



Sección de Biología
Universidad de La Laguna

LA DISFERLINA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO

DYSPHERLIN IN THE SKELETAL MUSCLE

Trabajo de Fin de Grado

SAMANTHA CASTRO GARCÍA

Tutorizado por Natalia Domínguez Reyes

Grado en Biología. Junio 2021

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 El músculo esquelético.....	3
2.2 La disferlina.....	6
3. OBJETIVOS	8
4. METODOLOGÍA	8
5. FUNCIONES DE LA DISFERLINA	9
5.1 Reparación del sarcolema.....	9
5.2 Funciones en la biología de la triada.....	14
5.3 Función de la disferlina en la diferenciación, crecimiento y regeneración del músculo esquelético.	16
6. LAS DISFERLINOPATÍAS	17
6.1 Fenotipos de las disferlinopatías.....	18
6.2 Mutaciones causantes de disferlinopatías.....	19
6.3 Diagnóstico de las disferlinopatías	20
7. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA LAS DISFERLINOPATÍAS	21
8. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	24
9. BIBLIOGRAFÍA	25

1. RESUMEN

La disferlina es una proteína transmembrana que pertenece a la familia de las ferlinas y está constituida por un dominio extracelular C-terminal y siete dominios C2 citosólicos. Se expresa principalmente en el músculo esquelético, aunque también se encuentra en el músculo cardíaco y en menor medida en otras células y tejidos. En este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica acerca del papel de la disferlina en el músculo esquelético, estudiándose sus funciones, las patologías producidas por las mutaciones en el gen que codifica esta proteína y los posibles tratamientos que se están desarrollando para estas enfermedades. La disferlina posee importantes funciones en el músculo esquelético, entre las cuales se encuentran la reparación de la membrana plasmática, la homeostasis del calcio, la formación de los túbulos T y el crecimiento y desarrollo del músculo. Las disferlinopatías son un tipo de distrofia muscular producidas por mutaciones en el gen que codifica la disferlina, caracterizadas por un desgaste muscular progresivo. En la actualidad no existen terapias para el tratamiento de estas distrofias, pero se están estudiando posibles tratamientos desde diversos enfoques, desde el uso de fármacos hasta la terapia génica.

Palabras clave: músculo esquelético, disferlina, disferlinopatía, funciones, terapias.

ABSTRACT

Dysferlin is a transmembrane protein that belongs to the ferlin family and is formed by a C-terminal extracellular domain and seven cytosolic C2 domains. It is expressed mainly in skeletal muscle, although it is also found in cardiac muscle and to a lesser extent in other cells and tissues. In this work, a bibliographic review about the role of dysferlin in skeletal muscle has been performed, studying its functions, the pathologies produced by mutations in the gene that encodes this protein and the treatments that are being developed for these diseases. Dysferlin has important functions in skeletal muscle, including plasma membrane repair, calcium homeostasis, T-tubule formation, and muscle growth and development. Dysferlinopathies are a type of muscular dystrophies produced by mutations in the gene that encodes dysferlin, characterized by progressive muscle wasting. Currently there are no therapies for the treatment of these dystrophies, but possible treatments are being studied from various approaches, from the use of drugs to gene therapy.

Keywords: skeletal muscle, dysferlin, dysferlinopathies, functions, therapies.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 El músculo esquelético

El tejido muscular es el responsable de la movilidad de los organismos y sus órganos. Existen tres tipos de tejido muscular: liso, estriado esquelético y estriado cardíaco.

El músculo liso está constituido por células fusiformes uninucleadas y su contracción es de carácter involuntario (Sepúlveda & Soto, 2014). Se encuentra localizado en aquellas estructuras corporales que no requieren movimientos voluntarios tales como las paredes de los órganos digestivos (desde la parte media del esófago hasta el ano), los órganos del tracto respiratorio, vasos sanguíneos, conductos glandulares, músculos erectores del pelo e intrínsecos del ojo, útero, etc. (Molist et al., 2017).

El músculo estriado cardíaco es un tipo de músculo estriado (Sepúlveda & Soto, 2014), denominado así por la presencia de estriaciones. Se encuentra formando parte de las paredes del corazón, cuya contracción rítmica es involuntaria (Molist et al., 2017). Está constituido por cardiomiocitos, células con núcleo central y que presentan estriaciones transversales (Sepúlveda & Soto, 2014).

El músculo estriado esquelético, el cual presenta también estriaciones, funciona bajo control voluntario y se encuentra inervado por fibras nerviosas que parten del sistema nervioso central. Se encuentra principalmente en toda la musculatura de las extremidades y tronco, pero también se localiza en la lengua, la faringe, en el segmento superior del esófago y en la porción lumbar del diafragma (Sepúlveda & Soto, 2014). El tejido muscular esquelético ocupa aproximadamente entre un 30-40 % del organismo (Janssen et al., 2000). Este trabajo se centrará en este tipo de tejido muscular.

El tejido muscular esquelético está formado por células musculares estriadas esqueléticas o miocitos. Estas células se asocian entre sí para formar un fascículo muscular, y, a su vez, varios fascículos se unen para dar lugar a un músculo esquelético (Molist et al., 2017). Cada una de las células se encuentra rodeada por una lámina basal, constituida por matriz extracelular, además de fibras reticulares y de colágeno que constituyen el endomisio. A su vez, cada fascículo muscular está rodeado por el perimisio, formado por tejido conjuntivo denso, y el músculo se encuentra envuelto por otra capa de tejido conjuntivo denominada epimisio (Molist et al., 2017). Los vasos sanguíneos y nervios atraviesan el tejido conjuntivo uniéndose al músculo, permitiendo de este modo la inervación y vascularización (Sepúlveda & Soto, 2014).

Las células musculares esqueléticas son células alargadas, cilíndricas y estriadas, dispuestas en paralelo formando haces o láminas. Son multinucleadas, es decir, forman un sincitio, cuyos núcleos y otros orgánulos se localizan justo debajo de la membrana plasmática, denominada sarcolema. El sarcolema presenta una serie de invaginaciones que dan lugar a los túbulos T. Estas células se caracterizan por poseer un citoesqueleto muy desarrollado que permite el acortamiento de las células, produciéndose así la contracción muscular (Molist et al., 2017). El citoesqueleto se encuentra constituido por filamentos de actina y miosina II, las cuales forman las miofibrillas. Estas miofibrillas se rodean de retículo endoplasmático liso, denominado retículo sarcoplásmico. (Molist et al., 2017)

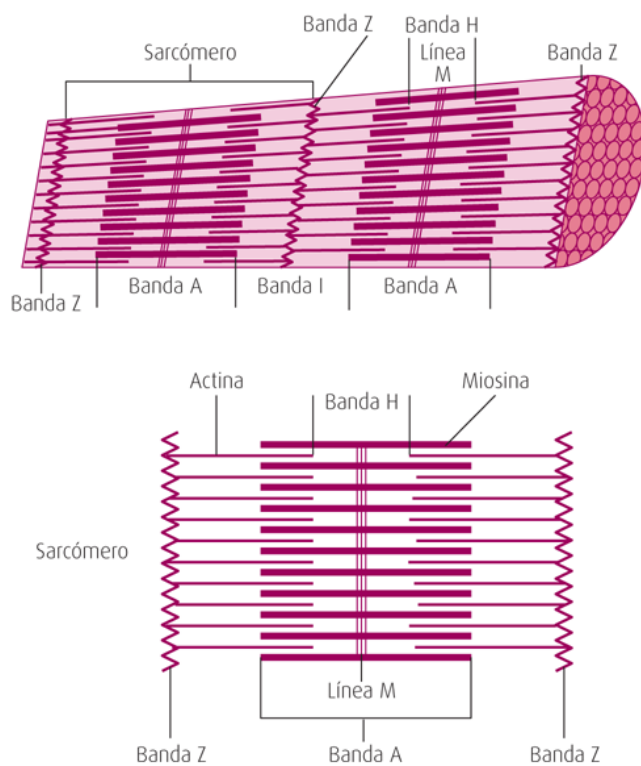


Figura 1: Esquema de la organización del sarcómero. (Sepúlveda & Soto, 2014).

Las células esqueléticas se denominan estriadas debido a que presentan, al ser observadas con microscopía óptica, un patrón de bandas oscuras, denominadas bandas A (anisótropas), y bandas claras, denominadas bandas I (isótropas), dispuestas perpendicularmente al eje mayor de la célula (Molist et al., 2017). En el centro de cada banda A encontramos un área pálida denominada banda H, que a su vez es dividida por la línea M. Por otro lado, cada banda I se encuentra cortada por la banda Z (Sepúlveda & Soto, 2014). La sección comprendida entre dos bandas Z es un sarcómero (Fig. 1), unidad anatómica y funcional del músculo estriado.

Los sarcómeros están constituidos por gran cantidad de proteínas. Encontramos dos tipos de filamentos: los filamentos delgados, formados por actina, tropomiosina, troponina y proteínas asociadas como la nebulina, tropomodulina y CapZ; y los filamentos gruesos, constituidos por miosina II y tres proteínas asociadas, miomesina, titina y proteína C, además de la enzima creatina quinasa (Gartner & Hiatt, 2015).

El retículo sarcoplásmico es uno de los orgánulos más importantes de la célula muscular. Se trata de retículo endoplasmático liso modificado, que presenta una serie de dilataciones denominadas cisternas terminales, localizadas en la zona de unión de las bandas A e I (Sepúlveda & Soto, 2014). En este lugar de unión, dos cisternas junto a un túbulo T central forman una tríada (Sepúlveda & Soto, 2014). El retículo sarcoplásmico regula la contracción muscular, secuestrando iones calcio, lo que produce la relajación, o liberando iones calcio, lo que produce la contracción (Gartner & Hiatt, 2015).

En condiciones normales, las células musculares no suelen dividirse, de manera que el aumento del número de células musculares es debido a otras células, denominadas células satélite. Se trata de células mononucleadas localizadas entre la membrana plasmática de las células estriadas y la lámina basal. Éstas actúan como células madre con la capacidad de formar nuevas células musculares estriadas (Molist et al., 2017).

Las células musculares se encuentran invadidas por neuronas motoras procedentes de la médula espinal y el tronco encefálico (Molist et al., 2017). Denominamos unión neuromuscular a la estructura formada por una neurona motora y todas las células musculares a las que inerva (Gartner & Hiatt, 2015). Consiste en una sinapsis entre el terminal axónico y la membrana del miocito, todo ello recubierto por expansiones gliales de las células de Schwann (Molist et al., 2017).

La contracción muscular comienza con la transmisión del impulso nervioso, el cual produce la despolarización de la membrana de la fibra muscular, entrada de calcio extracelular y liberación de iones calcio de las cisternas del retículo sarcoplásmico, aumentando así la concentración de calcio intracelular (Sepúlveda & Soto, 2014). Los iones calcio se unen a la troponina C, lo cual modifica la conformación del complejo de troponina, y esto produce el movimiento de la tropomiosina, dejando libre el sitio de unión para la miosina en la actina (Sepúlveda & Soto, 2014). Con la unión de miosina con actina tiene lugar el inicio de la contracción muscular, ya que ésta produce la liberación de ADP y Pi de la cabeza de la miosina II (Sepúlveda & Soto, 2014). La cabeza de la miosina sufre un cambio conformacional que le da la capacidad de desplazar al filamento de actina aproximadamente 10 nm hacia la banda H (Sepúlveda & Soto, 2014). Este cambio conformacional también hace posible la unión del ATP a la cabeza de miosina, lo que produce un nuevo cambio de conformación del sitio de unión de la actina, provocando la separación de actina y miosina (Sepúlveda & Soto, 2014). A continuación, la actividad ATPasa de la miosina hidroliza el ATP y, con la energía química

liberada, la molécula de miosina recupera su conformación inicial (Sepúlveda & Soto, 2014). Este proceso se repite varias veces por segundo, permitiendo así el desplazamiento del filamento de actina por la cabeza de la miosina en dirección a la banda H, siempre y cuando las concentraciones de calcio intracelular sean altas, ya que cuando las concentraciones de calcio alcanzan los niveles basales se produce la relajación muscular (Sepúlveda & Soto, 2014).

2.2 La disferlina

La disferlina es una proteína transmembrana de un solo paso de alto peso molecular, aproximadamente 240 kDa, que se expresa en gran medida en miofibras multinucleadas (Mcnally, 2012). Presenta homología en la secuencia de aminoácidos con el factor de espermatogénesis de *Caenorhabditis elegans*, FER-1, de ahí su nombre (Amato & Brown, 2011). Pertenece a la familia de las ferlinas, un grupo de proteínas transmembrana que poseen un dominio extracelular C-terminal corto y entre cinco y siete dominios C2 citosólicos en tándem múltiple, (Cárdenas et al., 2016). Dentro del grupo de las ferlinas humanas se incluyen cinco genes que codifican proteínas: FER1L1/DYSF (disferlina), FER1L2/OTOF (otoferlina), FER1L3/MYOF (mioferlina), FER1L5 (Fer1L5) y FER1L6 (Fer1L6), y el pseudogen FER1L4 que codifica un largo ARN no codificante (Lek et al., 2010; Redpath et al., 2016; Song et al., 2013). El gen DYSF se conserva en humanos, chimpancés, monos Rhesus, perros, vacas, ratones, ratas, pollos, peces cebra y *C.elegans* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/20748>). Este trabajo se centrará en la disferlina humana.

Se localiza principalmente en el músculo esquelético, concretamente en la membrana plasmática y en la red de túbulos T (Cooper & Head, 2014); también se encuentra en vesículas citoplasmáticas (Glover & Brown, 2007). Asimismo, se localiza en gran medida en el músculo cardíaco (Demonbreun & McNally, 2017). Además, la podemos encontrar en menor medida en otras células o tejidos como monocitos, pulmón, piel, cerebro, testículos y placenta (Bashir et al., 1998), aunque se desconoce el papel de la disferlina en estos tejidos (Demonbreun & McNally, 2017).

La disferlina está constituida por siete dominios C2 en tándem dentro de su dominio citoplasmático (Cooper & Head, 2014) (Fig. 2); estos dominios C2 son de plegamiento independiente, están formados por 100-130 aminoácidos organizados en una estructura de ocho cadenas β (Corbalan-garcia & Gómez-fernández, 2014) y actúan como dominios de unión a lípidos regulados por calcio (Cooper & Head, 2014). No todos los dominios C2 se unen al

calcio y existen algunos que median interacciones proteína-proteína en lugar de proteína-lípido. Además de los dominios C2, la disferlina posee motivos Fer (FerI, FerA y FerB) y DysF, cuyas funciones se desconocen (Bulankina & Thoms, 2020; Cárdenas et al., 2016). La mayoría de las acciones de las ferlinas están mediadas por los dominios C2 (Lek et al., 2012). Los dominios C2 se unen a fosfolípidos ácidos de manera dependiente de calcio; en concreto el dominio C2A se asocia a fosfatidilserina y fosfoinosítidos (Therrien et al., 2009). Estudios recientes han mostrado que los siete dominios C2 tiene afinidades variables al calcio, siendo el C2A y C2C los más sensibles (Abdullah et al., 2014).

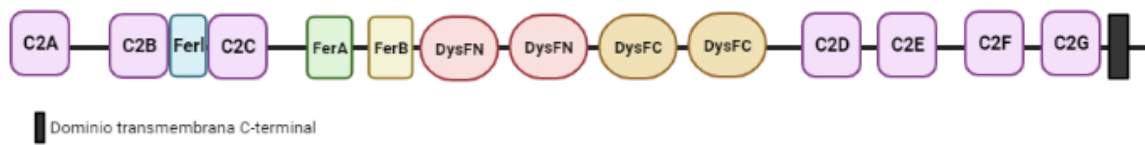


Figura 2: Organización de los dominios de la disferlina.

Esta proteína es codificada por el gen DYSF, constituido por 58 exones, con una longitud de más de 150 kb de ADN genómico y se localiza en el cromosoma 2p13 (Aoki et al., 2001; Bashir et al., 1998; Liu et al., 1998). Este gen se transcribe en una molécula de ARNm de aproximadamente 8,5 kb, el cual codifica la proteína de la disferlina de 2080 aminoácidos (Amato & Brown, 2011).

El gen DYSF en humanos posee 19 variantes de splicing, de las cuales 11 codifican proteínas mientras que el resto no (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core:g=ENSG00000135636;r=2:71453722-71686768). Algunas variantes son: en el exón v1, el cual codifica el primer dominio de unión al calcio, el dominio C2A, en la que se altera la sensibilidad al calcio y las propiedades de unión a lípidos del primer dominio C2 (Fuson et al., 2018); en el exón 17, presente en la isoforma del músculo esquelético, pero no en todas las isoformas de otros tejidos; en los exones 5a y 40a, muy poco expresados en el músculo esquelético, pero ampliamente expresados en otros tejidos. En la isoforma canónica del gen de la disferlina en el músculo esquelético se encuentran el exón canónico 1 y el exón 17, pero esta variante carece de los exones 5a y 40a (Cooper & Head, 2014).

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo ha sido llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre el papel de la disferlina en el músculo esquelético. Para ello se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar de las funciones de la disferlina en el músculo esquelético.
- Estudiar las enfermedades que se producen cuando el gen que codifica a disferlina posee alguna mutación.
- Estudiar las estrategias que se están desarrollando para tratar las patologías causadas por mutaciones en el gen que codifica a disferlina.

4. METODOLOGÍA

Para la elaboración de este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda de artículos científicos, revisiones y libros sobre la disferlina y el músculo esquelético en diversos buscadores académicos y páginas web científicas:

- **Google Scholar**, buscador especializado en bibliografía científico-académica.
- **PubMed**, buscador que permite acceder a bibliografía y artículos científicos de biomedicina.
- **Science Direct**, sitio web que ofrece gran cantidad de artículos científicos.
- **NCBI**, página web que ofrece gran cantidad de información biomédica y genómica.
- **Ensembl**, buscador de genomas que aporta información sobre los genomas de vertebrados.

Para llevar a cabo las búsquedas se han utilizado palabras clave como: *dysferlin*, *dysferlinopathy*, *mutations in dysferlin*, *membrane repair*, *functions of dysferlin*, *therapy*. Los artículos fueron elegidos en base al título y abstract, seleccionando aquellos que tuvieran mayor relevancia con el tema estudiado. Además, se han seleccionado artículos que hayan sido publicados recientemente.

5. FUNCIONES DE LA DISFERLINA

5.1 Reparación del sarcolema

La función más estudiada de la disferlina es su participación en la reparación de la membrana de las células musculares esqueléticas. La contracción de las fibras musculares hace que se genere tensión mecánica en el sarcolema de las células, produciendo microlesiones, las cuales deben ser reparadas rápidamente para evitar la muerte celular (Bulankina & Thoms, 2020).

Numerosos estudios han demostrado la importancia del complejo distrofina-glicoproteína (DGC) en la estabilidad de la estructura del sarcolema, ya que este complejo conecta el citoesqueleto y la matriz extracelular (Dalkilic & Kunkel, 2003; Durbeej & Campbell, 2002). El DGC está constituido por distrofina, distroglicanos (α y β), sarcoglicanos (α , β , γ y δ), sarcospan, sintrofinas ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$; y en neuronas las sintrofinas $\gamma 1$ y $\gamma 2$) y α -distrobrevina (Fig.3)

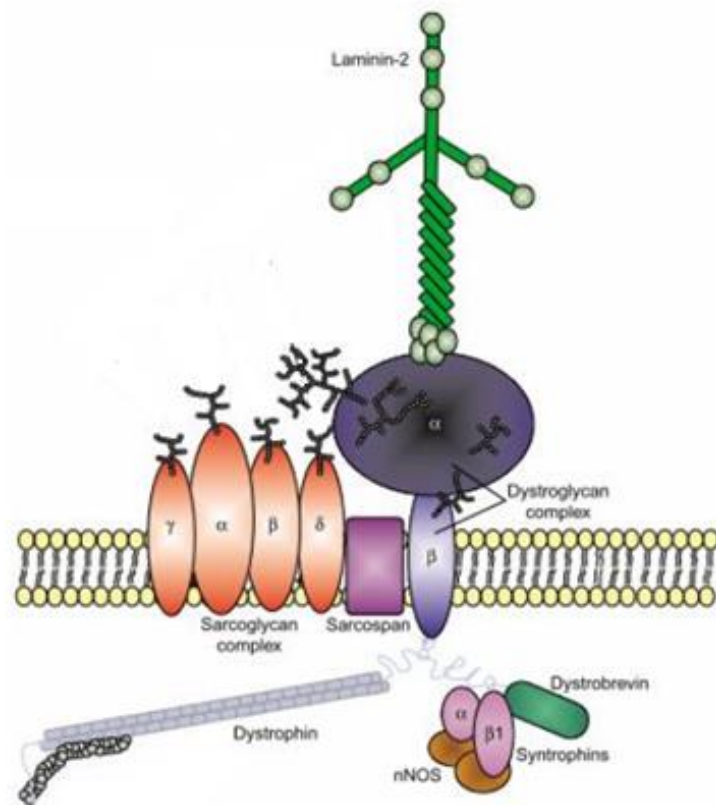


Figura 3: Complejo distrofina-glicoproteína (Durbeej & Campbell, 2002).

(Durbeej & Campbell, 2002). La distrofina se une a la actina del citoesqueleto y a la proteína transmembrana β -distroglicano; el dominio extracelular de β -distroglicano se une a la proteína de membrana periférica α -distroglicano, la cual a su vez se une a la laminina-2 de la lámina basal (Durbeej & Campbell, 2002).

La pérdida de alguno de los componentes del DGC hace que la membrana sea susceptible de sufrir daños mecánicos (Glover & Brown, 2007) cuya consecuencia patológica sería el desarrollo de una distrofia muscular. Sin embargo, se ha demostrado que las células musculares carentes de disferlina poseen una membrana estructuralmente estable, ya que la degeneración asociada a la deficiencia de disferlina está mediada por un mecanismo distinto al de las distrofias ligadas al DGC (Glover & Brown, 2007). Es decir, aparentemente la disferlina no tiene ninguna interacción importante con el DGC (Amato & Brown, 2011).

Tradicionalmente, la reparación y regeneración de las fibras musculares se ha atribuido principalmente a las células satélite (Glover & Brown, 2007). Éstas se ubican debajo de la lámina basal de las fibras musculares, y cuando se encuentran activadas expresan factores reguladores miogénicos como Myo-D y Myf-5 (Cornelison & Wold, 1997). Las células satélite son activadas mediante un daño en el músculo o debido a esfuerzos mecánicos (Gartner & Hiatt, 2020). Influenciadas por los factores reguladores de la miogénesis, estas células se transforman en mioblastos que se fusionan entre sí formando miotubos, los cuales se diferencian en células musculares esqueléticas (Gartner & Hiatt, 2020). Se ha identificado la expresión de disferlina en las células satélite activadas, lo que implica a la disferlina en los eventos de fusión de membranas que ocurre durante la reparación de las fibras musculares mediada por dichas células (De Luna et al., 2004).

En el proceso de reparación de la membrana plasmática intervienen varios mecanismos: taponamiento, parcheo, internalización por endocitosis y externalización o desprendimiento de membranas (Barthélémy et al., 2018; Moe et al., 2015). Estos mecanismos pueden coexistir dependiendo del tipo de célula y del tamaño de la lesión (Barthélémy et al., 2018; Bulankina & Thoms, 2020).

Como consecuencia de una lesión en la membrana plasmática se produce la entrada de calcio extracelular, que genera un gran aumento de los niveles de calcio intracelular, lo cual desencadena su reparación (Barthélémy et al., 2018). Este aumento desencadena el reclutamiento de proteínas y el reordenamiento del citoesqueleto (Barthélémy et al., 2018). La fosfatidilserina se coloca alrededor de la rotura y la actina se une a su vez a la fosfatidilserina (Barthélémy et al., 2018). Los filamentos de actina facilitan el transporte de vesículas hacia la zona de rotura de la membrana, con la ayuda de la kinesina, y la miosina promueve la exocitosis (Barthélémy et al., 2018). La exocitosis dependiente de calcio disminuye la tensión de la membrana y facilita el proceso de reparación (Barthélémy et al., 2018).

En primer lugar, se produce una respuesta de emergencia, lo que se conoce como taponamiento (Barthélémy et al., 2018). Este mecanismo, a diferencia de otros, no hace que la membrana vuelva a estar unida, sino que crea un “tapón” que bloquea el sitio de rotura (Moe et al., 2015). Consiste en un proceso en el que compartimentos membranosos o vesículas u otros componentes de la membrana, como proteínas, se entrecruzan entre sí y con la membrana plasmática creando un tapón que detiene la entrada y salida de materiales de la célula (Barthélémy et al., 2018; Moe et al., 2015). Se trata de una solución temporal, posteriormente la membrana ha de ser sellada (Moe et al., 2015). En este caso los compartimentos membranosos no se fusionan entre sí, solamente se unen.

Cuando las roturas de membrana son de pequeño tamaño, la reparación tiene lugar mediante internalización o externalización de la misma. En el mecanismo de internalización mediado por endocitosis se produce la invaginación de la membrana plasmática que se encuentra alrededor de la rotura, creando una vesícula que pasa al interior de la célula y cerrando la zona de rotura, de manera que se produce un proceso similar a la endocitosis (Moe et al., 2015). La externalización o desprendimiento de membranas es el mecanismo opuesto a la internalización, en el que se produce una evaginación de la membrana hacia el exterior de la célula (Moe et al., 2015).

La hipótesis del parcheo es una vía rápida de reparación de células musculares esqueléticas que implica reclutamiento de vesículas (Glover & Brown, 2007). Esta hipótesis propone que la entrada de calcio a través del sitio de rotura de la membrana produce eventos de fusión local vesícula-vesícula y vesícula-membrana plasmática (R. Han & Campell, 2007). De manera que, se acumulan vesículas grandes debajo del sitio de rotura, creando un “parche” de membrana nueva (R. Han & Campell, 2007). Se ha confirmado mediante dos estudios que la disferlina tiene un papel en el resellado de la membrana por esta vía, estableciendo esta proteína como el primer componente de reparación de la membrana identificado en el músculo esquelético (Bansal et al., 2003; Lennon et al., 2003). Por un lado, las miofibras sin disferlina no logran volver a sellarse (Bansal et al., 2003), y por otro lado, cuando la expresión de disferlina es reducida, las miofibras tardan más en repararse (Lennon et al., 2003). Además, un enriquecimiento de disferlina en el sitio de lesión concuerda con la hipótesis del parche, que indica que las vesículas citoplasmáticas que albergan disferlina se agregan para fusionarse con la membrana lesionada (Mcneil & Terasaki, 2001).

Se ha considerado que los lisosomas son la principal fuente de endomembrana en las células de mamífero en el proceso de reparación de la membrana (Reddy et al., 2001), aunque recientemente se ha identificado un orgánulo, el *enlargeosome*, que participa en la reparación en ausencia de lisosomas (Cocucci et al., 2004; Huang et al., 2007). Es probable que, por su analogía con fer-1 de *C. elegans*, la fusión de las vesículas con la membrana plasmática esté mediada por la disferlina, y tenga lugar a través de los dominios C2 que median la unión de fosfolípidos con proteínas de manera dependiente de calcio. Cabe destacar que la disferlina no se localiza en los lisosomas de los miotubos intactos, pero las vesículas que contienen disferlina se fusionan con los lisosomas tras el daño del sarcolema (McDade & Michele, 2014). Se desconoce la composición de las vesículas que contienen disferlina y si éstas derivan de alguno de los compartimentos de membrana conocido (McDade & Michele, 2014). Se ha observado que estas vesículas no pertenecen la vía secretora de las células musculares (McDade & Michele, 2014).

La deficiencia de disferlina altera gravemente la reparación de la membrana, lo que indica que es un miembro clave durante el proceso. Además de disferlina, en el proceso de reparación intervienen otras proteínas específicas que interaccionan con ésta (Fig.4):

- **Anexinas A1, A2 y A6** (Demonbreun et al., 2016; Lennon et al., 2003). Las anexinas se asocian de manera altamente dependiente de calcio a la disferlina y la membrana plasmática (Glover & Brown, 2007). La asociación entre A1 y disferlina se rompe cuando se produce una lesión en el sarcolema, mientras que la asociación con A2 se mantiene independientemente de la lesión, lo que indica que cada una de las anexinas tiene papeles independientes en el proceso de reparación (Glover & Brown, 2007).
- **Mitsugumin 53 (MG53) y caveolina 3**, ambas proteínas específicas musculares son importantes en la nucleación de la maquinaria de reparación del sarcolema y para la regulación del tráfico de disferlina hacia y desde la membrana plasmática (Cai et al., 2009; Hernández-Deviez et al., 2008).
- **AHNAK**, una proteína de anclaje que participa en la regulación de la homeostasis del calcio, la señalización y la estructura del citoesqueleto (Huang et al., 2007; Park et al., 2018).
- **Mioferlina**, otra proteína perteneciente a la familia de las ferlinas que, al igual que disferlina, está implicada la reparación de la membrana plasmática.
- **Calpaína 3**, es una proteína específica del músculo perteneciente a la familia de las cisteín proteasas dependientes de calcio, que se asocia a titina (Glover & Brown, 2007).

Está implicada en la remodelación del citoesqueleto en fenómenos como la fusión de mioblastos y reparación de la membrana plasmática (Glover & Brown, 2007).

- **Affixina (β -parvin)**, proteína que une las integrinas y el citoesqueleto (Matsuda et al., 2005).
- **Vinculina**, proteína que participa en el transporte de vesículas retrógradas a lo largo de los microtúbulos y la tubulina A (de Morrée et al., 2010; Flix et al., 2013).

Los diversos dominios C2 de la disferlina parecen tener funciones independientes (Cárdenas et al., 2016). Por un lado, tenemos el dominio C2A, el cual se ha demostrado que media la fusión de los lisosomas con el sarcolema (Han et al., 2012), y es necesario en la acumulación de disferlina dependiente de MG53 en los sitios de daño (Matsuda et al., 2012). El motivo C2B-Fer1-C2C está implicado en la regulación de la expresión de la disferlina en el sarcolema, además de regular su tasa endocítica (Evesson et al., 2010). En la región C terminal de la disferlina encontramos los dominios C2F y C2G, también implicados en la reparación del sarcolema (Cárdenas et al., 2016). Estos dominios se asemejan estructuralmente con la sinaptotagmina, proteína con región transmembrana y dos dominios C2 (Bai & Chapman, 2004), crucial en varios procesos de exocitosis como el de las vesículas sinápticas de las neuronas o las vesículas de secreción de células secretoras (Bai & Chapman, 2004). El fragmento de disferlina estructuralmente similar a la sinaptotagmina se denominó “minidisferlina”. Se ha demostrado que esta minidisferlina es capaz de restaurar la actividad de reparación de la membrana en fibras del músculo esquelético deficientes en disferlina (Krahn et al., 2010), pero no corrige el fenotipo distrófico (Lostal et al., 2012). Esto indica que el resto de los dominios de la disferlina, de los cuales carece la minidisferlina, están involucrados en otras funciones críticas del músculo esquelético (Cárdenas et al., 2016).

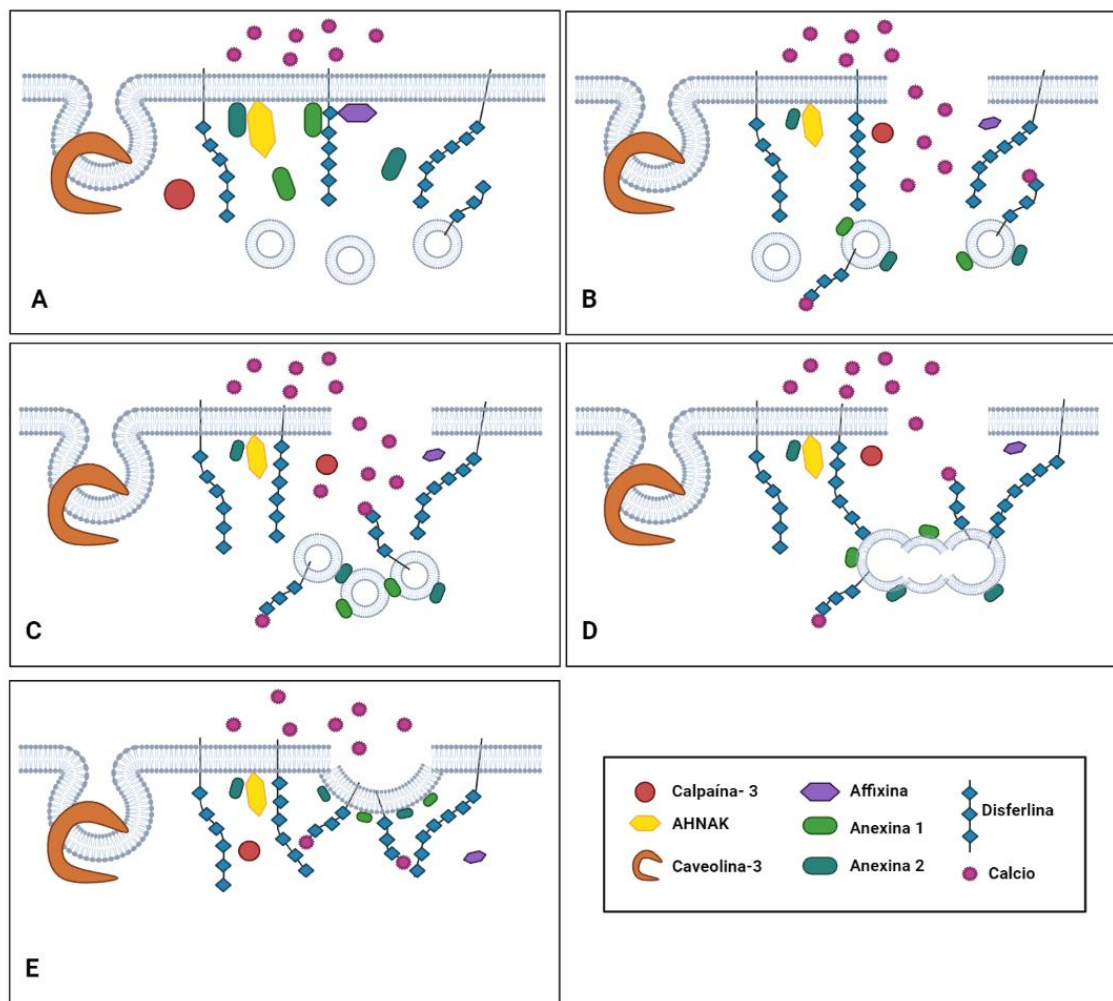


Figura 4: Modelo de reparación de la membrana mediada por disferlina [Basado en (Han & Campbell, 2007) y (Glover & Brown, 2007)]. En una fibra muscular normal la disferlina se encuentra unida al sarcolema y a las vesículas citoplasmáticas por su dominio transmembrana C-terminal, e interactúa con las anexinas 1 y 2, AHNAK, affixina y caveolina-3 (A). La rotura de la membrana plasmática hace que entre calcio hacia el interior de la fibra, aumentando la concentración de calcio intracelular (B). El aumento del calcio activa la calpaína, lo que lleva a la escisión de proteínas del citoesqueleto, reduciendo la tensión de la membrana. Las vesículas intracelulares que portan disferlina se unen por medio de las anexinas 1 y 2 para formar un parche de endomembrana y migrar hacia la zona de rotura (C, D). La affixina facilita el tráfico de vesículas mediante la reorganización del citoesqueleto en la zona de rotura. Las moléculas de disferlina presentes tanto en las vesículas como en la membrana plasmática median el acoplamiento y la fusión del parche, reparando la membrana y evitando la entrada de más calcio al interior celular (E).

5.2 Funciones en la biología de la triada

La disferlina participa en la inducción de la curvatura de las membranas durante la biogénesis del túbulo T, especialmente en la regeneración de los músculos y probablemente también durante la reparación del sistema en caso de lesión (Hofhuis et al., 2017; Waddell et al., 2011), además de intervenir en la homeostasis del calcio (Kerr et al., 2013).

Recientemente se ha demostrado que la disferlina se localiza en la unión A-I de las fibras musculares (Kerr et al., 2013). Dado que las triadas están localizadas en esta unión y ayudan a

producir una contracción uniforme en el músculo, se ha observado que el músculo deficiente de disferlina posee una estructura alterada del túbulo T, lo que afecta al correcto desarrollo de su función, además de aumentar el estrés oxidativo, la inflamación y la necrosis después de la lesión (Kerr et al., 2013).

El túbulo T, junto a dos cisternas terminales del retículo sarcoplásmico, forman un sistema de compartimentos de membrana denominado triada (Bulankina & Thoms, 2020). La triada posee dos tipos de receptores, los receptores de dihidropiridina (DHPR) que son canales de calcio de tipo L (LTCC) dependientes de voltaje y localizados en los túbulos T, y los receptores de rianodina (RyR), canales de calcio que regulan la liberación de calcio inducida por calcio por las cisternas del retículo sarcoplásmico (Bulankina & Thoms, 2020). La principal función de la triada es el acoplamiento de excitación-contracción de las fibras musculares estriadas, lo cual es llevado a cabo mediante la unión física de los tipos de canales mencionados anteriormente (Bulankina & Thoms, 2020).

La disferlina localizada en los túbulos T forma un complejo tanto con los DHPR como con los RyR, regulando su función en el caso de lesión. Es decir, es probable que la disferlina actúe estabilizando la homeostasis del calcio en las fibras dañadas, inhibiendo las DHPR y previniendo la fuga de calcio a través de los RyR inducida por la lesión (Kerr et al., 2013).

Los músculos con deficiencia de disferlina presentan anomalías en los túbulos T durante la regeneración (Hofhuis et al., 2017). La disferlina actúa junto a caveolina 3, anfifisina 2 y fosfatidilinositol bisfosfato (PIP2) durante el proceso de biogénesis de los túbulos T (Hofhuis et al., 2017). La anfifisina 2, junto a PIP2, inducen la curvatura de la membrana en el proceso de tubulación (Hofhuis et al., 2017). La caveolina 3 actúa como regulador negativo de la función de disferlina, ya que al expresar la disferlina junto con caveolina-3 se ha observado una reducción de la tubulación de la membrana mediada por disferlina (Hofhuis et al., 2017). Un estudio reciente mostró que la disferlina generaba túbulos de membrana en células no musculares o deficientes de disferlina, lo que demuestra que una de las funciones de disferlina es la formación de túbulos T (Hofhuis et al., 2017). Existen hallazgos que indican que los dominios C2 de la disferlina son los responsables de la formación de la curvatura en el proceso de tubulación (Marty et al., 2013). La formación de túbulos T no es universal para todos los miembros de las ferlinas, ya que se ha observado que la expresión de mioferlina y otoferlina no induce la formación de túbulos T (Hofhuis et al., 2017). Los fosfolípidos son un componente importante en la formación de los sistemas de túbulos T en presencia de disferlina, ya que se

ha demostrado que la disferlina no puede inducir la tubulación en ausencia de PIP2 (Hofhuis et al., 2017). Las mutaciones en el gen DYSF que producen disferlinopatías interfieren con las propiedades de unión de fosfolípidos y en la tubulación de la membrana, lo que indica que los defectos en estos dos procesos son relevantes en la patogénesis de la distrofia muscular causada por la deficiencia de disferlina (Hofhuis et al., 2017).

5.3 Función de la disferlina en la diferenciación, crecimiento y regeneración del músculo esquelético.

En pacientes con disferlinopatías, el músculo esquelético se desarrolla de forma normal antes de que aparezcan los síntomas de la enfermedad (Bulankina & Thoms, 2020). Los signos de patología, como son fibras con núcleos centrales o variabilidad en el tamaño de las fibras, aparecen cuando el individuo alcanza cierta edad, de manera que, si la disferlina tiene un papel importante durante el crecimiento del músculo o su diferenciación, probablemente tenga lugar en un punto determinado del desarrollo del individuo (Bulankina & Thoms, 2020).

Existe información contradictoria acerca del papel de la disferlina en los procesos de diferenciación, crecimiento y regeneración del músculo esquelético (Bulankina & Thoms, 2020).

Algunos autores defienden que la ausencia de disferlina no tiene efectos sobre la diferenciación de mioblastos (Defour et al., 2014; Humphrey et al., 2012). Un estudio con células miogénicas de ratón deficientes en disferlina mostró que los mioblastos proliferaban activamente en el medio de cultivo y se fusionaban formando miotubos largos multinucleados en el medio de diferenciación, es decir, esta línea celular no tenía problemas para proliferar ni para fusionarse formando miotubos (Humphrey et al., 2012). Otro estudio llevado a cabo con líneas celulares tanto de ratón como de humano apoya que la deficiencia de disferlina no tiene efectos sobre la diferenciación de mioblastos (Defour et al., 2014). Sin embargo, se observó una mala reparación de las membranas de células musculares disferlinopáticas (Defour et al., 2014). Además, se ha observado que los ratones con deficiencia de disferlina muestran características distróficas a partir de los 2 meses de edad, y que estas características empeoraron a los 4 meses, lo que indica que la ausencia de disferlina no afecta al desarrollo del músculo (Lostal et al., 2010).

Otros autores defienden la función de la disferlina en la diferenciación de mioblastos de modo que la fusión de mioblastos se vea afectada solo indirectamente (Bulankina & Thoms, 2020). Un estudio llevado a cabo con cultivos primarios de músculo esquelético humano sugiere

que la ausencia de disferlina afecta al proceso de diferenciación muscular *in vitro* (De Luna et al., 2006). Se ha encontrado acumulación de disferlina en los sitios de fusión de los mioblastos, lo que indica que la disferlina participa en los eventos de fusión (De Luna et al., 2006). También se ha observado que los niveles de MyoD en los cultivos de células musculares deficientes en disferlina no difieren del músculo normal (De Luna et al., 2006). Sin embargo, los niveles de ARNm de miogenina se reducen en cultivos de fibras musculares deficientes en disferlina, lo cual sugiere que la disferlina está involucrada en la vía de diferenciación muscular mediada por miogenina (De Luna et al., 2006). Además, los mioblastos aislados de pacientes con disferlinopatías o de ratones con deficiencia de disferlina proliferaron con una tasa normal (Cohen et al., 2012; De Luna et al., 2006), pero poseían una menor eficacia de fusión *in vitro* como resultado de la activación de la vía de señalización proinflamatoria que inhibe la miogénesis (Cohen et al., 2012).

Se ha observado que la regeneración muscular se atenúa en ausencia de disferlina, lo que genera un mayor número de fibras musculares inmaduras y sugiere que la regeneración se retrasa o es incompleta en pacientes con disferlinopatía (Cárdenas et al., 2016; Chiu et al., 2009). La regeneración muscular requiere una respuesta inmune temporalmente aguda y transitoria, pero en las disferlinopatías la respuesta inflamatoria es prolongada, lo cual probablemente sea debido a una falta de liberación de citocinas estimulada por los mioblastos (Cárdenas et al., 2016; Chiu et al., 2009).

6. LAS DISFERLINOPATÍAS

Las disferlinopatías son un grupo de enfermedades musculares con herencia autosómica recesiva, que se producen debido a mutaciones en el gen DYSF, el cual codifica la proteína disferlina.

Son un tipo de distrofias musculares, que son un grupo de trastornos hereditarios que se caracterizan por debilidad y desgaste progresivos de los músculos esqueléticos (Cooper & Head, 2014). Existe gran variabilidad en las características genéticas y bioquímicas, la distribución de la musculatura afectada, el grado de compromiso respiratorio y cardíaco y la afectación de otros sistemas orgánicos como los ojos y el sistema nervioso central; incluso existe gran variabilidad entre pacientes con un mismo trastorno (Carter et al., 2018). La debilidad del músculo esquelético es característica de todas las distrofias musculares, aunque la distribución, el grado y la naturaleza progresiva de la debilidad difieren entre los trastornos (Carter et al., 2018). Las distrofias musculares tienen una distribución mundial y una incidencia estimada de 1/2000

nacidos vivos (Cárdenas et al., 2016). En pacientes con disferlinopatía, el músculo esquelético está afectado, mientras que la función cardíaca generalmente permanece intacta (Demonbreun & McNally, 2017). La función respiratoria se ve afectada levemente y ocasionalmente se necesita asistencia respiratoria (Takahashi et al., 2013).

Las disferlinopatías son categorizadas como enfermedades raras, considerando que una enfermedad es rara cuando afecta a un número pequeño de personas en comparación con la población general. En Europa se considera que una enfermedad es rara cuando afecta a 1 de cada 2.000 personas. Se desconoce la incidencia exacta de las disferlinopatías en el mundo, pero se estima que poseen una incidencia aproximada de 1-9/1.000.000 (<https://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/?lng=ES>)

6.1 Fenotipos de las disferlinopatías

Se definen principalmente 4 fenotipos de disferlinopatías:

Distrofia muscular de cinturas 2B o R2 (LGMD2B o LGMD R2 relacionada con la disferlina):

Las distrofias musculares de cinturas (LGMDs) son enfermedades musculares genéticas que se caracterizan por debilidad progresiva y atrofia muscular, y que afectan mayoritariamente a las caderas, hombros y músculos proximales de las extremidades (Wicklund, 2014). Este tipo de enfermedad tiene su inicio en la niñez tardía hasta el inicio de la edad adulta, aproximadamente entre los 15 y los 30 años.

La clasificación de las LGMDs se lleva a cabo mediante una nomenclatura de consenso. En primer lugar, se dividen en dos subtipos dependiendo del patrón de herencia: autosómico dominante (LGMD1) y autosómico recesivo (LGMD2). A continuación, y mediante el uso de un sistema alfabético, se clasifican en función del orden en que han sido descubiertas (Wicklund, 2014). Actualmente se propone otro sistema para la clasificación de las LGMDs, en el que, primeramente, se indica el modo de herencia, siendo “D” dominante y “R” recesiva; a continuación, se indica mediante números el orden de descubrimiento, y por último se indica a qué proteína afecta (Straub et al., 2018).

La distrofia muscular de cinturas 2B o R2 es uno de los fenotipos más comunes de disferlinopatía. Esta enfermedad se presenta con una afección temprana y prominente de la musculatura proximal de las piernas (Amato & Brown, 2011). También pueden verse afectados los músculos de la cintura escapular y los músculos de la parte posterior de las piernas (Amato

& Brown, 2011; Nguyen et al., 2007). En fases avanzadas de la enfermedad los pacientes presentan debilidad muscular generalizada, a excepción de la musculatura facial, bulbar y la intrínseca de las manos (Nguyen et al., 2007). Los pacientes requieren de ayuda para caminar tras 20 años del inicio de la enfermedad, bien sea de muletas o bastones como de silla de ruedas, dependiendo del caso (Klinge et al., 2010).

Miopatía distal de Miyoshi:

Fue descrita por primera vez en Japón y es otro de los fenotipos más comunes de disferlinopatía. Los pacientes presentan atrofia de los músculos distales posteriores de las piernas, concretamente del gastrocnemio (gemelo) y sóleo. Este tipo de distrofia suele presentarse en la adolescencia o en la veintena. El primer síntoma en personas afectadas es la incapacidad de ponerse de puntillas. En algunos casos al inicio de la enfermedad se puede presentar engrosamiento de los gemelos y dolor. Además, es frecuente que la afección de los músculos sea asimétrica (Amato & Brown, 2011; Paradas et al., 2010). Pasado un tiempo, la debilidad progresa afectando al compartimento posterior de los muslos, los cuádriceps, la musculatura pélvica y la cintura escapular (Paradas et al., 2010). Un tercio de los pacientes acaban en silla de ruedas pasados 10 años del inicio de la enfermedad (Linssen et al., 1997).

Miopatía tibial anterior:

Se caracteriza por una debilidad distal severa, que afecta principalmente a los músculos tibiales anteriores y presentan una leve debilidad proximal en las piernas (Amato & Brown, 2011). La progresión de esta enfermedad es rápida, afectando a los músculos de la cintura pélvica, flexores de los dedos de las manos y finalmente a los músculos proximales del brazo (Illarioshkin et al., 1996). Los pacientes acaban perdiendo la capacidad de desplazarse.

Miopatía axial:

Los pacientes presentan debilidad de la musculatura paraespinal, acompañada de dolor lumbar e hiperlordosis. También aparece afección de la musculatura posterior de los muslos y piernas. La enfermedad se inicia a partir de los 50 años de edad. (Nagashima et al., 2004; Seror et al., 2008).

6.2 Mutaciones causantes de disferlinopatías

Las disferlinopatías son causadas debido a mutaciones del gen de la disfelina, DYSF. Actualmente existen dos bases de datos donde se registran las mutaciones del gen conocidas hasta el momento. La primera base de datos creada es la base de datos de distrofia muscular de

Leiden (www.lovd.nl/DYSF). Consta de 424 variantes de secuencia única, de las cuales 300 son causantes de enfermedades y aproximadamente 100 son polimorfismos (Blandin et al., 2012). Según esta base de datos, las mutaciones que tienen lugar en la disferlina son: un 43% mutaciones de cambio de sentido, un 53% mutaciones sin sentido y un 4% son debidas a pequeñas inserciones y deleciones dentro de los exones que forman la isoforma canónica de la proteína, a excepción de los exones 17 y 35 (Cooper & Head, 2014). Las variantes de splicing de los exones v1, 5a y 40a no han sido secuenciadas en el diagnóstico de disferlinopatías. La segunda base de datos es la UMD-DYSF (<http://www.umd.be/DYSF/>). Se han descrito en torno a 266 eventos mutacionales de los cuales: 175 sustituciones de bases (65,8%), 54 deleciones (20,3%), 26 duplicaciones (9,8%), 6 inserciones (2,3%) y 5 inserción/delección (1,9%) (Blandin et al., 2012). De las 266 mutaciones, 220 afectan a la secuencia exónica (82,7%) y 46 a la intrónica (17,3%) (Blandin et al., 2012). Las mutaciones exónicas se dividen en mutaciones de cambio de sentido (33,1%), mutaciones sin sentido (18%), mutaciones de cambio de marco de lectura (27,8%) e inserciones y deleciones (3,8%) (Blandin et al., 2012).

6.3 Diagnóstico de las disferlinopatías

Para concluir el diagnóstico de las disferlinopatías se llevan a cabo diversos estudios.

La creatina quinasa (CK) es una enzima localizada en el interior de las células que puede pasar a la sangre cuando hay daño en la membrana plasmática, de manera que es usada comúnmente como marcador de la degeneración muscular (Demonbreun & McNally, 2017). En condiciones de distrofia, las concentraciones séricas de CK en sangre son muy elevadas, entre 35 y 200 veces la normalidad (Amato & Brown, 2011).

Mediante resonancias magnéticas se ha comprobado que no existen grandes diferencias en cuanto a la distribución y la gravedad del compromiso muscular entre los distintos fenotipos. (Díaz et al., 2016; Paradas et al., 2010). En la miopatía de Miyoshi se han observado, mediante tomografía computerizada y resonancia magnética, áreas de disminución en el músculo gastrocnemio principalmente y, en menor grado, disminución del aductor mayor, isquiotibiales y glúteo menor (Illa et al., 2001; Linszen et al., 1997). Tanto en la miopatía de Miyoshi como en la miopatía axial se observa una baja densidad de los músculos paraespinales (Amato & Brown, 2011). La miopatía tibial anterior presenta predilección temprana por el reemplazo de grasa en los músculos tibiales anteriores (Illa et al., 2001). En el fenotipo LGMD2B o LGMDR2 se muestra afección grave del músculo gastrocnemio y sóleo, al igual que en la miopatía de Miyoshi (Amato & Brown, 2011).

Las biopsias musculares muestran fibras de tamaño variable, un aumento del tejido conjuntivo endomisial y fibras dispersas, tanto necróticas y como en regeneración (Amato & Brown, 2011). Mediante inmunodetección se muestra la ausencia o expresión muy reducida de la disferlina en el sarcolema, aunque esta característica no es específica de las disferlinopatías, ya que también se puede observar en otras distrofias ((Amato & Brown, 2011; Cárdenas et al., 2016). En las biopsias también se puede observar un marcado infiltrado de células inflamatorias endomisiales y paraespinales principalmente de linfocitos T CD4+ y macrófagos ((Amato & Brown, 2011), Cárdenas et al., 2016; Wicklund, 2014)). Otra característica que diferencia a las disferlinopatías de otras miopatías inflamatorias primarias es la aparición del complejo de ataque de membrana (MAC) en el sarcolema de las fibras musculares no necróticas, las cuales no aparecen en el resto de las miopatías (Amato & Brown, 2011). Mediante la técnica de Western Blot se demuestra que existe una marcada reducción o ausencia de disferlina en pacientes con disferlinopatía (Amato & Brown, 2011).

Mediante análisis ultraestructural de las fibras musculares se ha observado la ruptura de la membrana plasmática y su reemplazo por capas de vesículas pequeñas (Cenacchi et al., 2005; Selcen et al., 2001).

Para llevar a cabo el diagnóstico genético se realiza una secuenciación de ADN genómico o ADNc de músculo o sangre, además de otros análisis como la secuenciación masiva del genoma, la secuenciación del exoma completo y el chip genético (Fanin & Angelini, 2016).

7. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA LAS DISFERLINOPATÍAS

Actualmente no existen terapias específicas para tratar a pacientes con disferlinopatías debido a que aún falta información sobre los efectos que tienen las mutaciones del gen de la disferlina sobre el tejido muscular (Cárdenas et al., 2016). Se barajan diversos enfoques para la terapia de las disferlinopatías, entre las cuales se encuentran la síntesis de proteína funcional después de la transferencia del ADN codificante de la disferlina por medio del vector del virus adenoasociado (AAV), la edición genética y tratamientos farmacológicos o inmunológicos (Barthélémy et al., 2011).

Se ha conseguido restablecer la función de reparación de la membrana plasmática en modelos animales deficientes en disferlina mediante la transferencia de variantes funcionales de genes de disferlina, pero no se ha logrado detener el desgaste muscular (Cárdenas et al., 2016). Las terapias que se prueban principalmente para tratar enfermedades recesivas como las disferlinopatías son las basadas en la transferencia de genes (Barthélémy et al., 2011). Un

estudio reciente ha demostrado que la transferencia no viral con un vector de ADN que codifica a la disferlina de longitud completa en mioblastos deficientes en disferlina produce una expresión de disferlina estable y la supervivencia de las células tras la transferencia (Escobar et al., 2016). El vector más utilizado en la terapia génica muscular es el AAV, pero posee grandes problemas técnicos porque su tamaño de encapsidación está limitado a 4kb, equivalente a tres dominios C2 (Barthélémy et al., 2011). Un grupo de investigadores desarrolló un sistema de dos vectores, denominado AAV.DYSF.DV, para la transferencia de disferlina completa (Sondergaard et al., 2015). Consiste en dividir el ADNc de disferlina en dos segmentos con una región de superposición de 1 kb (Sondergaard et al., 2015). Tras la co-inyección, estos segmentos de ADNc proporcionan un sustrato para la recombinación y obtención del gen de longitud completa (Sondergaard et al., 2015). Se observó que los ratones con deficiencia de disferlina y los primates no humanos que fueron tratados con este vector, tanto por vía intramuscular como intravenosa, mostraron niveles elevados de expresión de disferlina en el músculo, y también se restauró la capacidad de reparación de la membrana en ratones deficientes de disferlina (Sondergaard et al., 2015). Otro grupo de investigadores ha utilizado dos vectores AAV independientes, uno que lleva la secuencia intrónica portadora de ADNc 5' de disferlina y un sitio de empalme donante y otro que contiene la secuencia intrónica portadora de ADNc 3' y sitio de empalme aceptor (Lostal et al., 2010). Este mecanismo ha permitido la transcripción de disferlina de longitud completa en ratones carentes de disferlina (Barthélémy et al., 2011).

Otra perspectiva en las terapias de las disferlinopatías es la transferencia de minigenes de disferlina. Un grupo de investigación detectó en un paciente con disferlinopatía moderada una minidisferlina, lo que abre nuevas perspectivas terapéuticas (Krahn et al., 2010). La minidisferlina es una proteína que contienen únicamente los dos últimos dominios C2 de los siete que posee la disferlina y el dominio transmembrana (Barthélémy et al., 2011). En el estudio se inyectó un AAV que codifica minidisferlina en ratones deficientes de disferlina y se observó que la minidisferlina restauró la función de reparación de la membrana en las fibras musculares esqueléticas (Krahn et al., 2010). Sin embargo, no fue capaz de corregir el fenotipo distrófico, lo que indica que los otros dominios que no se encuentran en la minidisferlina están involucrados en funciones críticas de la disferlina en el músculo esquelético (Barthélémy et al., 2011; Krahn et al., 2010). Estos hallazgos indican que tanto la inyección de AAV como la expresión de minidisferlina no resultan tóxicos para el organismo, lo cual abre las puertas a futuros desarrollos clínicos (Barthélémy et al., 2011).

Se conoce que la relación entre el genotipo y el fenotipo en las disferlinopatías es compleja (Barthélémy et al., 2011). Un grupo de investigación identificó dos hermanas gravemente afectadas por la enfermedad que eran homocigóticas para una mutación nula de disferlina, mientras que su madre, era heterocigótica para dicha mutación pero poseía otra mutación en el intrón 31 que llevaba a la omisión del exón 32 manteniendo la pauta de lectura (Sinnreich et al., 2006). La paciente presentaba un fenotipo leve, lo que indica que el alelo con el exón 32 omitido complementa parcialmente la mutación de disferlina nula (Barthélémy et al., 2011). Este descubrimiento se ha considerado como una forma “natural” de tratar las disferlinopatías (Barthélémy et al., 2011). La tecnología de salto del exón para tratar las mutaciones de disferlina resulta un estrategia prometedora (Barthélémy et al., 2011). Mediante esta técnica se pretende evitar la mutación del exón 32 sin afectar al marco de lectura ni a la función de la proteína (Barthélémy et al., 2015). En un estudio se han utilizado oligonucleótidos antisentido para evitar la mutación en el exón 32 en mioblastos de pacientes con disferlinopatía y se ha observado que la disferlina fue capaz de recuperar la capacidad de la membrana a un nivel similar al de los mioblastos sin mutación (Barthélémy et al., 2015).

También se ha propuesto el uso de la edición genética para tratar mutaciones en el gen de la disferlina. Las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) son una posibilidad para el tratamiento de enfermedades como las distrofias musculares. Las iPSC se pueden diferenciar *in vitro* para generar precursores de células musculares y ser transferidas a ratones con distrofia muscular, de manera que se las mutaciones se pueden corregir de manera precisa y eficaz, y podría ser una posible terapia para estas enfermedades (Turan et al., 2016). Un grupo de investigación ha conseguido corregir una mutación sin sentido del gen de la disferlina (c.5713C>T; p.R1905X) usando iPSC mediante la edición de genes mediada utilizando el sistema CRISPR/Cas9 (Turan et al., 2016).

También se plantean enfoques inmunológicos y farmacológicos para el tratamiento de las disferlinopatías. Se ha descrito el uso del fármaco Dantroleno como un posible tratamiento para las disferlinopatías, ya que aparentemente bloquea la liberación de iones calcio del retículo sarcoplásmico mediante la unión al receptor de rianodina y porque disminuye la fuerza de la contracción muscular (Hattori et al., 2007). Se ha observado que su administración reduce los niveles de CK, aunque hasta el momento no se ha visto mejora del fenotipo muscular (Hattori et al., 2007). También se han hecho estudios con Deflazacort, un glucocorticoide que se utiliza como antiinflamatorio e inmunosupresor, pero se ha demostrado que los efectos no han sido beneficiosos (Walter et al., 2013). Se ha propuesto la suplementación con vitamina D como una

posible terapia. La vitamina D3 es importante en la homeostasis del calcio y participa en la miogénesis y contracción muscular (De Luna et al., 2012). Un estudio analizó el efecto de esta vitamina en la expresión de disferlina *in vitro* usando varios tipos de células: HL60, monocitos y miotubos portadores de la mutación; además también se estudiaron los monocitos de pacientes con disferlinopatía a los que se les había administrado vitamina por vía oral (De Luna et al., 2012). Se observó que la vitamina D3 mejora la expresión de disferlina tanto *in vitro* como en el ensayo clínico (De Luna et al., 2012). También se ha planteado el uso de Diltiazem como posible terapia, ya que se trata de un fármaco que inhibe la entrada de calcio a través de los DHPR, y se podría usar para la prevención de los cambios estructurales y funcionales en los túbulos T en las disferlinopatías (Kerr et al., 2013).

8. CONCLUSIONES

1. La disferlina tiene un papel crucial en el proceso de reparación de la membrana plasmática de las células musculares esqueléticas, en el cual también intervienen otras proteínas específicas. Los mecanismos de reparación dependen del tipo de célula y el tamaño de la lesión.
2. La disferlina interviene en la biogénesis del túbulo T. Ésta actúa junto a anfisina 2 y PIP2 en la inducción de la curvatura de la membrana en el proceso de formación del túbulo. La expresión de caveolina-3 reduce la tubulación de la membrana mediada por disferlina.
3. La disferlina interviene en la homeostasis del calcio, probablemente inhibiendo los DHPR y previniendo la fuga de calcio a través de los RyR inducida por la lesión.
4. Existe información contradictoria sobre el papel de la disferlina en los procesos de diferenciación, crecimiento y regeneración del músculo esquelético. Algunos autores defienden que la ausencia de disferlina carece de efectos sobre la diferenciación de los mioblastos, mientras que otros defienden que la ausencia de disferlina afecta indirectamente al proceso de diferenciación.
5. Las mutaciones en el gen que codifica la disferlina producen un tipo de distrofias musculares con herencia autosómica recesiva denominadas disferlinopatías, caracterizadas por el desgaste muscular progresivo. Existen varios fenotipos de disferlinopatías: la distrofia muscular de cinturas 2B o R2, la miopatía de Miyoshi, la miopatía tibial anterior y la miopatía axial.
6. Las disferlinopatías están mediadas por un mecanismo distinto a las distrofias producidas por defectos en el complejo distrofina-glicoproteína.

7. Actualmente no existen terapias específicas para tratar las disferlinopatías. Se están desarrollando diversas estrategias para el tratamiento de estas patologías: el uso de AAVs para la transferencia del ADN codificante de disferlina, la transferencia de minigenes de disferlina, la tecnología del salto de exón, la edición genética y el uso de fármacos.

CONCLUSIONS

1. Dysferlin has a crucial role in the plasma membrane repair process of skeletal muscle cells, in which other specific proteins are also involved. The repair mechanisms depend on the cell type and the lesion size.
2. Dysferlin is involved in the T tubule biogenesis. It interacts with amphiphysin 2 and PIP2 in the induction of membrane curvature in the tubule formation process. Caveolin-3 expression reduces dysferlin-mediated membrane tubulation.
3. Dysferlin is involved in calcium homeostasis, probably by inhibiting DHPRs and preventing injury-induced calcium leakage through RyRs.
4. There is contradictory information on the role of dysferlin in the differentiation, growth and regeneration processes of skeletal muscle. Some authors defend that the absence of dysferlin has no effect on myoblasts differentiation, while others defend that the absence of dysferlin indirectly affects the differentiation process.
5. Mutations in the gene that encodes dysferlin produce a type of muscular dystrophies with autosomal recessive inheritance called dysferlinopathies, characterized by progressive muscle wasting. There are several dysferlinopathies phenotypes: limb-girdle muscular dystrophy 2B or R2, Miyoshi myopathy, anterior tibial myopathy, and axial myopathy.
6. Dysferlinopathies are mediated by a different mechanism than dystrophies caused by defects in the dystrophin-glycoprotein complex.
7. Currently there are no specific therapies to treat dysferlinopathies. Several approaches are being developed for the treatment of these pathologies: the use of AAVs for the transfer of DNA encoding dysferlin, the transfer of dysferlin minigenes, the exon skipping technology, the gene editing, and the use of drugs.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abdullah, N., Padmanarayana, M., Marty, N. J., & Johnson, C. P. (2014). Quantitation of the Calcium and Membrane Binding Properties of the C2 Domains of Dysferlin. *Biophysj*, *106*(2), 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.4492>

- Amato, A. A., & Brown, R. H. (2011). Dysferlinopathies. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 101, Issue 2003). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045031-5.00007-4>
- Aoki, M., Liu, J., Richard, I., Aoki, M., Liu, J., Richard, I., Bashir, R., Britton, S., & Keers, S. M. (2001). Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. *Neurology*, *57*, 271–278. <https://doi.org/10.1212/WNL.57.2.271>
- Bai, J., & Chapman, E. R. (2004). The C2 domains of synaptotagmin - Partners in exocytosis. *Trends in Biochemical Sciences*, *29*(3), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.01.008>
- Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S. S., Groh, S., Chen, C.-C., Williamson, R., McNeil, P. L., & Campbell, K. P. (2003). Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature*, *423*, 168–172. <https://doi.org/10.1038/nature01604.1>
- Barthélémy, F., Blouin, C., Wein, N., Mouly, V., Courrier, S., Dionnet, E., Kergourlay, V., Mathieu, Y., Garcia, L., Butler-Browne, G., Lamaze, C., Lévy, N., Krahn, M., & Bartoli, M. (2015). Exon 32 Skipping of Dysferlin Rescues Membrane Repair in Patients' Cells. *Journal of Neuromuscular Diseases*, *2*(3), 281–290. <https://doi.org/10.3233/JND-150109>
- Barthélémy, F., Defour, A., Lévy, N., Krahn, M., & Bartoli, M. (2018). Muscle Cells Fix Breaches by Orchestrating a Membrane Repair Ballet. *Journal of Neuromuscular Diseases*, *5*(1), 21–28. <https://doi.org/10.3233/JND-170251>
- Barthélémy, F., Wein, N., Krahn, M., Lévy, N., & Bartoli, M. (2011). Translational research and therapeutic perspectives in dysferlinopathies. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, *17*(9–10), 875–882. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00084>
- Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S., Vafiadaki, E., Lako, M., Richard, I., Marchand, S., Bourg, N., Argov, Z., Sadeh, M., Mahjneh, I., Marconi, G., Passos-bueno, M. R., Moreira, E. D. S., Zatz, M., Beckmann, J. S., & Bushby, K. (1998). A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nature Genetics*, *20*, 37–42.
- Blandin, G., Beroud, C., Labelle, V., Nguyen, K., Wein, N., Hamroun, D., Williams, B., Monnier, N., Rufibach, L. E., Urtizbera, J. A., Cau, P., Bartoli, M., Lévy, N., & Krahn, M. (2012). UMD-DYSF, a novel locus specific database for the compilation and interactive analysis of mutations in the dysferlin gene. *Human Mutation*, *33*(3). <https://doi.org/10.1002/humu.22015>
- Bulankina, A. V., & Thoms, S. (2020). Functions of Vertebrate Ferlins. *Cells*, *9*, 1–31. <https://doi.org/10.3390/cells9030534>
- Cai, C., Weisleder, N., Ko, J. K., Komazaki, S., Sunada, Y., Nishi, M., Takeshima, H., & Ma, J. (2009). Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(23), 15894–15902. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.009589>
- Cárdenas, A. M., González-jamett, A. M., Cea, L. A., Bevilacqua, J. A., & Caviedes, P. (2016). Dysferlin function in skeletal muscle : Possible pathological mechanisms and therapeutical targets in dysferlinopathies. *Experimental Neurology*, *283*, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.06.026>
- Carter, J. C., Sheehan, D. W., Prochoroff, A., & Birnkrant, D. J. (2018). Muscular Dystrophies. *Clinics in Chest Medicine*, *39*(2), 377–389. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2018.01.004>
- Cenacchi, G., Fanin, M., De Giorgi, L. B., & Angelini, C. (2005). Ultrastructural changes in dysferlinopathy support defective membrane repair mechanism. *Journal of Clinical Pathology*, *58*(2), 190–195. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.018978>
- Chiu, Y. H., Hornsey, M. A., Klinge, L., Jørgensen, L. H., Laval, S. H., Charlton, R., Barresi, R., Straub, V., Lochmüller, H., & Bushby, K. (2009). Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, *18*(11), 1976–1989. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp121>
- Cocucci, E., Racchetti, G., Podini, P., Rupnik, M., & Meldolesi, J. (2004). Enlargeosome, an Exocytic Vesicle Resistant to Nonionic Detergents, Undergoes Endocytosis via a Nonacidic Route. *Mol Biol Cell*, *15*(December), 5318–5328. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>

- Cohen, T. V., Cohen, J. E., & Partridge, T. A. (2012). Myogenesis in dysferlin-deficient myoblasts is inhibited by an intrinsic inflammatory response. *Neuromuscular Disorders*, *22*(7), 648–658. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2012.03.002>
- Cooper, S. T., & Head, S. I. (2014). Membrane Injury and Repair in the Muscular Dystrophies. *The Neuroscientist*, 1–16. <https://doi.org/10.1177/1073858414558336>
- Corbalan-garcia, S., & Gómez-fernández, J. C. (2014). Biochimica et Biophysica Acta Signaling through C2 domains : More than one lipid target. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1838*(6), 1536–1547. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.008>
- Cornelison, D. D. W., & Wold, B. J. (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Developmental Biology*, *191*(2), 270–283. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8721>
- Dalkilic, I., & Kunkel, L. M. (2003). Muscular dystrophies: Genes to pathogenesis. *Current Opinion in Genetics and Development*, *13*(3), 231–238. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(03\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(03)00048-0)
- De Luna, N., Díaz-Manera, J., Paradas, C., Iturriaga, C., Rojas-García, R., Araque, J., Genebriera, M., Gich, I., Illa, I., & Gallardo, E. (2012). 1 α ,25(OH) $_2$ -vitamin D $_3$ increases dysferlin expression in vitro and in a human clinical trial. *Molecular Therapy*, *20*(10), 1988–1997. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.156>
- De Luna, N., Gallardo, E., & Illa, I. (2004). In vivo and in vitro dysferlin expression in human muscle satellite cells. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *63*(10), 1104–1113. <https://doi.org/10.1093/jnen/63.10.1104>
- De Luna, N., Gallardo, E., Soriano, M., Dominguez-Perles, R., De La Torre, C., Rojas-García, R., García-Verdugo, J. M., & Illa, I. (2006). Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation “in vitro.” *Journal of Biological Chemistry*, *281*(25), 17092–17098. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601885200>
- de Morrée, A., Hensbergen, P. J., van Haagen, H. H. H. B. M., Dragan, I., Deelder, A. M., 't Hoen, P. A. C., Frants, R. R., & van der Maarel, S. M. (2010). Proteomic analysis of the dysferlin protein complex unveils its importance for sarcolemmal maintenance and integrity. *PLoS ONE*, *5*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013854>
- Defour, A., Van Der Meulen, J. H., Bhat, R., Bigot, A., Bashir, R., Nagaraju, K., & Jaiswal, J. K. (2014). Dysferlin regulates cell membrane repair by facilitating injury-triggered acid sphingomyelinase secretion. *Cell Death and Disease*, *5*(6). <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.272>
- Demonbreun, A. R., & McNally, E. M. (2017). Plasma Membrane Repair in Health and Disease. *Curr Top Membr.*, *77*, 1–26. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2015.10.006> Plasma
- Demonbreun, A. R., Quattrocchi, M., Barefield, D. Y., Allen, M. V., Swanson, K. E., & McNally, E. M. (2016). An actin-dependent annexin complex mediates plasma membrane repair in muscle. *Journal of Cell Biology*, *213*(6), 705–718. <https://doi.org/10.1083/jcb.201512022>
- Díaz, J., Woudt, L., Suazo, L., Garrido, C., Caviedes, P., Cárdenas, A. M., Castiglioni, C., & Bevilacqua, J. A. (2016). Broadening the imaging phenotype of dysferlinopathy at different disease stages. *Muscle and Nerve*, 1–8. <https://doi.org/10.1002/mus.25045>
- Durbeej, M., & Campbell, K. P. (2002). Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: An overview of current mouse models. *Current Opinion in Genetics and Development*, *12*(3), 349–361. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00309-X](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00309-X)
- Escobar, H., Schöwel, V., Spuler, S., Marg, A., & Izsvák, Z. (2016). Full-length Dysferlin Transfer by the Hyperactive Sleeping Beauty Transposase Restores Dysferlin-deficient Muscle. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *5*(November 2015), e277. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.52>
- Evesson, F. J., Peat, R. A., Lek, A., Brilot, F., Lo, H. P., Dale, R. C., Parton, R. G., North, K. N., & Cooper, S. T. (2010). Reduced plasma membrane expression of dysferlin mutants is attributed to accelerated endocytosis via a syntaxin-4-associated pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(37), 28529–28539. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.111120>
- Fanin, M., & Angelini, C. (2016). Progress and challenges in diagnosis of dysferlinopathy. *Muscle and Nerve*,

54(5), 821–835. <https://doi.org/10.1002/mus.25367>

- Flix, B., De La Torre, C., Castillo, J., Casal, C., Illa, I., & Gallardo, E. (2013). Dysferlin interacts with calsequestrin-1, myomesin-2 and dynein in human skeletal muscle. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(8), 1927–1938. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.007>
- Fuson, K., Rice, A., Mahling, R., Snow, A., Nayak, K., Meyer, A. G., Redpath, G. M. I., Hinderliter, A., Sandra, T., & Sutton, R. B. (2018). Alternate Splicing of Dysferlin C2A Confers Ca²⁺-Dependent and Ca²⁺-Independent Binding for Membrane Repair. *Structure*, 22(1), 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.10.001>.Alternate
- Glover, L., & Brown, R. H. (2007). Dysferlin in membrane trafficking and patch repair. *Traffic*, 8(7), 785–794. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00573.x>
- Han, R., & Campell, K. P. (2007). Dysferlin and Muscle Membrane Repair. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(4), 409–416.
- Han, W. Q., Xia, M., Xu, M., Boini, K. M., Ritter, J. K., Li, N. J., & Li, P. L. (2012). Lysosome fusion to the cell membrane is mediated by the dysferlin C2A domain in coronary arterial endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 125(5), 1225–1234. <https://doi.org/10.1242/jcs.094565>
- Hattori, H., Nagata, E., Oya, Y., Takahashi, T., Aoki, M., Ito, D., & Suzuki, N. (2007). A novel compound heterozygous dysferlin mutation in Miyoshi myopathy siblings responding to dantrolene. *European Journal of Neurology*, 14(11), 1288–1291. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2007.01958.x>
- Hernández-Deviez, D. J., Howes, M. T., Laval, S. H., Bushby, K., Hancock, J. F., & Parton, R. G. (2008). Caveolin regulates endocytosis of the muscle repair protein, dysferlin. *Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6476–6488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708776200>
- Hofhuis, J., Bersch, K., Büssenschütt, R., Drzymalski, M., Liebetanz, D., Nikolaev, V. O., Wagner, S., Maier, L. S., Gärtner, J., Klinge, L., & Thoms, S. (2017). Dysferlin mediates membrane tubulation and links T-tubule biogenesis to muscular dystrophy. *Journal of Cell Science*, 130(5), 841–852. <https://doi.org/10.1242/jcs.198861>
- Huang, Y., Laval, S. H., Remoortere, A., Baudier, J., Benaud, C., Anderson, L. V. B., Straub, V., Deelder, A., Frants, R. R., Dunnen, J. T., Bushby, K., & Maarel, S. M. (2007). AHNAK a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. *The FASEB Journal*, 21(3), 732–742. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6628com>
- Humphrey, G. W., Mekhedov, E., Blank, P. S., de Morree, A., Pekkurnaz, G., Nagaraju, K., & Zimmerberg, J. (2012). GREG cells, a dysferlin-deficient myogenic mouse cell line. *Experimental Cell Research*, 318(2), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.10.004>
- Illa, I., Serrano-Munuera, C., Gallardo, E., Lasa, A., Rojas-García, R., Palmer, J., Gallano, P., Baiget, M., Matsuda, C., & Brown, R. H. (2001). Distal Anterior Compartment Myopathy: A Dysferlin Mutation Causing a New Muscular Dystrophy Phenotype. *Annals of Neurology*, 49, 130–134.
- Illarioshkin, S. N., Tanaka, H., Vereshchagin, N. V., Markova, E. D., Poleshchuk, V. V., Lozhnikova, S. M., Sukhorukov, V. S., Limborska, S. A., & Slominsky, P. A. (1996). Clinical and molecular analysis of a large family with three distinct phenotypes of progressive muscular dystrophy. *Brain*, 119, 1895–1909.
- Janssen, I., Heymsfield, S. B., Wang, Z. M., & Ross, R. (2000). Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18–88 yr. *Journal of Applied Physiology*, 89(1), 81–88. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.1.81>
- Kerr, J. P., Ziman, A. P., Mueller, A. L., Muriel, J. M., Kleinhans-Welte, E., Gumerson, J. D., Vogel, S. S., Ward, C. W., Roche, J. A., & Bloch, R. J. (2013). Dysferlin stabilizes stress-induced Ca²⁺ signaling in the transverse tubule membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(51), 20831–20836. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307960110>
- Klinge, L., Aboumoussa, A., Eagle, M., Hudson, J., Sarkozy, A., Vita, G., Charlton, R., Roberts, M., Straub, V., Barresi, R., & Bushby, K. (2010). New aspects on patients affected by dysferlin deficient muscular dystrophy. *Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 81, 946–953. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.178038>

- Krahn, M., Wein, N., Bartoli, M., Lostal, W., Courrier, S., Bourg-Alibert, N., Nguyen, K., Vial, C., Streichenberger, N., Labelle, V., DePetris, D., Pécheux, C., Leturcq, F., Cau, P., Richard, I., & Lévy, N. (2010). A naturally occurring human minidysferlin protein repairs sarcolemmal lesions in a mouse model of dysferlinopathy. *Science Translational Medicine*, 2(50). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000951>
- Lek, A., Evesson, F. J., Sutton, R. B., North, K. N., Cooper, S. T., & Cooper, S. T. (2012). Ferlins : Regulators of Vesicle Fusion for Auditory Neurotransmission , Receptor Trafficking and Membrane Repair. *Traffic*, 13, 185–194. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01267.x>
- Lek, A., Lek, M., North, K. N., & Cooper, S. T. (2010). Phylogenetic analysis of ferlin genes reveals ancient eukaryotic origins. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 231. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-231>
- Lennon, N. J., Kho, A., Bacskai, B. J., Perlmutter, S. L., Hyman, B. T., & Brown, R. H. (2003). Dysferlin Interacts with Annexins A1 and A2 and Mediates Sarcolemmal Wound-healing. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50466–50473. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307247200>
- Linssen, W. H. J. P., Notermans, N. C., Van der Graaf, Y., Wokke, J. H. J., Van Doorn, P. A., Höweler, C. J., Busch, H. F. M., De Jager, A. E. J., & De Visser, M. (1997). Miyoshi-type distal muscular dystrophy Clinical spectrum in 24 Dutch patients. *Brain*, 120, 1989–1996.
- Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C., Fardeau, M., Angelini, C., Serrano, C., Urtizberea, J. A., Hentati, F., Hamida, M. Ben, Bohlega, S., Culper, E. J., Amato, A. A., Bossie, K., Oeltjen, J., Bejaoui, K., Mckenna-yasek, D., Hosler, B. A., Schurr, E., ... Jr, R. H. B. (1998). Dysferlin , a novel skeletal muscle gene , is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Article*, 20, 31–36.
- Lostal, W., Bartoli, M., Bourg, N., Roudaut, C., Bentaïb, A., Miyake, K., Guerchet, N., Fougerousse, F., McNeil, P., & Richard, I. (2010). Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Human Molecular Genetics*, 19(10), 1897–1907. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq065>
- Lostal, W., Bartoli, M., Roudaut, C., Bourg, N., Krahn, M., Pryadkina, M., Borel, P., Suel, L., Roche, J. A., Stockholm, D., Bloch, R. J., Levy, N., Bashir, R., & Richard, I. (2012). Lack of correlation between outcomes of membrane repair assay and correction of dystrophic changes in experimental therapeutic strategy in dysferlinopathy. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038036>
- Marty, N. J., Holman, C. L., Abdullah, N., & Johnson, C. P. (2013). The C2 domains of otoferlin, dysferlin, and myoferlin alter the packing of lipid bilayers. *Biochemistry*, 52(33), 5585–5592. <https://doi.org/10.1021/bi400432f>
- Matsuda, C., Kameyama, K., Tagawa, K., Ogawa, M., Suzuki, A., Yamaji, S., Okamoto, H., Nishino, I., & Hayashi, Y. K. (2005). Dysferlin interacts with affixin (β -parvin) at the sarcolemma. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 64(4), 334–340. <https://doi.org/10.1093/jnen/64.4.334>
- Matsuda, C., Miyake, K., Kameyama, K., Keduka, E., Takeshima, H., Imamura, T., Araki, N., Nishino, I., & Hayashi, Y. (2012). The C2A domain in dysferlin is important for association with MG53 (TRIM72). *PLoS Currents*, 53, 1–8. <https://doi.org/10.1371/5035add8caff4>
- McDade, J. R., & Michele, D. E. (2014). Membrane damage-induced vesicle-vesicle fusion of dysferlin-containing vesicles in muscle cells requires microtubules and kinesin. *Human Molecular Genetics*, 23(7), 1677–1686. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt557>
- Mcnelly, E. (2012). Novel Targets and Approaches to Treating Skeletal Muscle Disease. In *Muscle: Fundamental Biology and Mechanisms of Disease* (First Edit, Issue Dmd). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381510-1.00081-8>
- Mcneil, P. L., & Terasaki, M. (2001). Coping with the inevitable: How cells repair a torn surface membrane. *Nature Cell Biology*, 3(5), 124–129. <https://doi.org/10.1038/35074652>
- Moe, A. M., Golding, A. E., & Bement, W. M. (2015). Cell healing: Calcium, repair and regeneration. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 45, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.026>
- Molist, P., Pombal, M., & Megías, M. (2017). *Tejidos animales: Muscular*. Atlas de Histología Animal y Vegetal. <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/a-muscular.pdf>
- Nagashima, T., Chuma, T., Mano, Y., Goto, Y., Hayashi, Y. K., Minami, N., Nishino, I., Nonaka, I., Takahashi,

- T., Sawa, H., Aoki, M., & Nagashima, K. (2004). Dysferlinopathy associated with rigid spine syndrome. *Neuropathology*, *24*, 341–346.
- Nguyen, K., Bassez, G., Krahn, M., Bernard, R., Laforêt, P., Labelle, V., Urtizberea, J. A., Figarella-Branger, D., Romero, N., Attarian, S., Leturcq, F., Pouget, J., Lévy, N., & Eymard, B. (2007). Phenotypic Study in 40 Patients With Dysferlin Gene Mutations. *Archives of Neurology*, *64*(8), 1176–1182.
- Paradas, C., Llauger, J., & Ma, C. (2010). Redefining dysferlinopathy phenotypes based on clinical findings and muscle imaging studies. *Neurology*, *75*, 316–323. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ea1564>
- Park, J. W., Kim, I. Y., Choi, J. W., Lim, H. J., Shin, J. H., Kim, Y. N., Lee, S. H., Son, Y., Sohn, M., Woo, J. K., Jeong, J. H., Lee, C., Bae, Y. S., & Seong, J. K. (2018). AHNAK loss in mice promotes type II pneumocyte hyperplasia and lung tumor development. *Molecular Cancer Research*, *16*(8), 1287–1298. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0726>
- Reddy, A., Caler, E. V., Andrews, N. W., & Haven, N. (2001). Plasma Membrane Repair Is Mediated by Ca²⁺-Regulated Exocytosis of Lysosomes. *Cell*, *106*(2), 157–169. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11511344
- Redpath, G. M. I., Sophocleous, R. A., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., & Cooper, S. T. (2016). Ferlins Show Tissue-Specific Expression and Segregate as Plasma Membrane/Late Endosomal or Trans-Golgi/Recycling Ferlins. *Traffic*, *17*(3), 245–266. <https://doi.org/10.1111/tra.12370>
- Selcen, D., Stilling, G., & Engel, A. G. (2001). The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurology*, *56*, 1472–1481.
- Seror, P., Krahn, M., Laforet, P., & Leturcq, F. (2008). Complete fatty degeneration of lumbar erector spinae muscles caused by a primary dysferlinopathy. *Muscle and Nerve*, *37*, 410–414. <https://doi.org/10.1002/mus.20910>
- Sinnreich, M., Therrien, C., & Karpati, G. (2006). Lariat branch point mutation in the dysferlin gene with mild limb-girdle muscular dystrophy. *Neurology*, *66*(7), 1114–1116. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000204358.89303.81>
- Sondergaard, P. C., Griffin, D. A., Pozsgai, E. R., Johnson, R. W., Grose, W. E., Heller, K. N., Shontz, K. M., Montgomery, C. L., Liu, J., Clark, K. R., Sahenk, Z., Mendell, J. R., & Rodino-Klapac, L. R. (2015). AAV. Dysferlin overlap vectors restore function in dysferlinopathy animal models. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *2*(3), 256–270. <https://doi.org/10.1002/acn3.172>
- Song, H., Sun, W., Ye, G., Ding, X., Liu, Z., Zhang, S., Xia, T., Xiao, B., Xi, Y., & Guo, J. (2013). Long non-coding RNA expression profile in human gastric cancer and its clinical significances. *Journal of Translational Medicine*, *11*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-225>
- Straub, V., Murphy, A., & Udd, B. (2018). 229th ENMC international workshop : Limb girdle muscular dystrophies – Nomenclature and reformed classification. *Neuromuscular Disorders*, *28*, 702–710. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.05.007>
- Takahashi, T., Aoki, M., Suzuki, N., Tateyama, M., Yaginuma, C., Sato, H., Hayasaka, M., Sugawara, H., Ito, M., Abe-Kondo, E., Shimakura, N., Ibi, T., Kuru, S., Wakayama, T., Sobue, G., Fujii, N., Saito, T., Matsumura, T., Funakawa, I., ... Itoyama, Y. (2013). Clinical features and a mutation with late onset of limb girdle muscular dystrophy 2B. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *84*(4), 433–439. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2011-301339>
- Therrien, C., Fulvio, S. Di, Pickles, S., & Sinnreich, M. (2009). Characterization of Lipid Binding Specificities of Dysferlin C2 Domains Reveals Novel Interactions with Phosphoinositides †. *Biochemistry*, *48*, 2377–2384.
- Turan, S., Farruggio, A. P., Srifa, W., Day, J. W., & Calos, M. P. (2016). Precise correction of disease mutations in induced pluripotent stem cells derived from patients with limb girdle muscular dystrophy. *Molecular Therapy*, *24*(4), 685–696. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.40>
- Waddell, L. B., Lemckert, F. A., Zheng, X. F., Tran, J., Evesson, F. J., Hawkes, J. M., Lek, A., Street, N. E., Lin, P., Clarke, N. F., Landstrom, A. P., Ackerman, M. J., Weisleder, N., Ma, J., North, K. N., & Cooper, S. T. (2011). Dysferlin, annexin A1, and mitsugumin 53 are upregulated in muscular dystrophy and localize to

longitudinal tubules of the T-system with stretch. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 70(4), 302–313. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31821350b0>

Walter, M. C., Reilich, P., Thiele, S., Schessl, J., Schreiber, H., Reiners, K., Kress, W., Müller-Reible, C., Vorgerd, M., Urban, P., Schrank, B., Deschauer, M., Schlotter-Weigel, B., Kohnen, R., & Lochmüller, H. (2013). Treatment of dysferlinopathy with deflazacort: A double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-26>

Wicklund, M. P. (2014). The Limb-Girdle Muscular Dystrophies. *Neurologic Clinics of NA*, 32(3), 729–749. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2014.04.005>