



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES NORMALES DE
EXPRESIÓN DE DISFERLINA EN MONOCITOS CD14+ DE
SANGRE PERIFÉRICA POR CITOMETRÍA DE FLUJO, COMO
UNA HERRAMIENTA DE TAMIZAJE RÁPIDO PARA
DISFERLINOPATÍAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

CARLOS MIGUEL DEL ÁNGEL MUÑOZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. LAURA SÁNCHEZ CHAPUL
2017**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno.

Del Ángel
Muñoz
Carlos Miguel
52 155 54 73 44 44
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306062889

2. Datos del Asesor.

Dra.
Laura
Sánchez
Chapul

3. Datos del Sinodal 1.

Dr.
Ramón Mauricio
Coral
Vázquez

4. Datos del Sinodal 2

Dr.
Ambar
López
Macay

5. Datos del Sinodal 3

Dra.
Verónica
Pérez
De la Cruz

6. Datos del Sinodal 4

Dr.
Sigifredo
Pedraza
Sánchez

7. Datos del trabajo escrito

Determinación de los niveles normales de expresión de disferlina en monocitos CD14+ de sangre periférica por citometría de flujo, como una herramienta de tamizaje rápido para disferlinopatías.

60p
2017

Agradecimientos

Antes que a nadie, quiero agradecer a mi tutora y amiga Laura, pues tras muchos años de apoyo, amistad y sobre todo su admirable paciencia, es que este trabajo se ha podido concluir. Agradezco también a mis revisores de tesis y jurado por sus valiosos comentarios y ayuda para darle forma a este trabajo escrito. Al banco de sangre del Instituto Nacional de Rehabilitación. Y gracias especiales a los pacientes que participaron en este estudio, pues son la principal motivación para el desarrollo de herramientas que ayuden a mejorar la calidad de vida de la gente de este gran país y que día a día anónimamente hacen la diferencia.

A mis familiares y amigos.

“Por mi raza hablará el espíritu”

ÍNDICE

Resumen.....	5
Abstract	6
Introducción	7
Distrofias musculares en México	12
Disferlinopatías	13
Distrofia muscular de cinturas de tipo 2B (LGMD2B)	14
Miopatía de Miyoshi (MM)	16
Miopatía distal con inicio tibial anterior (DMAT).....	17
Miopatía con debilidad próximo-distal	18
Disferlina	18
Estructura de la disferlina	20
Dominio C2.....	20
Dominio DysF.	23
Disferlina en monocitos e inflamación.....	23
Diagnóstico de disferlinopatías	27
Inmunofluorescencia.....	29
Western Blot (WB)	31
Citometría de flujo	33
Justificación	33
Objetivo general.....	34
Objetivos Particulares	35
Metodología.....	35
Diseño del estudio.....	35
Descripción del universo de trabajo.....	35
Material y métodos	37
Muestras clínicas.....	37
Inmunomarcaje de monocitos	37
Análisis estadístico	38
Resultados.....	39
Características de la Población.....	39
Cuantificación de la expresión de disferlina en monocitos.	41

Correlación entre niveles de disferlina en monocitos, la edad de inicio de la enfermedad, el diagnóstico clínico y la expresión de disferlina en músculo.	45
Sensibilidad y especificidad de la prueba.....	47
Discusión	50
Conclusión.....	53
Referencias.....	56

Índice de Tablas y figuras

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades neuromusculares.....	8
Tabla 2. Distrofias musculares en México	12
Figura 1. Progresión típica de LGMD 2B.....	16
Figura 2. Función reparadora de la disferlina en músculo	26
Figura 3. Biopsia de musculo sano y músculo con LGMD2B	28
Figura 4. Inmunofluorescencia directa e indirecta.....	30
Figura 5. Procedimiento del Western Blot	33
Tabla 3. Distribución estadística de los pacientes.....	40
Figura 6. Índice medio de fluorescencia.....	41
Figura 7. Análisis de inmunofluorescencia en músculo y cuantificación de disferlina en monocitos.	42
Figura 8. Correlación entre el índice medio de fluorescencia (IMF) y la edad de los pacientes.....	43
Figura 9. Índice medio de Fluorescencia (IMF) estima la media marginal en pacientes masculinos.	44
Figura 10. Índice medio de Fluorescencia (IMF) estima la media marginal en pacientes femeninos.	44
Tabla 4. Características de los pacientes de acuerdo al diagnóstico clínico y a la disferlina en músculo.....	46
Tabla 5. Punto de corte del IMF para diferenciar pacientes de controles.....	47
Tabla 6. Punto de corte de IMF para diferenciar pacientes masculinos de controles masculinos y pacientes femeninos e controles femeninos.....	48
Tabla 7. Tasa de similitud de IMF en diferentes puntos de corte para disferlina.....	48
Figura 10. Propuesta para una clínica de diagnóstico	50

Determinación de los niveles normales de expresión de disferlina en monocitos CD14+ de sangre periférica por citometría de flujo, como una herramienta de tamizaje rápido para disferlinopatías

Resumen

Las disferlinopatías son desórdenes musculares autosómicos recesivos causados por mutaciones en el gen *DYSF*, codificante de la proteína disferlina, que se expresa altamente en músculo cardíaco y esquelético y en monocitos/macrófagos. Son entidades clínicas sub-diagnosticadas, debido a la gran variabilidad fenotípica, al amplio espectro mutacional y al menos en México, a la falta de posibilidades de realizar un análisis genético como rutina diagnóstica. Una alternativa para el diagnóstico de las disferlinopatías es el análisis de disferlina en monocitos CD14+ por citometría de flujo, sin embargo, no se conocen los valores normales de dicha proteína en células de sangre. El objetivo de este trabajo fue determinar los niveles normales de expresión de disferlina en monocitos CD14+ por citometría de flujo, para proponer esta metodología como una herramienta de tamizaje para las disferlinopatías. Se estudiaron muestras de sangre de 29 pacientes con algún tipo de disferlinopatía y 183 individuos sanos y se analizó la expresión de disferlina en monocitos CD14+, por citometría de flujo. La cantidad relativa de disferlina se expresó como la intensidad media de fluorescencia (IMF). El desempeño de nuestro método de diagnóstico se evaluó determinando el mejor punto de corte del IMF de disferlina y se

determinó un punto de corte para el IMF de disferlina de 139, con un 82.8% de sensibilidad y un 85.2% de especificidad, sin embargo, este valor implica una alta tasa de casos negativos y falsos positivos. Se probó otra estrategia de análisis calculando la tasa de similitud en diferentes puntos de corte, lo que nos permitió definir cuatro grupos para la clasificación de la enfermedad. Con lo anterior concluimos que el IMF puede diferenciar casos de disferlinopatía de individuos sanos, por lo que proponemos la determinación de disferlina en monocitos como un marcador auxiliar en el diagnóstico.

Palabras clave: disferlinopatías, citometría de flujo, monocitos, disferlina, distrofias musculares.

Abstract

Dysferlinopathies are recessive autosomic muscular disorders caused by mutations in the DYSF gene that encodes the protein Dysferlin, which is highly expressed in cardiac muscle, skeletal muscle and monocytes/macrophages. They are under-diagnosed entities, due to the great phenotypical variability, wide mutational spectra and, at least in Mexico, the difficulty to routinely realize genotypification as a diagnostic tool. Advances in diagnosis have allowed Dysferlin analysis by flow cytometry in CD14+ monocytes, however; evidence regarding the normal blood levels of such protein in the population are non-existent. The main objective of this work was to determine the normal levels of expression of Dysferlin in CD14+ monocytes by flow cytometry, in order to propose a methodology as a screening tool for Dysferlinopathies. Monocytes

of 29 patients and 183 healthy individuals were immunostained, ran in a *FACSCalibur* flow cytometer, and analyzed in the software *FlowJo*. The relative amount of Dysferlin was expressed as Mean fluorescence intensity (MFI). The performance of our diagnosis was evaluated by choosing the best cut-off value for MFI for Dysferlin. The best cut-off value of MFI for Dysferlin was of 139, with a sensitivity of 82.8% and a specificity of 85.2%, however, this value considers a great rate of negative and false positive cases, so another alternate analysis was made, which let us define four groups for the classification of the disease. With this study, we conclude that the MFI can differentiate cases of dysferlinopathies from healthy individuals, and it is likely that it can be used as a good marker for diagnostic purposes.

Keywords: Dysferlinopathies, flow cytometry, monocytes, Dysferlin, muscular dystrophies.

Introducción

Las enfermedades neuromusculares (ENM) son un grupo muy amplio de desórdenes que afectan la funcionalidad del músculo o la motricidad. La patología puede deberse a la afectación directa del músculo o indirectamente a alguno de los constituyentes que forman la placa neuromuscular. A su vez las enfermedades neuromusculares se pueden clasificar en grupos más pequeños que reflejan alguna similitud en los síntomas, desarrollo u origen de las enfermedades en particular. Un grupo de enfermedades ENMs son las llamadas distrofias musculares, estas ENM son monogénicas, es decir, se relacionan directamente a la mutación, ausencia o presencia de un gen en particular.¹ Las distrofias musculares se caracterizan por afectar el

funcionamiento normal de las células musculares y por el reemplazo crónico de tejido muscular por tejido fibro-adiposo o conectivo, lo que desencadena la pérdida crónica de la fuerza en el músculo o músculos afectados, disparidad severa del movimiento y pérdida de masa muscular. Algunas distrofias tienen un carácter hereditario asociado al cromosoma X, por lo que suelen ser más comunes en varones, y en la mayor parte de los casos los síntomas se manifiestan durante la infancia, aunque en algunos tipos de distrofias, éstos pueden aparecer hasta la edad adulta. Algunas distrofias son más severas que otras, por lo que en ocasiones los pacientes fallecen durante la infancia, mientras que algunos llegan a la etapa adulta con afectaciones motoras de ligeras a severas, el desenlace puede ser fatal y en los casos graves, los pacientes pierden la habilidad de moverse, lo que lleva a una degeneración sistémica que afecta la respiración y deglución². El tratamiento adecuado con medicamentos y terapia de rehabilitación ayudan a retrasar la progresión de los síntomas, (aunque denota excepción) y actualmente no existe una cura para este grupo de enfermedades³.

La sociedad muscular mundial (WMS por sus siglas en inglés) tiene la base de datos actualizada más amplia de enfermedades neuromusculares y las agrupa en 16 grupos de acuerdo a sus características clínicas y genéticas⁴, esta clasificación se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades neuromusculares

Grupo de ENM		Algunos ejemplos destacados
1	Distrofias musculares	Distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, distrofia muscular de Emery-Dreifuss, distrofia

		muscular asociada a Nesprina, Distrofia muscular Fascioescapulohumeral, distrofias de cinturas.
2	Distrofias musculares congénitas	Distrofia muscular congénita, con deficiencia de merosina, miopatía de Bethelm, síndrome de Ulrich, mioesclerosis, síndrome de espina rígida, distrofia de Fukuyama, Síndrome de Walker-Warbug, enfermedad muscular oculo cerebral, distrofia muscular con hipoglicosilación del distroglicano.
3	Miopatías congénitas	Miopatía Nematina, miopatía congénita con desproporción de tipo-fibra, enfermedad del núcleo central, miopatía del cuerpo hialino.
	Miopatías distales	Miopatía de Miyoshi, Distrofia muscular tibial, miopatía de Nonaka.
5	Otras miopatías	Miopatías miofibrilares, enfermedad de Danon, distrofia muscular oculofaríngea, miopatía de Edström, miopatía escapulohumeral.
6	Síndromes miotónicos	Distrofia miotónica tipo I y II, enfermedad de desgarre muscular, síndrome de Schwartz-Jampel.
7	Enfermedades relacionadas a canales iónicos	Asociada a canales de cloro, calcio y potasio.
8	Hipertermias malignas	Hipertermia maligna.
9	Miopatías metabólicas	Enfermedad de almacenaje del glucógeno, deficiencia de la fosfoglicerato cinasa, deficiencia de la acetil CoA,

		mioglobulinuria recurrente,
10	Cardiomiopatías hereditarias	Cardiomiopatía hipertrófica familiar, cardiomiopatía dilatada, cardiomiopatía restrictiva, enfermedad de Pompe.
11	Síndromes miasténicos congénitos	Síndromes de canal lento, síndromes de canal rápido, deficiencia de receptor de acetilcolina, síndrome de Escobar, síndrome congénito miasténico presináptico.
12	Enfermedades de la moto neurona	Esclerosis lateral amiotrófica, atrofia musculares espinales relacionadas a atrofia tipo I, atrofia muscular espinal distal, atrofia muscular espinal escapulohumeral.
13	Ataxias hereditarias	Ataxia espinocerebral, ataxia de Friedreich, ataxia oculomotora.
14	Neuropatías motoras y sensoriales	Neuropatía desmielinante tipo I, síndrome Déjerine-Sottas, neuropatía motora distal hereditaria.
15	Paraplegias hereditarias	Paraplegia espástica, ataxia espástica.
16	Otras enfermedades neuromusculares	Síndrome opsoclono mioclono, Neuropatía Familiar amiloidea, artrogriposis distal, Artrogriposis múltiple congénita, oftalmoplegia progresiva externa.

Extraída de la tabla genética de desórdenes musculares (Gene Table of Neuromuscular disorders), preparada por J. Kaplan (Institut Cochin, Paris. France)

A pesar de que las distrofias musculares parecen entidades clínicas bien caracterizadas, el diagnóstico no siempre es sencillo, ya que las características fenotípicas no siempre son tan claras. Por ejemplo, se sabe que existen casos de

pacientes con un tipo de distrofia de cinturas muy particular en el que el fenotipo y síntomas son muy similares a un caso de distrofia muscular de Duchenne⁵.

Hoy en día, gracias a la implementación de técnicas moleculares para su diagnóstico, se han clasificado estas entidades clínicas en diferentes grupos. Aquellas en las cuales algún complejo transmembranal de glicoproteínas del sarcolema o en estrecha relación con él se ven afectados, lo que provoca daño en la membrana celular por estrés mecánico o químico y lleva a la ruptura del sarcolema y la destrucción de la fibra muscular, lo que explica que en la mayoría de estas distrofias musculares se pueda observar acumulación extracelular de algunas enzimas musculares, como la creatinfosfocinasa (CPK), como es el caso de la Distrofia de Duchenne y de Becker, la distrofia miotónica, la fascioescapulohumeral, distrofia de cinturas y la distal. Por otro lado, cuando la vía de señalización afectada no daña directamente el sarcolema, si no que llevan a la degradación lenta y crónica del músculo, no se observa acumulación de enzimas musculares, como por ejemplo en la distrofia oculofaríngea y en algunos casos de la congénita⁶.

Adicionalmente, en cualquiera de los casos, el origen de la enfermedad se puede vincular directamente con la alteración en la función de una o varias proteínas, por ejemplo proteínas de matriz extracelular como la laminina-a2, proteínas nucleares como emerina y laminina, proteínas del citoesqueleto como nesprinas y finalmente aquellas que participan en la glicosilación de proteínas (proteín-O-manosil transferasa 1 y 2, N-Acetil glucosaminil transferasa, fukutina, siendo las más comunes y de mayor objeto de estudio aquellas proteínas relacionadas con el sarcolema como la distrofina (distrofinopatías), disferlina (disferlinopatías) y Titina (titinopatías)⁷.

Distrofias musculares en México

A pesar de que se atienden casos clínicos caracterizados con algún tipo de distrofia muscular en los institutos nacionales de salud de México, en la actualidad no existen muchos estudios sobre la incidencia de este grupo de enfermedades degenerativas, que permitan caracterizar la prevalencia en la población Mexicana.

En el Instituto Nacional de Rehabilitación, en colaboración con otras entidades de salud del gobierno de México como el Centro Médico Siglo XXI, el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, y el Instituto Politécnico Nacional se realizó un estudio donde se analizaron biopsias de pacientes con enfermedades musculares degenerativas, con el fin de describir la frecuencia de éstas en una población representativa de 122 pacientes. En ese estudio, se reportaron las siguientes frecuencias de acuerdo a la proteína afectada en el paciente: 52.36 % por distrofina, 18.40% por disferlina, 14.15% por sarcoglicanos, 11.32% por calpaina-3, 1.89% por merosina, 1.42% por caveolina, y 0.47% por emerina. Además en el mismo estudio se reporta que de esta población bien caracterizada con alguna distrofia muscular, 26.89% de las biopsias mostraron una expresión normal de las proteínas analizadas⁷.

Tabla 2. Distrofias musculares en México (tomado de Gómez Díaz et al, 2010).

Proteína o proteínas afectadas	Prevalencia
Distrofina	52.36%
Disferlina	18.40%
Sarcoglicanos	14.15%
Calpaína-3	11.32
Merosina	1.89%

Caveolina	1.42%
Emerina	0.47%

Es importante resaltar que las miopatías causadas por la afectación en la expresión de disferlina ocupan el segundo lugar en frecuencia, desafortunadamente en la clínica de diagnóstico, esta afectación generalmente no es diagnosticada correctamente o no es caracterizada de la manera debida y se clasifica como una miopatía o polimiositis y no se da el tratamiento, terapia y atención adecuada a los pacientes que la padecen.

Disferlinopatías

Las disferlinopatías son un grupo de distrofias musculares autosómico recesivas con gran variabilidad fenotípica causada por la mutación del gen codificante de la disferlina (*DYSF*; MIM# 603009, 2p13.2, GenBank NM_003494.2), por ende el nombre de estas enfermedades. Éste gen se expresa principalmente en el músculo esquelético y cardiaco, en monocitos y macrófagos, aunque se sabe que también que en corazón y cerebro puede llegar a expresarse, aunque su función en éstos últimos aún no se encuentra muy bien caracterizada⁸. Los pacientes que sufren una mutación en este gen generalmente presentan una disminución significativa o ausencia total en la expresión de disferlina, lo que es la principal causa de los síntomas característicos de este grupo de enfermedades. Las disferlinopatías se pueden dividir en 4 fenotipos que en la mayor parte de los casos clínicos, pueden ser bien caracterizados. Las principales son la distrofia muscular de cinturas de tipo 2B (LGMD2b, del inglés Limb-Girdle Muscular disease) y la miopatía de Miyoshi (MM), conformando el 80% de los fenotipos, y la miopatía distal con inicio tibial anterior (DMAT del inglés distal

myopathy with antero-tibial onset) y miopatía con debilidad próximo-distal, en las cuales el cuadro clínico es muy característico de cada una. El gen *DYSF*, tiene un amplio espectro mutacional, con una gran proporción de mutaciones sin sentido e inserciones o deleciones que alteran el marco de lectura, sin ningún “hotspot” de mutaciones en particular, actualmente se tienen reportadas 1174, de éstas, 416 se correlacionan directamente con un estado patológico, pero solamente 80 son recurrentes⁹.

Distrofia muscular de cinturas de tipo 2B (LGMD2B)

Es una afectación de carácter congénito autosómica recesiva. Actualmente es el padecimiento muscular degenerativo más común en adolescentes, con una frecuencia de 1 entre 3,500 nacimientos masculinos¹⁰. Los principales músculos afectados son los músculos proximales y gastrocnemios. Hasta el día de hoy, se conocen más de 65 mutaciones diferentes en pacientes caracterizados con LGMD2B o miopatía de Miyoshi, sin embargo no existen puntos calientes por lo que se dificulta el diagnóstico¹¹. En un estudio genético llevado a cabo en una familia consanguínea de 6 generaciones con esta miopatía, se identificaron 2 fenotipos principales, un denominado “clásico” con una edad de inicio de la enfermedad que oscila entre los 3 y 5 años y una progresión que toma entre 15 y 25 años, en la cual se va perdiendo paulatinamente la capacidad de caminar, y prácticamente todos los pacientes terminan su vida en una silla de ruedas; y un fenotipo “lento” en el cual la enfermedad se manifiesta en la adolescencia y las afectaciones se confinan a los músculos tibiales y de la pantorrilla¹². Afectaciones en los músculos de las extremidades superiores también pueden aparecer, aunque el inicio de los síntomas puede ser hasta 9 años después del inicio de la enfermedad. En un electromiograma, se pueden observar

cambios miopáticos, y en las biopsias musculares se observa reducción del tamaño de las fibras musculares, rompimiento de las fibras, incremento en el tejido conectivo, infiltrado inflamatorio y necrosis. La CPK se encuentra en concentraciones hasta 25 veces mayores que los niveles normales reportados¹³. Los familiares de pacientes con LGMD2B que son portadores heterocigotos de la enfermedad, presentan síntomas leves, que aparecen solamente en la edad adulta, específicamente alrededor de los 50 años, como debilidad muscular en las extremidades inferiores, infiltración de grasa en las fibras musculares, aparición de fibras amiloides en el sarcolema del músculo afectado y en las paredes de los vasos sanguíneos, incremento moderado de la CPK y una expresión baja de los niveles de disferlina en músculo^{12,14}.

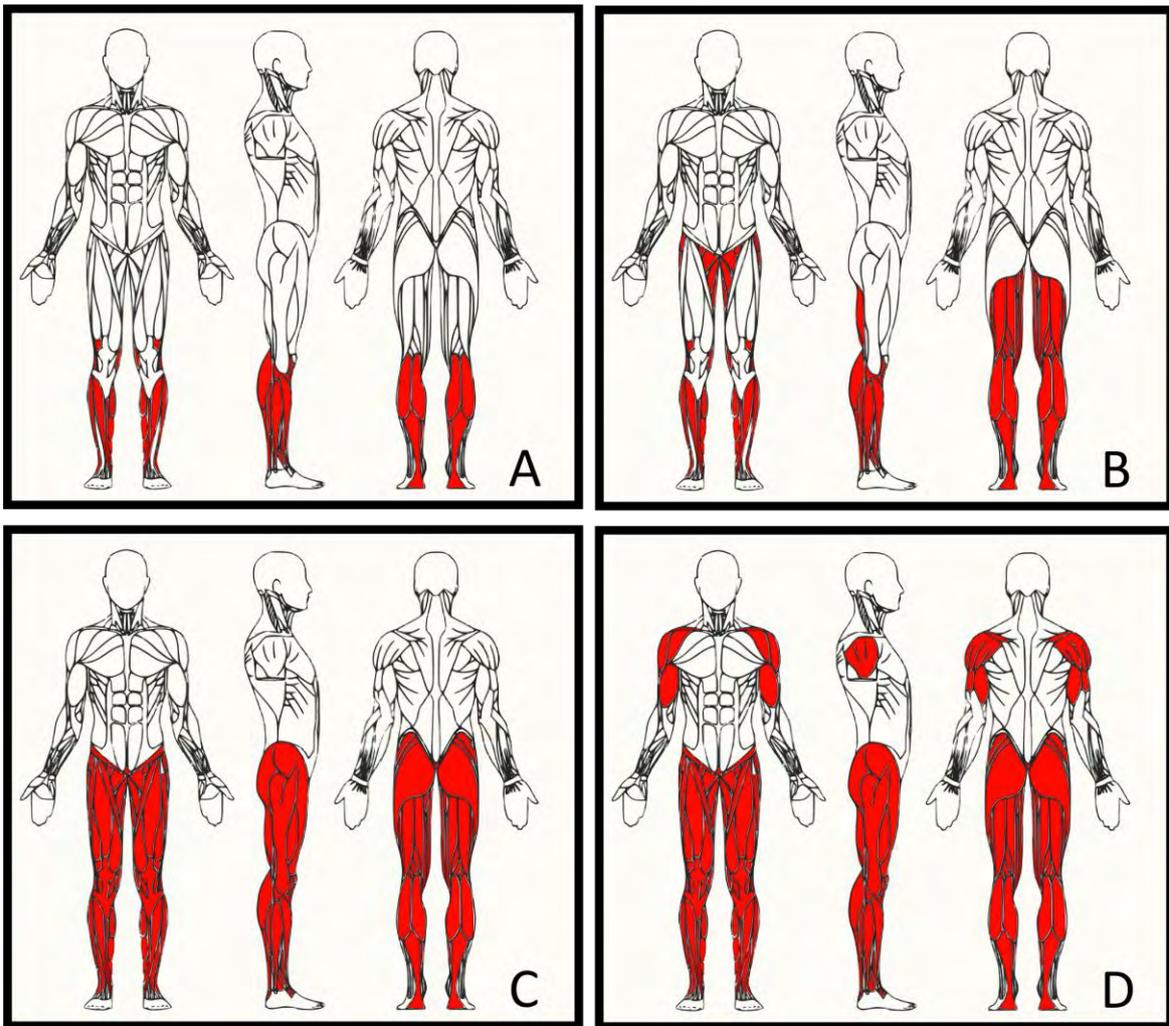


Figura1. Progresión típica de LGMD 2B. La LGMD2B suele afectar con mayor severidad un lado del cuerpo. El músculo sóleo, extensor común de los dedos, tibial anterior y gemelo interno suelen ser los primeros y más comúnmente afectados (A), aunque también es frecuente los de la mano. Conforme la enfermedad avanza de los músculos distales, a los proximales, el músculo tensor de la facia, sartorio, los gemelos, bíceps femoral y el cuádriceps (B), en algunos casos, también los glúteos, (C) sufren daño, mientras que en la forma más grave de la enfermedad también los trapecios, deltoides, bíceps, tríceps, serrato y traquial (D) se pueden observar síntomas. Generalmente los músculos de la cara y cuello no se encuentran afectados, por lo que complicaciones de deglución y masticación son extremadamente raras. (Modificado de Mahjneh, 2001).

Miopatía de Miyoshi (MM)

La MM es un desorden muscular que inicia durante la adolescencia (alrededor de los 19 años) y principios de la edad adulta, y afecta los músculos más alejados del centro del cuerpo (músculos distales). Los individuos afectados experimentan debilidad y atrofia en los músculos de las piernas, principalmente en las pantorrillas. Se pueden afectar ambas o solamente una, en cuyo caso se puede observar sin ayuda de ningún

instrumento, una notable diferencia de tamaño entre éstas. Aunque en algunos casos y conforme progresa la enfermedad, también se pueden afectar los músculos de los brazos y hombros, en cuyo caso generalmente se acompaña de debilidad muscular, pero en la mayoría de los casos la debilidad muscular se restringe a las pantorrillas y progresa paulatinamente hacia los músculos del centro del cuerpo (proximales), los músculos de los muslos y los glúteos son los siguientes afectados. Eventualmente los pacientes afectados con este tipo de distrofia terminan postrados en una silla de ruedas¹⁵. Una característica observable en algunos casos al inicio de la enfermedad, es la pérdida de reflejo en los tobillos. El análisis histopatológico de las biopsias de músculo suelen ser muy similares a aquellas de pacientes con LGMD2B, en donde se observa además disminución o ausencia de la expresión de disferlina¹⁶.

Miopatía distal con inicio tibial anterior (DMAT)

Esta es una condición rara e inicia en la edad adulta, con una mediana de 35 años. También es una miopatía que afecta los músculos distales, e inicia con una reducción en la capacidad de dorsiflexión de los tobillos. A diferencia de la MM, la progresión no es tan obvia, y solamente en casos muy raros afecta músculos proximales, faciales, cardíaco y extremidades superiores¹⁷. A diferencia de como ocurre en otras enfermedades musculares, las biopsias de los músculos afectados muestran poco daño distrófico. Lo que sí se puede observar es un reemplazo adiposo severo. Los electromiogramas revelan cambios drásticos en el músculo tibial anterior, mientras que los músculos cercanos como el extensor no presentan daño. Los niveles de CPK se

encuentran incrementados entre 20 y 70 veces de su valor normal en este tipo particular de la enfermedad¹⁸.

Miopatía con debilidad próximo-distal

Entre otros fenotipos que se han descrito en años recientes, la miopatía con debilidad próximo distal, es la que presenta una mayor prevalencia e importancia desde un punto de vista epidemiológico¹⁹. Este fenotipo inicia en la adolescencia y aparece tras una extensión de la MM, hacia músculos más proximales, o a partir de una LGMD2B, que desciende hacia la parte inferior de las extremidades inferiores, en vez de hacia la cintura. Los pacientes afectados también pueden presentar desórdenes pseudometabólicos, mialgias, calambres, e intolerancia general al ejercicio etc²⁰. A diferencia de otras disferlinopatías, el inicio de la enfermedad suele ser asimétrico, afectando solamente una o desfasadamente las extremidades. En esta enfermedad también se puede observar un aumento de los niveles de CPK.

Disferlina

La disferlina, también conocida como FER1L1 (ferlin1-like 1) es una proteína que pertenece a una familia de proteínas que incluye a la otoferlina (FER1L12), la mioferlina (FER1L13), la FER1L4, FER1L5 y FER1L61. La disferlina es una proteína transmembranal, con un peso molecular de 230 a 280kDa y se expresa principalmente en la región intracelular de la membrana plasmática de las células musculares esqueléticas²¹ y algunos otros tejidos como por ejemplo, monocitos, cerebro, páncreas, riñón y algunos tejidos embrionarios de otros animales⁸.

El gen de la disferlina (*DYSF*) se localiza en la región 2p13.3 y el alelo más común, contiene 55 exones. Uno de los primeros estudios que reveló algo de la naturaleza de

la disferlina, fue el identificar la homología que existe entre la disferlina y el factor de espermatogénesis de *Caenorhabditis elegans* FER-1, factor requerido para la fusión de organelos membranosos con la membrana plasmática durante la espermiogénesis²². Gracias a este hallazgo, se especuló que la disferlina podría llevar a cabo un papel importante en la fusión y dinámica de la membrana celular de las fibras musculares y aquellas células en las cuales se expresa²³⁻²⁴. Evidencias de microscopía electrónica más recientes²⁵ sugieren que el papel que desempeña la disferlina es como efectora de la reparación del daño celular y secundariamente del transporte vesicular, fusión celular y en manera mucho más reducida como coadyuvante de la secreción de citosinas y quimiocinas, desarrollo de los túbulos-t y señalización extracelular de ATP. Cabe destacar que esta última función solamente se ha reportado en embriones de pepino de mar²⁶.

También se ha demostrado que la disferlina no se encuentra localizada aleatoriamente en la membrana celular, si no que se agrupa en macrodominios de balsas lipídicas, sugiriendo una función en el transporte intramembranal de lípidos. Se sabe que la fusión lisosomal es un mecanismo importante para la formación y agrupamiento de las balsas lipídicas, es por eso que se han realizado estudios para determinar si la disferlina interviene de alguna manera en el proceso de señalización de éste mecanismo. El silenciamiento con RNA de interferencia provocó el paro total de éste mecanismo en células de arteria coronaria bovina y la disminución de la producción de ceramida y la translocación de la esfingomielasa ácida (ambos involucrados en el transporte de balsas lipídicas²⁷).

Estructura de la disferlina

Estructuralmente, la disferlina está conformada por siete dominios C2, dos dominios DysF y un dominio pequeño C-terminal transmembranal compuesto únicamente por 12 aminoácidos. La función principal de los dominios C2 y el primer dominio DysF se encuentra relacionada con el censo del Ca^{2+} intracelular como iniciador o regulador del transporte vesicular. Actualmente se desconoce la función que desempeña el dominio DysF restante²⁸.

Dominio C2

Se dice que los dominios de tipo C2 son módulos, un tipo muy específico de dominios altamente móviles, muy conservados entre diferentes taxa y con funciones específicas muy similares entre sí. Participan activamente en la conformación de proteínas multi-dominio, a partir de una variedad de dominios estáticos²⁹, y que se encuentran principalmente en proteínas que de alguna u otra manera se relacionan con procesos de exocitosis mediados por calcio³⁰. El mecanismo completo por el cual éste dominio regula o participa en la exocitosis aún se desconoce. Se sabe que tienen una estructura de sándwich, con 8 láminas β agrupadas una encima de otra, formando una cavidad estructural formada por la primer y última asa del dominio, en el cual se pueden unir hasta 3 iones calcio. El primero de los siete dominios C2 de la disferlina denominado como C2-A es altamente homólogo al de la sinaptotagmina I y III, bioquímicamente bien caracterizadas por unir una gran variedad de ligandos y sustratos principalmente fosfolípidos de membrana por ejemplo, durante el anclaje y fusión de las vesículas sinápticas, con los axones de la neurona pre-sináptica, también participan en el transporte intra y extracelular mediado por vesículas de fosfolípidos, además de que

generalmente su actividad es regulada de manera positiva por la presencia de iones Ca^{2+} ³¹. El dominio C2 une tanto calcio como una gran variedad de fosfolípidos, y es especialmente afín a aquellos cargados negativamente y a cationes divalentes, conocidos por participar en la exocitosis sináptica como son Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} y Mg^{2+} ³². El modelo más estudiado para entender ciertos procesos de intercambio vesicular como la endocitosis y la exocitosis mediadas por calcio en la célula, son las sinaptotagminas.

Estudios genéticos posteriores confirmaron el papel esencial de los dominios C2 de la sinaptotagmina en la captura de calcio y en la correcta secreción y acoplamiento de las membranas. Modelos transgénicos de ratones sinaptotagmina K.O., demuestran que el dominio C2 juega un papel regulatorio más que fundamental en la exocitosis³³. Se ha podido determinar un nuevo mecanismo por el cual el dominio C2 de la sinaptotagmina-1 acopla el flujo de calcio a la maquinaria celular; a través de la formación espontánea en ausencia de calcio de un arreglo circular en forma de anillos del dominio C2 en la membrana celular. Éstos anillos se van apilando uno sobre otro, con un dominio C2 mirando hacia el centro del círculo y el otro interactuando hacia la membrana celular. Eventualmente este acoplamiento forma un tubo/canal recubierto de proteína que interrumpe la continuidad membranal, impidiendo que el complejo SNARE actúe de manera normal. Cuando el flujo de calcio interacciona con el dominio C2 y se une, el anillo se deshace y la fusión procede sin impedimentos³⁴.

Otra manera en la que el dominio C2 está involucrado en la fusión y dinámica de la membrana celular, es a través de la acción directa del calcio. Cuando el calcio se une a los 2 dominios C2 de la sinaptotagmina-1, provoca que su estructura en el espacio cambie y se incruste en la membrana celular, provocando pequeñas inflexiones o

curvaturas superficiales, que en conjunto con el complejo SNARE, aumentará la proximidad de las membranas que se van a fusionar y por lo tanto la probabilidad de que esto pase³⁵.

A pesar de que los siete dominios pertenecen a la misma familia de proteínas y aparentemente desempeñan funciones similares, existen diferencias entre cada uno de ellos, motivo por el cual se han realizado estudios para intentar caracterizar cada uno y de esta manera comprender de manera más profunda la fisiología y función de la disferlina. Uno de estos hallazgos, relevante al estudio de las disferlinopatías, es el que el dominio C2A de la disferlina tiene la capacidad de unirse a la fosfatidilserina (PS), al fosfatidilinositol 4 fosfato [PtdIns(4)P], y al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato [PtdIns(4,5)P(2)] en presencia de Ca^{2+} . Mientras que los dominios C2 restantes (incluido el primer dominio DysF, que presenta características muy similares a los dominios C2), solamente tienen la capacidad de unirse de una manera muy débil a la fosfatidilserina y al contrario del dominio C2A, es en ausencia de Ca^{2+} además de que carece de la capacidad para unirse a los fosfoinositol ³⁶. Se especula que la capacidad de unión a fosfoinositoles un mecanismo importante para la incorporación de nuevos fosfolípidos a la membrana del sarcolema en presencia de calcio intracelular. Ya sea cualquiera de las dos maneras, como promotor directo de la formación vesicular, inactivador indirecto de los dominios C2 o una combinación de ambas, el papel que desempeña el calcio no queda completamente esclarecido, más no por eso se desprecia el papel central que juega en la dinámica membranal a través del dominio C2.

Dominio DysF.

Una vez establecido que la función putativa del dominio C2 es la unión de calcio para diferentes funciones celulares, queda por esclarecer la función de los dos dominios DysF restantes. Existen estudios que han tratado de determinar el mecanismo molecular de la proteína a través del estudio de la interacción de la disferlina con otras proteínas en músculo esquelético. Por ejemplo, la nucleoproteína homóloga de anquilosis progresiva de 700 kDa (ANKH, por sus siglas en inglés) implicada en una gran variedad de enfermedades musculares; cardiomiopatías y trastornos neuronales³⁷ en presencia de calcio, interacciona con la disferlina en sitios muy específicos relacionados con el primer dominio DysF, ambas proteínas se colocan en el sarcolema de los túbulos T durante eventos de reparación de daño celular, y a su vez, la reducción de la expresión de la disferlina, se relaciona con una disminución en la presencia de ANKH en el sarcolema, sugiriendo que la disferlina funciona como una reclutadora de ANKH a través de la unión de esta al primer dominio DysF.

Disferlina en monocitos e inflamación

Los monocitos son células del sistema inmune innato, son producidas a partir de precursores de leucocitos en la médula ósea. Tras eventos mediados por la secreción de quimiocinas, durante infecciones, o eventos de alto estrés celular, migran hacia los tejidos blanco, donde se encargan principalmente de la secreción de factores pro-inflamatorios, aunque se sabe que también participan en la fagocitosis. En condiciones normales se encuentran en sangre circulante, médula y bazo, y una vez que migran hacia el sitio blanco, son capaces de diferenciarse tanto en macrófagos como en células dendríticas³⁸.

Se ha observado que los monocitos deficientes en disferlina presentan una sobre activación, así como una elevada actividad fagocítica, exacerbando la respuesta inflamatoria, demostrando que esta desregulación contribuye a la progresión de las miopatías, prolongando los procesos distróficos, al aumentar la permanencia de éstas células del sistema inmune en el sitio de daño³⁷. El mecanismo molecular no se conoce con certeza, pero hay evidencia que sugiere que la disferlina juega un papel importante en la adhesión y la movilidad de los monocitos a través de la regulación negativa de las proteínas de adhesión y la alteración en la formación de complejos proteicos de fibronectina junto con una serie de integrinas en la membrana celular, que contribuyen a mantener a los fagocitos en su estado pasivo. Una vez que se inicia la respuesta inmune y los macrófagos son reclutados, los niveles de disferlina disminuyen a concentraciones menores a 100 nmol/l, la capacidad fagocítica aumenta proporcionalmente a la disminución de disferlina, además de que ésta capacidad fagocítica se triplica en presencia del factor de necrosis tumoral TNF- α , también involucrado en el proceso inflamatorio, facilitándoles ser más agresivos y moverse a través del endotelio³⁹.

A pesar de que el papel que juega la disferlina en los monocitos no se entiende a la perfección, a través de la observación del comportamiento y la expresión de la disferlina en modelos celulares THP1 de tipo leucémico, se ha podido demostrar que durante la fase de diferenciación de los monocitos, tanto la expresión del RNAm como de la proteína se eleva. Esto, sumado al hecho de que en modelos con deficiencia de disferlina, la regulación de las integrinas de unión a fibronectina se ve afectada, sugiere un papel sumamente importante de la disferlina en la adhesión y motilidad de los macrófagos dando como resultado un fenotipo altamente móvil⁴⁰.

La inflamación muscular es un signo menudo presente en pacientes con deficiencia de disferlina, pero debido a que la poliomiositis (enfermedad autoinmune) también presentan inflamación muscular los pacientes son frecuentemente mal diagnosticados con este padecimiento. Las biopsias de pacientes con disferlinopatía muestran un mayor número de fibras inmaduras, en comparación con otros tipos de distrofia muscular, una regeneración atenuada, una limpieza retardada de fibras necróticas y una fase inflamatoria prolongada. Las fibras necróticas persistentes promueven más la reacción inflamatoria dirigiendo a las células miogénicas hacia un proceso fibrótico, además se demostró niveles de expresión de pequeñas GTPasas de la familia Rho, tal como RhoA, Rac1 y Cdc 42, las cuales se ven incrementadas en células inmunes de murino comparado con un control celular. Por lo tanto debido a estos factores, se puede pensar que el daño a las miofibrillas en músculo con deficiencia de disferlina, estimula una cascada inflamatoria que puede iniciar exacerbando y perpetuando la capa de miofibras llevando a un proceso distrófico específico.

La deficiencia de disferlina en macrófagos, trae como consecuencia anomalías en su función, jugando un papel en la reacción inflamatoria del músculo esquelético de muchos pacientes con distrofia muscular de cinturas tipo 2B, es por ello que es necesaria una regulación eficiente de la membrana, para un número de funciones críticas de monocitos o macrófagos, incluyendo receptores que median la fagocitosis, secreción de citocinas y receptores que regulan la señalización a través de la familia de pequeñas GTPasas de la familia Rho ya mencionadas.

Otros estudios han evidenciado que la respuesta inmune en tejido deficiente de disferlina se encuentra comprometida. En el músculo, la deficiencia de disferlina causa reducción en la secreción de citosinas y quimiocinas así como un subsecuente

desbalance local del reclutamiento y persistencia de células inmunes. Además como la disferlina es fuertemente expresada en monocitos se sugiere que una posible modificación del monocito podría contribuir al fenotipo de la disferlina.

Estudios recientes ha mostrado que macrófagos deficientes de disferlina tienen una alta fagocitosis y son mucho más agresivos que las células de tipo silvestre, sin embargo el mecanismo que desencadena esta observación aún es desconocido. También se ha demostrado que la disferlina se encuentra en un complejo de adhesión focal en células del músculo esquelético, donde las adhesiones focales son sitios de ataques celulares, cuando el citoesqueleto interno es conectado a la matriz extracelular vía integrinas⁴⁰.

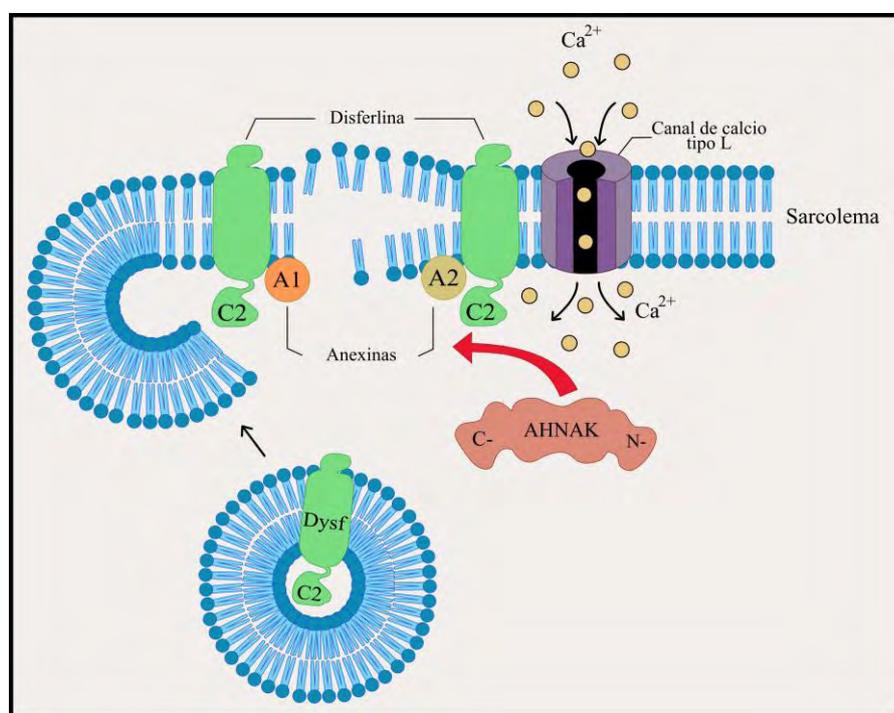


Figura 2. Función reparadora de la disferlina en músculo. Cuando el calcio extracelular ingresa a la célula ya sea debido al daño causado al sarcolema por tensión mecánica o por procesos autónomos de reestructuración membranal, comienza una cascada de señalización mediada por disferlina. El calcio extracelular, se une al dominio C2 de la disferlina, lo que inicia el reclutamiento de

anexinas y de la proteína AHNAK, junto con la translocación al sitio de reparación, de vesículas altamente enriquecidas con disferlina, que retroalimentaran esta cascada de señalización y proveerán los fosfolípidos necesarios para incorporar a la membrana celular. Ahí, la disferlina interacciona con las anexinas para formar un parche y empezar la fusión membranal, a la vez que se promueve el reclutamiento y ensamble de complejos reparadores formados por AHNAK que ayudaran a acelerar la incorporación de vesículas a la membrana del sarcolema. (Modificado de Huang Y. 2007)

Diagnóstico de disferlinopatías

Actualmente, los avances en genética molecular han provisto de un mayor entendimiento de los procesos involucrados en la presentación clínica sin embargo, la heterogeneidad genética y clínica, hace difícil el diagnóstico de estas enfermedades; retrasando el tratamiento de pacientes y el asesoramiento genético de las familias. Para diagnosticar las disferlinopatías, es necesario corroborar la evaluación clínica con estudios electromiográficos, medir los niveles de creatinfosfocinasa (CPK) que correlacionan de manera positiva con las diferentes disferlinopatías, análisis de biopsias de músculo y estudios genéticos⁴¹.

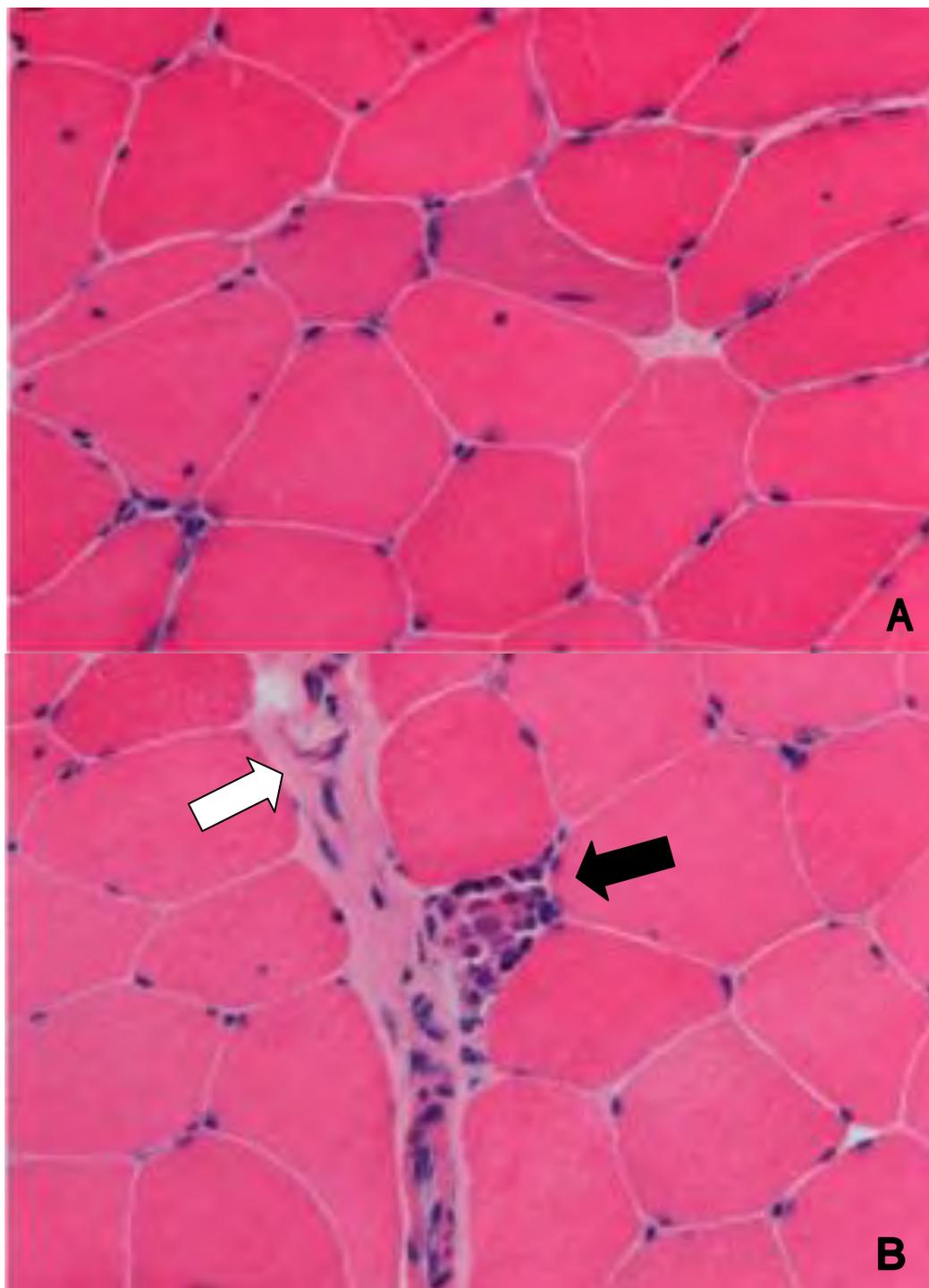


Figura 3. Biopsia de musculo sano y músculo con LGMD2B. Tinción comparada de Hematoxilina Eocina (HE) de (A) biopsia de músculo esquelético de un control sano y (B) biopsia de un paciente con LGMD2B. Se puede observar el reemplazo de las fibras musculares por tejido adiposo (flecha blanca) y focos de fibras necróticas. (flecha negra) característicos de la enfermedad.

Las técnicas inmunohistoquímicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), han jugado un papel muy importante en el diagnóstico diferencial de las distrofias

musculares, particularmente para las formas recesivas donde la ausencia o disminución, como defecto primario en la expresión de la proteína en cuestión, puede ser detectada. Por otro lado, dada la sutileza de las diferencias en el inmunomarcaje de proteínas relacionadas entre sí, o por su localización intracelular o naturaleza *per se* es difícil en ocasiones determinar su presencia o ausencia por inmunofluorescencia, por lo que es necesario usar otras herramientas como el Western Blot (WB) para confirmar el diagnóstico. De cualquier manera, éstas técnicas tienen algunos inconvenientes: son laboriosas, requieren mucho tiempo de ejecución, la cantidad total de proteína se estima por la intensidad de tinción, la obtención de muestras es un método complejo y el resultado es dependiente del operador⁴².

Inmunofluorescencia

Es una técnica que se usa comúnmente en el área clínica principalmente para la detección de anomalías en la expresión o localización de alguna proteína. Es por eso que ha sido ampliamente utilizada como una herramienta en el diagnóstico de las distrofias musculares, y con ellas las disferlinopatías¹¹. También se usa en muchas áreas de laboratorio, tanto para el aspecto médico, clínico e investigación. Fue desarrollada por Coons, Kaplan y Osborne en 19-- y permite la detección de proteínas en muestras de tejidos en suspensión, células cultivadas e inclusive micropartículas recubiertas de antígeno. Una de las ventajas de la inmunofluorescencia es que se puede realizar en muestras frescas o previamente fijadas, siempre y cuando los antígenos que se quieren detectar permanezcan íntegros. En la inmunofluorescencia, se marcan o conjugan anticuerpos químicamente con agentes fluorescentes (por ende,

que en ocasiones se les denomine como anticuerpo conjugado) como isotiocianato de fluoresceína (FITC) o isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC). Estos anticuerpos se pueden unir de manera directa o indirecta el antígeno para el cual están diseñados, lo que permite su detección a través de diferentes técnicas de fluorescencia como citometría de flujo, escáner de arreglos, o microscopía de fluorescencia.

Los dos métodos principales de inmunofluorescencia, son el directo e indirecto. En la inmunofluorescencia directa, el anticuerpo dirigido contra la proteína de interés (anticuerpo primario) se encuentra marcado con fluorescencia, lo que permite su observación directa, mientras que en la inmunofluorescencia indirecta, que es la más frecuentemente usada, se ocupa un anticuerpo primario que no tiene marcaje fluorescente, posteriormente se usa un anti-anticuerpo marcado con algún fluoróforo (anticuerpo secundario) dirigido contra la porción fija del primer anticuerpo, lo que permite la observación indirecta del anticuerpo primario⁴³.

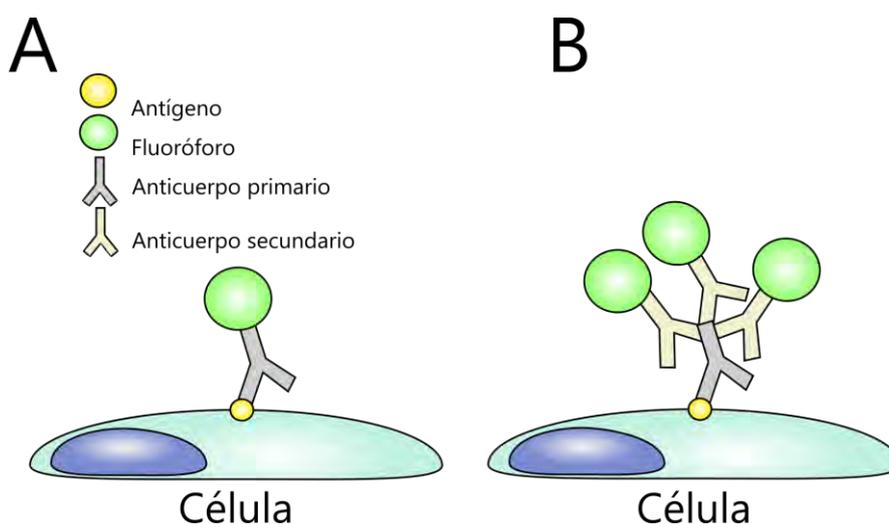


Figura 4. Inmunofluorescencia directa e indirecta. En la inmunofluorescencia directa (A) el anticuerpo primario marcado con el fluoróforo se dirige directamente al sitio de interés en la célula, mientras que en la inmunofluorescencia indirecta (B), el anticuerpo primario no se encuentra marcado, se requiere de un anticuerpo secundario marcado con fluoróforo para observarlo en un microscopio de fluorescencia o en un citómetro de flujo. Imagen adaptada de www.leinco.com/immunochemistry..

La inmunofluorescencia directa es mucho más rápida que la indirecta, ya que incluye menos pasos de marcaje de anticuerpos/proteínas y existe poco riesgo de reactividad cruzada. Aunque como se puede observar en la imagen anterior, la cantidad de señal es mucho menor, y en la mayor parte de los casos (cuando se quieren buscar proteínas no estructurales) la tinción directa no es una buena opción, otros puntos que hay que considerar cuando se realiza IF, es que no todos los anticuerpos primarios marcados se encuentran disponibles en el mercado, y que su costo es mucho mayor que uno que no tenga marca fluorescente. La inmunofluorescencia indirecta es más tardada ya que se usa un anticuerpo secundario para observar la señal fluorescente, se corre el riesgo de observar reacciones cruzadas, aunque dependiendo de la calidad del anticuerpo secundario, este riesgo se reduce substancialmente, también es menos costosa, ya que existen una gran variedad de anticuerpos secundarios marcados, en una gran variedad de colores (esto es, marcados con diferentes fluorocromos) y clonados en una gran variedad de especies hospederas (rata, ratón, conejo, cabra, caballo, humano, etc.)⁴³ Además, la IF indirecta tiene una mayor sensibilidad porque permite la unión de más de un anticuerpo secundario al anticuerpo primario, como se muestra en la imagen anterior.

Western Blot (WB)

Otra aproximación directa para el diagnóstico parcial de las disferlinopatías ha sido el WB. Ésta técnica nos ayuda a discernir la presencia o ausencia de una proteína en específico, entre una mezcla de proteínas de manera semi cuantitativa. El WB es una técnica fundamental en biología celular y molecular. La técnica presenta 3

características principales que nos aportan datos sobre la proteína que se quiere investigar. Primero: la separación de las proteínas por peso molecular en una electroforesis de gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE por sus siglas en inglés). Como las proteínas previamente se desnaturalizan en un buffer con detergente, su carga neta total es negativa, lo que permite que migren a través del gel, hacia el electrodo positivo. El gel actúa como una red o filtro, que facilita el paso de las proteínas entre más pequeñas sean, lo que resulta en una separación final, de acuerdo a su peso molecular. Segundo: la transferencia de las proteínas a una fase sólida por carga eléctrica (blotting): en este caso la migración de las proteínas se realiza de manera perpendicular, fuera del gel, hacia una membrana. El tiempo de transferencia depende del tamaño de las proteínas que se encuentren en el gel, y la intensidad del campo eléctrico usado. Tercero: La detección monoespecífica de las proteínas, por anticuerpos marcados (inmunodetección): después de la transferencia, la proteína o proteína se detectará usando el anticuerpo marcado adecuado. Similar a la inmunofluorescencia, se puede realizar de manera directa o indirecta, solamente que en este caso el anticuerpo no siempre se encuentra marcado con una molécula fluorescente, existen marcajes colorimétricos como la tertrametilbenzidina (TMB), o el DAB tetrahidroclorido de diaminobenzidina, o quimioluminiscentes como el Luminol⁴³.

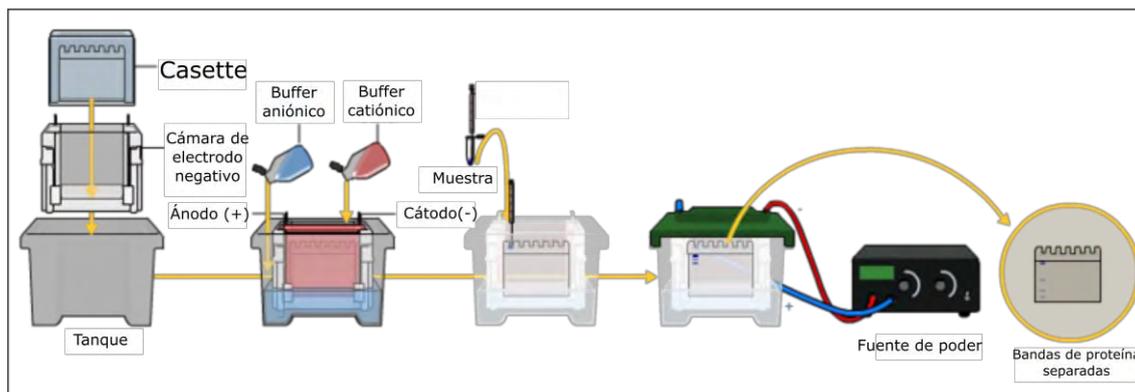


Figura 5. Procedimiento del Western blot. El Western blot consta de 3 pasos principales: la separación por peso molecular de proteínas por carga, la transferencia de estas proteínas a una fase sólida de nitrocelulosa o algún otro polímero sensible a la carga eléctrica y que conserve las proteínas en él, y finalmente el marcaje y observación de dichas proteínas por medios fluorescentes, radioactivos, luminiscentes o colorimétricos. Imagen adaptada de proteomeplus.wordpress.com.

Citometría de flujo

Los avances recientes en el diagnóstico de algunas distrofias musculares como las disferlinopatías, han permitido el análisis de disferlina en monocitos de sangre periférica por citometría de flujo. La ventaja de esta técnica es que la recolección de la muestra es fácil, con un procedimiento menos invasivo que la realización de una inmunofluorescencia de biopsia convencional de músculo, y los resultados de esta determinación en sangre, correlacionan con los hallazgos de inmunofluorescencia en músculo y WB de músculo y sangre⁴⁴ que en el caso de los paciente con disferlinopatías, puede ser una herramienta para el diagnóstico de la enfermedad sin la necesidad de una biopsia.

Justificación

Las disferlinopatías son entidades clínicas sub-diagnosticadas debido a la gran variabilidad fenotípica y al amplio espectro mutacional del gen *DYSF*. En nuestro país esto se adiciona a la falta de acceso a un análisis genético que no se está

disponible en la mayor parte de los estados de México,. En una publicación reciente sobre la etiología de las distrofias musculares en México, se plantea la posibilidad de que la deficiencia de disferlina pudiera ser la segunda causa más común de distrofias musculares.

Con la finalidad de implementar un método de diagnóstico accesible y menos invasivo a través de la detección de la expresión de disferlina en los monocitos CD14+, primero es necesario caracterizar los valores normales de expresión de esta proteína en nuestra población. Aún se desconoce si los resultados obtenidos por otros investigadores son reproducibles en nuestro medio, especialmente porque no existen valores estandarizados del índice medio de fluorescencia (IMF) de disferlina en monocitos de sangre periférica medidos por citometría de flujo ya que si el IMF de disferlina en monocitos de sangre periférica medido por citometría de flujo permite diferenciar con un grado de exactitud aceptable los casos de disferlinopatías de controles sanos, entonces es probable que sea un buen marcador diagnóstico de la enfermedad con validez de convergencia significativa con otros procedimientos que forman parte del constructo obtenido por datos clínicos, de laboratorio y gabinete.

Objetivo general.

Explorar si el índice medio de fluorescencia (IMF) de disferlina detectada en monocitos de sangre periférica por citometría de flujo, podría ser un marcador diagnóstico útil para identificar los casos de disferlinopatías en pacientes de México.

Objetivos Particulares

- 1** Caracterizar el índice medio de fluorescencia (IMF) promedio de disferlina en la población sana, a través de la medición en monocitos de sangre periférica de controles sanos en edades que van entre 15 a 60 años.
- 2** Correlacionar la presencia de disferlina en músculo esquelético con la encontrada en monocitos, por inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo.
- 3** Proponer un algoritmo diagnóstico para las disferlinopatías en México.

Metodología

Diseño del estudio

Se trata de un estudio transversal de observación y comparativo entre pacientes y controles sanos, tipo prueba diagnóstica.

Descripción del universo de trabajo

Positivos. Todos los pacientes del servicio de Neurología del Hospital General de Durango, del Instituto Nacional de Rehabilitación y del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, y Centros de Rehabilitación física públicos o privados, así como de centros que refirieron pacientes para biopsia muscular en las instituciones participantes o asociaciones de distrofia muscular nacionales en quienes se encontraron manifestaciones de distrofia que hayan sido confirmados como portadores de la enfermedad, al menos por inmunofluorescencia.

Negativos (controles sanos). Participantes apareados por edad y sexo sin antecedentes heredofamiliares de disferlinopatía y sin manifestaciones clínicas de la enfermedad que acudieron a la consulta o al banco de sangre del INR.

Criterios de inclusión

Para asegurar la validez del estudio, los pacientes que conformaron el grupo “positivo” fueron seleccionados sin importar el sexo o la edad, y solamente si se había confirmado algún tipo de disferlinopatía por medio de estudios electromiográficos, bioquímicos (niveles de CPK) y un análisis de biopsia muscular, que hoy en día es el estándar de oro para el diagnóstico. El grupo negativo o de muestras control fue conformado por sujetos de edad o sexo indistinto, apareados con los pacientes y sin manifestaciones clínicas de algún tipo de distrofia muscular o antecedentes familiares que pudieran causar algún resultado ambiguo. Tanto el grupo de positivos como negativos firmaron una carta de consentimiento informado.

Criterios de eliminación

Se consideraron como criterios de eliminación, cualquier tipo de contaminación, etiquetamiento incierto o degradación tanto observable como inferible en las muestras de tejido muscular y sanguíneo, así como la solicitud de retiro de la muestra de los voluntarios del estudio.

Criterios de exclusión

Se consideró como un criterio de exclusión solamente a aquellos voluntarios que rechazaron participar en el estudio.

Material y métodos

Muestras clínicas

Se obtuvieron 4 ml de muestra de sangre en tubos BD Vacutainer BD EDTA (Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, E.U.A) de individuos sanos y pacientes diagnosticados con disferlinopatía, con base al estudio clínico e inmunofluorescencia de músculo esquelético. Las muestras de individuos sanos fueron tomadas del banco de sangre del Instituto Nacional de Rehabilitación. Las biopsias de pacientes fueron tomadas bajo su consentimiento.

Inmunomarcaje de monocitos

A partir de la toma de muestra, dentro de las primeras 24 horas, se marcaron 100µl de sangre fresca de cada una de las muestras de controles sanos y pacientes con 1µl de anticuerpo monoclonal anti-CD14-PerCP-Cy5.5 humano, clona M5E2 (BD Bioscience, San José, CA). La muestra se homogeneizó con vortex (5s) y se incubó 30 min a temperatura ambiente (TA) en obscuridad. Después se agregaron 200 µl de solución de lisis FACS Lysing solution (BD Bioscience, San José, CA), la muestra se homogeneizó con vortex (15s) y se incubó 10 min a TA en la obscuridad. Para lavar, se agregó 1ml de solución de lavado (PBS 1x con 5% de albúmina de suero) y se centrifugó por 5 min a 2000 rpm. El sobrenadante se eliminó y se homogeneizaron 150 µl de solución de permeabilización FACS (BD Bioscience, San José, CA) con la muestra y se incubó por 10 minutos a TA. El sobrenadante se removió por centrifugación (5 min a 2000 rpm) y se agregó 1 µl de anti-disferlina C-terminal, clona HAM1/7B6 (Vector Laboratories, Burlingame, CA), la muestra se incubó 30 minutos a TA en obscuridad. Después de eso, se agregó 1 ml de solución de lavado y se centrifugó por 5 min a 2000 rpm a TA, el

sobrenadante se eliminó y se agregó 1 μ l de anticuerpo IgG anti-ratón (H+L) conjugado con FITC (Bethyl Labs, Montgomery, TX), la muestra se homogeneizó con vortex (5s) y se incubó 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se lavó la muestra agregando 1ml de solución de lavado, se centrifugó por 5 min a 2000 rpm para remover el sobrenadante y se resuspendió en 400 μ l de para formaldehído (PFA) al 1%.

Las muestras se corrieron en un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron en el software FlowJo5.7.2 (*Tree Star, Ashland, USA*). La cantidad relativa de disferlina se expresó como el índice medio de fluorescencia (IMF). Los experimentos se realizaron con su control de isotipo correspondiente.

Análisis estadístico

Las formas de distribución de las variables cuantitativas se comprobaron con el estadístico de Kolmogorov-Smirnov. Las comparaciones de dos promedios se efectuaron con t de Student o U de Mann-Whitney y Chi cuadrada para comparar proporciones. Tres o más promedios se compararon con análisis de varianza o H de Kruskal-Wallis. Para las correlaciones se aplicaron r de Pearson o rho de Spearman; para el análisis multivariado se usó el modelo general lineal del análisis de varianza. Los puntos de corte del IMF para diferenciar casos de controles se estimaron a través de curvas COR. Los datos fueron procesados con el paquete SPSS ver 17.0 y en todos los contrastes se fijó el error alfa como 0.05.

Resultados

Características de la Población

Se obtuvo sangre total de 183 individuos sanos (31.7% mujeres y 68.3% hombres) del banco de sangre del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR). La edad promedio de las mujeres fue de 37.27 años (rango 20-55) y para los hombres fue de 37.9 años (rango 19-60). Estos individuos sanos no tenían ninguna enfermedad muscular o padecimiento relacionado. Se obtuvo sangre total de 29 pacientes con diagnóstico clínico de disferlinia involucrados en este trabajo, 17 hombres y 12 mujeres de entre 14 a 42 años (con una media de 26.3 ± 7.4) de los servicios de distrofias musculares del INR, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Hospital General de Durango y la Asociación de Distrofia Muscular de Occidente AC en México. El diagnóstico clínico mostró 12 casos (41.4%) con miopatía de Miyoshi (MM), 8 (27.6%) con un fenotipo proximal, 1 (3.4%) con miopatía tibial anterior y 8 (27.6%) casos con distrofia muscular de cinturas 2B. La edad de inicio de los síntomas fue entre 5 y 19 años (con una media de 14.6 ± 3.4) y el tiempo de evolución fue de entre 2 y 26 años, con una media de 11.7 ± 6.2 (Tabla 3).

En 3 pacientes no se pudo obtener información de la tinción por inmunofluorescencia de sus muestras de músculo, por lo que no se pudo realizar una comparación entre los resultados de sangre y músculo. Los hallazgos histológicos de las biopsias musculares consistieron en fibras atrofiadas con fibras degenerativas y en regeneración, variación del tamaño de las fibras, infiltrado inflamatorio y núcleos central incrementados. La inmunofluorescencia mostró una tinción anormal de disferlina en el sarcolema de todas las biopsias musculares, con una reducción severa en 3 pacientes (10.3%), señal

negativa en 11 (37.9%) y expresión anormal en 11(37.9%). Solamente un caso (3.4%) tuvo una expresión normal de disferlina (Tabla 3).

Tabla 3. Características de la población de estudio

Características	Hombres (n = 17)	Mujeres (n =12)	P
Edad (SD)	26.9 (±8.5)	26.5 ± (5.9)	0.94
Edad de inicio (SD)	13.5 (±4.1)	16.1 (±1.4)	0.04
Duración de la enfermedad (SD)	12.7 (±6.7)	10.5 (±5.4)	0.35
IMF para Disferlina (SD)	116.3 (±189.9)	78.2 (±58.2)	0.61
Fenotipo			
LGMD2B	11 (64.7%)	4 (33.3%)	0.10
MM	3 (17.6 %)	7 (58.30%)	
Proximal-distal	1 (5.9%)	1 (8.3%)	
DMAT	2 (11.8%)	0	
Disferlina en músculo			
Severamente reducida	1 (5.9%)	2 (16.7%)	0.77
Expresión reducida	6 (35.3%)	5 (41.7%)	
Sin tinción	7 (41.2%)	4 (33.3%)	
No determinada	2 (11.8%)	1 (8.3%)	
Normal	1 (5.9%)	0	
Lista de mutaciones caracterizadas			
Mutación	IMF de Disferlina		
c.3478C>T	69.1		
D737E	89.7		
c4253G>A	42.9		
c.1392dupA	86.3		
E382K	81		
	SD:	Desviación estándar.	
	IMF:	Índice medio de fluorescencia	
	LGMD2B:	Distrofia muscular de cinturas de tipo 2B	
	MM:	Miopatía de Miyoshi	
	DMAT:	Miopatía con inicio distal anterior	

Cuantificación de la expresión de disferlina en monocitos.

Se calcularon los valores de expresión de disferlina en monocitos circulantes CD14+ de individuos sanos y pacientes con disferlinopatía (figura 5), y se observó que los datos de citometría de flujo correlacionan con los resultados obtenidos por inmunofluorescencia en músculo. Se observó señal positiva en los monocitos CD14+, aún en aquellos casos donde la inmunofluorescencia reportó una reducción severa o inclusive ausencia total en músculo (Fig. 5). El IMF de disferlina en monocitos obtuvo un rango de 7.9 a 714.0, con una media de 100.5 +/- 149.3 unidades, sin una distribución normal (D de Kolmogorov-Smirnov 1.52, $p = 0.01$).

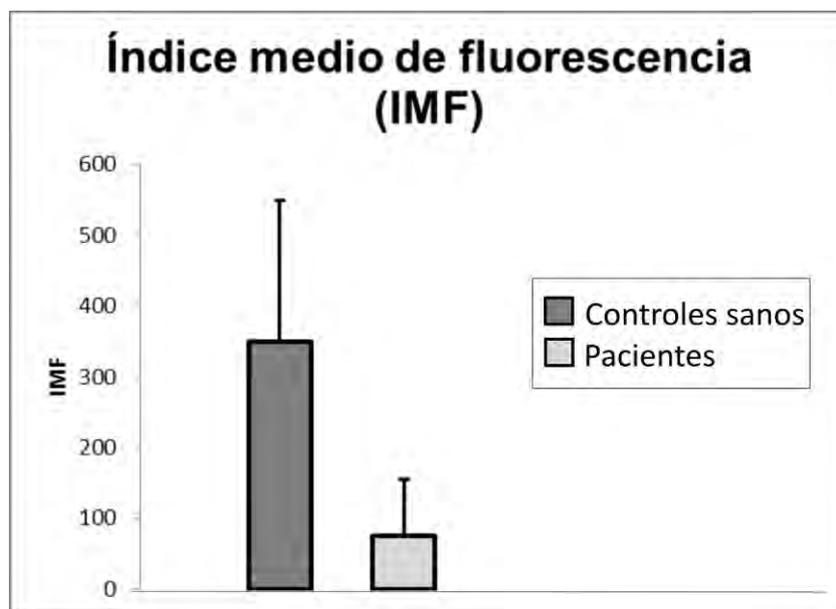


Figura 6. Índice medio de fluorescencia. Índice medio de fluorescencia de los controles $n=137$, media=349.45 y de pacientes diagnosticados con disferlinopatía $n=29$, media=

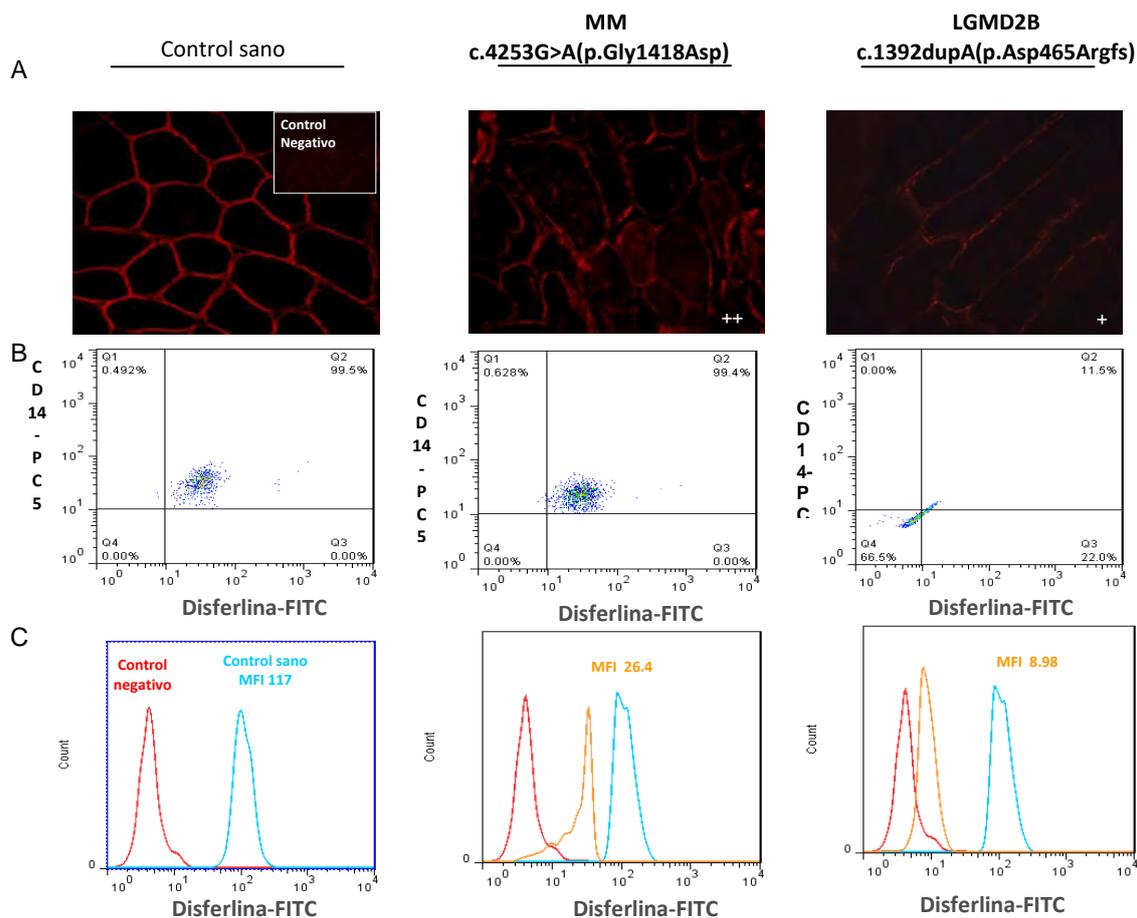


Figura 7. Análisis de inmunofluorescencia en músculo y cuantificación de disferlina en monocitos.(A) Patrones de inmunofluorescencia de la expresión de disferlina en el sarcolema de las fibras musculares de controles sanos (Izquierda), pacientes con MM (centro) y pacientes con LGMD2B (derecha). (B) Gráficas de puntos (dot plot) de Disferlina-fITC vs. CD14 PECY5 muestran una disminución significativa de monocitos expresando disferlina en los pacientes con MM (99.4%) y LGMD 2B (11.5%) a comparación de los controles normales. En los histogramas (C) se puede observar una disminución de los niveles de IMF de los monocitos CD14+ en pacientes con MM (26.4) y LGMD2B (8.98). Estos resultados correlacionan con aquellos hallados por inmunofluorescencia de biopsias de músculo, donde se observa una disminución en la expresión de disferlina.

ESTAS GRAFICAS DE CITOMETRÍA ME PARECE QUE NO ESTÁN BIEN, PREFIERO HACER

MIS COMENTARIOS EN PERSONA O POR TELÉFONO.

Cuando se analizó la correlación entre edad de los pacientes con la IMF para disferlina, se encontró una correlación (rho de Spearman – 0.311, $p = 0.10$); con una clara tendencia hacia los IMF bajos, con el incremento de edad en los pacientes (Fig.6). En el grupo control, no hubo individuos entre 14 y 18 años, ni de más de 42 años de edad. Hay que hacer notar que las pruebas estadísticas para hombres no hicieron diferencia entre pacientes y controles en el estrato de 19-22 años ($p = 0.16$) y en el estrato de 29-

31 años ($p = 0.47$). En las mujeres tampoco hubo diferencia en el estrato de 19 a 22 años ($p = 0.15$). La tendencia es que el IMF de los hombres disminuye conforme la edad incrementa ($p = 0.07$), mientras que en otros grupos de edad, no existen diferencias (Fig. 7 y 8). Hay que hacer notar que el estrato de mujeres de edad entre 23-28 años, tuvo un IMF significativamente alto (487.9 ± 67.1) que el estrato de hombres control de la misma edad (327.4 ± 44.7) ($p = 0.04$) (Fig. 7 y 8)

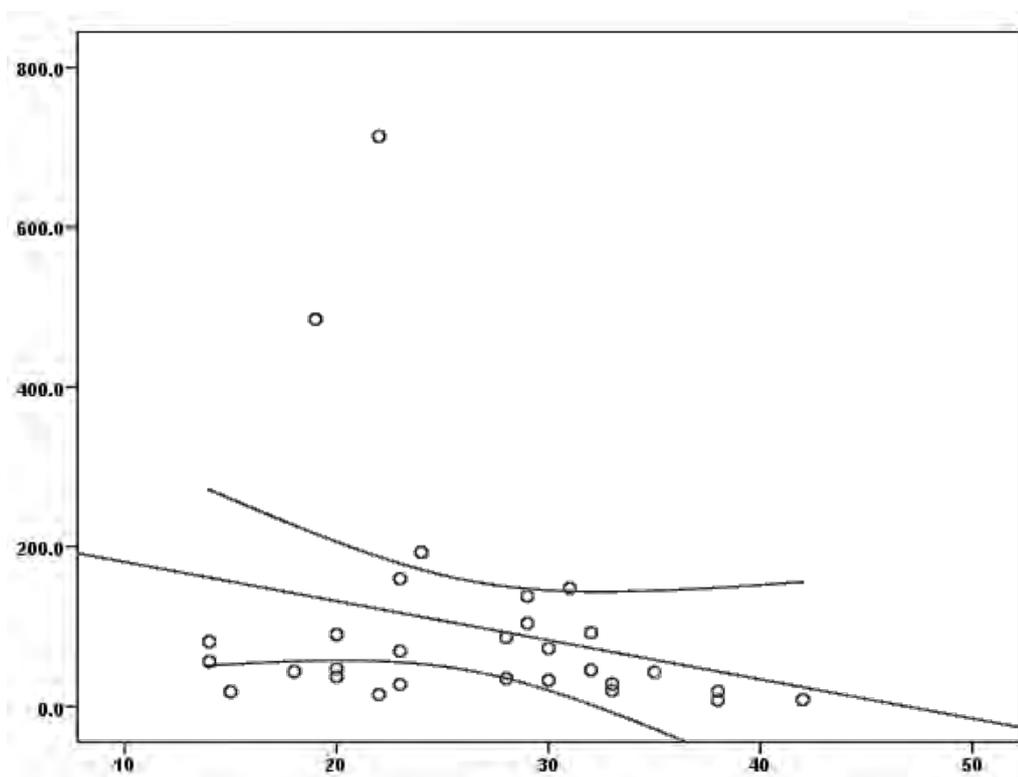


Figura 8. Correlación entre el índice medio de fluorescencia (IMF) y la edad de los pacientes. Hay que hacer notar que el IMF mostró una importante correlación negativa con la edad de los pacientes, rho de Spearman de -0.134 (P 50.48) con una clara tendencia hacia niveles más bajos del IMF, con un incremento en la edad del paciente.

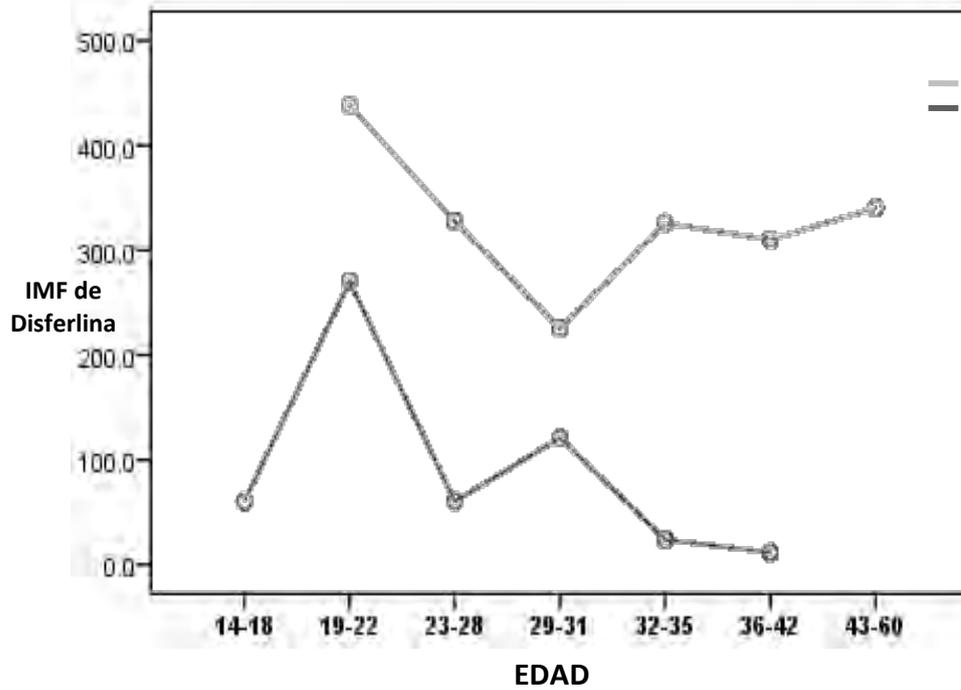


Figura 9. Índice medio de Fluorescencia (IMF) estima la media marginal en pacientes masculinos. Medias marginales estimadas del IMF de disferlina en controles y pacientes masculinos.

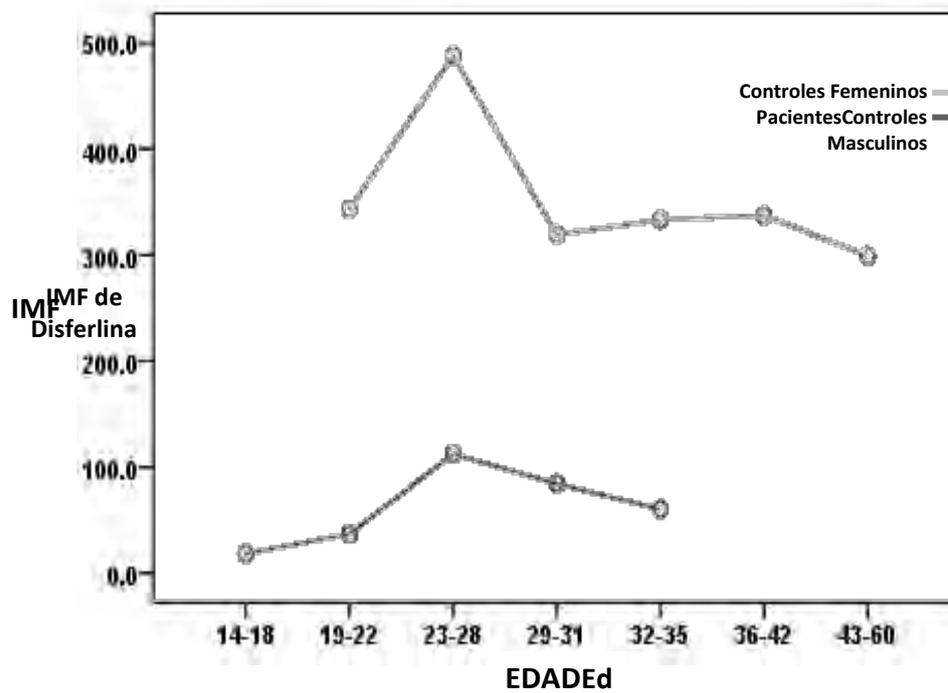


Figura 10. Índice medio de Fluorescencia (IMF) en mujeres Medias marginales estimadas del IMF de disferlina en controles y pacientes femeninos.

Correlación entre niveles de disferlina en monocitos, la edad de inicio de la enfermedad, el diagnóstico clínico y la expresión de disferlina en músculo.

Se mostró que la correlación del inicio de la enfermedad con el IMF de disferlina tiene una correlación negativa, (Rho de Spearman -0.134 ($p = 0.48$)) y un tiempo de evolución de -0.189 ($p = 0.32$). Por género, solamente la edad media de inicio de los síntomas fue diferente, es evidente que los síntomas aparecen en edades más tempranas en los hombres que en las mujeres y en que los tiempos de progresión de la enfermedad son mayores en las mujeres que en los hombres (Tabla 5). En general, el IMF no difiere entre los niveles de expresión de disferlina en músculo ($p = 0.56$ Kruskal-Wallis) y el fenotipo clínico ($p = 0.15$ Kruskal-Wallis); de cualquier manera, es importante hacer notar que los casos con un decremento severo de la expresión de disferlina en músculo también tienen la media más baja de expresión en monocitos, con un IMF de 27.9 ± 9.3 , seguido de los casos no determinados, con una señal negativa, y aquellos con una expresión anormal de disferlina. De acuerdo al fenotipo clínico, el IMF más bajo se observó en pacientes con miopatía próximo-distal, seguido de aquellos con fenotipo anterior tibial, Miyoshi y fenotipo proximal (Tabla. 4).

No existen diferencias significativas observables entre las medias del IMF, edad, inicio de la enfermedad, fenotipo clínico y expresión de disferlina en músculo por género; de cualquier manera, en el caso del fenotipo proximal, el inicio de los síntomas en hombres fue de 4.7 años menor comparada con la media de inicio de síntomas en mujeres, los hombres tuvieron una edad de inicio de los síntomas de 12.3 ± 5.4 años, mientras que las mujeres presentaron una edad de inicio de 17.0 ± 1.4 años ($p = 0.14$ de acuerdo a la t de Student).

Tabla 4. Características de los pacientes de acuerdo al diagnóstico clínico y a la disferlina en músculo

	Diagnóstico clínico				<i>p</i> *
	LGMD2B	MM	Proximal-distal	DMAT	
	(<i>n</i> = 15)	(<i>n</i> = 10)	(<i>n</i> = 2)	(<i>n</i> = 2)	
Edad	28.4 (7.8)	25.4 (6.1)	26.0 (8.4)	16.0 (2.8)	0.15
Edad de inicio	14.1 (4.1)	15.8 (2.2)	15.5 (0.7)	11.5 (4.9)	0.51
Duración de la enfermedad	14.2 (5.9)	9.8 (5.5)	10.5 (7.7)	4.5 (2.1)	0.09
IMF	129.0 (203.1)	76.4 (46.8)	46.3 (0.9)	62.2 (26.5)	0.90

	Disferlina en músculo					<i>p</i> *
	Severa	Anormal	Negativa	ND	Normal	
	(<i>n</i> = 3)	(<i>n</i> = 11)	(<i>n</i> = 11)	(<i>n</i> = 3)	(<i>n</i> = 1)	
Edad	22.6 (9.2)	26.0 (6.6)	28.8 (8.6)	24.0 (5.2)	22.0	0.68
Edad de inicio	15.3 (2.5)	14.4 (4.1)	15.1 (3.2)	14.6 (0.5)	8.0	0.51
Duración de la enfermedad	7.6 (8.1)	11.5 (4.4)	13.6 (7.6)	9.3 (5.1)	14.0	0.69
IMF	27.9 (9.3)	115.2(130.9)	44.9(29.1)	65.2(58.1)	714.0	0.15

ND = No determinada, los números en paréntesis son la desviación estándar (SD),

Tabla 5. Punto de corte del IMF de disferlina para diferenciar pacientes de controles

Rango de IMF de disferlina	Pacientes	Controles	Total
6.86-139.0	24 (82.8%)	27 (14.8%)	51
139.1-931.0	5 (17.2%)	156 (85.2%)	161
Total	29	183	212

Sensibilidad y especificidad de la prueba.

El mejor punto de corte para el IMF de disferlina (generado por la curva ROC) fue de ≤ 139 unidades de fluorescencia con un área bajo la curva de 0.902 ± 0.04 con IC95% 0.81-0.98 ($p = 0.0001$) y un 82.8% de sensibilidad y un 85.2% de especificidad. El valor de predictibilidad positiva fue de $24/51 = 47\%$ (muy bajo) mientras que el valor de predictibilidad negativo fue de $156/161 = 96.8\%$ (muy alto). La precisión de la prueba fue de 84.9%. (Tabla. 5).

Cuando el análisis se hizo por género, se observó que para los hombres, el mejor punto de corte baja a 105.0 ± 0.06 con un área bajo la curva COR de 0.875 con IC95% 0.76-1.0 ($p = 0.0001$). Con tal punto de corte la sensibilidad de la prueba fue de 82.4% y la especificidad de 92.0%, el valor pronóstico positivo ascendió a 58.3% y el negativo a 97.4% con una exactitud de 90.8% y prevalencia de 11.9% (Tabla.6).

Para las mujeres el mejor punto de corte ascendió a 176.0, con un área bajo la curva COR de 0.940 ± 0.02 con IC95% 0.89-1.0 ($p = 0.0001$). En este grupo la sensibilidad de la prueba fue de 91.7%, especificidad de 79.3%, valor pronóstico positivo de 47.8%,

negativo de 97.8% con una exactitud de 81.4% y prevalencia de prueba de 17.1% (Tabla.7).

Tabla 6. Punto de corte de IMF de disferlina para diferenciar pacientes masculinos de controles masculinos y pacientes femeninos e controles femeninos.

	IMF	Pacientes	Controles	Total
Masculinos	6.86-105.0	14 (82.4%)	10 (8.0%)	24
	105.1-931.0	3 (17.6%)	115 (92.0%)	118
	Total	17	183	142
Femeninos	17.4-176	11 (91.7%)	12 (20.7%)	23
	176.1-897.0	1 (8.3%)	46 (79.3%)	47
	Total	12	58	70

Tabla 7. Tasa de similitud de IMF en diferentes puntos de corte para disferlina.

Puntos de corte para IMF	Grupo		Tasa de similitud
	Pacientes	Controles	
7.86–43.6	13 (46.5%)	2 (1.0%)	46.5
45.6–72.9	5 (17.9%)	3 (1.5%)	11.9
73.5–89.70	3 (10.7%)	7 (3.6%)	2.90
91.1–138.0	3 (10.7%)	19 (9.8%)	1.09
140–193.0	2 (7.1%)	25 (12.9%)	0.55
>193	3 (10.7%)	138 (71.2%)	0.10
Total	29 (100%)	194 (100%)	

En los análisis llevados a cabo, los diferentes puntos de corte para disferlina arrojaron una alta tasa de falsos positivos y falsos negativos (Tablas 5-7), por lo que una alternativa diferente para el análisis fue calcular las razones o tasas de similitud en diferentes puntos de corte. Este análisis permitió definir individuos en diferentes rangos dependiendo de sus niveles de IMF. Los individuos con sospechas de padecer una disferlinopatía que caen en el rango de IMF de 7.86 a 43, tienen 46.5 veces más probabilidad de ser pacientes que individuos normales; por otro lado los sujetos con un MFI > 193 tienen 10 veces más probabilidad de ser individuos normales (Tabla 7). Por lo tanto, se propuso un algoritmo de diagnóstico en el cual se crearon 4 grupos de clasificación de la enfermedad, basados en las tasas de similitud (Fig. 8). De acuerdo a este protocolo, encontramos que 21 pacientes con una fuerte sospecha basada en información clínica de padecer alguna disferlinopatía y por tener un IMF entre 7.89-89.7 se clasificarían como Grupo 1 y 2 (13 y 18 respectivamente), por lo que se debería ofrecer directamente una prueba de secuenciación de *DYSF* para la confirmación molecular de la enfermedad. De los 21 pacientes en este grupo, 15 presentaron LGMD2B, 2 DMAT, 10 MM, y 2 fenotipo próximo-distal. Para aquellos pacientes clasificados en el grupo 3 (6 pacientes) se debería ofrecer una reevaluación clínica, volver a medir los niveles de disferlina y dar seguimiento con pruebas moleculares. Los principales fenotipos en este grupo fueron MM y proximal. Aquellos en el grupo 4 (2 pacientes) presentaron menor probabilidad de padecer alguna disferlinopatía, ambos pacientes presentaron un fenotipo proximal, y uno de ellos un nivel de expresión normal de disferlina en músculo, por lo que ellos deberán someterse otro tipo de estudios para descartar algún subtipo de LGMD.

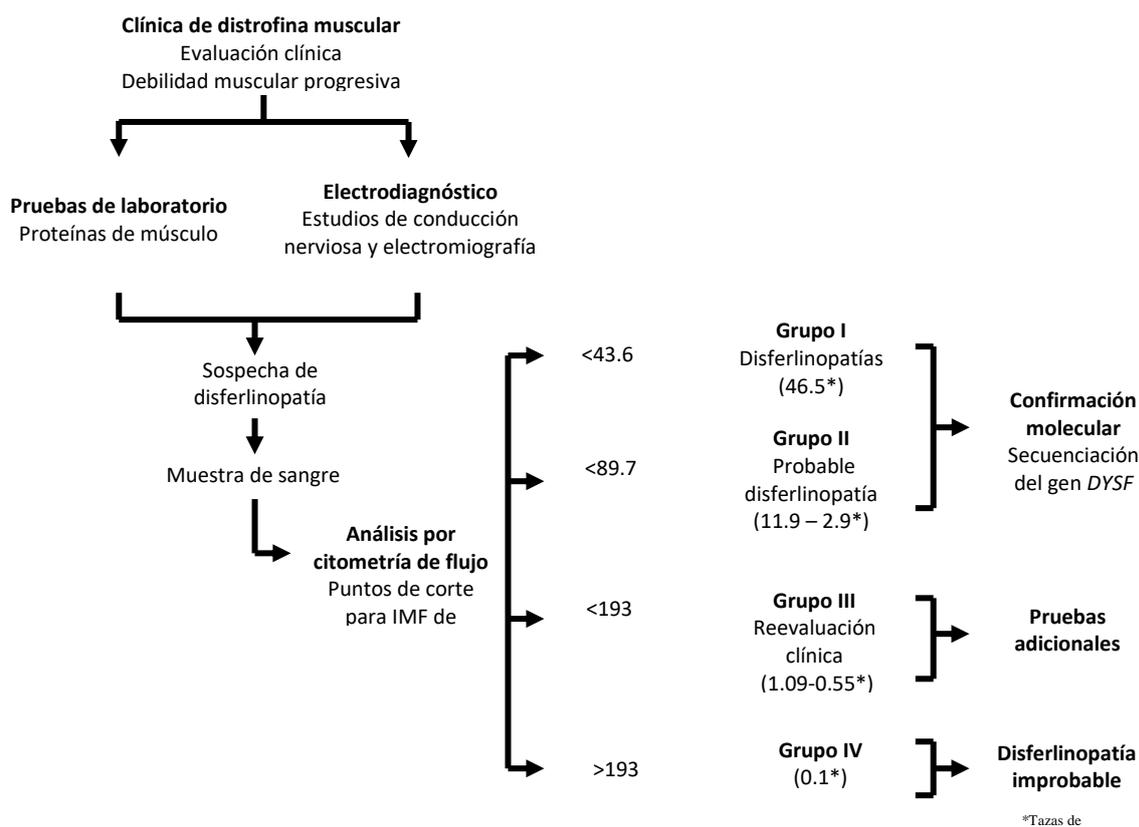


Figura 10. Propuesta para una clínica de diagnóstico. Aquí se muestra el algoritmo para el diagnóstico de las disferlinopatías que demuestra un gran rango de probabilidad diagnóstica que puede servir como una guía para clasificar a los individuos con sospecha de alguna disferlinopatías y para aplicar confirmación genética con el fin de poder distinguir casos de déficit primario y/o disminución secundaria en otras enfermedades neuromusculares.

Discusión

Los avances recientes en el conocimiento de las disferlinopatías, incluyendo el diagnóstico y el monitoreo de mutaciones y expresión de proteínas de interés a través del análisis de proteínas de monocitos de sangre periférica tanto por western blot como por citometría de flujo⁴⁵, ha permitido adoptar esta técnica para continuar el estudio de éstas enfermedades bajo el contexto de investigación biomédica. Esta es una poderosa herramienta pues nos permite saber los niveles de expresión de disferlina en músculo, objeto primario del diagnóstico actual, y comparar con la

información que nos otorgan los monocitos. En cuanto al papel de los monocitos deficientes de disferlina, aún se sabe poco acerca de su rol en la prognosis de la enfermedad, hay estudios que indican que además de la deficiencia de disferlina, existe una desregulación de proteínas de anclaje de matriz extra celular como la fibronectina y que esta deficiencia provoca un aumento tanto en la actividad fagocítica de los monocitos, como una disminución en la capacidad de adhesión⁴⁰. Esta observación es paradójica, pues se ha reportado que existe un aumento en la infiltración de monocitos en pacientes con disferlinopatías y una permanencia de monocitos que agravan la enfermedad secretando interleucinas y creando focos de inflamación persistentes⁴⁶. La implementación de la citometría de flujo en el diagnóstico de la enfermedad, sin duda nos aportará más información que permita entender de una manera más integral este grupo de enfermedades. Hoy en día, existen suficientes estudios y evidencia robusta para justificar su canalización hacia la implementación de nuevas herramientas para del diagnóstico primario como el trabajo piloto que se describió en este trabajo. La implementación del algoritmo de diagnóstico que se propone es un primer paso para el desarrollo e investigación de nuevas alternativas de diagnóstico en institutos de salud pública en México que resulten menos invasivas para los pacientes. A pesar de que no existe mucha información previa sobre los niveles de expresión de disferlina en monocitos con la cual comparar los resultados obtenidos, éstos son consistentes con un estudio de la regulación epigenética de la expresión de disferlina en monocitos CD14+ de sangre periférica de muestras de individuos sanos que se realizó en el hospital de Santa Creu i Sant Pau, Barcelona. En ese estudio se reporta que la expresión de disferlina es mayor en mujeres que en hombres, pero a diferencia de lo encontrado en este trabajo, no se

reportan diferencias de acuerdo a los grupos de edad⁴⁷. De una manera consecuente a lo previamente observado, reportamos que los síntomas de la enfermedad se manifiestan y desarrollan de manera diferente entre sexos, demostrando que en la mujeres aparece antes, y que además los niveles de disferlina no disminuyen tanto como en lo hombres. En este trabajo se reporta por primera vez, una diferencia significativa en el patrón de expresión de disferlina en monocitos CD14+ de sangre periférica de acuerdo a la edad, lo cual es interesante, puesto que entender cómo operan los mecanismos de regulación en la traducción del gen *DYSF* a lo largo del tiempo, abre una ventana de oportunidades para la investigación de las disferlinopatías y la terapia molecular. También existen evidencias que sugieren que la expresión de disferlina en monocitos puede ser regulada por factores epigenéticos como marcas específicas de metilación del gen, o por efectos de la vitamina D3¹⁰, que incrementa los niveles de expresión de disferlina tanto en monocitos como en músculo esquelético. Investigar la regulación del gen a nivel epigenético puede ser un campo de estudio para el desarrollo de terapias novedosas.

Adicionalmente a lo ya discutido, se reportan por primera vez los niveles cuantitativos de expresión de disferlina en monocitos CD14+ de sangre periférica de una muestra representativa de la población mexicana. A pesar de no haber obtenido una alta correlación estadística entre el IMF, la edad de los pacientes, la edad de inicio de los síntomas, el diagnóstico clínico y la inmunofluorescencia en músculo, el algoritmo basado en las tasas de similitud que se propone en este trabajo, es una primera aproximación para lograr la clasificación de los grupos pacientes con sospecha de disferlinopatía, con el fin de canalizar de manera adecuada a los pacientes que sufren

alguna condición muscular y de dar un mejor tratamiento y diagnosticar a los pacientes que no tienen conocimiento de su condición clínica.

Conclusión

1. Shieh, P. B. Muscular Dystrophies and Other Genetic Myopathies. *Neurol. Clin.* **31**, 1009–1029 (2013).
2. Chiò, A. & Lauria, G. Degenerative neuromuscular diseases: Crucial gene and cell machinery discoveries. *Lancet Neurol.* **15**, 12–13 (2016).
3. Kaplan, J. C. & Hamroun, D. The 2015 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul. Disord.* **24**, 1123–1153 (2014).
4. Emery, A. E. H. Muscular dystrophy into the new millennium. *Neuromuscul. Disord.* **12**, 343–349 (2002).
5. Schwartz, M., Hertz, J. M., Sveen, M. L. & Vissing, J. LGMD2I presenting with a characteristic Duchenne or Becker muscular dystrophy phenotype. *Neurology* **64**, 1635–1637 (2005).
6. Erazo-Torricelli, R. [Updates in muscular dystrophies]. *Rev. Neurol.* **39**, 860–71 (2004).
7. Gómez-Díaz, B. *et al.* Immunodetection analysis of muscular dystrophies in Mexico. *Muscle and Nerve* **45**, 338–345 (2012).
8. Oulhen, N., Onorato, T., Ramos, I. & Wessel, G. Dysferlin is essential for endocytosis in the sea star oocyte. *Dev. Biol.* **388**, 94–102 (2014).
9. Vincent, A. E. *et al.* Dysferlin mutations and mitochondrial dysfunction. *Neuromuscul. Disord.* **26**, 782–788 (2016).
10. Luna-angulo, A. B. *et al.* Diagnóstico molecular de enfermedades neuromusculares en el Instituto Nacional de Rehabilitación, situación actual y perspectivas. (2016).
11. Cacciottolo, M. *et al.* Reverse engineering gene network identifies new dysferlin-interacting proteins. *J. Biol. Chem.* **286**, 5404–5413 (2011).
12. Illarioshkin, S. N. *et al.* X-linked nonprogressive congenital cerebellar hypoplasia: Clinical description and mapping to chromosome Xq. *Ann. Neurol.* **40**, 75–83

- (1996).
13. Bushby, K. *et al.* A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat. Genet.* **20**, 37–42 (1998).
 14. Nowak, R. J., DiCapua, D. B., Zebardast, N. & Goldstein, J. M. Response of patients with refractory myasthenia gravis to rituximab: a retrospective study. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **4**, 259–266 (2011).
 15. MIYOSHI, K., KAWAI, H., IWASA, M., KUSAKA, K. & NISHINO, H. AUTOSOMAL RECESSIVE DISTAL MUSCULAR DYSTROPHY AS A NEW TYPE OF PROGRESSIVE MUSCULAR DYSTROPHY. *Brain* **109**, 31–54 (1986).
 16. Yamanouchi, Y. *et al.* Limb-girdle muscular dystrophy: clinical and pathologic reevaluation. *J. Neurol. Sci.* **129**, 15–20 (1995).
 17. Udd, B. *et al.* Tibial Muscular Dystrophy. *Arch. Neurol.* **50**, 604 (1993).
 18. Liu, J. *et al.* Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **20**, 31–36 (1998).
 19. Nguyen, K. *et al.* Dysferlin mutations in LGMD2B, Miyoshi myopathy, and atypical dysferlinopathies. *Hum. Mutat.* **26**, 165–165 (2005).
 20. Urtizbera, J. A. *et al.* Dysferlinopathies. *Neurol. India* **56**, 289–97 (2008).
 21. Matsuda, C. *et al.* Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy. *Neurology* **53**, 1119–22 (1999).
 22. Washington, N. L. & Ward, S. FER-1 regulates Ca²⁺-mediated membrane fusion during *C. elegans* spermatogenesis. *J. Cell Sci.* **119**, 2552–2562 (2006).
 23. Krajacic, P., Pistilli, E. E., Tanis, J. E., Khurana, T. S. & Lamitina, S. T. FER-1/Dysferlin promotes cholinergic signaling at the neuromuscular junction in *C. elegans* and mice. *Biol. Open* **2**, 1245–52 (2013).
 24. Britton, S. *et al.* The Third Human FER-1-like Protein Is Highly Similar to Dysferlin. *Genomics* **68**, 313–321 (2000).
 25. Bansal, D. *et al.* Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* **423**, 168–172 (2003).
 26. Selcen, D., Stilling, G. & Engel, A. G. The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurology* **56**, 1472–81 (2001).
 27. Sewry, C. A. Muscular dystrophies: an update on pathology and diagnosis. *Acta*

- Neuropathol.* **120**, 343–358 (2010).
28. Abdullah, N., Padmanarayana, M., Marty, N. J. & Johnson, C. P. Quantitation of the Calcium and Membrane Binding Properties of the C2 Domains of Dysferlin. *Biophys. J.* **106**, 382–389 (2014).
 29. Tordai, H., Nagy, A., Farkas, K., Bányai, L. & Patthy, L. Modules, multidomain proteins and organismic complexity. *FEBS J.* **272**, 5064–5078 (2005).
 30. Wang, D., Takeuchi, H., Gao, J., Zhang, Z. & Hirata, M. Hetero-oligomerization of C2 domains of phospholipase C-related but catalytically inactive protein and synaptotagmin-1. (2014). doi:10.1016/j.jbior.2014.09.001
 31. Lee, J. & Littleton, J. T. Transmembrane tethering of synaptotagmin to synaptic vesicles controls multiple modes of neurotransmitter release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 201420312 (2015).
 32. Davletov, B. A. & Südhof, T. C. A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca²⁺/phospholipid binding. *J. Biol. Chem.* **268**, 26386–90 (1993).
 33. Littleton, J. T., Stern, M., Perin, M. & Bellen, H. J. Calcium dependence of neurotransmitter release and rate of spontaneous vesicle fusions are altered in *Drosophila* synaptotagmin mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10888–92 (1994).
 34. Wang, J. *et al.* Calcium sensitive ring-like oligomers formed by synaptotagmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 13966–71 (2014).
 35. Lai, Y., Lou, X., Wang, C., Xia, T. & Tong, J. Synaptotagmin 1 and Ca²⁺ drive trans SNARE zippering. *Sci. Rep.* **4**, 4575 (2015).
 36. Therrien, C., Di Fulvio, S., Pickles, S. & Sinnreich, M. Characterization of Lipid Binding Specificities of Dysferlin C2 Domains Reveals Novel Interactions with Phosphoinositides[†]. *Biochemistry* **48**, 2377–2384 (2009).
 37. Chiu, Y.-H. *et al.* Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1976–1989 (2009).
 38. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656–61 (2010).
 39. Nagaraju, K. *et al.* Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B. *Am. J.*

- Pathol.* **172**, 774–85 (2008).
40. de Morree, A. *et al.* Dysferlin Regulates Cell Adhesion in Human Monocytes. *J. Biol. Chem.* **288**, 14147–14157 (2013).
 41. Han, R. *et al.* Dysferlin-mediated membrane repair protects the heart from stress-induced left ventricular injury. *J. Clin. Invest.* **117**, 1805–1813 (2007).
 42. Glover, L. & Brown, R. H. Dysferlin in Membrane Trafficking and Patch Repair. *Traffic* **8**, 785–794 (2007).
 43. Alberts, B. *et al.* *Molecular biology of the cell.* (Garland Science, 2002).
 44. Sewry, C. A. Immunocytochemical analysis of human muscular dystrophy. *Microsc. Res. Tech.* **48**, 142–154 (2000).
 45. Wein, N. *et al.* Immunolabelling and flow cytometry as new tools to explore dysferlinopathies. *Neuromuscul. Disord.* **20**, 57–60 (2010).
 46. Cohen, T. V *et al.* Upregulated IL-1 β in dysferlin-deficient muscle attenuates regeneration by blunting the response to pro-inflammatory macrophages. *Skelet. Muscle* **5**, 24 (2015).
 47. Gallardo, E. *et al.* Genetic and Epigenetic Determinants of Low Dysferlin Expression in Monocytes. *Hum. Mutat.* **35**, 990–997 (2014).

Se demostró que el ensayo de determinación del IMF de disferlina en monocitos por citometría de flujo, y la significancia del análisis estadístico, en conjunto pueden diferenciar con una precisión aceptable casos de disferlinopatías, de aquellos de individuos sanos, además de que se reportó por primera vez que existen diferencias en la expresión de disferlina tanto en controles sanos, como en pacientes, en función de la edad. Estos datos en conjunto nos permitieron definir grupos de similitud clínica e integrarlos en un posible algoritmo para el diagnóstico de este grupo de enfermedades.

Referencias

1. Shieh, P. B. Muscular Dystrophies and Other Genetic Myopathies. *Neurol. Clin.* **31**, 1009–1029 (2013).
2. Chiò, A. & Lauria, G. Degenerative neuromuscular diseases: Crucial gene and cell machinery discoveries. *Lancet Neurol.* **15**, 12–13 (2016).

3. Kaplan, J. C. & Hamroun, D. The 2015 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul. Disord.* **24**, 1123–1153 (2014).
4. Emery, A. E. H. Muscular dystrophy into the new millennium. *Neuromuscul. Disord.* **12**, 343–349 (2002).
5. Schwartz, M., Hertz, J. M., Sveen, M. L. & Vissing, J. LGMD2I presenting with a characteristic Duchenne or Becker muscular dystrophy phenotype. *Neurology* **64**, 1635–1637 (2005).
6. Erazo-Torricelli, R. [Updates in muscular dystrophies]. *Rev. Neurol.* **39**, 860–71 (2004).
7. Gómez-Díaz, B. *et al.* Immunodetection analysis of muscular dystrophies in Mexico. *Muscle and Nerve* **45**, 338–345 (2012).
8. Oulhen, N., Onorato, T., Ramos, I. & Wessel, G. Dysferlin is essential for endocytosis in the sea star oocyte. *Dev. Biol.* **388**, 94–102 (2014).
9. Vincent, A. E. *et al.* Dysferlin mutations and mitochondrial dysfunction. *Neuromuscul. Disord.* **26**, 782–788 (2016).
10. Luna-angulo, A. B. *et al.* Diagnóstico molecular de enfermedades neuromusculares en el Instituto Nacional de Rehabilitación, situación actual y perspectivas. (2016).
11. Cacciottolo, M. *et al.* Reverse engineering gene network identifies new dysferlin-interacting proteins. *J. Biol. Chem.* **286**, 5404–5413 (2011).
12. Illarioshkin, S. N. *et al.* X-linked nonprogressive congenital cerebellar hypoplasia: Clinical description and mapping to chromosome Xq. *Ann. Neurol.* **40**, 75–83 (1996).
13. Bushby, K. *et al.* A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *lifer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat. Genet.* **20**, 37–42 (1998).
14. Nowak, R. J., DiCapua, D. B., Zebardast, N. & Goldstein, J. M. Response of patients with refractory myasthenia gravis to rituximab: a retrospective study. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **4**, 259–266 (2011).
15. Miyoshi, K., Kawai, H., Iwasa, M., Kusaka, K. & Nishino, H. Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy.

- Brain* **109**, 31–54 (1986).
16. Yamanouchi, Y. *et al.* Limb-girdle muscular dystrophy: clinical and pathologic reevaluation. *J. Neurol. Sci.* **129**, 15–20 (1995).
 17. Udd, B. *et al.* Tibial Muscular Dystrophy. *Arch. Neurol.* **50**, 604 (1993).
 18. Liu, J. *et al.* Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **20**, 31–36 (1998).
 19. Nguyen, K. *et al.* Dysferlin mutations in LGMD2B, Miyoshi myopathy, and atypical dysferlinopathies. *Hum. Mutat.* **26**, 165–165 (2005).
 20. Urtizberea, J. A. *et al.* Dysferlinopathies. *Neurol. India* **56**, 289–97 (2008).
 21. Matsuda, C. *et al.* Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy. *Neurology* **53**, 1119–22 (1999).
 22. Washington, N. L. & Ward, S. FER-1 regulates Ca²⁺-mediated membrane fusion during *C. elegans* spermatogenesis. *J. Cell Sci.* **119**, 2552–2562 (2006).
 23. Krajacic, P., Pistilli, E. E., Tanis, J. E., Khurana, T. S. & Lamitina, S. T. FER-1/Dysferlin promotes cholinergic signaling at the neuromuscular junction in *C. elegans* and mice. *Biol. Open* **2**, 1245–52 (2013).
 24. Britton, S. *et al.* The Third Human FER-1-like Protein Is Highly Similar to Dysferlin. *Genomics* **68**, 313–321 (2000).
 25. Bansal, D. *et al.* Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* **423**, 168–172 (2003).
 26. Selcen, D., Stilling, G. & Engel, A. G. The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurology* **56**, 1472–81 (2001).
 27. Sewry, C. A. Muscular dystrophies: an update on pathology and diagnosis. *Acta Neuropathol.* **120**, 343–358 (2010).
 28. Abdullah, N., Padmanarayana, M., Marty, N. J. & Johnson, C. P. Quantitation of the Calcium and Membrane Binding Properties of the C2 Domains of Dysferlin. *Biophys. J.* **106**, 382–389 (2014).
 29. Tordai, H., Nagy, A., Farkas, K., Bányai, L. & Patthy, L. Modules, multidomain proteins and organismic complexity. *FEBS J.* **272**, 5064–5078 (2005).
 30. Wang, D., Takeuchi, H., Gao, J., Zhang, Z. & Hirata, M. Hetero-oligomerization of C2 domains of phospholipase C-related but catalytically inactive protein and synaptotagmin-1. (2014). doi:10.1016/j.jbior.2014.09.001

31. Lee, J. & Littleton, J. T. Transmembrane tethering of synaptotagmin to synaptic vesicles controls multiple modes of neurotransmitter release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 201420312 (2015).
32. Davletov, B. A. & Südhof, T. C. A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca²⁺/phospholipid binding. *J. Biol. Chem.* **268**, 26386–90 (1993).
33. Littleton, J. T., Stern, M., Perin, M. & Bellen, H. J. Calcium dependence of neurotransmitter release and rate of spontaneous vesicle fusions are altered in *Drosophila* synaptotagmin mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10888–92 (1994).
34. Wang, J. *et al.* Calcium sensitive ring-like oligomers formed by synaptotagmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 13966–71 (2014).
35. Lai, Y., Lou, X., Wang, C., Xia, T. & Tong, J. Synaptotagmin 1 and Ca²⁺ drive trans SNARE zipper. *Sci. Rep.* **4**, 4575 (2015).
36. Therrien, C., Di Fulvio, S., Pickles, S. & Sinnreich, M. Characterization of Lipid Binding Specificities of Dysferlin C2 Domains Reveals Novel Interactions with Phosphoinositides[†]. *Biochemistry* **48**, 2377–2384 (2009).
37. Chiu, Y.-H. *et al.* Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1976–1989 (2009).
38. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656–61 (2010).
39. Nagaraju, K. *et al.* Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B. *Am. J. Pathol.* **172**, 774–85 (2008).
40. de Morree, A. *et al.* Dysferlin Regulates Cell Adhesion in Human Monocytes. *J. Biol. Chem.* **288**, 14147–14157 (2013).
41. Han, R. *et al.* Dysferlin-mediated membrane repair protects the heart from stress-induced left ventricular injury. *J. Clin. Invest.* **117**, 1805–1813 (2007).
42. Glover, L. & Brown, R. H. Dysferlin in Membrane Trafficking and Patch Repair. *Traffic* **8**, 785–794 (2007).
43. Alberts, B. *et al.* *Molecular biology of the cell.* (Garland Science, 2002).
44. Sewry, C. A. Immunocytochemical analysis of human muscular dystrophy.

- Microsc. Res. Tech.* **48**, 142–154 (2000).
45. Wein, N. *et al.* Immunolabelling and flow cytometry as new tools to explore dysferlinopathies. *Neuromuscul. Disord.* **20**, 57–60 (2010).
 46. Cohen, T. V *et al.* Upregulated IL-1 β in dysferlin-deficient muscle attenuates regeneration by blunting the response to pro-inflammatory macrophages. *Skelet. Muscle* **5**, 24 (2015).
 47. Gallardo, E. *et al.* Genetic and Epigenetic Determinants of Low Dysferlin Expression in Monocytes. *Hum. Mutat.* **35**, 990–997 (2014).