



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**IDENTIFICACIÓN DE TRASTORNOS RELACIONADOS AL GEN *FKRP* EN
PACIENTES MEXICANOS CON ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES DE
ETIOLOGÍA NO ESTABLECIDA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

NAVARRO COBOS MARÍA JOSÉ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA OTIGOZA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR, INP.

COMITÉ TUTOR:

DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

CD. MX., OCTUBRE 2017.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**IDENTIFICACIÓN DE TRASTORNOS RELACIONADOS AL GEN *FKRP* EN
PACIENTES MEXICANOS CON ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES DE
ETIOLOGÍA NO ESTABLECIDA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

NAVARRO COBOS MARÍA JOSÉ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA OTIGOZA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR, INP.

COMITÉ TUTOR:

DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

MÉXICO, CD. MX., OCTUBRE 2017.


Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina de Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de agosto de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **NAVARRO COBOS MARÍA JOSÉ** con número de cuenta **510210573**, con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DE TRASTORNOS RELACIONADOS AL GEN FKRP EN PACIENTES MEXICANOS CON ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES DE ETIOLOGÍA NO ESTABLECIDA"**, realizada bajo la dirección del **DR. MIGUEL ÁNGEL ALCÁNTARA ORTIGOZA**:

Presidente: DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUÍZ
Vocal: DRA. ANGÉLICA GONZALEZ OLIVER
Secretario: DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
Suplente: DR. JAIME BERUMEN CAMPOS
Suplente: DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 13 de septiembre de 2017


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Primeramente, agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la oportunidad de realizar la Maestría y el apoyo brindado en todos los aspectos.

También agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante la realización del posgrado, así como a los fondos federales del Instituto Nacional de Pediatría ('Recursos Fiscales del Programa E0220' Modalidad A y B, Ciudad de México, México).

Finalmente, a los miembros de mi comité Tutorial por sus valiosos comentarios y apoyo para la correcta realización de este trabajo de investigación.

Agradecimientos Personales

Agradezco profundamente a la Dra. Ariadna González y al Dr. Miguel Ángel Alcántara por su invaluable apoyo antes, durante y después de la maestría, aprendí muchísimo de ustedes tanto profesional como personalmente,

Al gran equipo que hizo posible el desarrollo de este proyecto: Dra. Bernadette Estandia, Dra. Cesárea Bermúdez, Dra. Adriana Ruíz, Dr. Arturo Carlos II Becerra, Dra. Guadalupe Vargas, ya que cada uno contribuyó de manera valiosa para poder finalizar este trabajo,

A la M. en C Nancy Hernández, Dra. Miriam Reyna, Dr. José Velázquez, parte del laboratorio de biología molecular del INP, por compartirme un poco de su conocimiento cuando lo necesite durante estos 2 años.

Dedicatoria

A las 5 personas que más amo en este mundo:

A mi mamá, no tengo palabras para describir lo que significa en mi vida, gracias por todo tu apoyo, tu amor incondicional y las palabras exactas para darme el soporte que he necesitado,

A mi papá, por ser el mejor papá del mundo, la persona a quien más admiro y mi modelo de vida a seguir,

A Andrea, por simplemente estar en mi vida y hacerla mejor, por ser mi apoyo durante estos dos años, sin tu ayuda esto no hubiera sido posible,

A mamá Yaya, donde quiera que estés siempre serás parte de mi corazón,

A mamá Cuquita, por tus palabras y horas de plática y consejos, tus cálidos abrazos y tu amor infinito.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Objetivos	6
Metodología	7
Resultados	10
Discusión	13
Conclusiones	18
Literatura citada	19
Anexo 1: Tablas	22
Anexo 2: Figuras	28
Anexo 3: Galeras del artículo	35

Resumen

Las distrofias musculares de cinturas (LGMD) son un grupo clínica y genéticamente heterogéneo de trastornos neuromusculares. La LGMD2I (MIM #607155) y otras entidades alélicas, se atribuyen a variantes patogénicas en *FKRP* (19q13.32, MIM *606596) que conducen a un defecto de la *O*-glicosilación del α -distroglicano. Clínicamente se superpone con las distrofinopatías (DMD/B) y variantes patogénicas en este gen, se han identificado hasta en un 12% de los casos con estudio molecular negativo a delecciones/duplicaciones en el gen *DMD*. En nuestro país, a pesar de que la frecuencia de portadores de la variante patogénica común en población europea p.(Leu276Ile) en individuos de ascendencia mexicana es de 1/64, no existen reportes de pacientes con LGMD2I, ni de los genotipos *FKRP* condicionantes y además se desconoce la frecuencia de la LGMD2I en pacientes con trastornos neuromusculares de etiología no establecida (**TNMENE**), situación que sólo podría ser confirmada por el estudio molecular del gen *FKRP*. Se incluyeron 60 pacientes pediátricos no relacionados con **TNMENE** para el análisis por secuenciación automatizada tipo Sanger del único exón codificante del gen *FKRP*, con estudio molecular negativo para delecciones en 22 exones del gen *DMD* (Xp21.2-p21.1, MIM *300377, n=55/60), y/o estudio normal de amplificación múltiple de sondas ligadas (MLPA) para 80 exones del gen *DMD* (n=25/60). En 5 pacientes (2 hombres y 3 mujeres) se analizó directamente el gen *FKRP*, ya que el cuadro clínico era sugestivo de LGMD. Se describen las características clínicas y la correlación genotipo-fenotipo de 2 casos en quienes se identificaron genotipos *FKRP* para dos variantes patogénicas previamente descritas: p.[Leu276Ile];[Asn463Asp] y p.[Asn463Asp];[Asn463Asp]. Los resultados indican que los trastornos relacionados a *FKRP* son responsables de al menos el 3.3% (2/60) de los pacientes catalogados con DMD/B o **TNMENE**. Se identificaron además dos pacientes heterocigotos para variantes de significado clínico incierto: c.427C>A o p.(Arg143Ser) (rs148206382) y c.143G>C o p.(Arg48Pro) (novel), ausentes en más de 100 controles sanos étnicamente relacionados. Este es el primer estudio en el país que indaga la frecuencia de los trastornos relacionados al gen *FKRP* en pacientes con clínica de DMD/B o **TNMENE**. La frecuencia identificada de estos trastornos justificaría su inclusión en el diagnóstico diferencial en pacientes con fenotipo similar a DMD/B o **TNMENE** y estudio molecular normal del gen *DMD*.

Abstract

The limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) are a clinically and genetically heterogeneous group of neuromuscular diseases. The LGMD2I (MIM#6077155) and other allelic entities are attributed to pathogenic variants in *FKRP* gene (19q13.32, MIM *606596) leading to an *O*-glycosylation defect of α -dystroglycan. Clinically they have an overlap with the dystrophinopathies, so that the LGMD2I has been identified in up to 12% of cases with negative molecular study to mutations in the *DMD* gene. In our country, although the frequency of carriers of the common pathogenic variant in European population p.(Leu276Ile) in individuals of Mexican ancestry is 1/64, there are no reports of patients with LGMD2I, nor of the conditioning *FKRP* genotypes and additionally the frequency of LGMD2I in patients with Neuromuscular Disorders of Unknown Etiology (NDUE) is unknown, a situation that could only be confirmed by the molecular study of the *FKRP* gene. It was included 60 non-related pediatric patients with NDUE, for the Sanger-type automated sequencing analysis of the unique coding exon of the *FKRP* gene, these patients had negative molecular study for deletions in 22 exons of the *DMD* gene (Xp21.2-p21.1, MIM *300377, n=55/60), and/or normal MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) for 80 exons of the *DMD* gene (n=25/60). In five patients (2 men and 3 women), the *FKRP* gene was analyzed directly since the clinical phenotype was suggestive of LGMD. We describe the clinical characteristics and genotype-phenotype correlation of 2 cases in which *FKRP* genotypes were identified for two pathogenic variants previously described: p.[Leu276Ile];[Asn463Asp] and p.[Asn463Asp];[Asn463Asp]. Results indicate that *FKRP*-related disorders are responsible for at least 3.3% (2/60) of patients classified as DMD/B or NDUE. It was also identified two heterozygous patients for variants of uncertain clinical significance: c.427C>A o p.(Arg143Ser) (rs148206382) and c.143G>C o p.(Arg48Pro) (novel), absent in over 100 ethnically related healthy controls. This is the first study in our country that investigates the frequency of *FKRP*-related disorders in patients with clinical picture of DMD/B or NDUE. The identified frequency of these disorders would justify their inclusion in the differential diagnosis in patients with a phenotype similar to DMD/B or NDUE and a normal molecular study of *DMD* gene.

Introducción

El término distrofia muscular se refiere a un grupo de enfermedades genéticas que causan degeneración progresiva del músculo esquelético, las distrofias musculares de cinturas (LGMD, del inglés "*limb girdle muscular dystrophies*") son un grupo heterogéneo de trastornos musculares monogénicos y progresivos con involucro primario o predominante de la musculatura pélvica y/o escapular.¹ Actualmente hay identificados 31 loci responsables, 8 de ellos condicionantes de formas autosómicas dominantes y 23 de formas autosómicas recesivas (**Tabla 1**).² El algoritmo sugerido para el diagnóstico de las LGMD requiere una valoración neuromuscular interdisciplinaria que incluya una historia clínica completa, interrogatorio de antecedentes familiares, evaluación neuromuscular e histopatológica/inmunohistoquímica de la biopsia muscular, así como medición de enzimas séricas musculares (creatinín-fosfoquinasa o CK, aldolasa, lactato deshidrogenasa, transaminasas, entre otras), electromiografía y en ocasiones, se sugieren estudios de imagen muscular mediante resonancia magnética nuclear (RMN) o ultrasonografía para que con base en los patrones de afección muscular identificados, se decida el estudio molecular del gen más probablemente involucrado.³

Entre las formas autosómicas recesivas que representan la mayoría de las LGMD, se encuentran las que condicionan alteraciones en la *O*-glicosilación post-traduccional del α -dístroglicano.^{4,5} Este tipo de alteración disminuye su habilidad para unirse a diversos ligandos extracelulares incluida la cadena α 2-laminina (o merosina α -2), lo que caracteriza a un subgrupo de enfermedades neuromusculares colectivamente llamadas "dístroglicanopatías".^{6,7,8,9} Dentro de este subgrupo, se encuentran los defectos de *O*-glicosilación debido a la deficiencia de la proteína relacionada a fukutina (FKRP) condicionada a su vez por variantes amorfas/hipomorfas en el gen *FKRP* (OMIM *606596), el cual se organiza en 4 exones (los 3 primeros no codificantes) distribuidos en 12 kb de 19q13.32.^{1,2,6,7,10} Este gen se identificó a través de la homología con el gen codificante de la fukutina^{1,3} que causa la distrofia muscular tipo Fukuyama (FMD, OMIM #253800).^{2,10} La *FKRP* mediante el análisis *in silico* de su secuencia,^{1,4,10,11,12,13,14} se consideró una glucosiltransferasa putativa localizada en el aparato de Golgi^{6,7} y que junto con la proteína fukutina llevan a cabo la adición de un residuo en tándem de ribitol-5-fosfato como modificación post-traduccional al α -dístroglicano (**Figura 1**).⁷ Los pacientes con deficiencia de la proteína *FKRP* presentan una reducción de leve a severa en la cantidad a nivel de inmunohistoquímica o en el peso molecular en la inmunotransferencia (Western blot) del α -dístroglicano, y el grado de severidad de dicha reducción puede correlacionar con el tipo de variantes patogénicas (amorfas/hipomorfas) documentadas en el gen *FKRP* y el fenotipo resultante.¹⁷ La confirmación de un trastorno relacionado al gen *FKRP* en

pacientes con alteraciones en el α -dístroglicano a nivel muscular deben confirmarse por análisis molecular.^{15,16}

El espectro clínico por variantes patogénicas en *FKRP* va desde formas congénitas caracterizadas por anomalías en músculo-ojo-cerebro (MIM#613153) con o sin discapacidad intelectual (MIM#606612) hasta distrofias musculares de presentación desde la infancia hasta la adultez (MIM#607155; LGMD2I o distrofia muscular de cinturas por distroglicanopatía tipo C, 5 o MDDGC5), sin embargo, la amplia expresividad de los trastornos relacionados a *FKRP*, incluyen también pacientes asintomáticos en los cuales sólo se llega a documentar la elevación de CK.¹ La LGMD2I de inicio temprano y curso severo se sobrelapa clínicamente con las distrofinopatías (similar a los fenotipos Duchenne/Becker), ya que los pacientes presentan debilidad muscular pélvica proximal con signo de Gower's, pseudohipertrofia de gastrocnemios (hasta en el 76% de los casos),^{7,14,17} pérdida de deambulación en la segunda a tercera década de vida,^{11,18} elevación persistente de CK sérica (>10-20X),^{1,2,3,13,14,19} involucro cardíaco (cardiomiopatía dilatada presente en el 30-50% de los casos)^{2,3,11,13,14} e insuficiencia respiratoria restrictiva (aproximadamente en el 65%).^{3,10,13,14,18} A la fecha, no se ha definido un patrón electromiográfico característico y la velocidad de conducción nerviosa en algunos casos se ha reportado normal.¹¹ La biopsia muscular en estos pacientes revela cambios distróficos, infiltrado inflamatorio y reducción de inmunomarcaje para laminina $\alpha 2$ con disminución variable de α -dístroglicano, pero con un patrón inmunohistoquímico normal para β -dístroglicano.^{2,3,11,17} La evaluación inmunohistoquímica para distrofina se ha reportado normal, disminuida o irregular, lo cual contribuye a la dificultad diagnóstica para su diferenciación con las distrofinopatías.^{1,13} De hecho, pacientes con distrofinopatías fueron identificados en un ~4% (4/103) de pacientes daneses que cumplían criterios diagnósticos para LGMD2,¹⁸ e interesantemente, mediante el estudio molecular del gen *FKRP* se identificaron pacientes con LGMD2I en el ~13% (13/102) de casos únicos masculinos con fenotipo de distrofia muscular Duchenne o Becker en quienes no se identificó delección o duplicación en el gen *DMD* mediante Southern blot.¹³ Lo anterior, pone de manifiesto la dificultad para la identificación certera de pacientes con LGMD2I sólo basado en datos clínicos, de laboratorio y/o de gabinete.

Se estima que la LGMD2I representa al menos 10% de todas las LGMD² y ésta fue descrita por primera vez en una familia consanguínea de Túnez.¹ Acorde a la distribución de las frecuencias alélicas para variantes patogénicas del gen *FKRP*, la frecuencia de LGMD2I varía entre poblaciones; así, entre la población caucásica se aprecia la frecuencia más alta a nivel mundial (38.4% en pacientes daneses clasificados como LGMD2)¹⁹ y en cambio, en poblaciones asiáticas existen sólo 12 pacientes reportados a la fecha.²⁰ Los genotipos en *FKRP* responsables en diversos grupos étnicos se relacionan a las frecuencias

alélicas prevalentes que parecen estar influenciadas por efecto de fundador, deriva génica, y/o posibles efectos de ventaja selectiva. Así la variante p.(Leu276Ile) [rs28937900] es común en individuos europeos,^{21,22,23} con una frecuencia alélica (FA) en la base Exome Aggregation Consortium (ExAC, <http://exac.broadinstitute.org/>) >1%, en la base dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) de 0.2% y en el Proyecto de los 1000 genomas (<http://www.internationalgenome.org/>) de 0.8%; mientras que para la variante p.(Tyr182Cys) [rs543163491] en población asiática²⁰ se reporta una FA de 0.3% en ExAC y dbSNP y de 0.06% en el Proyecto de los 1000 genomas.

Con excepción de Brasil,¹ en México y otros países latinoamericanos, no existen reportes de mutaciones en el gen *FKRP* identificadas en pacientes con distrofia muscular en estudio o con un trastorno neuromuscular de causa no establecida (**TNMENE**), a pesar de que el Instituto Nacional de Pediatría (INP) se considera un centro de referencia para el diagnóstico y manejo de trastornos neuromusculares. Si bien, existe un estudio que evaluó biopsias musculares, mediante inmunohistoquímica con un panel de 18 anticuerpos, provenientes de 290 pacientes mexicanos con diagnóstico clínico de distrofia muscular, en el cual se documentó que después de las distrofinopatías (52%), la segunda distrofia muscular más frecuente es la disferlinopatía (18%), en este estudio no se evaluaron las α -dístroglicanopatías.²⁴

Por lo anterior, consideramos importante el conocer en nuestra población la frecuencia de pacientes con variantes patogénicas en el gen *FKRP* y un aparente cuadro de distrofinopatía y estudio molecular del gen *DMD* negativo a deleciones o aquellos catalogados como un **TNMENE**, además de realizar la correlación genotipo-fenotipo y describir el espectro mutacional encontrado, ya que el Instituto Nacional de Pediatría analiza los trastornos neuromusculares y en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética Humana se tienen captadas más de 350 familias con diagnóstico presuntivo de DMD/B de los cuales en sólo el 50% se ha confirmado el diagnóstico de una distrofinopatía subyacente, por lo que existe la posibilidad diagnóstica de un trastorno relacionado a *FKRP* en pacientes con un estudio molecular negativo para distrofinopatía, además de que en nuestra institución no se evalúa de manera rutinaria a las α -dístroglicanopatías en biopsias musculares de pacientes con **TNMENE**.

Objetivos

General:

1. Determinar la frecuencia de variantes patogénicas en el gen *FKRP* en pacientes pediátricos catalogados con un aparente cuadro de distrofinopatía y estudio molecular del gen *DMD* negativo a deleciones o un **TNMENE**.

Particulares:

1. Determinar el tipo y la frecuencia de variantes patogénicas del gen *FKRP* en pacientes pediátricos con un aparente cuadro de distrofinopatía y estudio molecular del gen *DMD* negativo a deleciones o un **TNMENE** que acuden al Instituto Nacional de Pediatría.
2. Relacionar el fenotipo con el genotipo de *FKRP* documentado.
3. Comparar la frecuencia de variantes patogénicas en el gen *FKRP* encontrada en nuestra población de estudio con la frecuencia documentada en estudios realizados en otras poblaciones bajo criterios de inclusión similares.

Secundarios:

1. Identificar individuos portadores en las familias de los casos índices afectados de trastornos relacionados a *FKRP* atribuibles a mutaciones en el gen *FKRP*.
2. Brindar asesoramiento genético y ofrecer diagnóstico prenatal molecular a las familias en quienes se identifiquen mutaciones patogénicas en el gen *FKRP* condicionantes de trastornos relacionados a *FKRP*.

Metodología

La población de estudio consistió en pacientes en etapa pediátrica que acudieron al Instituto Nacional de Pediatría en quienes los servicios de Genética y/o Neurología Pediátrica emitieron un diagnóstico presuntivo de distrofinopatía (DMD/B), una distrofia muscular de cinturas (LGMD) o un **TNMENE** con base en datos clínicos, de laboratorio, gabinete e histopatológicos y que acudieron en el periodo comprendido del mes de septiembre del 2014 hasta el mes de febrero del 2016, así como pacientes en etapa pediátrica con trastornos neuromusculares con muestra de DNA genómico disponible en el Laboratorio de Biología Molecular del INP, que fueron captados durante el periodo comprendido del año de 1992 hasta el año de 2014 y que tenían un resultado negativo en el estudio molecular de deleciones parciales intragénicas del gen *DMD*. A los familiares de primer grado de casos afectados donde se identifique un genotipo patogénico en el gen *FKRP* con previo asesoramiento genético, se les invitó a participar también en el presente estudio.

Mediante la revisión de expedientes y/o registro interno del propio laboratorio se incluyeron 55 casos masculinos con los siguientes criterios de inclusión:

- a) Ausencia de deleciones en 22 exones representativos de los “hot-spots” del gen *DMD* (Dp427m exones 1, 3, 6, 8, 12, 13, 16, 17, 19, 43 al 45, 47 al 55 y 60; NM_004006.2)²⁵ por PCR múltiple (PCRm); de éstos, 25 pacientes también contaron con estudio normal de amplificación de sondas múltiples dependiente de ligamiento (MLPA, por sus siglas en inglés) para los 80 exones del gen *DMD* (SALSA MLPA® P034 DMD mix 1 probemix y P035 DMD mix 2 probemix, MRC-Holland Amsterdam, The Netherlands).
- b) Sin datos en la genealogía que sugieran un trastorno neuromuscular ligado al cromosoma X.
- c) Biopsia muscular con hallazgos de cambios distróficos y, en caso de estar disponible, inmunohistoquímica normal o parcial para distrofina.
- d) Cantidad suficiente de DNA genómico para realizar el estudio molecular del gen *FKRP*.

Se excluyeron a:

- a) Pacientes con datos en la genealogía sugestiva de un trastorno neuromuscular ligado al cromosoma X.
- b) Temporalmente: pacientes transfundidos en un periodo menor a tres meses.
- c) Pacientes en donde la obtención de la muestra de DNA genómico a partir de sangre periférica o cuya muestra de DNA bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular, fuera inadecuada y no acepten una segunda toma de muestra.

De manera adicional se incluyeron 5 casos clínicos clasificados como un **TNMENE** (2 masculinos y 3 femeninos) que presentaron debilidad muscular proximal (n=4), hiperCKemia (562-3,150UI/L, n=3), electromiografía (EMG) con patrón miopático (n=3), cambios distróficos en biopsia muscular (n=1) y/o inmunohistoquímica para distrofina positiva (n=1). En estos pacientes no se llevó a cabo el estudio de PCRm ni MLPA para el gen *DMD*.

Este trabajo de investigación fue aprobado por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad de nuestro instituto con número de registro 056/2014.

Se realizó el estudio molecular del gen *FKRP* mediante amplificación por PCR punto final de la secuencia codificante ubicada en el exón 4 (NM_001039885.2) del gen *FKRP* (nucleótidos c.1 a c.1488), así como el borde intrón 3-exón 4 y una porción de la región 5'-UTR y 3' UTR usando los primers (forward 5'-GCTGAAACCAATAGGGAAAAGAAA-3' y reverse 5'-ATAAATCTGGAGGTCGCTTCCC-3') diseñados para generar un amplicón de 1.85kb.

Los amplicones se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y purificación enzimática (ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup, Affymetrix, Inc.). Posteriormente se realizó secuenciación automatizada bidireccional tipo Sanger con 6 primers internos: A forward (5'-AGGGGGTGGTTCTGACAATC-3'), A reverse (5'-TACTAGGGCCACAACTCGG-3'), B forward (5'-GGAGTTCGAGGCATTTGACA-3'), B reverse (5'-CTCCTCGTAGAGGTAGGCG-3'), C forward (5'-TGCTGGACTTGACCTTCGC-3'), D reverse (5'-AAATCTGGAGGTCGCTTCCC-3') y subsecuente alineación con las secuencias de referencia del gen *FKRP* (NM_001039885.2 y NG_008898.2) con los programas Chromas Pro Versión 1.7.7 y Codon Code Aligner Versión 6.0.2.

Las variantes puntuales de sentido erróneo, sin registro en las principales bases de datos (dbSNP/ExAC/Exome Variant Server) o de significancia incierta, se sometieron a análisis *in silico* por los programas Poplyphen, SIFT y Mutation Taster. Adicionalmente, se buscaron en un mínimo de 100 controles sanos étnicamente relacionados, por PCR-ARMS (sistema de mutación refractario a la amplificación) con primers diseñados con el programa BatchPrimer 3v1.0 (**Tabla 2**).

Las variantes *novel* o de significancia incierta fueron valoradas para determinar su patogenicidad o benignidad de acuerdo a las guías para interpretación de variantes publicadas por el American College of Medical Genetics and Genomics and the Association of Molecular Pathology.²⁶ Adicionalmente, se realizó modelaje *in silico* de las proteínas

para predicción de los efectos estructurales de los cambios identificados, dado que la estructura precisa tridimensional de la proteína FKRP aún no se conoce, mediante el análisis de la secuencia de la proteína FKRP (NP_001034974.1) en el programa Phyre2 se escogieron los moldes de mayor porcentaje de identidad (confianza >95) (**Figura 8**).

Finalmente, en un paciente con datos clínicos muy sugestivos de distrofia muscular de Becker (DMB) pero con resultado de PCRm normal y para determinar la significancia clínica de una variante novel de sentido erróneo en *FKRP*, se realizó posteriormente análisis por MLPA del gen *DMD*.

Resultados

Se identificaron 2 casos masculinos (2/60, ~3.3%) con genotipos diagnósticos de un trastorno relacionado a *FKRP* en estado heterocigoto compuesto (paciente 1) y homocigoto (paciente 2); adicionalmente se identificaron 2 casos (pacientes 3 y 4) heterocigotos para una sola variante catalogada como de significado clínico incierto y ausentes en 100 controles sanos étnicamente relacionados mediante la técnica de PCR-ARMS.

En la **tabla 3** se resumen las características clínicas, genóticas, de laboratorio y de gabinete del paciente 1 (**Figuras 2 y 3**), masculino de 10 años de edad, producto de la gesta 6/6, padres no consanguíneos, 3 hermanas sanas y una hermana con edad actual de 20 años y con debilidad muscular (**Tabla 3 y figura 4**). El paciente comenzó el abordaje diagnóstico por presentar un cuadro clínico altamente sugestivo de distrofia muscular de Duchenne (DMD) basado en debilidad muscular de predominio proximal y pélvico, con caídas frecuentes desde los 6 años. Los hitos del desarrollo se refirieron como normales, con excepción del inicio de la deambulación al año 2 meses de edad con caídas frecuentes. A la exploración física se observó peso, talla y perímetro cefálico normales, tórax con *pectus excavatum*, dorso con escápulas discretamente aladas, ligero aumento en el volumen y consistencia de los músculos gastrocnemios, signo de Gowers positivo, disminución del reflejo del tendón de Aquiles y marcha basculante. Una valoración cardiológica refiere regurgitación mitral y tricúspidea leve. La imagen por RMN reveló involucro bilateral simétrico muscular pélvico y de los grupos musculares del muslo posterior, con infiltración adiposa demostrada por hiperintensidad en glúteo mayor, aductor mayor y vasto lateral, músculo grácil, aductor largo del muslo y sartorio (**Figura 5**), situación compatible con lo previamente descrito en la LGMD2I.²⁷

Posterior a obtener un resultado normal de PCRm para el gen *DMD* en el paciente 1, el análisis del gen *FKRP* identificó un genotipo heterocigoto compuesto diagnóstico de LGMD2I: c.[826C>A];[1387A>G] o p.[Leu276Ile];[Asn463Asp] por lo que se extendió el estudio molecular dirigido (secuenciación automatizada tipo Sanger) para ambas variantes en los padres y las hermanas (**Figura 4**). Se determinó el estado de portadores en ambos padres y 3 hermanas, mientras que la hermana con debilidad muscular presentó el mismo genotipo heterocigoto compuesto diagnóstico de LGMD2I observado en el caso índice (**Figura 4**). A nivel clínico, en ella se refiere una edad de presentación más tardía respecto a su hermano afectado (12 años vs. 6 años) y con leve debilidad muscular proximal.

El paciente 2 tuvo seguimiento en el INP de los 6 meses a los 11 años de edad (**Tabla 4 y figura 6**). Cuenta con el antecedente de padres provenientes de una población

endogámica del estado de México producto de la gesta 1/1, con desarrollo psicomotor normal hasta los 6 meses, cuando se observó hipotonía y retraso motor. Inició deambulación a los 14 meses, pero ésta la perdió a la edad de 24 meses. La última exploración física a los 11 años, reveló peso y talla bajos, debilidad e hipotrofia muscular generalizada, ausencia de reflejos osteotendinosos y la radiografía de tórax reportó escoliosis. La medición de CK resultó elevada, la electromiografía con patrón miopático y la biopsia muscular se reportó sólo con cambios distróficos. Debido a estos datos de laboratorio y de gabinete se solicitó PCRm para la identificación de deleciones de 22 exones y MLPA para 80 exones del gen *DMD*, los cuales se reportaron normales. El análisis del gen *FKRP* en el paciente 2 reveló un genotipo homocigoto para la variante c.1387A>G o p.(Asn463Asp) previamente reportado como un genotipo patogénico severo.²⁸ El estudio molecular dirigido en su madre confirmó el estado de portadora obligada para dicha variante (**Figura 6**). No se contó con la disponibilidad de las muestras de DNA genómico para estudio de *FKRP* de otros familiares de primer grado.

Referente a los dos pacientes con la identificación de una sola variante, el paciente 3 (**Tabla 5 y figura 7**) no cuenta con antecedentes familiares de importancia, sin embargo presentó un cuadro clínico caracterizado por hipotonía desde el mes de edad, estudios de laboratorio y de gabinete con elevación de CK, biopsia muscular con cambios distróficos, electromiografía con patrón miopático y estudio para deleciones de 22 exones por PCRm y MLPA para 80 exones del gen *DMD* los cuales se reportaron normales. El paciente falleció a los 4 meses con los diagnósticos de sepsis, insuficiencia respiratoria y cardiaca derecha. El análisis molecular del gen *FKRP* mostró el genotipo heterocigoto para una variante previamente descrita como de significado incierto: c.[427C>A];[=] o p.[Arg143Ser];[=] (rs148206382).^{12,30,31}

El paciente 4 (**Tabla 6 y figura 8**) inició con debilidad muscular proximal a los 6 años con pérdida de la deambulación a los 24 años, a la exploración física con lordosis lumbar acentuada, pseudohipertrofia de gastrocnemios, reflejos osteotendinosos ausentes, hiperCKemia (se desconocen valores) y una biopsia muscular con cambios distróficos. Presentaba además un patrón respiratorio obstructivo y cardiomiopatía dilatada, aunque se desconoce su evolución clínica después de los 40 años de edad. Por estos datos clínicos y de laboratorio, se realizó el estudio molecular de 22 exones por PCRm del gen *DMD* el cual fue negativo para deleciones. Posteriormente, el análisis de *FKRP* documentó un genotipo heterocigoto para una variante novel de sentido erróneo c.[143G>C];[=] o p.[Arg48Pro];[=]. El análisis molecular familiar de *FKRP* sólo fue posible en la madre en quien no se encontró dicha variante. Debido al fenotipo muy sugestivo de distrofia muscular de Becker se realizó MLPA mediante el cual se documentó una

duplicación en marco de lectura que involucra a los exones 3 a 9 [NM_004006.2:c.(93+1_94-1)_(960+1_961-1)dup], lo cual confirmó el diagnóstico de una distrofinopatía.

El análisis *in silico* con los programas Poplyphen, SIFT y Mutation Taster de la variante c.427C>A o p.(Arg143Ser), catalogada como benigna o de significancia clínica incierta por las bases de datos dbSNP, ClinVar (RCV000153241.5) y UniProt (http://web.expasy.org/variant_pages/VAR_018282.html); al realizar el puntaje para definir patogenicidad o benignidad²⁶ presentó un criterio moderado de patogenicidad (“PM3”), tres criterios de soporte de patogenicidad (“PP2”, “PP4” y “PP5”) y un criterio fuerte de benignidad (“BS1”), lo cual la clasifica como una variante de significado incierto. Este cambio afecta una posición del dominio hacia el interior del aparato de Golgi (aminoácidos 30-495, incluye la región “tallo” y dominio catalítico), por lo que adicionalmente se realizó el modelaje *in silico* de la proteína codificada por esta variante con el programa **Phyre2** usando los modelos con el mayor porcentaje de identidad, 97.8 para la aminoglucósido nucleotidil-transferasa ant(2’)-2ia apo forma (c4wqkA), la cual no reveló ningún cambio en las estructuras secundarias y terciaria de la proteína (**Figura 9**).

El análisis *in silico* de la variante *novel* c.143G>C o p.(Arg48Pro) mediante los tres programas la predicen como potencialmente dañina y el puntaje de patogenicidad o benignidad²⁶ la clasificó también como una variante de significado incierto al presentar un criterio de patogenicidad moderado (“PM2”), un criterio de soporte de patogenicidad (“PP2”) y uno de benignidad (“BP5”). Este cambio también se ubica en el extremo hacia el interior del aparato de Golgi y el análisis *in silico* con el programa **Phyre2** usando de modelo a la celulosa sintasa, intermediario translocación-2 (c4hg6a) con un porcentaje de identidad de 99.9, mostró una diferencia importante en la estructuras secundarias y terciaria, ya que esta posición en la proteína silvestre forma parte de un *coil* entre una hélice α y una hoja β , mientras que se predice que la variante induce la conformación de una hoja β (**Figura 9**).

Los datos clínico-genotípicos ya se encuentran en la base de datos Leiden Open (source) Variation Data (LOVD, <http://www.lovd.nl/3.0/home>)

Paciente 1: <https://databases.lovd.nl/shared/individuals/00101231>

Paciente 2: <https://databases.lovd.nl/shared/individuals/00101230>

Paciente 3: <https://databases.lovd.nl/shared/individuals/00101229>

Paciente 4: <https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000164288#00000024>

Discusión

La relevancia del presente trabajo de investigación reside en ser el primero en su tipo en nuestro país y el segundo a nivel latinoamericano sólo después del realizado en Brasil,¹ el cual tuvo como objetivo el determinar si existían pacientes con LGMD2I en una muestra de pacientes con DMD/DMB o **TNMENE**. Los resultados indican que los trastornos relacionados a *FKRP* comprenden al menos el ~3.3% del total de los casos analizados (2/60) o el 3.6%(2/55) de los pacientes catalogados clínicamente con sospecha de distrofinopatía, pero con PCRm negativa para deleciones en gen *DMD*. Esta proporción es menor a la observada en un estudio con criterios de inclusión similares al nuestro y realizado en población danesa donde se confirmó un trastorno relacionado a *FKRP* en 12.7% (n=13/102) de pacientes masculinos clasificados como casos esporádicos sin evidencia de deleciones o duplicaciones en el gen *DMD*.¹¹ Esta diferencia en frecuencias, podría deberse a que en nuestro grupo de estudio no se descarta el diagnóstico de una distrofinopatía en los pacientes al realizar solamente PCRm e incluso MLPA, o atribuirse a la diferencia en el tamaño de las muestras, a los criterios de inclusión considerados o por la variación natural y esperada de las frecuencias alélicas para trastornos con herencia autosómica recesiva en diferentes poblaciones.

En el norte de Europa, la LGMD2I tiene una alta prevalencia, donde comprende un 16% de los casos con cuadro clínico de LGMD originarios de Alemania²² y hasta un 38% en pacientes con presentación clínica de LGMD provenientes de Dinamarca.¹⁹ Así mismo, en Europa pareciera haber un gradiente genético de norte a sur, en pacientes con cuadro clínico de distrofia de cinturas, ya que en Italia se reporta que la LGMD2I comprende un 4.3-9%^{15,31,32} y en República Checa de 4.1%.³³ Estas diferencias en las frecuencias de LGMD2I aún entre poblaciones de origen europeo, podrían apoyar que en poblaciones genéticamente más distantes, como la mexicana, las diferencias podrían ser mayores. Sin embargo, cuando se compara la proporción de detección de la LGMD2I en estudios con criterios de selección menos restrictivos, como por ejemplo pacientes con hiperCKemia asintomática aislada, aún en pacientes de ascendencia europea,³⁴ los porcentajes tienden a ser similares (3.3-3.6% vs 2% respectivamente).

La variante c.826C>A o p.(Leu276Ile) (rs28937900) se considera el alelo más frecuente en LGMD2I a nivel mundial y particularmente en población general de origen europeo, donde su frecuencia alélica (FA) supera el 1% (0.01684) de acuerdo a la base Exome Aggregation Consortium (ExAC, <http://exac.broadinstitute.org/>), mientras que en la base *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>) en población de origen mexicano donde analizaron 128 alelos presenta una FA mucho menor (0.008). De acuerdo a la base

de datos Proyecto de los 1000 Genomas Fase 3 (<http://www.internationalgenome.org/>) individuos de ascendencia mexicana tienen una frecuencia alélica de 0.8% y una prevalencia de portadores de 1/64 para esta variante. Si bien la presencia de la variante p.(Leu276Ile) en población mexicana podría atribuirse a la contribución genética de origen europeo, las FA observadas implicarían en ambas poblaciones una frecuencia distinta en la prevalencia de individuos con genotipo homocigoto c.826C>A o p.(Leu276Ile), la cual aparentemente sería menor en mexicanos al existir un menor número de individuos heterocigotos p.(Leu276Ile) en la población general, respecto a lo observado europeos.

Referente a la presentación clínica condicionada por la variante p.(Leu276Ile) en estado homocigoto, ésta se considera leve, ya que ha sido reportada incluso en pacientes homocigotos que cursan únicamente con hiperCKemia¹⁹ y cuando se presenta en estado heterocigoto compuesto con una mutación nula, generalmente condiciona un fenotipo similar a una distrofinopatía tipo DMD¹. La segunda variante patogénica detectada en el paciente 1, c.1387A>G o p.(Asn463Asp) [rs121908110], se considera un alelo severo.²⁸ Lo anterior está en congruencia con el fenotipo clínico observado en el paciente 1 heterocigoto compuesto c.[826C>A];[1387A>G] o p.[Leu276Ile];[Asn463Asp], que es francamente similar a una distrofinopatía. Si bien la variabilidad inter- e intrafamiliar es común en la LGMD2I,^{1,35,36} y acorde a lo observado en la familia 1, dado que la hermana afectada presenta una afección muscular leve y una edad de inicio más tardía (12 años), este fenómeno se ha reportado principalmente en pacientes homocigotos para la variante p.(Leu276Ile),^{23,36} mientras que pacientes heterocigotos compuestos con esta variante tienen una edad de inicio y una presentación clínica similares, como se documentó en 2 miembros de una familia afectada reportada con el genotipo para *FKRP* p.[Leu276Ile];[Arg54Trpfs*16] (familia 9),¹¹ y en un estudio en Noruega con 10 pacientes heterocigotos compuestos.³⁶ En al menos una familia, la variabilidad clínica fue atribuida a la presencia de una o dos variantes patogénicas en el mismo alelo debido a un evento de recombinación intragénica,³⁷ sin embargo la secuenciación completa del exón 4 codificante del paciente 1 y su hermana afectada no reveló ningún cambio adicional al genotipo p.[Leu276Ile];[Asn463Asp], por lo que como en la mayoría de las familias LGMD2I, otros factores modificadores ambientales o genéticos deberán considerarse como condicionantes de la variabilidad fenotípica intrafamiliar.

El paciente 2 mostró un genotipo homocigoto: c.[1387A>G];[1387A>G] o p.[Asn463Asp];[Asn463Asp], situación acorde con el antecedente de endogamia en sus padres. De acuerdo a ExAC esta variante sólo se ha descrito en Latinos y con una FA baja (0.001954). Interesantemente el alelo c.1387A>G o p.(Asn463Asp) sólo se ha reportado en estado homocigoto en dos pacientes con distrofia muscular-distroglicanopatía (forma

congénita con o sin retraso mental), tipo B, 5 (MDDGB5, OMIM #606612) de ascendencia mexicana radicados en Estados Unidos, con quienes nuestro paciente comparte el cuadro clínico de inicio temprano con hipotonía, retraso motor severo, desarrollo cognitivo normal, debilidad facial, ausencia de reflejos tendinosos, sin compromiso cardiovascular pero con afección respiratoria, hiperCKemia y cambios distróficos en biopsia muscular.²⁸ Por lo anterior, nuestro paciente sería el tercer caso que apoyaría la presencia de un fenotipo con inicio congénito cuando la c.1387A>G o p.(Asn463Asp) se encuentra en estado homocigoto. Los padres de los 2 casos previamente reportados homocigotos p.(Asn463Asp) son nativos del área central de México (San Luis Potosí y Toluca, Estado de México) lo que sugiere que esta variante podría tener un efecto fundador,²⁸ lo cual podría ser apoyado por el hecho de que los padres del paciente 2 son originarios del San Felipe del Progreso, que también pertenece al Estado de México y se localiza cercano a Toluca. Sin embargo sería necesario realizar el análisis de haplotipos y documentar el genotipo *FKRP* en un mayor número de pacientes mexicanos para confirmar esta hipótesis.

Así mismo, se identificaron 2 pacientes con una sola variante de significado clínico incierto (heterocigotos). Aunque los trastornos relacionados a *FKRP* presentan una forma de herencia autosómica recesiva, hay excepciones reportadas que incluyen pacientes heterocigotos para la variante p.(Leu276Ile) con hiperCKemia, involucro cardíaco tardío y afección muscular.³⁸ De manera intrigante en el 7%²³ a 30-40% de pacientes caucásicos^{11,15,21,29} clínicamente catalogados como LGMD2I, la secuenciación completa del exón 4 del gen *FKRP* ha identificado únicamente una variante patogénica [como la p.(Leu276Ile)]^{1,11,15,17,18,21} o de significado clínico incierto [como la c.427C>A o p.(Arg143Ser)].^{15,21,29,30} Ello sugiere que un segundo alelo podría encontrarse en los exones no codificantes 1 al 3, o en regiones intrónicas o promotor, sin embargo esta posibilidad aún no ha sido demostrada experimentalmente.³⁶ Diversos estudios han considerado a estos pacientes como afectados independiente de la clasificación de la variante identificada en estado heterocigoto, sin embargo, algunos otros, incluido el presente estudio, sólo consideran el diagnóstico de un trastorno relacionado a *FKRP* en aquellos pacientes en quienes se demuestra la presencia de 2 variantes patogénicas.³⁵

La presencia de heterocigotos para sólo una variante de sentido erróneo con significado clínico incierto parece estar limitada a pacientes con presentación clínica de distrofia muscular de cinturas, y no en aquellos con formas congénitas,^{11,21,39} como la documentada en el paciente 3 heterocigoto para la c.427C>A o p.(Arg143Ser). Esta variante en las bases de datos como ClinVar (RCV000153241.5) y dbSNP (rs148206382) se refiere con interpretaciones contradictorias, y el puntaje de patogenicidad o benignidad fue compatible con una variante de significado incierto.²⁶ En la base de datos ExAC se

reporta que los latinos tienen la frecuencia más alta a nivel mundial para este alelo, con 3.95%, seguido de europeos no finlandeses (1.73%) y asiáticos del sur (0.77%), esto apoyaría que se trata de una variante común y benigna, aunque a la fecha no se han reportado individuos homocigotos. Al menos un estudio ha documentado un paciente con LGMD2I heterocigoto compuesto para la variante p.(Arg143Ser) con otra de significado incierto: p.(Pro358Leu) (rs143031195, RCV000153243.4).²⁹ La variante c.427C>A o p.(Arg143Ser) condiciona un cambio de un aminoácido básico de mayor tamaño (arginina) a uno polar de menor tamaño (serina) y a pesar de que la posición p.Arg143 se encuentra conservada en la mayoría de los mamíferos y vertebrados, excepto en el gato doméstico, el análisis *in silico* de la proteína codificada por esta variante no mostró cambios a nivel de estructuras secundaria, ni terciaria, por lo que al evaluar todo lo anterior, consideramos que no hay evidencia suficiente para clasificarla como una variante patogénica, como tradicionalmente se ha citado en otros trabajos.^{29,30}

Por otro lado, el análisis *in silico* mediante tres programas de la variante previamente no descrita c.143G>C o p.(Arg48Pro) e identificada en estado heterocigoto en el paciente 4, reveló que es potencialmente dañina, ya que el aminoácido arginina en la posición 48 está altamente conservado en mamíferos, y este cambio también se ubica en el extremo N-terminal de la proteína FKRP, el cual parece ser importante para la formación de homodímeros.⁶ El puntaje para patogenicidad o benignidad para este alelo la catalogó como variante de significado incierto y este cambio tampoco se encontró en 100 controles sanos étnicamente relacionados, sin embargo la confirmación posterior de una distrofinopatía en el paciente 4 sugiere que la variante p.(Arg48Pro) podría ser un hallazgo incidental de un alelo raro, aunque el análisis del modelaje a nivel de proteína mostró cambios evidentes en la estructura secundaria y terciaria (**Figura 9**). La prolina es un aminoácido que confiere rigidez, la cual es importante para la actividad catalítica en al menos la UDP-GalNAc: polipéptido α -N-acetilgalactosaminiltransferasa-T1,⁴⁰ también se ha visto que este aminoácido es importante para la formación de *loops* cortos en las proteínas.⁴¹ Así, con estos datos, no se puede descartar un posible papel deletéreo de la variante p.(Arg48Pro) en la función de la proteína FKRP, por lo cual se requieren estudios funcionales⁶ o en modelos celulares y/o animales⁴² que contribuyan a asignar o descartar un posible papel patogénico o modificador en el fenotipo.

El hallazgo de pacientes heterocigotos para una sola variante potencialmente patogénica en el gen *FKRP* y un **TNMENE** subyacente^{1,29} ha conducido a sugerir varias hipótesis para explicar este fenómeno: a) probablemente estas variantes en estado heterocigoto podrían ser polimorfismos benignos de muy baja frecuencia, cuyo hallazgo es meramente incidental; en nuestros casos, esta posibilidad se exploró para ambas

variantes y se descartó que fueran polimorfismos comunes con una FA de al menos del 1% al estar ausentes en nuestros 100 controles sanos étnicamente relacionados, aunque ello no aplica para la variante p.(Arg143Ser) por los datos depositados en las principales bases de datos genotípicos; b) se ha propuesto que estos pacientes pudieran tener un segundo alelo patogénico no identificado, dado que en literatura y en el presente trabajo de investigación, el análisis del gen *FKRP* sólo se enfocó a la región codificante (exón 4), por lo que no se descarta que el segundo alelo mutado se localice en el promotor, en regiones intrónicas no analizadas, o en los exones no codificantes 1 a 3, aunque esta última posibilidad ya se exploró y no se corroboró en al menos un estudio;²⁷ c) similar a otros padecimientos monogénicos e incluso algunas distrofias musculares y/o neuropatías periféricas con heterogeneidad alélica importante (por ejemplo las condicionadas por *LMNA*, OMIM*150330), podría considerarse un modo de herencia autosómico dominante debido a un efecto dominante-negativo de la única variante génica identificada, ya que existe evidencia de que la proteína *FKRP* forma homodímeros, así como oligomerización con otras proteínas aún no caracterizadas^{5,6} sin embargo a la fecha aún no se ha descrito este modo de herencia en familias con variantes patogénicas conocidas en LGMD; y por último, d) se ha sugerido un posible modo de herencia oligogénico, ya sea por herencia digénica o trigénica.¹ Para corroborar esta última posibilidad, se requeriría la realización de estudios de secuenciación de nueva generación para exomas o genomas completos, aunados a una adecuada evaluación clínica y de genealogía de los pacientes para poder realizar las correlaciones clínicas y de cosegregación de las variantes encontradas con el fenotipo patológico.

Conclusiones

El identificar dos pacientes con genotipo patológico, destaca la importancia de considerar a los trastornos relacionados al gen *FKRP* en el diagnóstico diferencial de pacientes con **TNMENE** o con sospecha de distrofinopatía no comprobada por estudio molecular del gen *DMD*.

La identificación certera de LGMD2I en los dos casos presentados, permitió brindar un asesoramiento genético de certeza a la familia 1 que continúa en seguimiento médico (vigilancia del desarrollo de cardiomiopatía dilatada), el reconocimiento de portadores y de otros familiares afectados de LGMD2I, así como la opción de ofrecerles estrategias preventivas basadas en diagnóstico prenatal molecular.

A la fecha, en México las distroglicanopatías no son evaluadas de manera rutinaria en el estudio de biopsias musculares,²⁵ por lo que el análisis molecular del gen *FKRP* y otros genes puede ser considerado una alternativa diagnóstica no invasiva, rápida y sencilla para la identificación de variantes patogénicas bialélicas.

La identificación de dos pacientes heterocigotos con variantes de significado clínico incierto, uno de ellos con distrofinopatía posteriormente corroborada, enfatizan la importancia de definir en el futuro su papel en la etiología de trastornos relacionados a *FKRP* ya sea para catalogarlas como patogénicas o benignas, modificadoras del fenotipo muscular, o meramente como hallazgos incidentales, y en este último caso, con el fin de evitar que pueden condicionar errores de diagnóstico molecular.

Literatura citada

1. De Paula F, Vieira N, Starling A et al. Asymptomatic carriers for homozygous novel mutations in the FKRP gene: the other end of the spectrum. *Eur J Hum Genet.* 2003;11:923-930.
2. Nigro V, Savarese M. Genetic basis of Limb-Girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta Myol.* 2014;33:1-12.
3. Cotta A, Carvalho E, Lopes A et al. Common recessive limb girdle muscular dystrophies differential diagnosis: why and how? *Arq Neuropsiquiatr.* 2014; 72(9):721-734.
4. Lu P, Zillmer A, Wu X et al. Mutations alter secretion of fukutin-related protein. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1802: 253-258.
5. Brown C. S, Torelli S, Brockington M, et al. Abnormalities in α - Dystroglycan Expression in MDC1C and LGMD2I Muscular Dystrophies. *Am J Pathol.* 2004; 164 (2): 727-737.
6. Alhamidi M, Kjeldsen Buvang E, Fagerheim T et al. Fukutin-related protein resides in the Golgi cisternae of skeletal muscle fibres and forms disulfide-linked homodimers via an N-terminal interaction. *PLoS One* 2001; 6:e22968.
7. Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M et al. Identification of a Post-translational Modification with Ribitol-Phosphate and Its Defect in Muscular Dystrophy *Cell Rep.* 2016; 14:2209-2223.
8. Keramaris-Vrantsis E, Lu P, Doran T, et al. Fukutin-related protein localizes to the Golgi apparatus and mutations lead to mislocalization in muscle in vivo. *Muscle Nerve.* 2007; 36: 455-465.
9. Dolatshad N.F, Brockington M, Torelli S, et al. Mutated fukutin-related protein (FKRP) localizes as wild type in differentiated muscle cells. *Exp Cell Res.* 2005; 309:370-378.
10. Mendell J, Boué D, Martin P. The Congenital Muscular Dystrophies: Recent Advances and Molecular Insights. *Pediatr Dev Pathol.* 2006; 9(6): 427-443.
11. Mercuri E. Brockington M, Straub V et al. Phenotypic Spectrum Associated with mutations in the Fukutin-Related Protein Gene. *Ann Neurol.* 2003; 53: 537-542.
12. Kang P, Feener C, Estrella E et al. LGMD2I in a North American population. *BMC Musculoskelet Disord.* 2007; 8:115.
13. Schwartz M, Hertz JM, Sveen ML, Vissing J. LGMD2I presenting with a characteristic Duchenne or Becker muscular dystrophy phenotype. *Neurology.* 2005; 64(9): 1635-1637.
14. Mc Donald C. Clinical approach to the diagnostic evaluation of hereditary and acquired neuromuscular diseases. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2012; 23(3): 495-563.
15. Guglieri M, Magri F, D'Angelo MG et al. Clinical, molecular and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Human Mutat.* 2008; 29:258-266.
16. Moore SA, Shilling CJ, Westra S et al. Limb-girdle muscular dystrophy in the United States. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006; 65:995-1003.

17. Yamamoto LU, Velloso FJ, Lima BL et al. Muscle protein alterations in LGMD2I patients with mutations in the Fukutin-related protein gene. *J Histochem Cytochem.* 2008; 56:995-1001.
18. Poppe M, Cree L, Bourke J et al. The phenotype of limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Neurology.* 2003; 60:1246-1251.
19. Sveen ML, Schwatz M, Vissing J. High prevalence and phenotype-genotype correlations of limb girdle muscular dystrophy type 2I in Denmark. *Ann Neurol.* 2006; 59:808-815.
20. Fu X, Yang H, Wei C et al. FKR mutations, including a founder mutation, cause phenotype variability in Chinese patients with dystroglycanopathies. *J Hum Genet.* 2016; 61:1013-1020.
21. Brockington M, Yuva Y, Prandini P et al. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet.* 2001; 10:2851-2859.
22. Walter MC, Peterser JA, Stucka R et al. FKR(826C>A) frequently causes limb-girdle muscular dystrophy in German patients. *J Med Genet.* 2004; 41:e50.
23. Frosk P, Greenberg CR, Tennese AA et al. The most common mutation in FKR causing limb girdle muscular dystrophy type 2I (LGMD2I) may have occurred only once and is present in Hutterites and other populations. *Hum Mutat.* 2005; 25: 38-44.
24. Gómez-Díaz B, Rosas-Vargas H, Roque-Ramírez B et al. Immunodetection analysis of muscular dystrophies in Mexico. *Muscle Nerve.* 2012; 338-345.
25. Bermúdez-López C, García de Teresa B, González del Ángel A, Alcántara-Ortigoza MA. Germinal mosaicism in a sample of families with Duchenne/Becker muscular dystrophy with partial deletions in the DMD gene. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2014; 18:93-97.
26. Richards S, Aziz N, Bale S et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* 2015; 17(5):405-424.
27. Fischer D, Walter MC, Kesper K et al. Diagnostic value of muscle MRI in differentiating LGMD2I from other LGMDs. *J Neurol.* 2005; 252:538-547.
28. MacLeod H, Pytel P, Wollmann R et al. A novel FKR mutation in congenital muscular dystrophy disrupts the dystrophin glycoprotein complex. *Neuromuscul Disord.* 2007; 17: 285-289.
29. Boito CA, Melacini P, Vianello A et al. Clinical and molecular characterization of patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Arch Neurol.* 2005; 62:1894-1899.
30. Fernández C, de Paula AM, Figarella-Branger D et al. Diagnostic evaluation of clinically normal subjects with chronic hyperCKemia. *Neurology.* 2006; 66:1585-1587.
31. Fanin M, Nascimbeni AC, Aurino S et al. Frequency of LGMD gene mutations in Italian patients with distinct clinical phenotypes. *Neurology.* 2009; 72:1432-1435.
32. Magri F, Del Bo R, D'Angelo MG et al. Frequency and characterization of anoctamin 5 mutations in a cohort of Italian limb-girdle muscular dystrophy patients. *Neuromuscul Disord.* 2012; 22:934-943.

33. Stehlíková k, Skálová D, Zídková J et al. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies in the Czech Republic. *BMC Neurol.* 2014;14:154.
34. Hanisch F, Grimm D, Zierz S, Deschauer M et al. Frequency of the FKRP mutation c.826C>A in isolated hyperCKemia and in limb-girdle muscular dystrophy type 2 in German patients. *J Neurol.* 2010; 257:300-301.
35. Bourteel H, Vermersch P, Cuisset JM et al. Clinical and mutational spectrum of limb-girdle muscular dystrophy type 2I in 11 French patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009; 80:1405-1408.
36. Stensland E, Lindal S, Jonsrud C et al. Prevalence, mutation spectrum and phenotypic variability in Norwegian patients with Limb Girdle Muscular Dystrophy 2I. *Neuromuscul Disord.* 2011; 21:41-46.
37. Vieira NM, Schlesinger D, de Paula F, Vainzof M, Zatz M. Mutation analysis in the FKRP gene provides an explanation for a rare cause of intrafamilial clinical variability in LGMD2I. *Neuromuscul Disord.* 2006; 16:870-873.
38. Schottlaender LV, Petzold A, Wood N, Houlden H. Diagnostic clues and manifesting carriers in fukutin-related protein (FKRP) limb-girdle muscular dystrophy. *J Neurol Sci.* 2015; 348:266-268.
39. Brockington M, Blake DJ, Prandini P et al. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of a congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet.* 2001; 69:1198-1209.
40. Fritz TA, Hurley JH, Trinh LB et al. The beginnings of mucin biosynthesis: The crystal structure of UDP-GalNAc: polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferase-T1. *PNAS.* 2004; 101(43): 15307-15312.
41. Krieger F, Möglich A, Kiefhaber T Effects of Proline and Glycine Residues on Dynamics and Barriers of loop Formation in Polypeptide Chains. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127:3346-3352.
42. Krag TO, Vissing J. A New Mouse Model of Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2I Homozygous for the common L276I Mutation Mimicking the Mild Phenotype in Humans. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015; 74:1137-1146.

Anexo 1: Tablas

Tabla 1. Clasificación genética y molecular de las distrofias musculares de cinturas (LGMD).

TIPO DE LGMD	MODO DE HERENCIA	GEN	PROTEÍNA	LOCUS
Alfa-sarcoglicanopatía (LGMD2D)	AR	<i>SGCA</i>	alfa-sarcoglicano	17q21.33
Beta-sarcoglicanopatía (LGMD2E)	AR	<i>SGCB</i>	beta-sarcoglicano	4q12
Gamma-sarcoglicanopatía (SCARMD, LGMD2C)	AR	<i>SGCG</i>	gamma-sarcoglicano	13q12.12
Delta-sarcoglicanopatía (LGMD2F)	AR	<i>SGCD</i>	delta-sarcoglicano	5q33.3
Calpainopatía (LGMD2A)	AR	<i>CAPN3</i>	calpaína 3	15q15.1
Dysferlinopatía (LGMD2B)	AR	<i>DYSF</i>	disferlina	2p13.2
LGMD2G	AR	<i>TCAP</i>	Titina-cap	17q12
LGMD2H	AR	<i>TRIM32</i>	Motivo de tripartita-32	9q33.1
LGMD2I (MDDGC5)	AR	<i>FKRP</i>	Proteína relacionada a fukutina	19q13.32
LGMD2J	AR	<i>TTN</i>	Titina	2q31.2
LGMD2K (MDDGC1)	AR	<i>POMT1</i>	Proteína O-manosiltransferasa 1	9q34.13
LGMD2L	AR	<i>ANO5</i>	Anoctamina 5	11p14.3
LGMD2M (MDDGC4)	AR	<i>FKTN</i>	Fukutina	9q31.2
LGMD2N (MDDGC2)	AR	<i>POMT2</i>	Proteína O-manosiltransferasa 2	14q24.3
LGMD2O (MDDGC3)	AR	<i>POMGNT1</i>	Proteína O-unida manosa beta1,2-Nacetilglucosaminiltransferasa	1p34.1
LGMD2Q	AR	<i>PLEC</i>	Plectina	8q24.3
MDDGA6	AR	<i>LARGE</i>	"like-glycosyltransferase"	22q12.3
MDDGA7	AR	<i>ISPD</i>	Dominio de Isoprenoide sintetasa	7p21.2
MDDGA8	AR	<i>POMGNT2</i>	proteína O-unida manosa N-acetilglucosaminiltransferasa 2 (beta 1,4-)	3p22.1
MDDGA	AR	<i>B3GNT1</i>	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa 1	11q13.2
MDDGA	AR	<i>B3GALNT2</i>	beta-1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa 2	1q42.3
MDDGC9 (LGMD)	AR	<i>DAG1</i>	dystroglicano 1 (glycoprotein 1 asociada a distrofina)	3p21
LGMD1A (miotilinopatía)	AD	<i>MYOT</i>	miotilina	5q31.2
LGMD1B	AD	<i>LMNA</i>	Lamina A/C	1q22
LGMD1C (caveolinopatía)	AD	<i>CAV3</i>	Caveolina-3	3p25.3
LGMD1D	AD	<i>DES</i>	Desmina	2q35
LGMD1E	AD	<i>DNAJB6</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	7q36.3
LGMD1F	AD	Desconocido	?	7q32.1-q32.2
LGMD1G	AD	Desconocido	?	4q21
LGMD1H	AD	Desconocido	?	3p25.1-p23

AD, autosómico dominante; AR, autosómico recesivo; LGMD, distrofias musculares de cinturas ("limb-girdle muscular dystrophy"; LGMD1, autosómico dominante; LGMD2, autosómico recesivo); MDDG, distrofia muscular del tipo distroglicanopatía. SCARMD: distrofia muscular severa de la infancia autosómico recesiva. La clave o nombre alternativo para algunas LGMD se señalan entre paréntesis.

Tabla 2. Primers diseñados para PCR ARMS para amplificación de variantes: c.427C>A o p.(Arg143Ser) y c.143G>C o p.(Arg48Pro)

c.[427C>A];[=] o p.[Arg143Ser];[=]	Secuencia (5'—3')	Longitud del producto	Tm	%GC	Auto complementariedad	Auto complementariedad 3'
Primer forward (normal)	CCTGGCCTGCTGGAG C	120	59.7	75.00	4.00	4.00
Primer forward (variante)	CCTGGCCTGCTGGAG A	120	57.6	68.75	4.00	2.00
Primer reverse (común)	CTCTCGCAGGCTGAC GTTC	120	60.8	63.16	5.00	2.00
c.[143G>C];[=] ó p.[Arg48Pro];[=]						
Primer forward (común)	CCTCTTCTATGTCTCG TGGCT	100	58.9	52.38	2.00	0.00
Primer reverse (normal)	CACCAGGACGGTGA CAC	100	57.1	64.71	5.00	5.00
Primer reverse (variante)	CACCAGGACGGTGA CAG	100	56.8	64.71	4.00	3.00

Tabla 3. Características clínicas de laboratorio y de gabinete del paciente 1 y hermana

Características clínicas, de laboratorio y gabinete	Paciente 1	Hermana
Edad inicio	6 años	12 años
Edad actual	10 años	20 años
Datos clínicos iniciales	Caídas frecuentes y debilidad muscular	Debilidad muscular
Inteligencia normal	+	+
Inicio de la deambulaci3n	1 a1o 2 meses	1 a1o 2 meses
P3rdida de la deambulaci3n	NA	NA
Debilidad facial	-	-
Macroglosia	-	-
Debilidad muscular proximal	+	+
Pseudohipertrofia de gastrocnemios	+	+
Acortamiento del tend3n de Aquiles	+	-
Signo de Gowers	+	Parcial
Patr3n respiratorio obstructivo	-	-
Cardiomiopatía dilatada	-	-
CK (normal: 25-140 UI/L)	1,834 UI/L (22X)	6,114 UI/L (74X)
Electromiografía	ND	ND
Biopsia muscular	Fibras con variaci3n en el tama1o y forma, necrosis, con cambios regenerativos y de hipertrofia, infiltrado inflamatorio multifocal, aumento de tejido conectivo. Sin inmunohistoquímica para distrofina	ND
Genotipo	c.[826C>A];[1387A>G] o p.[Leu276Ile];[Asn463Asp]. Variantes patogénicas previamente reportadas (rs28937900 y rs121908110)	c.[826C>A];[1387A>G] o p.[Leu276Ile];[Asn463Asp]

ND: no disponible, NA: no aplica, +: presente,-:ausente

Tabla 4. Características clínicas, de laboratorio y de gabinete del paciente 2.

Características clínicas, de laboratorio y de gabinete	Paciente 2
Edad inicio	6 meses
Datos clínicos iniciales	Hipotonía y retraso motor
Inteligencia normal	+
Inicio de la deambulación	14 meses
Pérdida de la deambulación	24 meses
Debilidad facial	+
Macroglosia	-
Debilidad muscular proximal	+
Pseudohipertrofia de gastrocnemios	-
Acortamiento del tendón de Aquiles	-
Patrón respiratorio obstructivo	- (infecciones respiratorias de repetición, sin capacidad para soplar por lo que no se realizaron pruebas de función respiratoria)
Cardiomiopatía dilatada	- (ecocardiograma normal a los 6 años de edad)
CK (normal: 25-140 UI/L)	3,294 UI/L (40X)
Electromiografía	Patrón miopático
Biopsia muscular	Atrofia y pérdida de estructura muscular, necrosis e infiltración de tejido adiposo Sin inmunohistoquímica para distrofina
Genotipo	c.[1387A>G];[1387A>G] o p.[Asn463Asp];[Asn463Asp]. Variante patogénica previamente reportada (rs121908110)

+: presente, -: ausente

Tabla 5. Características clínicas, de laboratorio y de gabinete de paciente 3

Características clínicas, de laboratorio y de gabinete	Paciente 3
Edad inicio	1 mes
Padecimiento	Hipotonía
Inteligencia normal	ND
Debilidad facial	-
Macroglosia	-
Debilidad muscular proximal	+
Pseudohipertrofia de gastrocnemios	-
Acortamiento del tendón de Aquiles	-
Patrón respiratorio obstructivo	+ (insuficiencia respiratoria progresiva desde los 3 meses que requirió intubación)
Cardiomiopatía dilatada	- (ecocardiograma con función ventrículo izquierdo normal a los 4 meses)
CK (normal: 25-140 UI/L)	3,000 UI/L (39X)
Biopsia muscular	Fibras atróficas con angulación ocasional, variación en tamaño, fibrosis peri y endomisial, algunas fibras con eosinofilia Sin inmunohistoquímica para distrofina
Genotipo	c.[427C>A];[=] o p.[Arg143Ser];[=]. Variante de significado clínico incierto previamente reportada (rs148206382)
Otros	Falleció a los 4 meses por sepsis, insuficiencia respiratoria y cardíaca derecha

+: presente, -: ausente, ND: no disponible.

Tabla 6. Características clínicas, de laboratorio y de gabinete del paciente 4

Características clínicas, de laboratorio y de gabinete	Paciente 4
Edad inicio	6 años
Padecimiento	Debilidad muscular y caídas frecuentes
Inteligencia normal	+
Inicio de deambulaci3n	ND
P3rdida de deambulaci3n	24 a3os
Debilidad facial	-
Macroglosia	-
Debilidad muscular proximal	+
Pseudohipertrofia de gastrocnemios	+
Acortamiento del tend3n de Aquiles	-
Patr3n respiratorio obstructivo	+
Cardiomiopatía dilatada	+
CK (normal: 25-140 UI/L)	(elevada)
Biopsia muscular	Músculo estriado con sustituci3n completa por adipocitos. Las pocas fibras musculares identificadas tienen rabdomi3lisis, algunas otras forman sincicios y hay internalizaci3n de núcleos. Estos datos corresponden a atrofia. Sin inmunohistoquímica para distrofina
Genotipo	NM_001039885.2(<i>FKRP</i>):c.[143G>C];[=] o p.[Arg48Pro];[=]. Variante no reportada. NM_004006.2(<i>DMD</i>):c.(93+1_94-1)_(960+1_961-1)dup

ND= no disponible, +: presente, -: ausente

Anexo 2: Figuras.

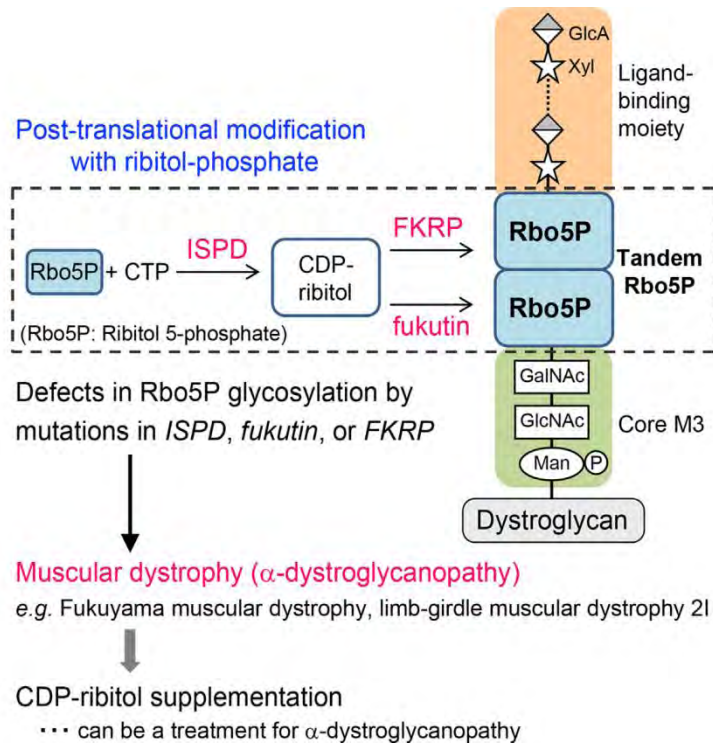


Figura 1. Esquema tomado de Kanagawa et al 2016; se representa la adición de un residuo en tándem de ribitol-5-fosfato que es llevada a cabo por las proteínas fukutina y FKRP como modificación post-traduccion del α -dístroglicano.⁷



Figura 2. Paciente 1 con genotipo en gen *FKRP* c.[826C>A];[1387A>G] o p.[Leu276Ile];[Asn463Asp]. A) presencia de tórax con *pectus excavatum*, B) dorso con escápulas discretamente aladas.



Figura 3. Paciente 1 con genotipo en gen *FKRP* c.[826C>A];[1387A>G] o p.[Leu276Ile];[Asn463Asp]. Se aprecia la cicatriz secundaria al sitio de la toma de biopsia muscular y aumento simétrico discreto en el volumen de ambas pantorrillas.

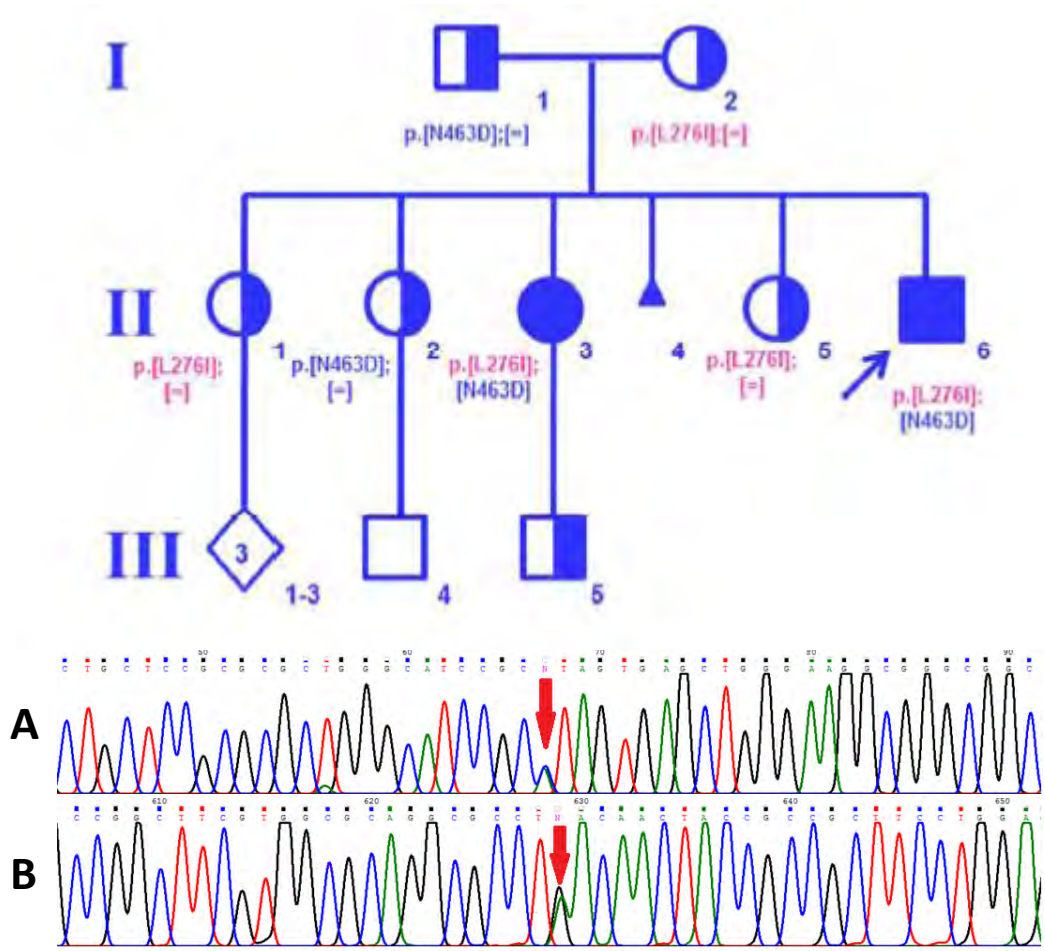


Figura 4. Árbol genealógico de la familia del paciente 1 (II-6). Se ilustran los genotipos caracterizados en los familiares de primer grado al caso índice mediante secuenciación del exón 4 del gen *FKRP*. Se observan las variantes patogénicas (flechas) en estado heterocigoto compuesto en los electroferogramas parciales (cadenas “forward”) del exón 4 de *FKRP* en II-6: A) c.826C>A o p.(Leu276Ile) o p.(L276I) y B) c.1387A>G o p.(Asn463Asp) o p.(N463D).



Figura 5. Imagen por resonancia magnética de cadera y muslos de paciente 1 mostrando infiltración grasa con hiperintensidad en glúteo mayor (MX), aductor mayor (AM) y vasto lateral (VL), escaso músculo grácil (GR), aductor largo del muslo (LN) y sartorio (SA).

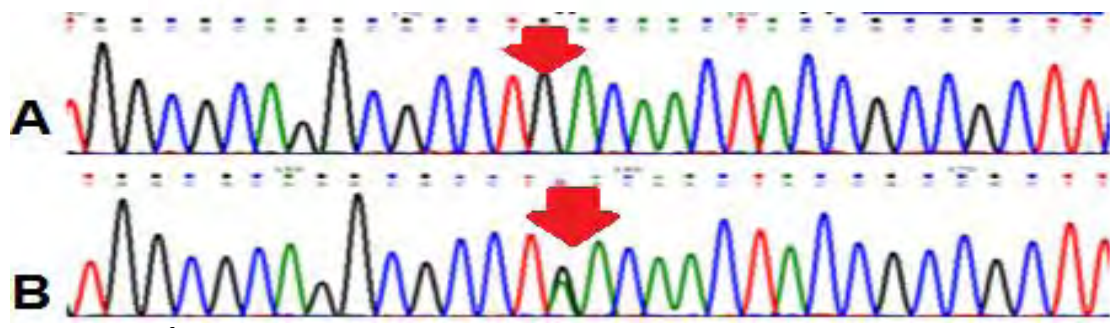
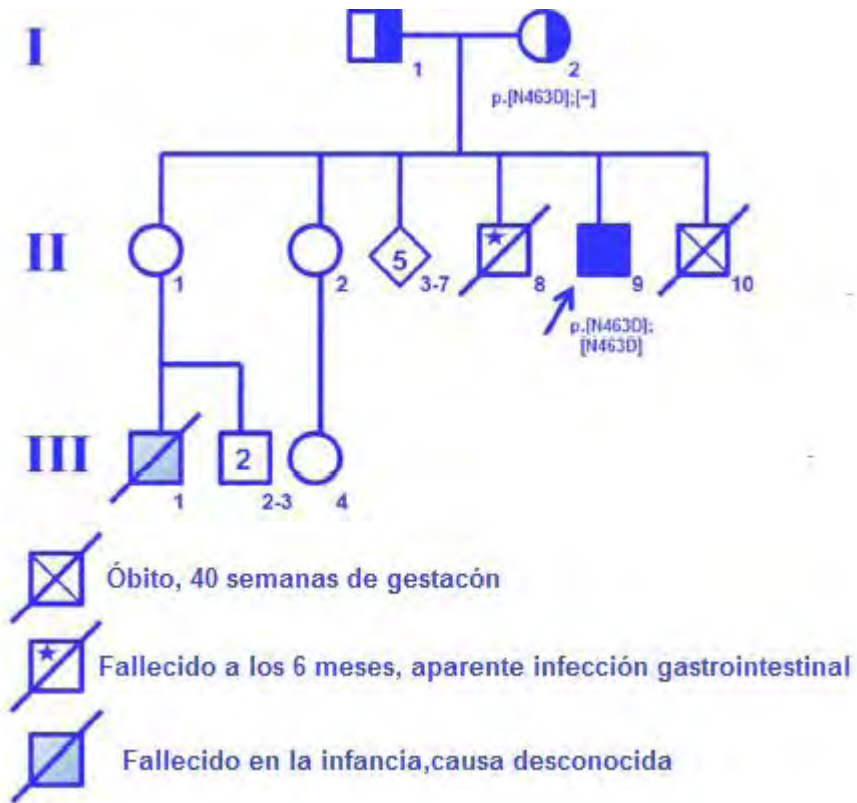


Figura 6. Árbol genealógico y genotipo de la madre y paciente 2 (II-9). **A):** Electroferograma parcial del exón 4 del gen *FKRP* (cadena “forward”) del caso índice que revela el genotipo homocigoto para la variante patogénica puntual de sentido erróneo c.1387A>G o p.(Asn463Asp). **B):** Electroferograma parcial del exón 4 del gen *FKRP* (cadena “forward”) de la madre (I-2) del paciente que revela la variante c.1387A>G o p.(Asn463Asp) en estado heterocigoto (portadora).

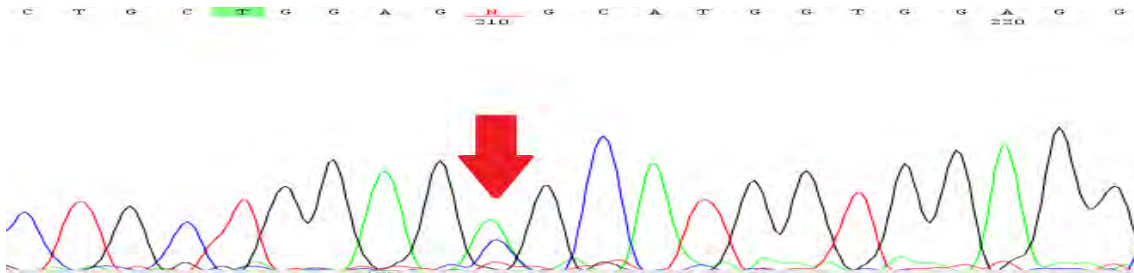


Figura 7. Electroferograma parcial del exón 4 de *FKRP* del paciente 3. Se señala el genotipo heterocigoto para la variante de sentido erróneo y de significado clínico incierto c.427C>A o p.(Arg143Ser) (rs148206382).

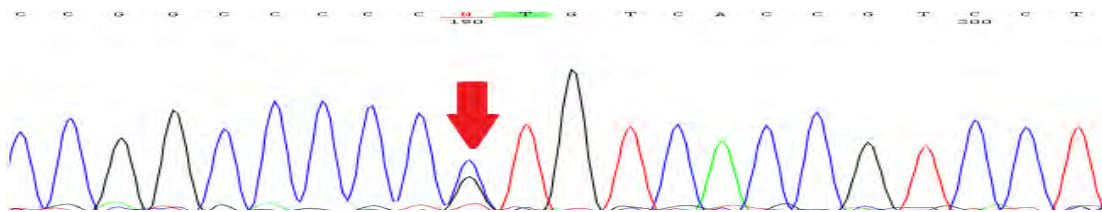


Figura 8. Electroferograma parcial de exón 4 gen *FKRP* de paciente 4. Se señala el genotipo heterocigoto para la variante de sentido erróneo y novel c.143G>C o p.(Arg48Pro).

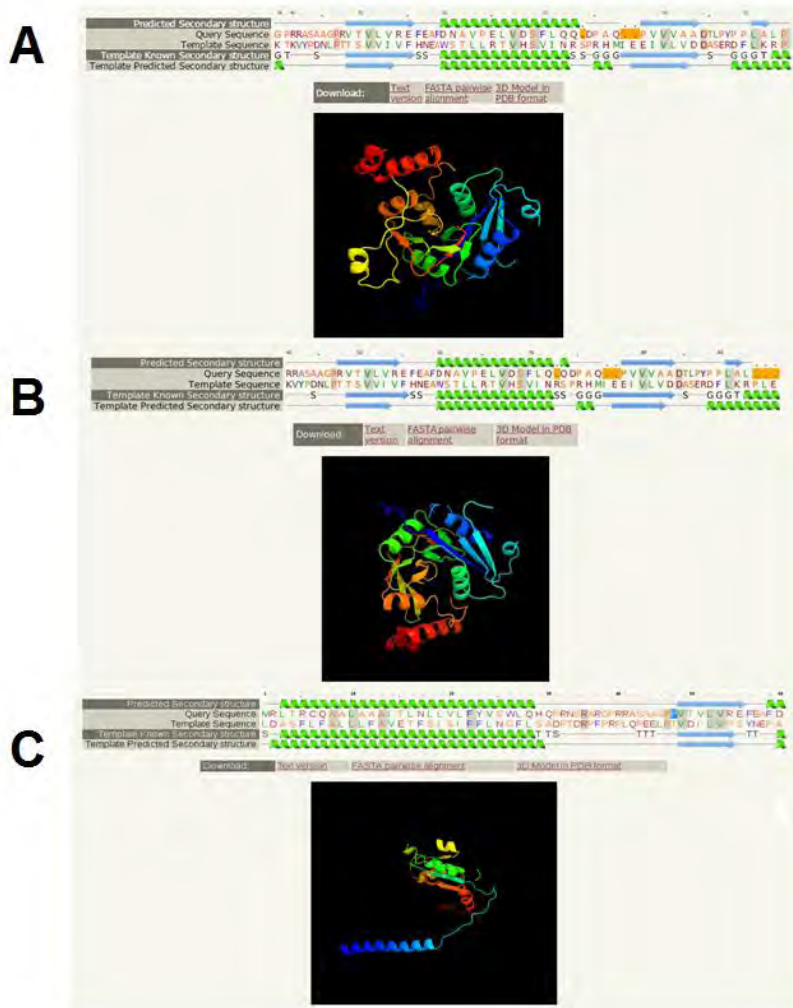


Figura 9. Modelaje *in silico* de proteínas con el programa Phyre 2. A) Mediante el uso como referencia de la secuencia de la proteína FKRP (NP_001034974.1), se decidió emplear la estructura cristalizada de la nucleótido-difosfato-azúcar transferasa (d1xhba2). B): modelaje *in silico* de la variante p.(Arg143Ser) gen FKRP, aminoglucosido nucleotidil-transferasa ant(2'')2-ia forma apo (c4wqkA). C): modelaje *in silico* de la variante p.(Arg48Pro) gen FKRP, celulosa sintasa, intermediario con translocación-2 celulosa (c4hg6A_). Las estructuras secundarias y terciaria del molde y la proteína prevista no difieren para la variante p.(Agr143Ser), ya que esta posición aparece en una hélice α en ambos modelos (A y B). Sin embargo, para la variante p.(Arg48Pro) hay una diferencia clara entre ambos modelos, ya que la arginina 48 forma parte de un *coil* entre una hélice alfa y una hoja beta, pero cuando ésta se sustituye por la correspondiente prolina, se predice que forma parte de una hoja β , lo cual claramente causa una distorsión en la estructura terciaria de la proteína resultante (A y C).

Molecular Analysis Confirms that *FKRP*-Related Disorders are Underdiagnosed in Mexican Patients with Neuromuscular Diseases

María José Navarro-Cobos^{Q1Q21,*} Ariadna Angel González-del^{2,*} Bernardette Estandia-Ortega²
Adriana Ruiz-Herrera³ Arturo Becerra⁴ Guadalupe Vargas-Ramírez⁵ Cesárea Bermúdez-López²
Miguel Angel Alcántara-Ortigoza²



Q3

¹Maestría en Ciencias Biológicas (Biomedicina)^{Q3}. Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

²Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, Mexico

³Servicio de Genética Médica, Hospital de Especialidades Pediátrico de León, Guanajuato, Mexico

⁴Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

⁵Servicio de Neurología Pediátrica, Hospital de Especialidades Pediátrico de León, Guanajuato, Mexico

Address for correspondence Miguel Angel Alcántara-Ortigoza, MD, PhD, Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, Avenida Insurgentes Sur 3700-C, Insurgentes-Cuicuilco, Coyoacán, Código Postal 04530, Ciudad de México, Mexico (e-mail: malcantaraortigoza@gmail.com).

Neuropediatrics 2017;00:1–9.

Abstract

The *FKRP*-related disorders include the limb-girdle muscular dystrophy type 21 (LGMD21, MIM#607155) which has a clinical overlap with dystrophinopathies. Except for Brazil, LGMD21 has not been described in other Latin-American countries, despite that 1/64 Mexican-ancestry individuals carry the commonest European p.(Leu276Ile) pathogenic *FKRP* variant (rs28937900, 1000 Genomes Project Phase 3), suggesting an underdiagnosis. Sequencing of exon 4 of *FKRP* in 60 unrelated Mexican patients with presumptive diagnoses of dystrophinopathy without *DMD* gene deletions, or with a neuromuscular disorder of unknown etiology, revealed two patients (2/60, 3.3%): one of them with an unreported pathogenic genotype, p.[Leu276Ile];[Asn463Asp] and a Duchenne-like phenotype; and the other that stands as the third reported case bearing the severe genotype, p.[Asn463Asp];[Asn463Asp] leading to a congenital presentation (MIM#606612). We identified two patients heterozygous for the p.(Arg143Ser) and the novel p.(Arg48Pro) variants, respectively, which were absent in 200 control alleles. Protein modeling suggests that p.(Arg143Ser) is a tolerated change, while p.(Arg48Pro) induces a structural modification, although further molecular confirmation of dystrophinopathy was obtained in the p.(Arg48Pro) patient. Our results justify the inclusion of *FKRP*-related disorders in the differential diagnosis of Mexican neuromuscular patients. The commonly reported heterozygous *FKRP* genotypes among LGMD21 deserve attention to avoid molecular misdiagnosis.

Keywords

- ▶ α -dystroglycanopathies
- ▶ Duchenne and Becker muscular dystrophies
- ▶ fukutin-related protein
- ▶ protein modeling
- ▶ variants of uncertain significance

* First authors who contributed equally to this work.

received
June 23, 2017
accepted after revision
August 21, 2017

© 2017 Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0037-1607054>
ISSN 0174-304X.

Introduction

Pathogenic variants in *FKRP* gene (19q13.32, MIM*606596) lead to a wide clinical spectrum of autosomal recessive muscular dystrophy phenotypes, ranging from the congenital forms characterized by muscle-eye-brain anomalies (MIM#613153) with or without intellectual disability (MIM#606612) to those that present from early childhood to adulthood (MIM#607155; Limb-girdle muscular dystrophy type 2I or LGMD2I, formerly known as muscular dystrophy-dystroglycanopathy, limb-girdle, type C.5. Early-onset LGMD2I with a severe course has a significant clinical overlap with dystrophinopathies (Duchenne-like), including predominant proximal and pelvic muscular weakness with Gowers' sign, calf pseudohypertrophy, loss of independent ambulation during the second to third decade, persistent elevation (≥ 10 – $20 \times$) of serum creatine kinase (CK), and cardiorespiratory involvement.^{1,2} In fact, dystrophinopathies were documented in approximately 4% (4/103) of a group of Danish patients who fulfilled the clinical diagnostic criteria for LGMD2^{Q4}.³ Conversely, LGMD2I was identified through *FKRP* analysis in 12.7% (13/102) of unique male cases with Duchenne or Becker muscular dystrophy (BMD) phenotypes without an identifiable deletion or duplication of the *DMD* gene.⁴

The frequency of LGMD2I varies across diverse populations, with the highest rates reported in Caucasians (i.e., 38.4% in Danish patients classified as LGMD2)³ but relatively few cases reported in Asians.⁵ The responsible *FKRP* genotypes in the various ethnic groups are related to the allelic frequencies observed for the main pathogenic variants, which appear to have been influenced by founder, genetic drift, and/or selective advantage effects; for example, p.(Leu276Ile) [rs28937900] is commonly found in European individuals,^{6–8} whereas p.(Tyr182Cys) [rs543163491] is more common among Asians.⁵ To our knowledge, except some cases in Brazil,⁹ LGMD2I has not been reported in other Latin-American patients with LGMD phenotypes or neuromuscular disorders of unknown etiology. In Mexico, the dysferlinopathies (LGMD2B, MIM#253601) are the most frequent identified LGMD subtype among the muscular dystrophies (18.4%, $N = 39/212$), but the employed immunoanalysis of muscle biopsies did not include any search for dystroglycanopathy.¹⁰ At present, the proportion of LGMD2I and the responsible *FKRP* genotypes in Mexican patients with muscular dystrophies remain unknown. Moreover, and reflecting the genetic contribution of Europeans, the documented carrier frequency for the p.(Leu276Ile) pathogenic *FKRP* variant is 1 in 64 Mexican-ancestry individuals (1000 Genomes Project Phase 3). Thus, the *FKRP*-related disorders could be underdiagnosed in Mexico.

Here, we performed a molecular analysis with the aim of determining the proportion of *FKRP*-related disorders in a sample of Mexican patients with either a presumptive diagnosis of dystrophinopathy or neuromuscular disorder of unknown etiology.

Methods

Subjects

A total of 60 unrelated Mexican patients were included. From an in-house registry of genomic DNA samples obtained from patients who were initially referred by a pediatric neurologist and/or geneticist for molecular study of the *DMD* gene due to a presumptive diagnosis of dystrophinopathy, we selected 55 male cases recruited between 1992 and 2016 using the following criteria: (1) absence of partial deletions in 22 exons representing the mutational hotspots of the *DMD* gene (Dp427m exon 1, 3, 6, 8, 12, 13, 16, 17, 19, 43 to 45, 47 to 55 and 60; NM_004006.2), as assessed by multiplex polymerase chain reaction (PCR) testing;¹¹ 25 of them also had normal multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay results for 80 *DMD* gene exons (SALSA MLPA P034 *DMD* mix 1 probe mix and P035 *DMD* mix 2 probe mix, MRC-Holland Amsterdam, The Netherlands); (2) genealogy without X-linked familial history of any neuromuscular disorder; (3) findings of dystrophic changes in the muscle biopsy, with partial or normal positivity of dystrophin at immunohistochemistry (IHC) assay, if available; and d) sufficient amount of genomic DNA to perform the molecular study of *FKRP*.

Also, five additional cases clinically classified with a neuromuscular disorder of unknown etiology were included (two males and three females). No multiplex PCR or MLPA assay of the *DMD* gene had been performed in these patients, which showed proximal muscular weakness ($n = 4$), hyperCKemia (562–3,150 IU/L, $n = 3$), myopathic pattern at electromyography (EMG, $n = 3$), dystrophic changes ($n = 1$) or dystrophin positivity at IHC assay ($n = 1$) on muscle biopsy. None of the 60 analyzed patients underwent an α -dystroglycan evaluation on muscle biopsy.

Molecular Analysis of the *FKRP* Gene

Genomic DNA samples from the 60 included patients were subjected to PCR using primers (forward 5'-GCTGAAACC AAATAGGGAAAAGAAA-3' and reverse 5'-ATAAATCTG-GAGGTCTCC-3') designed to generate a 1.85-kb amplicon encompassing the entire *FKRP* coding sequence of exon 4 (NM_001039885.2), plus the intron 3-exon 4 border and parts of the 5' and 3' untranslated regions contained within the exon 4. The amplicons were directly sequenced using four overlapping primers (sequences available upon request), and the obtained sequences were aligned and analyzed with Chromas Pro Version 1.7.7 software^{Q5} (Technelysium Pty Ltd). Variant annotation was performed using the Alamut Visual 2.7.2 software^{Q6} (Interactive Biosoftware).

Evaluation of Novel *FKRP* Variants or Those of Uncertain Significance

Missense variants absent from the main genotype databases (dbSNP, Exome Aggregation Consortium or ExAC, Exome Variant Server, 1000 Genomes Project Phase 3) or those cataloged as variants or those of uncertain significance (VUS), were directly searched by a specific-allele PCR assay of 100 ethnically relevant healthy controls (PCR conditions and primers available upon request). We scored the novel or VUS missense *FKRP*

Q7

variants for pathogenicity or benignity according to the recommended standards and guidelines for the interpretation of sequence variants.¹² Protein *in silico* modeling was used to predict the structural effects of the identified changes, using the JPred4³⁷ program (available at: <http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4/>) to calculate the secondary structures, and the Phyre2 program (available at: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) using NP_001034974.1 to query FKRP protein sequence and applying different templates to search for the best hits (confidence >95) given that the three-dimensional structure of the FKRP protein is still not available. We used the structure of the nucleotide-diphosphoglycer transferase (d1xhba2), which had the highest hit to NP_001034974.1. To determine the clinical significance of a novel missense FKRP variant that was found in a patient with a highly suspicious BMD phenotype but with a normal result on multiplex PCR testing, we additionally performed MLPA analysis of the *DMD* gene in this patient. This study was approved by the Research and Ethics Committee of the National Institute of Pediatrics (056/2014), Mexico.

Results

Confirmation of FKRP-Related Disorders in the Study Population: Genotypic and Clinical Data

Two male cases were identified with pathogenic biallelic genotypes diagnostic for a FKRP-related disorder (2/60, 3.3%). Their clinical and genotypic data are summarized in **Table 1**.

Patient 1 was referred for molecular *DMD* gene analysis based on a clinical picture that was highly suggestive of Duchenne-like muscular dystrophy (**Fig. 1**, **Supplementary Video**, online only) and the presence of dystrophic changes on muscle biopsy. After identifying his compound heterozygous FKRP genotype p.(Leu276Ile);(Asn463Asp) (**Fig. 2**), we obtained further detailed clinical, radiological, and familial history data (**Table 1**, **Figs. 2 and 3**). The patient had a 20-year-old sister with a mild proximal muscle weakness, in whom the same FKRP genotype was subsequently identified (**Table 1**, **Fig. 2**). By extending the molecular FKRP analysis to his relatives, we corroborated the obligate carrier status for p.(Leu276Ile) or p.(Asn463Asp) in both non-consanguineous parents and three healthy sisters (**Fig. 2**).

Supplementary Video Patient 1 with myopathic gait, hyperlordosis, scapular winging, and calf pseudohypertrophy. He can walk on his toes but not on his heels, and runs with difficulty. Gowers' maneuver is positive. His muscular strength in his lower extremities is 4/5 in the proximal muscles and 3/5 in the distal muscles.

Patient 2, who harbored a previously reported homozygous p.(Asn463Asp);(Asn463Asp) FKRP pathogenic genotype,¹⁴ presented at 6 months of age generalized hypotonia and severe motor delay. Based on hyperCKemia, a myopathic pattern on EMG, and dystrophic changes on muscle biopsy, multiplex PCR

testing and further MLPA assay of the *DMD* gene were requested, but these yielded normal results. Unfortunately, the clinical evolution of this patient past 11 years old is unknown. His parents denied consanguinity, although they were native to a small population of approximately 1,500 inhabitants (Tres Estrellas-San Felipe del Progreso, State of Mexico). The obligate carrier status for this pathogenic variant was only confirmed in his mother, as no other family member was available for molecular study.

Identification of Patients with Single FKRP Missense Variants and Their Genotypic and Clinical Data

We detected two additional male patients who each harbored a single FKRP missense variant. Patient 3, who was heterozygous for the previously reported c.427C > A or p.(Arg143Ser) (rs148206382) allele,^{6,15-17} presented at 1 month of age hypotonia, hyperCKemia (3000 IU/L, reference values: 55-170 IU/L), and respiratory insufficiency. Multiplex PCR testing and MLPA assay for the *DMD* gene yielded normal results, and the muscle biopsy revealed atrophic muscle fibers along with perimysial and endomysial fibrosis but failed to establish a definitive or presumptive diagnosis. The patient died at 4 months of age with a diagnosis of right heart failure, respiratory insufficiency, and septic shock.

Patient 4, who was heterozygous for novel FKRP variant c.143C > C or p.(Arg48Pro), first exhibited symptoms at 6 years of age, with proximal muscle weakness affecting all four extremities, calf pseudohypertrophy, hyperCKemia (unavailable values), a myopathic pattern at EMG, respiratory insufficiency, and dilated cardiomyopathy. Based on a clinical diagnosis of BMD, in the year of 1997 before the advent of the MLPA assay, a multiplex PCR testing for the *DMD* gene was done; however, it yielded a normal result. A muscle biopsy performed at 38 years of age was inconclusive. The patient lost ambulation at the 24 years of age, but his clinical evolution after 40 years of age is unknown. The familial FKRP analysis was only possible in the mother, in whom the p.(Arg48Pro) variant was not found. Due to his highly suspicious BMD phenotype, despite the identification of the heterozygous p.(Arg48Pro) FKRP genotype, MLPA assay and/or complete sequence analysis of *DMD* gene were indicated. Thus, we performed the former and found a predicted in-frame duplication encompassing exons 3 to 9 of the *DMD* gene, confirming the diagnosis of dystrophinopathy.

Pathogenicity Scoring and Modeling of the Proteins Resulting from the p.(Arg48Pro) and p.(Arg143Ser) FKRP Variants

These variants were absent in the 200 FKRP control alleles screened herein. Pathogenicity or benignity scoring¹² yielded a VUS classification for both: p.(Arg143Ser) met one moderate pathogenicity criterion ("PM3"), three supporting pathogenicity criteria ("PP2," "PP4" and "PP5"), and one strong benignity criterion ("BS1"); and p.(Arg48Pro) met one criterion each for moderate pathogenicity ("PM2"), supporting pathogenicity ("PP2"), and benignity ("BP5"). The protein structure *in silico* modeling only revealed an

Table 1 Main clinical data of identified Mexican patients with confirmed diagnoses of a *FKRP*-related disorder

	Patient 1	Affected sister of patient 1	Patient 2
Age at LGMD21 diagnosis	9 y	20 y	Unknown. Clinical follow-up unavailable after 11 y of age
Muscle involvement	Proximal and pelvic muscle weakness with Gowers' sign, discrete calf pseudohypertrophy. (→ Fig. 1 and → Supplementary Video, online-only)	Mild proximal muscle weakness predominantly in pelvic girdle, slight calf pseudohypertrophy, incomplete Gowers' sign	Generalized hypotonia, facial weakness and severe motor delay evident at 6 mo of age
Ambulation features	Independent ambulation started at 14 mo of age; myopathic gait, frequent falls, difficulties in running and climbing stairs since 6 y of age (→ Supplementary Video, online-only); still ambulant at 10 y of age	Independent ambulation started at 14 mo of age; at 12 y of age, exhibited difficulties in running and climbing stairs, and occasional falls; myopathic gait appeared at 18 y of age; still ambulant at 20 y of age	Independent ambulation started at 14 mo of age but was lost 10 mo later
Serum CK values	1,834 IU/L (Reference value: 55–170 IU/L)	6,114 IU/L (Reference value: 5–145 IU/L)	3,294 IU/L (Reference value: 55–170 IU/L)
Cardiovascular status	At 10 y of age, the patient is asymptomatic with normal EKG, LVEF 56% (reference value: 55–60%), slight tricuspid and mitral valve insufficiency	At 20 y of age, the patient is asymptomatic with LVEF 57% (reference value: 55–60%), slight tricuspid and mitral valve insufficiency	Normal ECG at 6 y of age
Respiratory function	Asymptomatic, but FVC was not available	Asymptomatic, but FVC was not available	Recurrent respiratory infections FVC values unavailable
EMG	ND	ND	Myopathic pattern
Muscle biopsy	Performed at 8 years of age; results were compatible with dystrophinopathy, but IHC for dystrophin was not performed	ND	Dystrophic changes, but IHC for dystrophin was not performed
Cognition	Normal, without formal evaluation	Normal, without formal evaluation	Normal, without formal evaluation
Other relevant clinical data	MRI revealed pelvic and posterior thigh muscle involvement (→ Fig. 3); discrete and bilateral Achilles tendon contractures were observed	Slight language articulation difficulties	Low weight and height, weakness and generalized muscular wasting, absence of osteotendinous reflexes, and scoliosis on X-ray chest evaluation at 11 y of age
Genotype ^a	Compound heterozygous c.[826C > A];[1387A > G] or p.[Leu276Ile];[Asn463Asp] (rs28937900 and rs121908110, respectively)	Compound heterozygous c.[826C > A];[1387A > G] or p.[Leu276Ile];[Asn463Asp] (rs28937900 and rs121908110, respectively)	Homozygous c.[1387A > G];[1387A > G] or p.[Asn463Asp];[Asn463Asp] (rs121908110)
Clinical presentation	LGMD type 2I (MIM#607155) Duchenne-like ^{2,3}	LGMD-like ^{2,3}	MDC1C-like (MIM#606612) ¹⁴

Abbreviations: CK, serum creatine kinase; ECG, echocardiogram; EKG, electrocardiogram; EMG, electromyography; FVC, forced vital capacity; IHC, immunohistochemistry; LGMD, limb-girdle muscular dystrophy; LVEF, left-ventricular ejection fraction evaluated by ECG; MDC1C, congenital muscular dystrophy 1C phenotype; MRI, magnetic resonance imaging; ND, not performed.

^aVariant nomenclature is given according to *FKRP* reference sequence NM_001039885.2.

important difference in the tertiary structure of the predicted protein encoded by the p.(Arg48Pro) variant (→ Fig. 4).

Discussion

Proportion of *FKRP*-Related Disorders in the Study Population

According to the 1000 Genomes Project Phase 3 database, Mexican-ancestry individuals have an allelic frequency of

0.8% and a carrier prevalence of 1/64 carriers for the commonest *FKRP* variant responsible for LGMD21 in the European population, c.826C > A or p.(Leu276Ile) (rs28937900). We, therefore, hypothesized that our study sample should include some cases of LGMD21. Indeed, our molecular analysis revealed that *FKRP*-related disorders conditioned by a biallelic pathogenic genotype accounted for 3.3% ($N = 2/60$) of our total study population or 3.6% ($N = 2/55$) of those cataloged as suspected dystrophinopathy with a negative result for multiplex PCR



Fig. 1 ^{QR} Discrete scapular winging and slight calf pseudohypertrophy in the patient 1.

testing of *DMD* gene deletions and 25 of them with a normal MLPA assay. This proportion is lower than the 12.7% ($N = 13/102$) found in a similar study performed in Danish males classified as sporadic cases without evidence of deletion/duplication of the *DMD* gene.⁴ This could reflect the impossibility of ruling out in our study group, a genotype responsible for dystrophinopathy by using only multiplex PCR testing or even MLPA assay, or may be due to the difference in sample size and/or the genetic structures of the populations. The LGMD2I is highly prevalent in Northern European populations, accounting for 16% of German⁷ and 38% of Danish³ LGMD patients. In Europe, there is an apparent north-to-south genetic gradient, with lower percentages of LGMD2I found in clinically well-

defined LGMD patients of Italian (4.3–9%)^{17–19} and Czech (4.1%)²⁰ populations. Thus, gross differences could be expected in the prevalence of LGMD2I across more genetically distant populations, including that of Mexico. In fact, the lower frequency observed for a *FKRP*-related disorder in our study could agree with the estimated carrier frequency of 1/30–50 or 1/100–150 for the p.(Leu276Ile) variant in non-Finnish European descent (1000 Genomes Project Phase 3 and ExAC databases) or Danish individuals,^{3,4} respectively, which is greater than the expected from 1/160 carrier individuals for a *FKRP*-related disorder attributed to the two main pathogenic *FKRP* variants in Latin-American [p.(Asn463Asp), 1/255, ExAC] or Mexican-ancestry [p.(Leu276Ile), 1/64, 1000 Genomes Project Phase 3] populations. However, when we compare our proportion of LGMD2I cases with those found in studies employing more permissive selection criteria (e.g. isolated hyperCKemia even in patients of European descent)²¹ and a lesser p.(Leu276Ile) carrier frequency (1/300),⁷ the figures tend to be more similar (3.3–3.6% vs. 2%, respectively).

Identified *FKRP* Pathogenic Genotypes and the Resulting Phenotypes

To the best of our knowledge, the coexistence of mild p.(Leu276Ile)^{3,6,9} and severe p.(Asn463Asp)¹⁴ *FKRP* alleles found in the patient 1 has not been previously reported in LGMD2I. This combination could explain his Duchenne-like phenotype, as the clinical courses described in patients harboring similar allele combinations have included more pronounced lower proximal muscle wasting/weakness and earlier onset compared with that observed in homozygous p.(Leu276Ile) patients.^{1–3} However, our hypothesis does not explain the milder LGMD2I phenotype observed in the older affected sister of patient 1. Although the existence of inter-familial and intrafamilial variation is well-recognized in LGMD2I,^{22,23} this phenomenon has been noted mainly in patients homozygous for p.(Leu276Ile).^{1,23} In at least one LGMD2I family, clinical variability was attributed to the presence of one or two pathogenic variants in the same

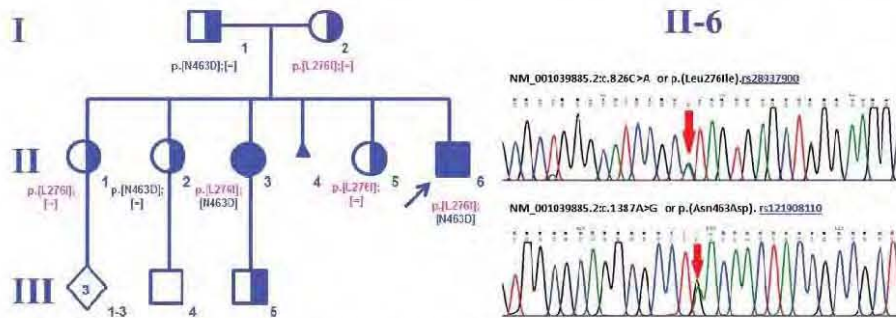


Fig. 2 Partial electropherograms (forward strands) of exon 4 of the *FKRP*^{QR} gene in the patient 1 (index case, II-6) showing the heterozygous compound *FKRP* genotype c.[826C > A];[1387A > G] or p.[Leu276Ile];[Asn463Asp], and his genealogy, in which further detailed clinical, familial, and molecular *FKRP* evaluations led to the identification of a previously unrecognized LGMD2I-affected sister (II-3) and asymptomatic carriers for both of the identified pathogenic variants. *FKRP* genotypes are indicated below each individual. LGMD2I, limb-girdle muscular dystrophy type 2I.

^{QR}



Fig. 3 Hip and thigh T1-weighted magnetic resonance imaging of the patient 1 showing fatty infiltration with hyperintensity at the gluteus maximus (MX), adductor magnus (AM), and vastus lateralis (VL), with sparing of the gracilis (GR), adductor longus (LN), and sartorius (SA). These findings are compatible with those described in LGMD2I.¹³ LGMD2I, limb-girdle muscular dystrophy type 2I.

FKRP allele due to an intragenic recombination event.²⁴ However, our complete sequencing of exon 4 in patient 1 and his affected sister did not reveal any coding change besides the p.(Leu276Ile);[Asn463Asp] genotype. Thus, as in most LGMD2I families, other environmental or genetic modifiers should be considered.

As far as we know, the patient 2 is the third reported case harboring the severe p.(Asn463Asp);[Asn463Asp] *FKRP* genotype.¹⁴ His clinical evolution highly resembles that previously described in two unrelated, USA-resident Mexican-ancestry patients with congenital muscular dystrophy type 1C (MDC1C, or formerly muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with or without intellectual disability), type B, 5 or MDDGB5, MIM#606612).¹⁴ The survivals of the two previously described female patients were not published, and our patient 2 failed to continue his clinical follow-up at 11 years of age. Thus, it is difficult to establish a survival prognosis for patients bearing this genotype. However, the early and highly disabling clinical course described in the three patients homozygous for p.(Asn463Asp);[Asn463Asp] genotype, along with the Duchenne-like phenotype documented in the patient 2, supports the notion that p.(Asn463Asp) variant is a severe *FKRP* allele.

Notably, the p.(Asn463Asp) variant accounted for three of the four confirmed pathogenic *FKRP* alleles identified in our two families. This variant has only been identified in Latin-American populations, with an allelic frequency of 0.2% according to the ExAC database. The parents of the previously described p.(Asn463Asp) homozygous Mexican-ancestry patients were native to a central geographic area of Mexico (San Luis Potosí State and Toluca City, State of Mexico), suggesting that this variant could be a founder allele.¹⁴ Indeed, this hypothesis could be supported by our present findings, as the parents of patient 2 came from San Felipe del Progreso, which belongs to the State of Mexico and is located near Toluca City.

However, the genotypes and detailed haplotype analysis of additional Mexican cases with *FKRP*-related disorders should be assessed to confirm the founder effect.

Patients with Heterozygous *FKRP* Genotypes

The *FKRP*-related disorders described to date typically follow the classical autosomal recessive mode of inheritance, where it is assumed that carriers are asymptomatic. This is consistent with our findings in the heterozygous relatives of patients 1 and 2. However, isolated exceptions to this pattern have been described, including the late cardiac and skeletal muscle involvement with hyperCKemia described for p.(Leu276Ile) heterozygotes,²⁵ but intriguingly, in 7%¹ to 30–40% of Caucasian patients^{2,6,15,17} clinically cataloged as LGMD2I, even supported sometimes by a finding of α -dystroglycanopathy on muscle biopsy, complete sequencing of *FKRP* exon 4 identified only one copy of a proven pathogenic allele [i.e., p.(Leu276Ile)]^{1,2,6,9,17,26} or a VUS missense allele [i.e., commonly the c.427C > A or p.(Arg143Ser) variant].^{6,15–17} This suggests that the second allele could lie in noncoding exons 1 to 3, or in intronic or promoter regions; however, this possibility has not yet been demonstrated.²³ Most of these studies have considered such patients to represent affected cases regardless of the type of variation identified in the heterozygous state. However, some others, including the present work, only confirm a diagnosis of a *FKRP*-related disorder in patients bearing two proven pathogenic variants.²³

The p.(Arg143Ser) variant identified in patient 3, changes a basic amino acid (Arg) to a polar uncharged residue (Ser) at a position that shows high phylogenetic conservation (from human to zebrafish) and is located in the domain of *FKRP* that is exposed to the Golgi lumen. A survey reveals conflicting interpretations for this change in the main databases (ClinVar RCV000153241.5, dbSNP rs148206382), and our scoring

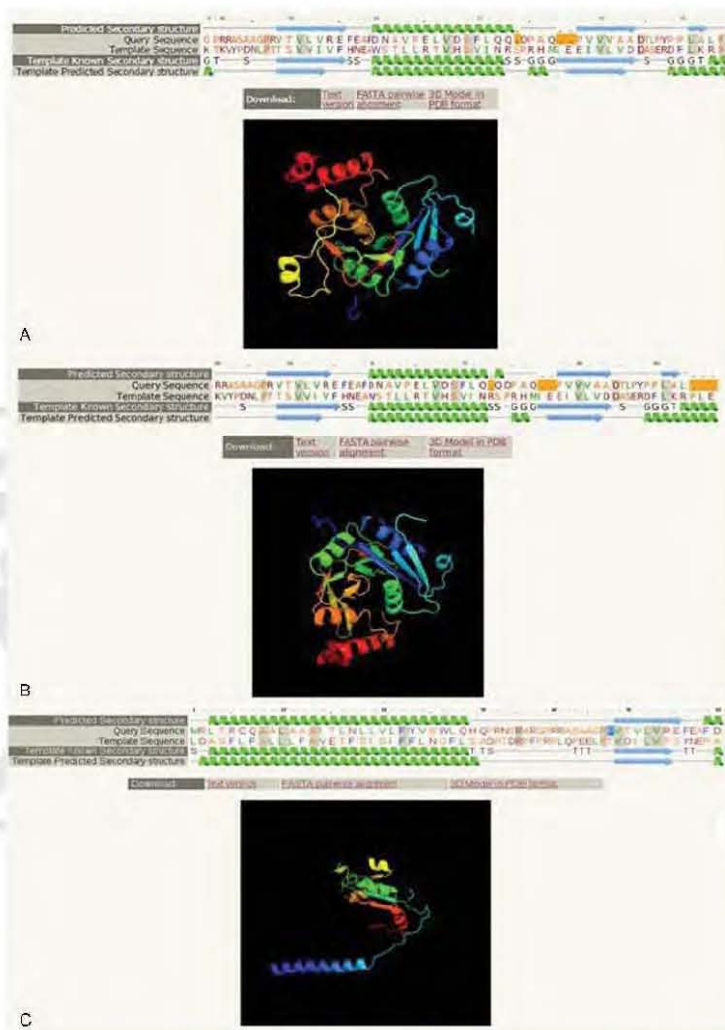


Fig. 4 Protein in silico modeling performed using the Phyre2 program. (A) Tertiary structure modeling of FKRP (reference sequence NP_001034974.1) with the available crystal structure of nucleotide-diphospho-sugar transferase (fold library entry viewer: d1xha2). (B) In silico modeling of the FKRP p.(Arg143Ser) variant with the aminoglycoside nucleotidyltransferase ant(2'')-2 ia, apo form (fold library entry viewer: c4wqkA). (C) In silico modeling of the FKRP p.(Arg48Pro) variant with the cellulose synthase, cellulose translocation-2 intermediate (fold library entry viewer: c4hg6A). The secondary and tertiary structures of the template and predicted protein do not differ for p.(Arg143Ser) variant, as in this position it appears into a α helix on both models (A and B). However, the predicted p.(Arg48Pro) protein differs from the template in terms of its secondary and tertiary structures. The arginine at this position is part of a coil located between an α helix and a β sheet, but the corresponding proline of the mutant is predicted to form part of a β sheet, which distorts the tertiary structure of the resulting protein (A and C). The PDB files for each model are available upon request by e-mail. PDB, program database.

for pathogenicity or benignity¹² did not support either option. Moreover, although the p.(Arg143Ser) allele was absent in our healthy controls; the ExAC database indicates that Latin-American populations have the highest worldwide frequency for this allele, at 3.95%, followed by non-Finnish Europeans (1.73%) and South Asians (0.77%). This agrees with the idea that this is a common and benign genetic variant, however to our knowledge, no individual homozygous for this allele has been listed in the ExAC database or reported in the literature, although at least one previous study documented a compound heterozygous LGMD2I patient with the p.(Arg143Ser) allele plus the *FKRP* VUS p.(Pro358Leu) [rs143031195, RCV000153243.4], but information regarding chromosomal phase was not mentioned.¹⁵ Besides, our protein *in silico* modeling predicted that the encoded change would not give an evident structure modification of FKRP (► Fig. 4). Thus, we consider that there is not enough evidence yet to consider the p.(Arg143Ser) variant as a pathogenic allele.

The second missense *FKRP* variant identified in the heterozygous patient 4 is a novel c.143G > C or p.(Arg48Pro) change with an inconclusive pathogenicity scoring.¹² This allele replaces a basic amino acid (Arg) with a hydrophobic one (Pro) in the predicted stem Golgi luminal domain of FKRP, at a position that is conserved among mammals and fish (*Tetraodon nigroviridis* and zebrafish). Similar to p.(Arg143Ser), p.(Arg48Pro) is located in the first third of the N-terminal domain of FKRP (amino acids 1–157), which seems to be important for the primary homodimerization interface of FKRP.²⁷ However, the further confirmation of dystrophinopathy in this patient suggests that p.(Arg48Pro) could be a coincidental finding of a rare or unique *FKRP* allele, although our protein modeling data (► Fig. 4) indicate that a definite damaging effect for this VUS should not be strictly discarded and deserves further functional²⁷ or animal models studies,²⁸ which could help clarify whether the commonly identified heterozygous genotypes for single missense variants in LGMD2I patients,^{1,2,6,9,15–17,26} could have any modifying or pathogenic role.

Conclusions

Our results indicate that *FKRP*-related disorders should be included as a differential diagnosis in Mexican patients with neuromuscular disorders of unknown etiology, including those resembling dystrophinopathies or congenital muscular dystrophies with normal results on *DMD* gene deletion/duplication analysis. At present, dystroglycanopathies are not routinely assessed in dystrophic muscle biopsies of patients in our country.¹⁰ Thus, molecular study of the *FKRP* gene could be considered a simple, rapid, non-invasive and accessible diagnostic alternative for identifying biallelic pathogenic genotypes. The present work, at least one previous report,¹⁴ and the main genotype databases collectively suggest that in Mexico, such genotypes could mainly represent p.(Asn463Asp) and the common European p.(Leu276Ile) pathogenic variants. Finally, the findings of a single missense VUS in LGMD or α -dystroglycanopathy cases suggest that such changes should be studied further, in the hopes of

defining their role in the etiology of *FKRP*-related disorders and avoiding possible molecular misdiagnoses. The World Wide Web resources that were consulted are provided as ►Supplementary Material, available online-only.^{Q10}

Note

This work was performed at the Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, Mexico.

Acknowledgments

This study was supported by research funding from the Instituto Nacional de Pediatría ("Recursos Fiscales del Programa E022" Modalidad A y B, Ciudad de México, Mexico). We thank Gabriela Cruz-Miranda for her assistance with the *DMD* gene MLPA assays, Dr. Gloria Queipo for her academic mentoring to MJ Navarro-Cobos, Dr. Jazmín Arteaga for the valuable clinical information of patient 4, Prof. Alvar Loria for his critical review of the draft manuscript, and to Dr. Marco A. Tiscareño-García and Dr. Rubén Alba-Medina for the muscle MRI and cardiological evaluations, respectively, of patient 1 and his relatives. MJ Navarro-Cobos is grateful to CONACYT (CVU #403632) for a scholarship and also to Posgrado en Ciencias Biológicas (Biomedicina)-UNAM, as this article is a requirement for her to obtain the Master's degree in Biological Science (Biomedicine Area).

References

- 1 Poppe M, Cree L, Bourke J, et al. The phenotype of limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Neurology* 2003;60(08):1246–1251
- 2 Mercuri E, Brockington M, Straub V, et al. Phenotypic spectrum associated with mutations in the fukutin-related protein gene. *Ann Neurol* 2003;53(04):537–542
- 3 Sveen ML, Schwartz M, Vissing J. High prevalence and phenotype-genotype correlations of limb girdle muscular dystrophy type 2I in Denmark. *Ann Neurol* 2006;59(05):808–815
- 4 Schwartz M, Hertz JM, Sveen ML, Vissing J. LGMD2I presenting with a characteristic Duchenne or Becker muscular dystrophy phenotype. *Neurology* 2005;64(09):1635–1637
- 5 Fu X, Yang H, Wei C, et al. *FKRP* mutations, including a founder mutation, cause phenotype variability in Chinese patients with dystroglycanopathies. *J Hum Genet* 2016;61(12):1013–1020
- 6 Brockington M, Yuva Y, Prandini P, et al. Mutations in the fukutin-related protein gene (*FKRP*) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet* 2001;10(25):2851–2859
- 7 Walter MC, Petersen JA, Stucka R, et al. *FKRP* (826C>A) frequently causes limb-girdle muscular dystrophy in German patients. *J Med Genet* 2004;41(04):e50
- 8 Frosk P, Greenberg CR, Tennese AA, et al. The most common mutation in *FKRP* causing limb girdle muscular dystrophy type 2I (LGMD2I) may have occurred only once and is present in Hutterites and other populations. *Hum Mutat* 2005;25(01):38–44
- 9 de Paula F, Vieira N, Starling A, et al. Asymptomatic carriers for homozygous novel mutations in the *FKRP* gene: the other end of the spectrum. *Eur J Hum Genet* 2003;11(12):923–930
- 10 Gómez-Díaz B, Rosas-Vargas H, Roque-Ramírez B, et al. Immunodetection analysis of muscular dystrophies in Mexico. *Muscle Nerve* 2012;45(03):338–345
- 11 Bermúdez-López C, García-de Teresa B, González-del Ángel A, Alcántara-Ortiz MA. Germinal mosaicism in a sample of families with Duchenne/Becker muscular dystrophy with partial deletions in the *DMD* gene. *Genet Test Mol Biomarkers* 2014;18(02):93–97

- 12 Richards S, Aziz N, Bale S, et al; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(05):405–424
- 13 Fischer D, Walter MC, Kesper K, et al. Diagnostic value of muscle MRI in differentiating LGMD2I from other LGMDs. *J Neurol* 2005;252(05):538–547
- 14 MacLeod H, Pytel P, Wollmann R, et al. A novel FKRP mutation in congenital muscular dystrophy disrupts the dystrophin glycoprotein complex. *Neuromuscul Disord* 2007;17(04):285–289
- 15 Boito CA, Melacini P, Vianello A, et al. Clinical and molecular characterization of patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Arch Neurol* 2005;62(12):1894–1899
- 16 Fernandez C, de Paula AM, Figarella-Branger D, et al. Diagnostic evaluation of clinically normal subjects with chronic hyperCKemia. *Neurology* 2006;66(10):1585–1587
- 17 Guglieri M, Magri F, D'Angelo MG, et al. Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Hum Mutat* 2008;29(02):258–266
- 18 Fanin M, Nascimbeni AC, Aurino S, et al. Frequency of LGMD gene mutations in Italian patients with distinct clinical phenotypes. *Neurology* 2009;72(16):1432–1435
- 19 Magri F, Del Bo R, D'Angelo MG, et al. Frequency and characterization of anoctamin 5 mutations in a cohort of Italian limb-girdle muscular dystrophy patients. *Neuromuscul Disord* 2012;22(11):934–943
- 20 Stehlíková K, Skálová D, Zídková J, et al. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies in the Czech Republic. *BMC Neurol* 2014;14:154
- 21 Hanisch F, Grimm D, Zierz S, Deschauer M. Frequency of the FKRP mutation c.826C>A in isolated hyperCKemia and in limb girdle muscular dystrophy type 2I in German patients. *J Neurol* 2010;257(02):300–301
- 22 Bourteel H, Vermersch P, Cuisset JM, et al. Clinical and mutational spectrum of limb-girdle muscular dystrophy type 2I in 11 French patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80(12):1405–1408
- 23 Stensland E, Lindal S, Jonsrud C, et al. Prevalence, mutation spectrum and phenotypic variability in Norwegian patients with limb girdle muscular dystrophy 2I. *Neuromuscul Disord* 2011;21(01):41–46
- 24 Vieira NM, Schlesinger D, de Paula F, Vainzof M, Zatz M. Mutation analysis in the FKRP gene provides an explanation for a rare cause of intrafamilial clinical variability in LGMD2I. *Neuromuscul Disord* 2006;16(12):870–873
- 25 Schottlaender IV, Petzold A, Wood N, Houlden H. Diagnostic clues and manifesting carriers in fukutin-related protein (FKRP) limb-girdle muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 2015;348(1-2):266–268
- 26 Yamamoto LU, Velloso FJ, Lima BL, et al. Muscle protein alterations in LGMD2I patients with different mutations in the Fukutin-related protein gene. *J Histochem Cytochem* 2008;56(11):995–1001
- 27 Alhamidi M, Kjeldsen Buvang E, Fagerheim T, et al. Fukutin-related protein resides in the Golgi cisternae of skeletal muscle fibres and forms disulfide-linked homodimers via an N-terminal interaction. *PLoS One* 2011;6(08):e22968
- 28 Krag TO, Vissing J. A new mouse model of limb-girdle muscular dystrophy type 2I homozygous for the common L276I mutation mimicking the mild phenotype in humans. *J Neuropathol Exp Neurol* 2015;74(12):1137–1146