi N, Kitamura F, Gregorio CC, Sorimachi H. The N- and C-terminal autolytic fragments of CAPN3/p94/calpain-3 restore proteolytic activity by intermolecular complementation. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 2014;111(51):E5527–36. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1411959111>
24. Savarese M, Sarparanta J, Vihola A, Udd B, Hackman P. Increasing Role of Titin Mutations in Neuromuscular Disorders. *J Neuromuscul Dis.* 2016;3(3):293–308.
25. Ojima K, Ono Y, Doi N, Yoshioka K, Kawabata Y, Labeit S, et al. Myogenic stage, sarcomere length, and protease activity modulate localization of muscle-specific calpain. *J Biol Chem.* 2007;282(19):14493–504.
26. Murphy RM, Vissing K, Latchman H, Lambole C, McKenna MJ, Overgaard K, et al. Activation of skeletal muscle calpain-3 by eccentric exercise in humans does not result in its translocation to the nucleus or cytosol. *J Appl Physiol [Internet].* 2011;111(5):1448–58. Available from: <http://jap.physiology.org/cgi/doi/10.1152/jappphysiol.00441.2011>
27. Glover L, Brown RH. Dysferlin in membrane trafficking and patch repair. *Traffic.* 2007;8(7):785–94.
28. Bevilacqua J a, Krahn M, Pedraza L, Gejman R, Gonzalez S, Lévy N. Dysferlinopathy in Chile: evidence of two novel mutations in the first reported cases. *Genet Test Mol Biomarkers [Internet].* 2009;13(1):105–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19309282>
29. Richard I, Roudaut C, Saenz A, Pogue R, Grimbergen JEMA, Anderson LVB, et al.

- Calpainopathy—A Survey of Mutations and Polymorphisms. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1999;64(6):1524–40. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707636556>
30. Brenguier L, Din P, Roudaut C, Bady B, Burgunder J, Chemaly R, et al. Multiple Independent Molecular Etiology for Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A Patients from Various Geographical Origins. 1997;34:1128–38.
 31. Sáenz A, Ono Y, Sorimachi H, Goicoechea M, Leturcq F, Blázquez L, et al. KEY WORDS: LGMD2A, calpainopathy, calpain-3, phenotype, protein activity. Abbreviations : LGMD2A: Limb-girdle muscular dystrophy type 2A, GMW: Gardner-Medwin-Walton, MRI: Magnetic resonance imaging, mCL: m-calpain catalytic subunit, EF-3: third EF-hand m.
 32. Laboratories KD, Genetics M, Health O, Road P, Molecular C, Children N, et al. HHS Public Access. 2015;17(5):405–24.
 33. Milic A, Daniele N, Lochmüller H, Mora M, Comi GP, Moggio M, et al. A third of LGMD2A biopsies have normal calpain 3 proteolytic activity as determined by an in vitro assay. *Neuromuscul Disord*. 2007;17(2):148–56.
 34. Sacconi S, Salviati L, Boileau P, Lopez A, Arregui DM, Der SM Van. Patients with a phenotype consistent with facioscapulohumeral muscular dystrophy display genetic and epigenetic heterogeneity. 2013;49(1):41–6.
 35. Berríos S. *El ADN de los chilenos y sus orígenes chilenos*. Primera ed. Berríos S, editor. Editorial Universitaria; 2016. 44 p.
 36. Santiago EE De. *Vascos en Chile 1520-2005*. 2005.
 37. Piluso G, Politano L, Aurino S, Fanin M, Ricci E, Ventriglia VM, et al. Extensive scanning of the calpain-3 gene broadens the spectrum of LGMD2A phenotypes. *J Med Genet*. 2005;42(9):686–93.
 38. Krahn M, Bernard R, Pécheux C, Hammouda EH, Eymard B, Lopez de Munain A, et al. Screening of the CAPN3 gene in patients with possible LGMD2A [4]. *Clin Genet*. 2006;69(5):444–9.