



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR CON SECUENCIACIÓN DE  
NUEVA GENERACIÓN Y SU UTILIDAD, EN EL DIAGNÓSTICO Y  
SEGUIMIENTO DE PACIENTES MEXICANOS CON DISTROFIA  
MUSCULAR DE CINTURAS.**

**TESIS**

Que para obtener el título de:  
**ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**

**Presenta:**

Dra. Valentina Martínez Montoya

**Asesores:**

Dra. Maria del Refugio Rivera Vega  
M e C Alejandro Martínez Herrera



Ciudad de México, octubre de 2018.



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**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
E INVESTIGACIÓN**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR CON SECUENCIACIÓN DE NUEVA  
GENERACIÓN Y SU UTILIDAD, EN EL DIAGNÓSTICO Y  
SEGUIMIENTO DE PACIENTES MEXICANOS CON DISTROFIA  
MUSCULAR DE CINTURAS.**

**TESIS  
QUE PRESENTA LA  
DRA. VALENTINA MARTÍNEZ MONTOYA**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**

---

**DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCIA  
TITULAR DEL CURSO  
SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

---

**DRA. MARIA DEL REFUGIO RIVERA VEGA  
TUTOR DE TESIS  
MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA  
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>I. PRESENTACIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>II. COLABORADORES</b> .....	<b>5</b>
<b>III. AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA</b> .....	<b>9</b>
<b>IV ABREVIATURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>V. ANTECEDENTES</b> .....	<b>13</b>
1. HISTORIA.....	13
2. DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS.....	14
3. TEJIDO MUSCULAR.....	14
4. MECANISMOS MOLECULARES DE DAÑO EN LAS DISTROFIAS MUSCULARES.....	20
5. CLASIFICACIÓN DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS.....	26
6. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS.....	28
7. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LOS SUBTIPOS DE DISTROFIAS.....	29
8. LGMD2A Y LGMD2B: GENÉTICA, FISIOPATOLOGÍA Y CLÍNICA.....	30
A. CALPAINOPATÍA.....	30
B. DISFERLINOPATÍAS.....	37
9 DIAGNÓSTICOS DIFERENCIALES EN LAS DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS.....	48
<b>VI. OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>
GENERALES Y ESPECÍFICOS.....	51
<b>VII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>52</b>
<b>VIII. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>53</b>
<b>IX. HIPÓTESIS</b> .....	<b>54</b>
<b>X. METODOLOGÍA</b> .....	<b>55</b>
1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	55
2. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	55

3. TIPO DE MUESTREO.....	55
4. CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	55
A. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	55
B. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	56
5 VARIABLES.....	56
6. MÉTODOS.....	57
A. MÉTODOS Y TÉCNICAS.....	58
<i>SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN.....</i>	<i>59</i>
<i>SECUENCIACIÓN DE SANGER.....</i>	<i>60</i>
B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	62
<b>XI. RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA MUESTRA.....	63
2. HALLAZGOS CLÍNICOS.....	65
3. RESULTADOS DE ESTUDIO MOLECULAR CON NGS PANEL DE 10 GENES.....	68
4. RESULTADOS DE ESTUDIO DE SANGER CONFIRMATORIO.....	74
<b>XII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>83</b>
<b>XIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>XIV. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>95</b>
<b>XV. ANEXOS.....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO I. CLASIFICACIÓN GENÉTICA DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS.....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO II. PRESENTACIONES CLÍNICAS MÁS COMUNES DE LOS SUBTIPOS DE DISTROFIAS.....</b>	<b>123</b>
<b>ANEXO III. ABORDAJE DIAGNÓSTICO DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS.....</b>	<b>124</b>
<b>ANEXO IV. ABORDAJE ACTUAL DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES.....</b>	<b>129</b>
<b>ANEXO V. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LOS PACIENTES.....</b>	<b>131</b>
<b>ANEXO VI. TEST DE ALDA MODIFICADO Y TEST CLÍNICO APLICADO A LOS PACIENTES DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO CON CLÍNICA DE LGMD.....</b>	<b>142</b>
<b>ANEXO VII. REGISTRO INTERNACIONAL DE DISFERLINOPATÍAS PARA PACIENTES : INSCRIPCIÓN OPCIONAL OFRECIDA A LOS PACIENTES.....</b>	<b>149</b>

## I. PRESENTACIÓN

Detrás de cada proyecto de investigación en ciencia siempre existirá una historia. Mi historia comienza cuando descubrí poco después de obtener mi licenciatura en Medicina, que con la Genética podía deleitarme con conocimiento y actividad intelectual pero también podría asombrarme con el diseño y la complejidad de la creación; fuí conciente del el respeto, la admiración y humildad que se debe tener para ser experto en una ciencia como esta. Entendí que no sólo a través de ella podía encontrar una explicación al funcionamiento del ser humano en todas sus áreas, sino también una explicación al complejo diseño divino que nos caracteriza como especie. Comprendí que sin entender esta maravillosa ciencia, no entenderíamos parte del funcionamiento de este mundo que cada día nos sorprende más y lo más importante no entenderíamos lo que somos, lo que podemos llegar a ser y lo que hemos sido desde siempre.

Después en una mañana de consulta clínica en Genética de repente aparece “Melanie”, una paciente que no solo toco mi corazón sino que cambió mi forma de ver como la ciencia sirve y puede servir a la humanidad. Fue en esa mañana de abril de 2016, cuando quise estudiar las distrofias musculares de origen genético, complicadas y extremadamente heterogéneas, pero que con ingenio, disciplina e investigación podrán ser tratadas satisfactoriamente en un futuro; así, los días de debilidad, falta de fuerza, tristeza e impotencia de aquellos que padecen estas condiciones, se convertirán en sonrisas, y agradecimiento a Dios por el hermoso regalo de la vida, y por el cumplimiento de propósitos que antes fueron frustrados desde la misma concepción, a través de la modificación estrafalaria de algo llamado Ácido Desoxirribonucleico.

## II. COLABORADORES

### **MARÍA DEL REFUGIO RIVERA VEGA.**

- Médico adscrito al servicio de Genética Médica.
- Profesor de pregrado y postgrado de Genética Médica.
- Profesor titular del curso de Alta especialidad en Genodermatología. Investigador asociado a Institutos Nacionales de Salud. Miembro del sistema Nacional de Investigadores Nivel I.
- RFC: RIVR560413TB5
- Teléfono: 56899768- 0445554179710
- Correo electrónico: [cuqui\\_rivera@yahoo.com](mailto:cuqui_rivera@yahoo.com)

### **ALEJANDRO MARTÍNEZ HERRERA**

- Biólogo Molecular .
- Doctor en Ciencias con especialidad en Genética y Biología Molecular. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.
- RFC: MAHA760210-160
- Teléfono: 5513923559
- Correo electrónico: [alex\\_mar\\_h@comunidad.unam.mx](mailto:alex_mar_h@comunidad.unam.mx).

### **DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS.**

- Médico Genetista, adscrito Servicio de Genética, Hospital General de México.
- Profesor adjunto del programa de postgrado de Ciencias Biológicas. Investigador asociado C de los Institutos Nacionales de Salud. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel II.
- RFC: CUCS621204.

- Teléfono: 27892000 Ext: 1016.
- Correo electrónico: [sercuevas@yahoo.com](mailto:sercuevas@yahoo.com)

#### **DR. JOSÉ SERGIO ZENTENO VACHERÓN**

- Médico especialista en Neurología, adscrito al Servicio Neurología Hospital General de México.
- Profesor adjunto del programa de postgrado de Neurología Universidad Nacional autónoma de México.
- RFC: ZEV5380521-324
- Teléfono: 56664288

#### **KARINA VILLALBA GUERRERO**

- Técnico laboratorista.
- Servicio de Genética Médica Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga.”
- Teléfono: 5519223250
- RFC: VIGK8404179DA
- Correo electrónico: [villalb@live.com.mx](mailto:villalb@live.com.mx)

#### **DANIEL TORRES MARTÍNEZ**

- Técnico laboratorista.
- Servicio de Genética Médica Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga.”
- Teléfono: 554128709
- RFC: TOMD820620AN4
- Correo electrónico: [danielm99@gmail.com](mailto:danielm99@gmail.com).

## **LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO GENZYME MÉXICO**

- Apoyo con estudio de NGS para pacientes con clínica de Distrofia muscular de cinturas, como parte de protocolo para análisis e identificación de pacientes con enfermedad de Pompe desde el año 2016 hasta el presente.

### III. AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

*A Dios, mi padre, quien le dio sentido a mi existencia y por medio del cual comprendí el más grande amor que pueda existir. Gracias por permitirme ser parte de algo que va más allá de mi propio entendimiento por la oportunidad, la habilidad y el propósito.*

*A Sam mi esposo, quien me enseñó que la nobleza supera los límites del amor, gracias por ser mi aliento, y mi apoyo incondicional, por tu paciencia y amor. Sin ti esto no habría sido posible. Te amo.*

*A mi madre, ejemplo claro de bondad, amor y humildad; me enseñaste siempre a ver lo bueno en otros y a mirar más alto: principalmente a aquel que todo lo sustenta en todo. Ese fue tu mejor legado.*

*A mi familia en Colombia de quienes aprendí el amor genuino y el apoyo, a mi abuelita Q:E:P:D quien incentivó en mí el amor por el estudio y a mi familia en México quienes con su amor me han pulido y amado como una nueva hija.*

*Finalmente dedico esta tesis a mis pacientes, ustedes son la razón de ser de mi profesión, merecen todo mi respeto y admiración.*

*Agradecimientos especiales:*

*Al Hospital General de México y la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de esta gran familia.*

*A la Dra. Maria del Refugio Rivera Vega por su ayuda, paciencia y colaboración para el desarrollo del proyecto desde su inicio.*

*Al M en C Alejandro Martínez Herrera asesor en la parte de Biología Molecular y segundo revisor de tesis, por su paciencia, amabilidad y enseñanza.*

#### **IV. ABREVIATURAS**

##### **A.**

- AAN (*The American Academy of Neurology guidelines for LGMD*): Guías de la Academia Americana de Neurología para Distrofias musculares del anillo óseo.
- AHNAK: nucleoproteína. Proteína asociada a la diferenciación neuroblástica, también conocida como desmoquina. Juega un rol en diversos procesos celulares como en la formación de la barrera hematoencefálica, estructura celular y migración, regulación del canal dependiente de calcio a nivel cardiaco y metástasis de tumores. entre las enfermedades asociadas con esta proteína estas LGMD2B.
- AON: oligonucleótidos anti sentido.

##### **B.**

- BMP4: proteína morfogénica del hueso tipo 4 inhibidora.

##### **C.**

- c-DNA: DNA complementario.
- Ck: creatincinasa .
- CMD1F : miocardiopatía dilatada tipo 1 F.
- Cys: cistidina.
- CMD: distrofia muscular congénita.

##### **D.**

- DNA: ácido desoxirribonucleico.
- DMAT: miopatía distal con compromiso tibial anterior.
- DGC: complejo distrofina- glicoproteína.

##### **E.**

- ECM: matriz extracelular.
- ENMC: European Neuromuscular Center.
- ERGIC : aparato intermedio de Golgi.
- ES: secuenciación del exoma.

##### **F.**

- Fenotipo Erb: fenotipo escapulo humeral de la calpainopatía.

-

**G.**

- GAA: *alfa- glucosidasa ácida o  $\alpha$ -1,4-glucosidasa.*
- Gen CAPN3: (*calcium-activated neutral proteinase 3*) o CAN3\_HUMAN

*Mayúsculas y cursivas: nomenclatura en Humanos.*

*Minúsculas: gen en otras especies.*

- Gen DYSF: (*dystrophy-associated fer-1-like 1*) o DYSF\_HUMAN

**H.**

- His: *histidina.*
- HNRPDL: *ribonucleoproteína heterogénea nuclear tipo D.*

**I.**

- IL4: *interleucina 4.*
- IL6: *interleucina 6*
- IL10: *interleucina 10*
- IHQ: *inmunohistoquímica.*

**K.**

- KB: *kilo bases*
- KDa: *kilodaltones*

**L.**

- LGMD: (*Limb Girdle Muscular Dystrophy*) *distrofia muscular del anillo óseo o de cinturas.*
- LGMD1: *distrofias de cinturas Autosómicas dominantes*
- LGMD2: *distrofia de cinturas Autosómicas recesivas.*

**M.**

- MyoD: *proteína 1 de diferenciación miogénica, pertenece a la familia de las proteínas conocidas como factores reguladores miogénicos (MRFs).*
- MMP9 y MMP2. *metaloproteinasas de matriz. ( Gelatinasa A y B)*
- MuRF1: *proteína muscular en anillo tipo 1.*

## N.

- *NADH-TR: reacción inmunohistoquímica para (nicotinamida adenina dinucleotide tetra-zolium reductase) utilizado para ver la capacidad de oxidación de la fibra muscular.*
- *Ng: nanogramos.*
- *NF-κB: factor nuclear Kappa –Beta*
- *NGS: secuenciación de nueva generación.*

## O.

- *ONOO-: peroxinitrilo.*

## P.

- *Pb: pares de bases*

## R.

- *RNA: ácido ribonucleico.*
- *RNA m: ácido ribonucleico mensajero.*
- *R16/17: repetidos de distrofina similar a espectrina 16 y 17.*
- *RNS: especies de nitrógeno reactivo*
- *RNM: resonancia magnética nuclear.*
- *REL: dominio tipo Rel, que contienen proteínas, pertenecientes al complejo heterodimérico del factor NF-kappa-B entre ellas: REL A/p65, RELB, NFKB1 /p105, NFKB1 /p50, REL, NFKB2/p52 y p65-p50 las más abundante de todas.*

## T.

- *TGFβ1: factor de crecimiento transformante beta1.*
- *TNF: factor de necrosis tumoral*

## W.

- *WWS: síndrome de Walker Warburg*
- *Wtn: vía beta catenina.*
- *WGS: secuenciación del genoma completo*

## V. ANTECEDENTES

### 1. HISTORIA

A inicios de la década de 1950, los Neurólogos Jhon Walton y Fred Nattras en Newcastle Inglaterra, <sup>(1)</sup> fueron los primeros en introducir el término Distrofia muscular de cinturas o (*Limb girdle muscular dystrophy (LGMD)*) para caracterizar a pacientes que presentaban un fenotipo de distrofia muscular proximal e historia familiar sugestiva de un patrón hereditario autosómico, más que ligado al cromosoma X, este último, característico de las distrofinopatías <sup>(2)</sup>. Jhon Walton fue el Neurólogo británico más renombrado en su generación, Walton llegó a Newcastle y entre 1951 y 1956 se convirtió el asesor de investigación de Nattras, lo cual les permitió trabajar juntos estableciendo así la primera clasificación clínica de las distrofias musculares; esta clasificación fenotípica sentaría las bases para estudios posteriores en genética molecular incluso hasta nuestros días <sup>(2)</sup>.

Walton y Nattras, crearon el primer grupo de Distrofia Muscular como un grupo de interés perteneciente al Consejo Central para el Cuidado de Lisiados a mediados de la década de 1950, y posteriormente el grupo fue establecido como una organización benéfica por derecho propio; actualmente es conocido como Centro de Investigación de la Distrofia Muscular Jhon Walton<sup>(3)</sup>. Hasta el momento, gracias a las investigaciones en este centro ya se aprobó el primer tratamiento autorizado para Distrofia muscular de Duchenne por la EMA (*European Medicines Agency*) para contrarrestar las mutaciones sin sentido en el gen *DMD* en la distrofia muscular de Duchenne. A futuro con los ensayos clínicos que están en marcha se podrán anticipar más tratamientos para distrofias musculares de origen genético <sup>(3)</sup>.

Actualmente se han identificado más de 30 subtipos genéticos asociados a la degeneración neuromuscular típica de estas patologías y se continúan identificando nuevas variantes conforme se hace uso de nuevas tecnologías de diagnóstico molecular en Genética <sup>(3)</sup>.

## **DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS.**

### **2. DEFINICIÓN**

Las distrofias musculares del anillo óseo también conocidas como distrofias musculares de cinturas (LGMD *Limb Girdle Muscular Dystrophy*) son desordenes neuromusculares de origen genético, cuya principal característica clínica es la debilidad que afecta los grupos musculares en la región proximal de la cintura pélvica y escapular <sup>(4)</sup>; según el subtipo de distrofia muscular las manifestaciones clínicas pueden variar ampliamente, incluso los pacientes pueden llegar a manifestar síntomas extra musculares o debilidad muscular distal en etapas posteriores de la vida <sup>(4)</sup>. El curso clínico es típicamente progresivo y puede tener diferentes rangos de compromiso desde fenotipos severos, moderados, y hasta leves especialmente en aquellos que cursan con progresión lenta <sup>(5,6)</sup>. Clínicamente estos desordenes se pueden presentar en cualquier rango de edad desde el nacimiento hasta etapas medias o tardías de la vida; frecuentemente se acompañan de niveles séricos elevados de enzimas musculares como la creatincinasa (Ck), y abarcan un alto grado de discapacidad y morbilidad como parte de la evolución natural de la enfermedad.

### **3. TEJIDO MUSCULAR**

#### **A. EMBRIOLOGÍA DEL MÚSCULO**

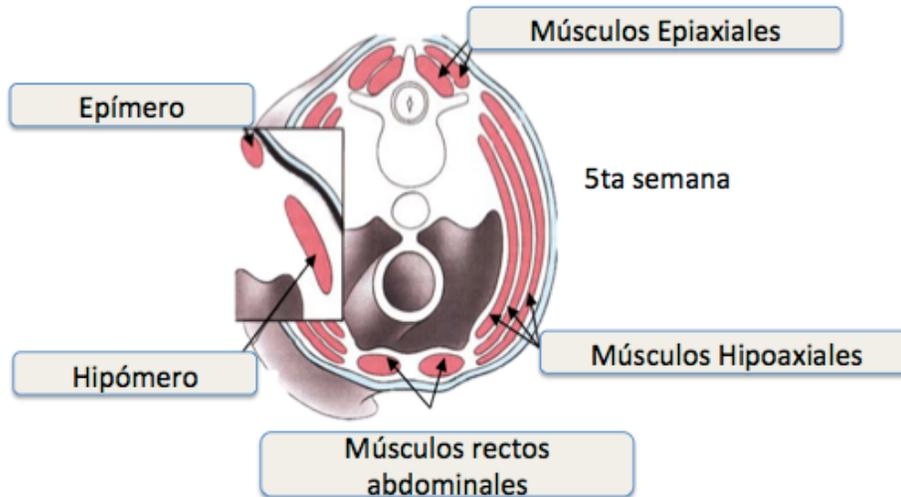
El tejido muscular se origina a partir de la hoja germinativa mesodérmica y esta formado por varios subtipos: músculo cardíaco, esquelético y liso. Los patrones de formación del músculo están regulados por los tejidos conectivos hacia los cuales han migrado los mioblastos. En la parte cefálica estos tejidos derivan de las células de la cresta neural, mientras que en las regiones cervical y occipital provienen del mesodermo somático. La pared corporal y las extremidades se originan en el mesodermo somático <sup>(5)</sup>.

Hacia el final de la quinta semana, las futuras células musculares están agrupadas en dos porciones: una pequeña porción dorsal, el epímero, formado por células dorso mediales de la somita organizadas como miotoma y una porción ventral más grande el hipómero, formado por migración de las células dorso laterales de la somita <sup>(6)</sup>.

Durante este proceso la expresión génica juega un rol fundamental. El Sonic Hedgehog expresado del gen (*SHH*), secretado por la notocorda y la placa del piso del tubo neural, hace que la parte ventral de la somita forme el esclerotoma y exprese *PAX1*, que a su vez controla la condrogénesis y la formación vertebral. Así mismo las proteínas Wnt funcionan como moléculas de señalización de la morfogénesis que provienen de la región dorsal del tubo neural activan *PAX3* que demarca el dermomiótoma. También las proteínas Wnt llevan a la porción dorso medial del somita a expresar el gen músculo específico *Myf5* para la formación de los músculos epiaxiales de la columna vertebral. La musculatura hipaxial (miembro y pared corporal) es derivada de la porción dorso lateral del somita que esta bajo la influencia de proteínas Wnt y la proteína BMP4 inhibidora, las cuales activan la expresión del gen *MyoD* <sup>(5,6)</sup>.

El dermomiótoma epaxial, adyacente al tubo neural y notocorda, da lugar a los músculos profundos de la espalda mientras que el resto de la musculatura del cuerpo y las extremidades se derivan de la extremidad hipoaxial del dermomiótoma. El mesénquima derivado del somita dorso lateral se agrupa y migran hacia los esbozos de las extremidades hacia la séptima semana de gestación para iniciar el desarrollo muscular., allí determinaran bajo la dirección del tejido conectivo las posiciones dorsales y ventrales de las masas musculares y como se formaran inicialmente <sup>(5,6,7)</sup>. (Figura 1)

Figura 1. Miotomo y diferenciación a músculos epiaxiales e ipoaxiales.



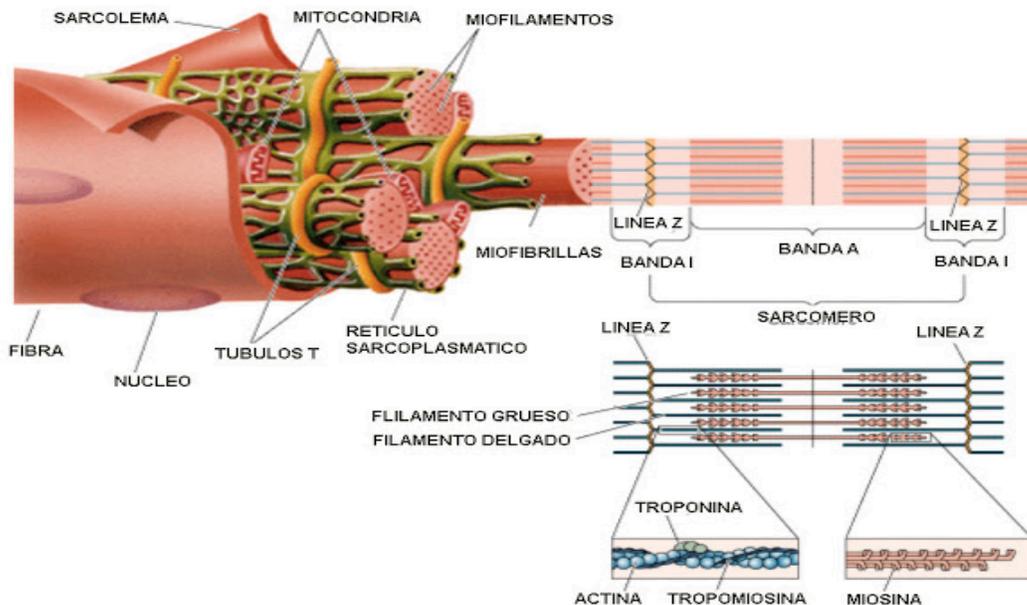
## B. ESTRUCTURA BÁSICA DE LA FIBRA MUSCULAR:

Generalmente el músculo esquelético toma un color rojo o rosa debido a la múltiple vasculatura que presenta, y por la presencia de pigmento de mioglobina. Dependiendo del grado de mioglobina, diámetro de la fibra y número de mitocondrias la fibra muscular se puede clasificar como roja, blanca o intermedia. El músculo esquelético está cubierto por estructuras derivadas de fibroblastos. El endomisio es la primera de ellas se encarga de rodear cada célula muscular de forma individual, el perimisio rodea haces o fascículos de fibras musculares, y finalmente el epimisio rodea a todo el músculo.

En cuanto a la célula muscular, esta se compone de varias estructuras que adquieren un nombre específico en el tejido muscular: la membrana de la célula muscular es el sarcolema; el citoplasma es el sarcoplasma; el retículo endoplásmico liso se conoce como retículo sarcoplásmico y las mitocondrias como sarcosomas. A las células musculares al ser más largas que anchas también se les conoce como fibras musculares <sup>(7,8)</sup>.

En el músculo esquelético, las fibras musculares se componen de varias miofibrillas cada una de 1 a 2 mm de diámetro y se alinean con precisión y orden con respecto a las demás. Esta disposición ordenada es la que origina las estriaciones transversales del bandeado claro y oscuro características del este tipo de músculo. (Figura 3). Las bandas oscuras se denomina bandas A, (Anisótropas a la luz polarizada) y las bandas claras de denominan bandas I ( Isótropas a la luz polarizada); a su vez el centro de las bandas A esta ocupada por un área pálida conocida como banda H interceptada por una línea delgada conocida como línea M. En la banda I o clara una línea delgada divide a esta y se conoce como banda Z. Es importante conocer que la región de la miofibrilla entre dos discos z sucesivos se conoce como sarcómera y se considera la UNIDAD CONTRÁCTIL de las fibras de músculo esquelético <sup>(7,8)</sup>. Durante la contracción muscular las bandas tienen un comportamiento específico. Las bandas I se estrechan, la H se extingue, y los discos Z se acercan entre si aproximando las bandas A y I.

Figura 2. Composición y distribución de la fibra muscular y la unidad contráctil :



Fuente: Noat, perfil V.fisiología del tejido miofascial y los ´distintos tipos de contracción muscular´.[Internet]. Elongacionporbiomecanica.blogspot.mx. 2018 [cited 28 March 2018]. Available from: <http://elongacionporbiomecanica.blogspot.mx/2010/02/el-musculo-biomecanica-muscular-y.html>

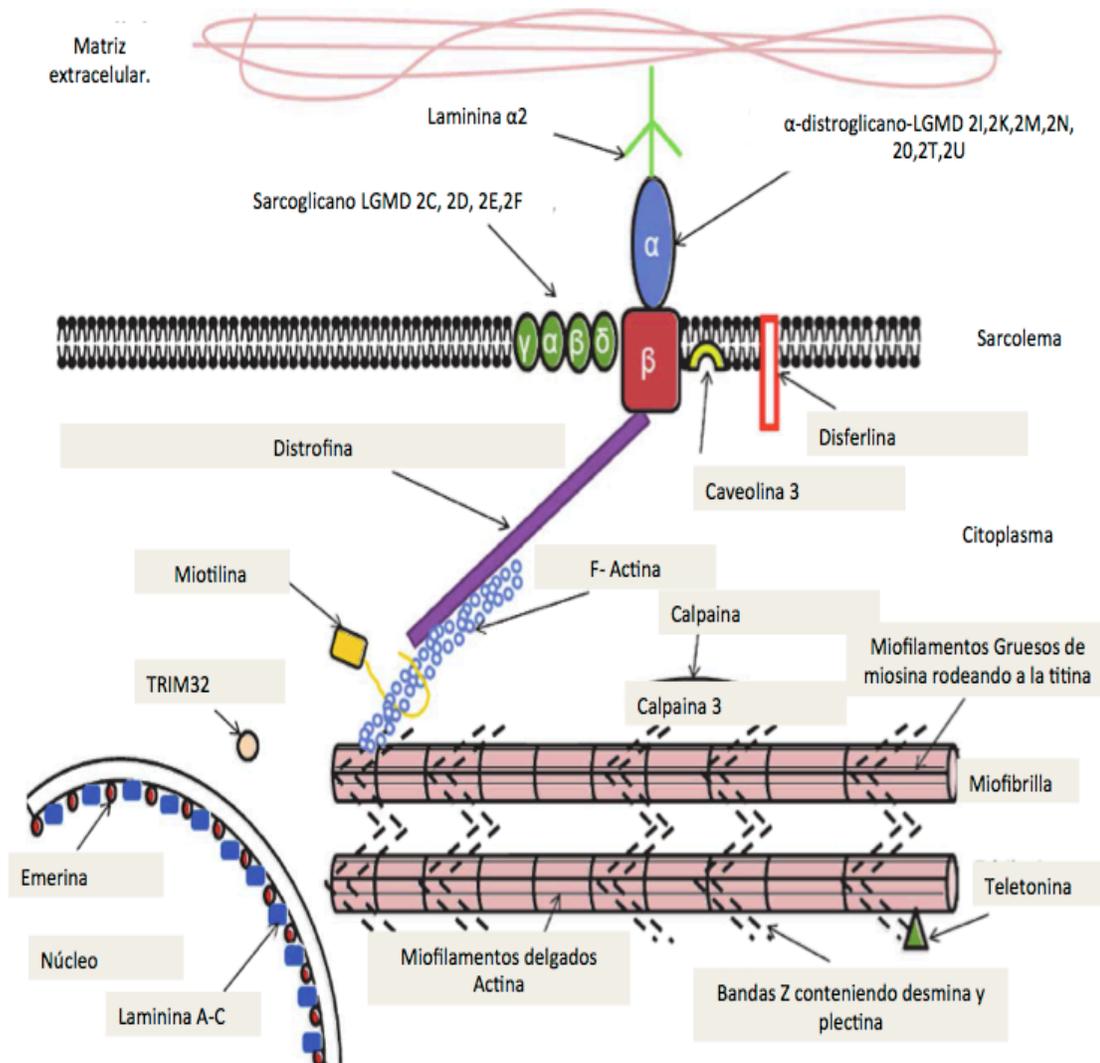
La membrana celular de la fibra muscular o sarcólema tiene una conformación única con respecto a otras membranas celulares. Una de sus características es que

esta constituida por invaginaciones que llegan a la zona central entre las bandas A y I estructuras que se denominan túbulos T. Estos túbulos permiten una rápida despolarización a lo largo del sarcolema. Con este sistema el sarcolema esta en comunicación directa y cercana con el retículo sarcoplásmico el cual almacena grandes cantidades de calcio intracelular. Este retículo forma una red alrededor de cada miofibrilla, y tienen cisternas dilatadas terminales en cada unión A-I. (2 cisternas terminales flanquean cada túbulo T). Estas cisternas contienen canales de calcio reguladas por voltaje; esta disposición estructural permite que ante cualquier estímulo la señal sea casi instantáneamente transmitida a la totalidad de la célula por el mecanismo de despolarización <sup>(7,8)</sup>.

Para la organización estructural de las miofibrillas dentro de la fibra muscular es necesaria la participación de muchas proteínas como la miosina y la actina que componen los miofilamentos gruesos y delgados respectivamente, e intervienen en la contracción muscular a través del modelo de deslizamiento de filamentos. Otras proteínas y enzimas ya se han caracterizado ampliamente hasta la fecha y se han convertido en blancos para el funcionamiento, reparación, control de daño y supervivencia del músculo, por lo cual han sido objetos de estudio, para explicar la génesis y la fisiopatología de las distrofias musculares. Actualmente se conocen más de 30 elementos afectados en las distrofias de origen genético. Las distrofias de origen genético en su mayoría alteran la estructura y por lo tanto el funcionamiento de elementos importantes en la fisiología muscular, lo cual explica la amplia diversidad de fenotipos que caracterizan a esta patologías y las múltiples vías moleculares afectadas según el subtipo genético <sup>(8)</sup>.

A continuación se muestran la organización de las proteínas comúnmente afectadas en las distrofias musculares (Figura 4).

Figura 4. Organización de las proteínas asociadas a distrofias musculares en la célula muscular.



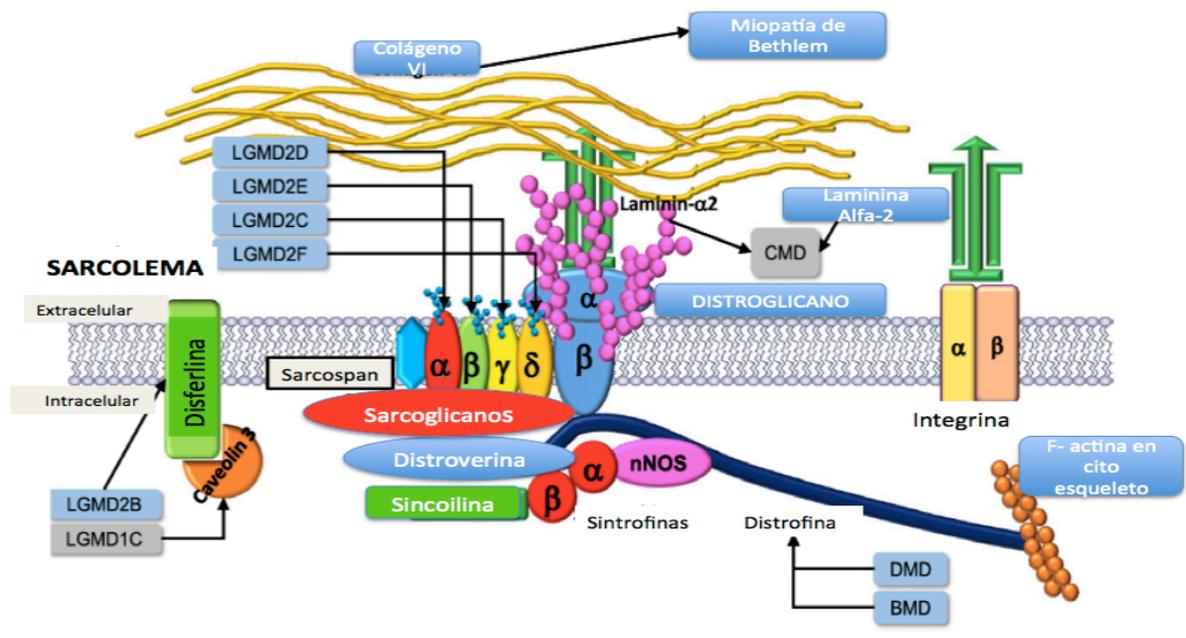
Fuente: (tomada de Murphy A, Straub V. The Classification, Natural History and Treatment of the Limb Girdle Muscular Dystrophies. Journal of Neuromuscular Diseases. 2015;2(s2):S7-S19).

Figura 4. El complejo de la glicoproteína- distrofina en el sarcolema vincula la matriz extracelular al cito esqueleto de F-actina vía laminina 2.( Complejo distroglicano- distrofina). Los sarcoglicanos forman un subcomplejo vía sarcospan. Otras proteínas asociadas a LGMD se encuentran en otras partes del sarcolema (disferlina, caveolina), en el citosol (calpaína-3, trim-32) o la lámina nuclear (lamina A / C) <sup>(9)</sup>.

#### 4. MECANISMOS MOLECULARES DE DAÑO EN LAS DISTROFIAS MUSCULARES

La causa primaria de la mayoría de las formas conocidas de distrofia consisten en mutaciones en genes que codifican una amplia variedad de proteínas del músculo, incluyendo: proteínas que hacen parte de la matriz extracelular (ECM), proteínas transmembranales, proteínas asociadas a membrana, enzimas citoplasmáticas y proteínas de la matriz nuclear. Se sabe que las formas más severas de distrofia muscular se producen debido a mutaciones en los componentes del complejo *distrofina-glicoproteína* (DGC) un punto clave que esta localizado en el sarcolema y que provee una estabilidad mecánica a la fibra muscular <sup>(10)</sup>. (Figura 5). El principal mecanismo afectado en las distrofias musculares es la disrupción sarcolemal <sup>(11)</sup>.

Figura 5. Complejo distroglicano-glicoproteína Representación esquemática del complejo distrofina-glicoproteína, (DGC) y otras proteínas sarcoplásmicas envueltas en las LGMD.



Fuente: Nigro V, Piluso G. Spectrum of muscular dystrophies associated with sarcolemmal-protein genetic defects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(4):585-5

- **Mecanismos de daño muscular en modelos desarrollados en ratones:**

#### **A. DISRUPCIÓN DE LA CONEXIÓN ENTRE EL CITO ESQUELETO Y LA MATRIZ EXTRACELULAR.**

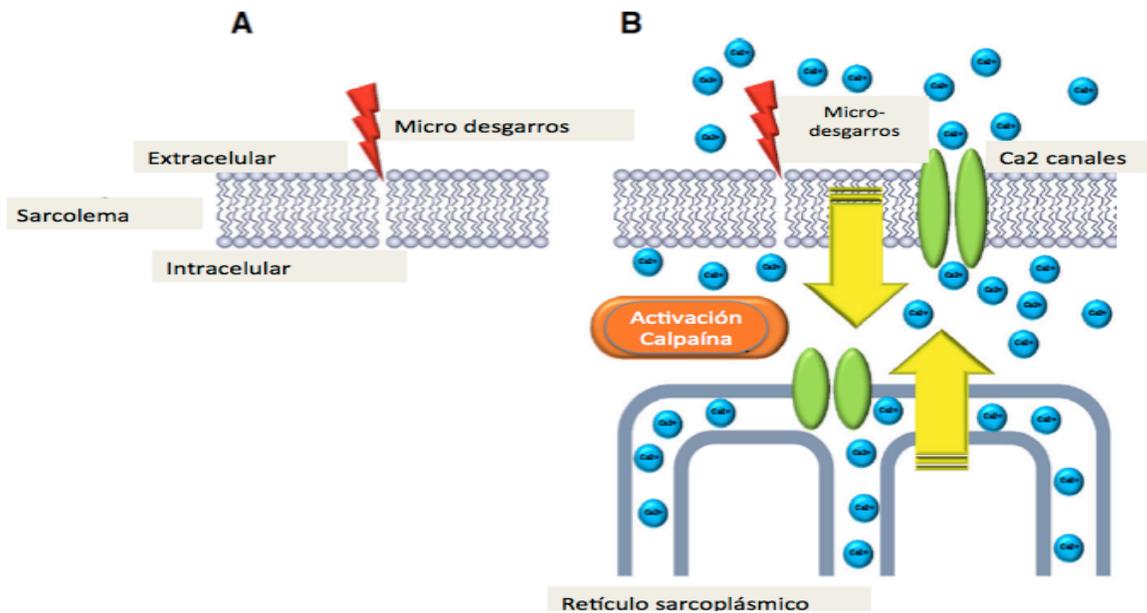
##### **➤ INESTABILIDAD DE LA MEMBRANA E INFLUJO DE CALCIO**

La principal causa de la fisiopatología relacionada con inestabilidad de la membrana dentro de este grupo, es la ausencia o una estructura anormal de la proteína distrofina, lo cual resulta en una reducción o ausencia completa de los compuestos remanentes del DGC de la membrana y como consecuencia una alteración en el mecanismo fisiológico de respuesta frente al estrés muscular debido a una inestabilidad en el sarcolema. Esto desestabiliza la transmisión de fuerzas laterales lo cual genera un aumento del número y tamaño de las “lágrimas sarcolemales” o micro desgarros sarcolemales; esto explica el paso de proteínas séricas no hidrofóbicas que atraviesan la barrera lipídica al exterior reflejado en aumento de los niveles séricos de las mismas <sup>(11,12)</sup>. Se cree que este mecanismo es mediado por el calcio.

La entrada de calcio a la célula muscular puede mediar la activación de vías moleculares que llevan a distrofia. La entrada masiva de calcio a su vez activa a la calpaína y altera el equilibrio de las proteínas musculares lo cual conlleva a degeneración muscular y muerte celular dando lugar a distrofia muscular. Finalmente en respuesta al proceso inflamatorio crónico, el intento de recuperar la fibra muscular genera reemplazo de este por tejido conectivo y tejido adiposo <sup>(8)</sup>. Se sabe que el óxido nítrico (ON) es una molécula que regula múltiples funciones en la fibra muscular, cuando se pierde la integridad del sarcolema esta molécula es removida del sarcolema y aparece en su forma reducida en el citosol. La molécula R16/17 con dominios tipo espectrina junto a sintrofina, convergen en el sarcolema junto al ON. Cuando existe mutaciones en estas moléculas tipo deleciones se

asocian a fenotipos más severos de distrofia debido a la inducción de isquemia funcional <sup>(10,11,12)</sup>. (Figura 6).

Figura 6. Micro desgarros sarcolemales e influjo de calcio masivo a la fibra muscular



Fuente: Nigro V, Piluso G. Spectrum of muscular dystrophies associated with sarcolemmal-protein genetic defects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(4):585-593.

## B. RESPUESTA INFLAMATORIA Y SU ROL EN EL DAÑO MUSCULAR:

El infiltrado inflamatorio muscular puede verse incluso mucho antes de que aparezcan las manifestaciones clínicas en el paciente. Este infiltrado es acumulativo, y siempre y cuando exista fibra muscular, este seguirá avanzando conforme evoluciona la enfermedad. La respuesta inflamatoria en el músculo juega un rol fundamental en el proceso de degeneración muscular, y su progresión. En condiciones fisiológicas existe un balance entre los macrófagos pro inflamatorios denominados M1 y los macrófagos antiinflamatorios M2, siendo un mecanismo crítico para el proceso de degeneración / regeneración del músculo <sup>(12)</sup>.

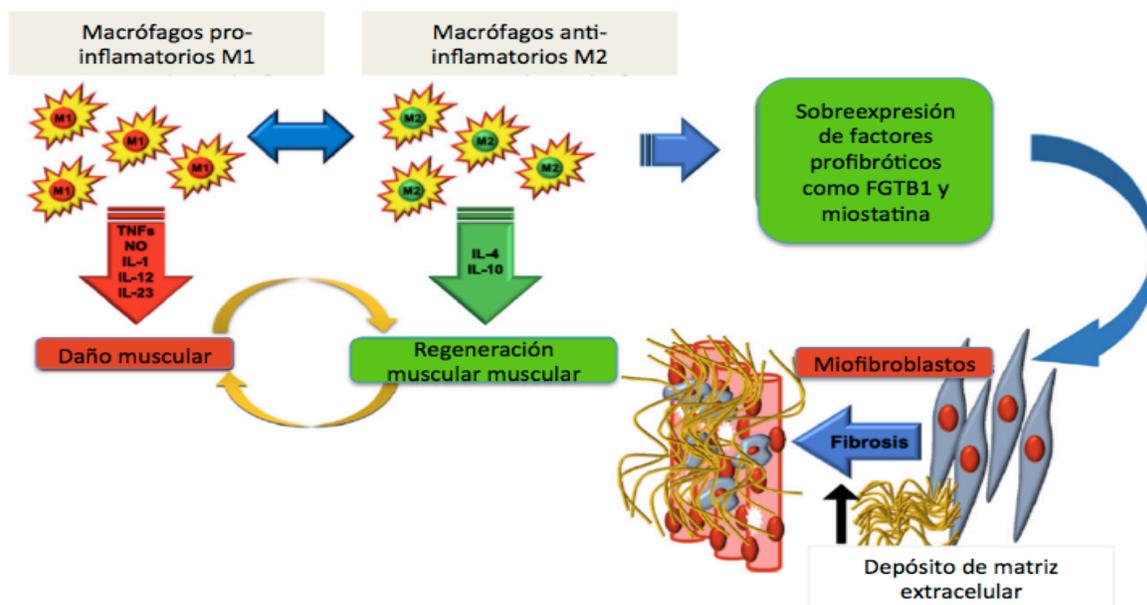
En la distrofia muscular, las poblaciones residentes de fagocitos mononucleares no puede responder adecuadamente al estrés tisular y los monocitos ingresan al

músculo lesionado y se diferencian en un espectro de fagocitos mononucleares tipo M1. Las células recién reclutadas son pro inflamatorias y secretan múltiples mediadores como el factor de necrosis tumoral (TNF), óxido nítrico (NO) y la interleucina 1. (L-1). Otros mediadores incluyen IL-12 e IL-23, que son decisivos para influir en la polarización de las células TH1, que conducen aún más respuestas inflamatorias. Los macrófagos M1, también realizan fagocitosis de miofibrillas lesionadas y luego presentan antígenos a las células T para inducir su activación; producen oxígeno y especies de oxígeno reactivo incluyendo el superóxido y el ON los cuales son tóxicos para el músculo. Tanto el TNF- $\alpha$  como el IFN- $\gamma$  son dos citoquinas inflamatorias producidas tanto por los macrófagos M1 como por las células del músculo esquelético que inhiben la transición de M1 a M2.

Al contrario, entre mayores niveles de macrófagos M2, (antiinflamatorios) existan en la fibra muscular mayores son las posibilidades de regeneración y fibrosis; se ha visto que en modelos animales existe mayor proliferación de células satélites y regeneración muscular en fibras musculares donde la población de M2 es más abundante <sup>(12)</sup>.

Existen citosinas antiinflamatorias como la IL4 e IL10 que promueven la activación de M2, y la subsecuente regeneración muscular. En un estudio de modelos de distrofia en ratones, realizados por Y. Nitahara y colaboradores, encontraron que posterior a la ablación de la expresión de IL10, los ratones desarrollaban severo compromiso cardiaco y respiratorio <sup>(13)</sup>. El destino final de las distrofias musculares finalmente se evidencia en la aparición de fibrosis progresiva que daña la función residual de contracción, fuerza y elasticidad. La fibrosis es la complicación más común de las distrofias e impone un reto terapéutico a futuro incluso con tratamiento a base de terapia génica. La fibrosis ocurre como consecuencia de la inflamación crónica y envuelve vías de activación del TGF $\beta$  y miostatina. Medicamentos con blanco terapéutico dirigido contra el TGF $\beta$ 1, son motivo de estudio en este momento <sup>(12, 13)</sup>. (Figura 7).

Figura 7. Rol de los macrófagos M1 y M2 en el proceso de inflamación muscular y vías profibróticas en el músculo con distrofia.



Fuente: Nigro V, Piluso G. Spectrum of muscular dystrophies associated with sarcolemmal-protein genetic defects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(4):585-593.

### C. SEÑALIZACIÓN DEL NF- $\kappa$ B

Hasta el momento se sabe que el NF- $\kappa$ B es uno de los mayores mediadores del daño muscular en las distrofias musculares. La familia del NF- $\kappa$ B contienen 5 miembros; RelA también conocido como P65, RelB, c-Rel, p105/p50 y p100/p52 los cuales forman homo y heterodímeros. Aunque el NF- $\kappa$ B es un factor esencial para la supervivencia celular aun faltan estudios que puedan corroborar un rol directo en el daño muscular. Se han propuesto 3 mecanismos diferentes por los cuales la activación del factor induce pérdida muscular, tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones de estrés. El primer mecanismo propuesto es el aumento de la expresión de varias proteínas involucradas en los procesos de ubiquitinación vía proteosoma incluyendo la ubiquitin-ligasa tipo 3, MuRF1 la cual estimula la pérdida de músculo esquelético. En el segundo mecanismo el factor NF- $\kappa$ B incrementa la expresión de muchas citosinas pro inflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión celular y enzimas que degradan la matriz celular las cuales

en conjunto aumentan la pérdida de músculo esquelético. El tercer mecanismo propuesto es el bloqueo de la regeneración de miofibrillas en respuesta a la lesión muscular <sup>(10)</sup>.

#### **D. ESTRÉS OXIDATIVO**

El estrés oxidativo es un importante agente de desgaste muscular y de la activación del NF- $\kappa$ B en las distrofias musculares. El estrés oxidativo, puede producir aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y ON. Este estrés primario oxidativo se convierte a especies de oxígeno reactivos secundarios (ROS) y reactiva especies de Nitrógeno (RNS) como el radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>) y el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Los niveles elevados de ROS y RNS pueden dañar las membranas lipídicas, proteínas estructurales y regulatorias, y el DNA. En el músculo distrofico se han reportado hallazgos de incremento en los niveles de peroxidación lipídica y proteica sobre todo en paciente con DMD, y se ha corroborado estos mismos hallazgos en modelos animales de distrofia muscular <sup>(14)</sup>.

#### **E. METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ**

Las proteinasas de la matriz extracelular son una familia de endopeptidasas dependientes de Zinc que juegan un importante rol en la degradación de la matriz extracelular, inflamación, fibrosis, y activación de las citoquinas latentes y moléculas de adhesión en varios estados patológicos. En diferentes estudios de modelos en animales del daño en la fibra muscular, las metaloproteinasas más expresadas son MMP9 y MMP2, (gelatinasa A y B), implicadas en la fisiopatología de miopatías inflamatorias. Se ha observado que los niveles de MMP9 se empiezan a incrementar progresivamente alrededor del día 10 con un pico hacia los 25 días, hasta los 2 meses, su incremento posiblemente genera modificaciones postraduccionales de proteínas estructurales en las miofibrillas, y disminución de los niveles del Beta- distroglicano y utropina; de hecho el beta-distroglicano es un blanco de la MMP9 y se ha encontrado fragmentos de este en las sarcoglicanopatías <sup>(10, 15)</sup>.

## F. AUTOFAGIA

La autofagia es un mecanismo celular, que se ha sido vinculado a la supervivencia muscular, por lo tanto un defecto en esta se ha visto relacionada a mayor progresión del daño muscular y patologías como miopatía de Bethlem y distrofia muscular congénita de Ulrich. Sin embargo los resultados hasta el momento son controvertidos; por ejemplo mientras la ausencia de un mecanismo de autofagia integro puede estar asociado a miopatía de Bethlem, un mecanismo integro de autofagia muscular puede estar en relación con efectos deletéreos en otros tipos de distrofias musculares, incluso la reducción de la autofagia en modelos animales con 3 -metiladenina puede reducir cambios como fibrosis, apoptosis e incluso aumentar la regeneración muscular y masa muscular <sup>(10)</sup>.

## G. MIOSTATINA

La miostatina es miembro de la superfamilia de citosinas TGF— $\beta$  las cuales regulan negativamente la masa muscular interviniendo en las vías que se activan en procesos de fibrosis muscular. La neutralización de esta molécula se ha visto en relación con incremento del crecimiento muscular, y su desarrollo, por lo que se ha propuesto como blanco terapéutico para distrofias musculares a futuro; también se han visto que su neutralización genera aumento en la proliferación y diferenciación de los mioblastos <sup>(10)</sup>.

## 5. CLASIFICACIÓN DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS

Existen actualmente 30 subtipos de distrofias musculares caracterizadas con las nuevas herramientas de Biología Molecular como la técnica de Secuenciación de Nueva generación (NGS), la cual ha permitido tener grandes avances en el conocimiento de estas patologías <sup>(16)</sup>. Los análisis moleculares han demostrado múltiples mutaciones causales en genes que codifican una amplia gama de proteínas involucradas en todos los aspectos de la biología celular y funcional del músculo esquelético, siendo el principal mecanismo molecular la pérdida de la conexión y relación entre los componentes de la matriz extracelular y la actina del

cito- esqueleto en la fibra muscular <sup>(16,17)</sup>; sin embargo existen múltiples mecanismos que conllevan a la distrofia y estos dependen del origen genético de la misma.

Todas las distrofias musculares de cinturas tienen un origen genético. Se dividen en dos grandes grupos dependiendo del patrón autosómico de herencia que presente: LGMD1: o distrofias dominantes y LGMD2: o distrofias recesivas. A su vez cada grupo tiene subdivisiones dependiendo de la alteración genética identificada y el mecanismo molecular implicado <sup>(18)</sup>. Las formas recesivas de distrofias musculares predominan tanto en prevalencia individual como en el número de subtipos, sin embargo algunas son extremadamente raras y se han descrito solo en ciertos grupos familiares; existe también variación en la prevalencia regional debido a efectos fundadores en varias poblaciones <sup>(18)</sup>.

La clasificación actual de las distrofias musculares de cinturas LGMD, es basada en 2 parámetros:

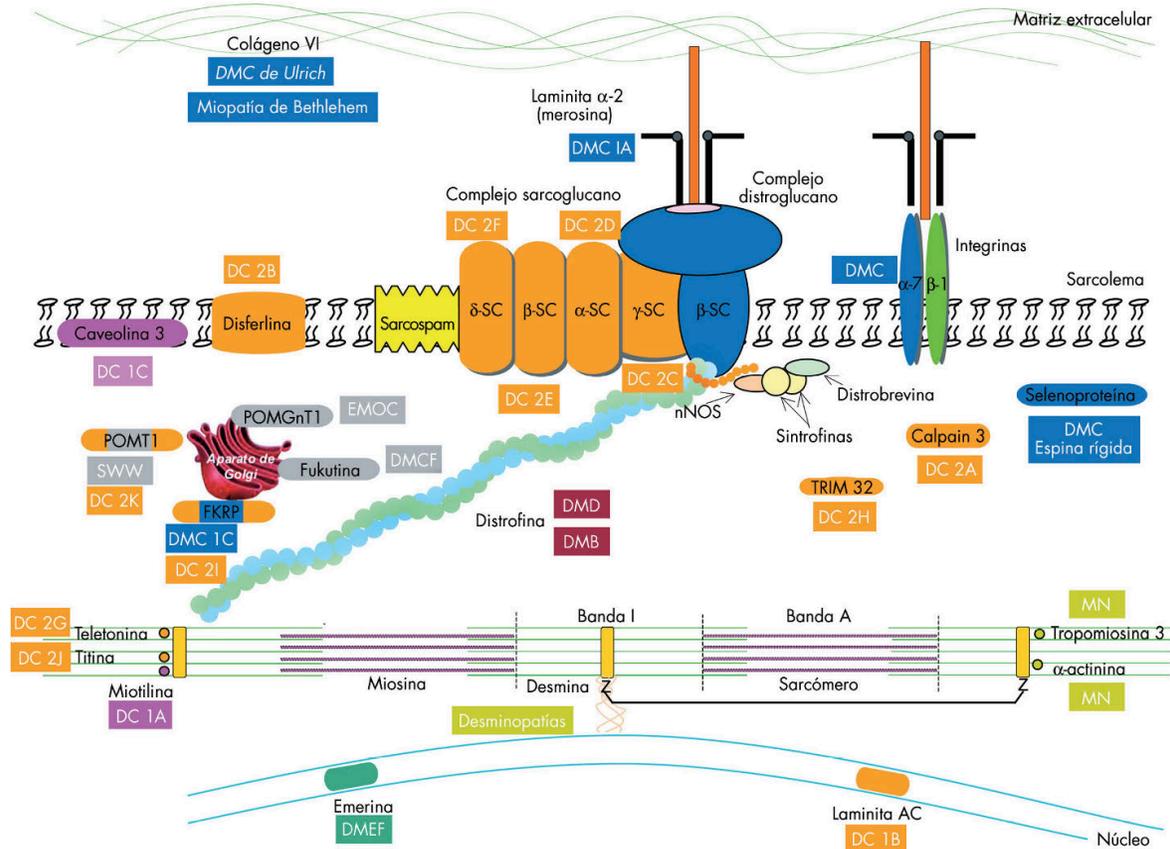
- A. FORMA DE HERENCIA : LGMD1: Dominantes. (*Loci* dominante). LGMD2: Recesivas. (*Loci* recesivo).
- B. LETRAS CONSECUTIVAS SEGÚN ORDEN ALFABÉTICO DE ACUERDO A COMO SE FUERON IDENTIFICANDO LOS GENES RESPONSABLES: conforme se fueron mapeando e identificando los genes a través de las técnicas moleculares. ( A, B, C, D, E, F ) etc.

Debido a que el grupo de distrofias recesivas se ha alcanzado el total de las letras designadas para los subtipos, actualmente la nomenclatura actual esta siendo revisada por ENMC, (*European Neuromuscular Center*); se cree que en un futuro no muy lejano esta clasificación será cambiada. Actualmente algunas distrofias con características clínicas particulares se clasifican con nombres.

Existen múltiples genes relacionados con la Distrofia, hace 10 años se conocían solo 16 *locis*, actualmente con la técnicas moleculares de Secuenciación de Nueva generación se han identificado 31 *loci*: 8 para formas dominantes y 23 para formas

recesivas. Para ver la clasificación genética de las distrofias musculares revisar (Anexo I).

Figura 8. Representación de proteínas y estructuras moleculares asociadas a los diferentes subtipos de LGMD en la célula muscular.



Fuente: Jornadas de Actualización de Neurología 22 de Junio 2013 Enfermedades Neuromusculares Miopatías hereditarias en el Uruguay de hoy - PDF [Internet]. Docplayer.es. 2018 Available from: <http://docplayer.es/18621552-Jornadas-de-actualizacion-de-neurologia-22-de-junio-2013-enfermedades-neuromusculares-miopatias-hereditarias-en-el-uruguay-de-hoy.html>

## 6. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS

En cuanto a la frecuencia de las distrofias musculares genéticamente confirmadas aún hay mucho por descubrir. La distrofia más común de aparición en el adulto y que presenta debilidad muscular en cinturas es la distrofia muscular de Becker con una incidencia de 1 en 30,000 recién nacidos masculinos y una prevalencia estimada en 2,38 a 7,29 por 100,000 habitantes. Otras distrofias pertenecientes al grupo LGMD, al ser raras tienen una prevalencia estimada de 0, 7 por 100,000

habitantes (LGMD2D y LGMD2E) a 0,43 por 100,000 (LGM2I). La frecuencia de algunas distrofias musculares esta basada en revisiones en poblaciones, por ejemplo LGMD2C es muy común en Roma y en la población de Túnez, con una prevalencia de 0,13 por 100. 000 habitantes <sup>(17)</sup>. En otras poblaciones como China y Australia las disferlinopatía (LGMD2B) y la calpainopatía (LGMD2A) son las más prevalentes en la población mientras que la (LGMD2I) es rara <sup>(18)</sup>.

En general se considera que la prevalencia global de las distrofias musculares de cinturas a nivel mundial oscila entre 1: 14,500 a 45,000 dependiendo de la población geografía y grupo étnico de origen estudiado. Aproximadamente el 10% corresponden a formas dominantes y dentro de este grupo los subtipos 1A a 1C abarcan el 90% de los casos, mientras que los subtipos 1D a AI son muchos mas raras en frecuencia y se han identificado solo en subgrupos de familias. Las formas recesivas continúan siendo mayor en prevalencia constituyendo cerca del 90% de los casos <sup>(19)</sup>.

En México actualmente se desconoce la prevalencia de este tipo de patologías y solo se conoce parcialmente el perfil génico de mutaciones en *CAPN3 calpainopatía*, en una población mexicana con alta prevalencia de esta entidad <sup>(20)</sup>.

## **7. MANIFESTACIONES CLÍNICAS PREDOMINANTES SEGÚN LOS SUBTIPOS DE DISTROFIAS:**

Para obtener más información sobre los fenotipos clínicos comunes a los subtipos de distrofias ver (Anexo II).

## 8. LGMD2A y LGMD2B

### A. CALPAINOPATÍA

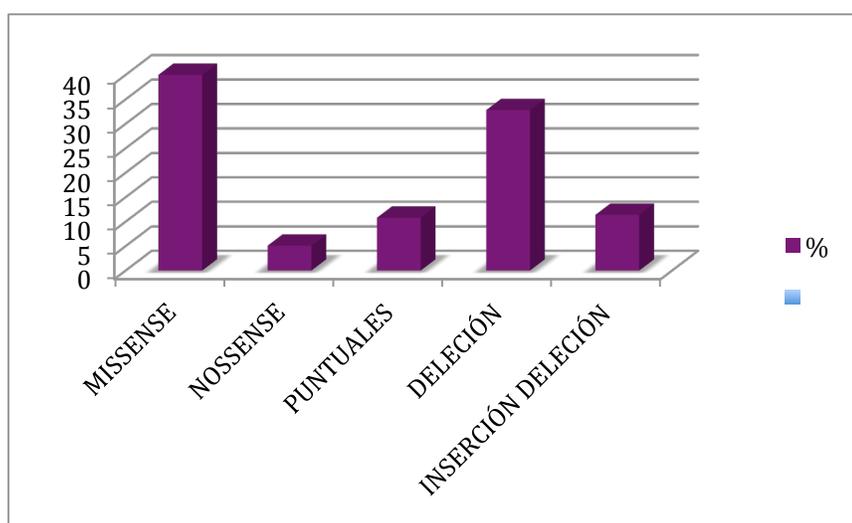
La calpainopatía o LGMD2A fue la primera distrofia muscular localizada por análisis de ligamiento <sup>(21)</sup>. Ha sido reportada como la distrofia muscular recesiva más frecuente en los grupos de poblaciones estudiadas con clínica de distrofia de cinturas.

El gen responsable de esta patología es el *CAPN3*, el cual fue identificado por análisis de ligamiento en el *locus* 15q15.1-15.3 en el cromosoma 5 y posteriormente clonado en el año 1995 <sup>(22)</sup>. El gen comprende 53 Kb de secuencia genómica, esta compuesto por 24 exones y codifica una proteína muscular específica de 94 KDa denominada calpaína <sup>(23)</sup>. Esta proteína no estructural con función tipo proteasa dependiente de calcio esta implicada en el proceso contráctil del músculo y esta ligada fuertemente a la titina; también, participa en mecanismo de reparación del cito esqueleto, en el mantenimiento de la estructura de las miofibrillas y puede estar envuelta en activación de factores de transcripción que están en relación con activación de genes de supervivencia y apoptosis celular. La calpaína tiene localización nuclear con un importante roll en la regulación de factores de transcripción que controlan la estabilidad muscular mediante la regulación de procesos como la apoptosis <sup>(24)</sup>.

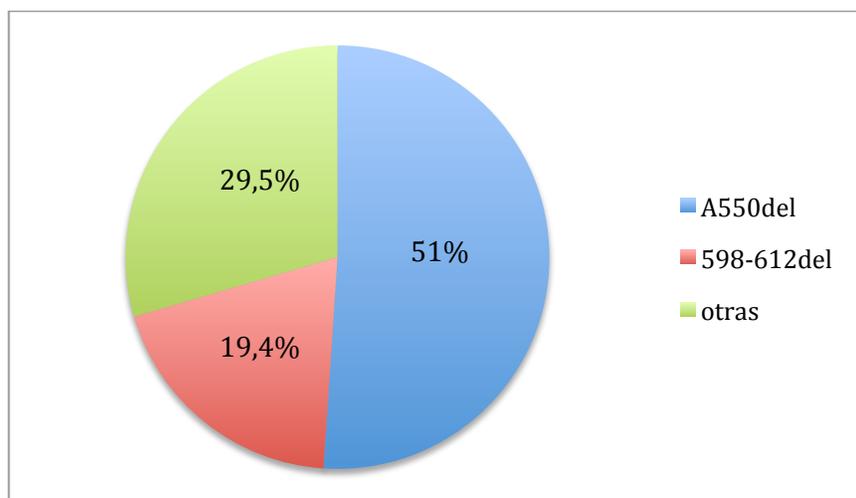
La calpaína que esta involucrada en la génesis de la distrofia muscular de cinturas LGMD2A, es del subtipo 3, que es músculo específica y se denomina: calpaína 3-proteasa (proteasa neutral activada por calcio-3; EC·4.22.17); la calpaína tipo 3 interviene principalmente en el remodelamiento del sarcómero <sup>(25)</sup>. Se han reportado mutaciones tanto exónicas como intrónicas y en regiones no codificantes a lo largo del gen. Se cree que el 40% corresponden a mutaciones missense, el 32,8% corresponde a deleciones y el 10.8% a mutaciones puntuales <sup>(25, 26, 27)</sup>.

Figura 9. Mutaciones en el gen CAPN3 más frecuentes y su incidencia.

TIPOS DE MUTACIÓN EN CAPN3				
Mutaciones Missense	Mutaciones Nonsense	Mutaciones puntuales	Mutaciones por deleción	Mutaciones por Inserción-Deleción
40%	5,10%	10,80%	32,80%	11,40%



PORCENTAJE DE MUTACIONES POR DELECIÓN EN CAPN3



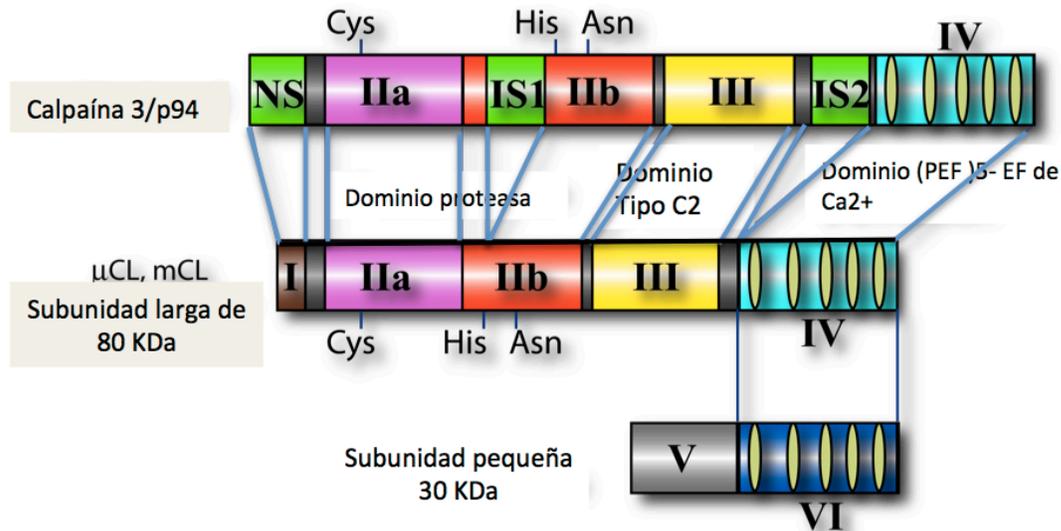
Fuente: CaMPDB :: Calpain :: Overview [Internet]. Calpain.org. 2018 Available from: <http://calpain.org/overview.rb?cls=calpain>.

## 1) GENÉTICA Y FUNCIÓN DE LA CALPAÍNA 3 ESPECÍFICA MUSCULAR. CAPN3.

La proteína CAPN3/p94 músculo específica, contiene 3 regiones específicas para su funcionamiento, estas regiones se conocen como NS, IS1 y IS2. La  $\mu$ -calpaína and m-calpaína se conocen como calpaínas convencionales. Estas consisten en una subunidad catalítica ( $\mu$ CL o mCL) y una unidad pequeña regulatoria de 30 K. La proteína músculo específica calpaína 3, p94/CAPN3 es altamente similar en composición con respecto a la subunidad  $\mu$ CL y mCL pero tienen 3 regiones características denominadas NS, IS1 e IS2 <sup>(26)</sup>.

El dominio N-terminal, con poca homología. IIA y IIB: los subdominios tipo proteasa que contienen los sitios activos *Cys e His* respectivamente; III: el dominio C2: denominado dominio de unión como calcio IV y VI: El dominio de unión mano-EF de calcio. V: Dominio hidrofóbico rico en glicina <sup>(26)</sup>. (Figura 10).

Figura 10. Representación esquemática de la estructura de las calpaínas convencionales y representación de la calpaína musculo específica p94 o calpaína 3.



Fuente: CaMPDB :CaMPDB:: Calpain :: Overview [Internet]. Calpain.org. 2018 Available from: <http://calpain.org/overview.rb?cls=calpain..>

Existen múltiples mecanismos por los cuales las mutaciones en el gen causan la inactivación del funcionamiento de la proteína y se sabe que la mayoría de alteraciones que afectan al **dominio proteasa** causan LGMD2A. Además existen múltiples mutaciones descritas que afectan el funcionamiento de la calpaína, como mutaciones inactivantes, que alteran el mecanismo de autólisis y mutaciones que modifican mecanismos no relacionados con funciones proteicas <sup>(27)</sup>.

En miocitos, la calpaína se ha visto distribuida a lo largo del citosol. Esta en relación con las líneas Z y la línea M de la fibra muscular y también alrededor del retículo sarcoplásmico. Como se mencionó previamente se sabe que la calpaína tiene el potencial de translocación nuclear a través de la secuencia de señalización de traslado ubicada en IS2, sin embargo la localización nuclear de la calpaína raramente ha sido observada *in vivo* <sup>(27)</sup>. Se sabe así mismo que la calpaína puede ser también activada por sodio sin embargo este mecanismo aún no ha sido dilucidado y no se sabe como influyen en la génesis de las distrofia. Aún falta mucha investigación de cómo la calpaína lleva a la degeneración de la fibra muscular, sin embargo se sabe que su roll es clave ya que al realizar biopsias en pacientes con esta distrofia solo el 3% de las fibras musculares muestran regeneración siendo esta una característica típica de LGMD2A sobre otras distrofias <sup>(28)</sup>.

## 2) MANIFESTACIONES CLÍNICAS

En cuanto a la presentación clínica la calpainopatía se caracteriza por la debilidad muscular variable, con rangos de presentación entre los dos años a los cuarenta años de edad. El fenotipo es ampliamente heterogéneo con diferencias tanto inter como intrafamiliares y puede presentar manifestaciones leves hasta casos severos de la enfermedad. Existen actualmente 3 fenotipos clínicos para calpainopatía Autosómica recesiva que son:

- a. Distrofia Pelvi femoral: LGMD: (Leyden Mobius LGMD): es el más frecuentemente observado en la clínica; en este fenotipo la debilidad muscular se hace evidente primero en los músculos de la cintura

pélvica y posteriormente en la cintura escapular con un rango de aparición desde antes de los 12 años hasta después de los 30 años.

- b. Distrofia Escapulo humeral: LGMD (Erb LGMD): es generalmente un fenotipo leve con aparición temprana poco frecuente. La debilidad muscular es primero evidente en cintura escapular y posteriormente en la cintura pélvica.
- c. La hiperCKemia puede ser observada en niños o individuos jóvenes que a menudo son asintomáticos clínicamente, presentando niveles de creatincinasa elevados.

La forma Autosómica dominante de la calpainopatía, muestra una gran variabilidad en el fenotipo, desde casos asintomáticos, hasta casos con dependencia a silla de ruedas después de los 60 años de edad. En pocos casos se presenta con un fenotipo moderadamente leve en comparación con la forma recesiva de la enfermedad.

Los hallazgos clínicos de la calpainopatía incluyen tendencia en los pacientes a caminar de puntillas, dificultad para correr y trotar, presencia de aleteo escapular, marcha de pato e hiperlordosis leve. La debilidad es principalmente proximal y también se puede ver debilidad en tronco y en el área peri escapular. Existen reportes de laxitud de los músculos abdominales, pacientes con acortamiento del tendón de Aquiles, escoliosis y contracturas articulares. Las personas afectadas no cursan con discapacidad intelectual o compromiso cardiaco y es poco frecuente el compromiso respiratorio <sup>(29)</sup>.

### **3) SOSPECHA CLÍNICA DE CALPAINOPATÍA**

La calpainopatía debe ser sospechada en individuos con las siguientes características clínicas:

- a. Debilidad muscular proximal (cintura pélvica/o escapular) con aparición temprana > 12 años, o aparición tardía en el adulto >30 años.

- b. Atrofia simétrica de músculos y debilidad de músculos proximales de miembros y del tronco. Hipertrofia de pantorrillas es poco frecuente y algunas veces se presenta solo de forma transitoria.
- c. Aleteo escapular, escoliosis, contractura del tendón de Aquiles, y otras contracturas articulares (principalmente en cadera, rodillas, codos, dedos, y columna).
- d. Marcha de pato, marcha en puntillas, dificultad para correr, subir escaleras, levantar pesas y levantarse del piso o de una silla.
- e. Respeto de músculos faciales, oculares, lingual y de cuello.
- f. Concentraciones elevadas de Ck en la infancia y la adolescencia, con o sin síntomas musculares evidentes.
- g. Ausencia de miocardiopatía y discapacidad intelectual.
- h. Dolor en espalda y mialgias, presente en el 50% de los pacientes con calpainopatía Autosómica dominante. (29).

Un signo temprano y transitorio que se encuentra a menudo en las biopsias de pacientes con esta condición es la miositis eosinofílica, la cual ha sido documentada en pacientes jóvenes que tienen incremento en la Ck en sangre periférica e hipereosinofilia. Algunos pacientes con LGMD2A, se pueden presentar también con una miopatía pseudometabólica, con astenia, adinamia, mialgias, intolerancia al ejercicio, debilidad muscular proximal, y excesiva producción de lactato. La hiperCKemia asintomática en rango 5-80 veces lo normal, es frecuentemente observada en niños o jóvenes en estadios preclínicos de la enfermedad e incluso puede persistir por décadas. Los niveles de Ck disminuyen progresivamente conforme la enfermedad avanza y el grado de progresión de la atrofia muscular y la debilidad es más marcada <sup>(30)</sup>.

La debilidad y la atrofia en los aductores de la cadera (glúteo máximo, semimembranoso y bíceps femoral) es evidente en el examen clínico y estudio imagenológico, lo cual hace de la resonancia magnética un buen eslabón en el abordaje diagnóstico de los pacientes debido a la selectividad del compromiso muscular. La pseudohipertrofia de pantorrillas es poco común. La pérdida de deambulación ocurre en promedio entre los 10 y 30 años después de aparición de

debilidad muscular, usualmente entre los 10 y 45 años. En estadios avanzados de la enfermedad, algunos pacientes pueden sufrir disfunción del diafragma lo cual resulta en disminución de la capacidad vital forzada e insuficiencia respiratoria. El compromiso cardiaco por otro lado solo se ha reportado ocasionalmente <sup>(29,30)</sup>.

#### 4) DIAGNÓSTICO:

Estudios posteriores a la sospecha clínica deben ser realizados para confirmar el diagnóstico. Las imágenes musculares a través de resonancia magnética revelan compromiso selectivo del compartimiento posterior de los aductores de la cadera y miembros inferiores <sup>(21)</sup>. La biopsia muscular puede mostrar degeneración patrones de regeneración y necrosis, además las fibras musculares pueden aparecer lobuladas y oxidadas en tinciones como NADH. La miositis eosinofílica es característica. La inmunohistoquímica (IHQ) para calpaína-3 puede ser poco confiable y el Western blot puede ser informativo pero no confirmatorio. El test genético dirigido es confirmatorio, y debe usarse cuando la biopsia muscular no esta disponible y los hallazgos bioquímicos son inconsistentes o normales.

#### 5) DIAGNÓSTICO GENÉTICO:

La determinación y detección de mutaciones en el gen *CAPN3*, a través de técnicas de secuenciación, es actualmente el Gold estándar en el diagnóstico de esta patología <sup>(30)</sup>. Con el rápido advenimiento de las tecnología de secuenciación entre ellas la NGS, la clasificación de muchas variantes genéticas nuevas asociadas a la patología continua en crecimiento. Sin embargo se debe recordar que la secuenciación directa de los 24 exones del gen, no excluyen otras mutaciones no vista por esta metodología, por lo cual es necesario en muchos casos que se evalúen mutaciones de (*splicing*) intrónicas y deleciones heterocigotas en el caso de que resultado de secuenciación no haya sido conclusivo; un ejemplo es el análisis de cDNA el cual permite la identificación más rápida de variaciones genéticas ubicadas en regiones no codificantes. Una limitante de este análisis es la necesidad del análisis sobre una muestra directa de tejido muscular para obtención del RNAm. Se ha intentado el análisis de RNAm en sangre periférica sin embargo a

diferencia del tejido muscular que posee una sola isoforma de *CAPN3* los leucocitos pueden tener 4 isoformas diferentes <sup>(30,31)</sup>.

Actualmente existen además de la secuenciación tipo Sanger múltiples métodos con base en la secuenciación, incluyendo identificación por ensayo de polimorfismos únicos (SNP) (*SNP Arrays*) basado en el mapeo genómico de homocigotidad e hibridación genómica comparada.

Otras tecnologías como WGS (*Whole Exome Sequencing*) y ES (*Exome Sequencing*) han conducido el advenimiento de la proyección de alto rendimiento basado en genes ahora disponible para las distrofias de cinturas. El uso de exoma dirigido basado en la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS), que examina a la vez varios de los genes de las enfermedades neuromusculares es cada vez más útil para identificar mutaciones en genes conocidos y novedosos en pacientes con LGMD2A y pueden servir como un "estándar" para el diagnóstico de esta <sup>(30,31)</sup>.

- 6) **TRATAMIENTO:** actualmente no existen terapias específicas en estas patologías. Se encuentran en investigación terapias inmunosupresoras para la miositis eosinofílica observada en algunos pacientes, sin embargo, aún no hay estudios que corroboren su utilidad. La terapia génica con vectores adenovíricos continua en investigación <sup>(21)</sup>.

## **B. DISFERLINOPATÍAS:**

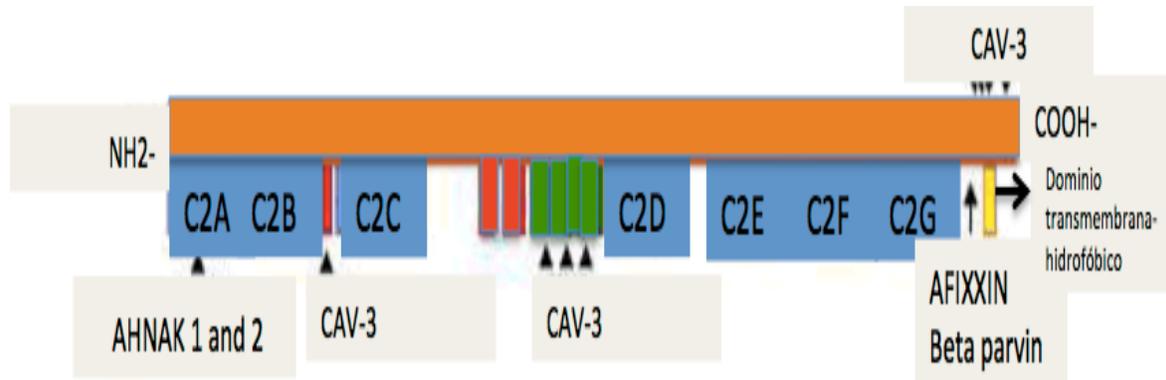
Las disferlinopatías primarias, son un grupo raro de trastornos Autosómicos recesivos, que pertenecen al grupo de las distrofias musculares de cinturas, y corresponden a la segunda distrofia de cinturas en frecuencia (15 al 25%) en muchas áreas geográficas. Las disferlinopatías están causadas por mutaciones en el gen *DYSF* ubicado en el *locus* 2p13, el cual tienen 55 exones y codifica para la proteína disferlina. Esta proteína de 237 KDa pertenece a la clase de proteínas homólogas llamadas "ferlinas"; se encuentra localizada en el sarcolema y el citoplasma de los miocitos y no esta asociada al DGC. Su principal función esta en relación con el mecanismo de reparación de la membrana de la fibra del músculo esquelético <sup>(32)</sup>.

Existe diferentes presentaciones de estos desordenes neuromusculares. Las disferlinopatias se clasifican en dos grupos, e incluyen un espectro clínico amplio. Los fenotipos más comunes son: Miopatía de Miyoshi, con debilidad distal primaria y la distrofia muscular del anillo óseo 2B LGMD2B con debilidad proximal primaria. Otros fenotipos son: Miopatía distal con compromiso tibial anterior (DMAT) y fenotipos próximo-distales. Presentaciones menos comunes van desde hiperCKemia aislada hasta disfunción severa y discapacidad. En personas jóvenes se han observado fenotipos de degeneración muscular espinal con o sin camptocormia <sup>(32, 33)</sup>.

### 1) GENÉTICA DE LA DISFERLINA

El gen *DYSF* abarca 150 Kb de DNA genómico. Estos exones predicen un DNAC de 6,5 KB y una proteína de 2088 aminoácidos. La disferlina está compuesta por un dominio transmembrana hidrofóbico y una región citoplasmática larga hidrofílica con múltiples dominios C2 que permiten funciones en la unión con el Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos de membrana. Contiene 7 dominios C2 y un único dominio C-terminal transmembranal. También tiene dominios FerA y FerB y dominios DysfN y DysfC. Los dominios C2 tienen homología con dominios protein- cinasas C. Los dominios C2 tipo 1 corresponden a C2A, C2B y C2E, y los tipos 2 a C2C, C2D y C2F y C2G. Su interacción con calcio y otras proteínas regulan el tráfico de membrana. (Figura 11). También se cree que la disferlina tiene un roll en metabolismo, asociación mitocondrial, y fusión celular inmune. Existe gran diversidad en los trascritos del gen y 14 de las isoformas de (splicing) descritas se han observado en los exones 5a, 17 y 40<sup>a</sup> <sup>(32)</sup>.

Figura 11: Dominios proteicos de la disferlina y su interacción con otras proteínas.



Fuente: L V. *Dysferlinopathies. Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy.* 2013;04(03)

## 2) FUNCIÓN DE LA DISFERLINA Y SU ROL EN LA REPARACIÓN DE MEMBRANA

La disferlina (Fer-1L1), tiene una homología con Fer-1 de *Caenorhabditis elegans*, en este organismo es necesaria para la fusión de la membrana durante la espermatogénesis y una mutación en este gen resulta en infertilidad. Otros miembros de la familia de las ferlinas son la otoferlina, y la mioferlina. La disferlina se encuentra en los túbulos T, y en la membrana plasmática, desde la semana quinta o sexta semana de gestación en el embrión. Se ha visto que juega un rol clave también en la tubulogénesis, T y en la fagocitosis mediada por monocitos. Esta involucrada en las vías de reparación del sarcolema que incluyen un rango de vías desde el tráfico intracelular de vesículas hasta fusión de las membranas separadas <sup>(32)</sup>.

La ausencia de disferlina compromete la reparación de la membrana dependiente de calcio en el músculo esquelético. Las fibras musculares nulas de disferlina en modelos animales, no excluyen la entrada de colorantes incluso en presencia de calcio, lo que sugiere fuertemente que la reparación de la membrana dependiente de calcio requiere disferlina. En el humano la disferlina ausente o mutante produce

una alteración de la reparación de la membrana y una cascada de eventos que comienza con la necrosis de la fibra muscular que da como resultado la pérdida de fibras musculares y la debilidad progresiva de las extremidades <sup>(34)</sup>. Xu, *Et al*, proponen un modelo de disferlina en el cual describen formas de disferlina paralelas u homodímeros que actúan a través de interacciones físicas de los dominios C2B y C2G y los dominios transmembranales. Después del daño de la membrana el calcio entra en la célula y se une al dominio C2A. Esta interacción calcio dependiente resulta en un puente entre dos membranas <sup>(35)</sup>. (Figura 12).

Figura 12. Modelo esquemático de la proteína disferlina y sus interacciones durante la reparación de membrana.

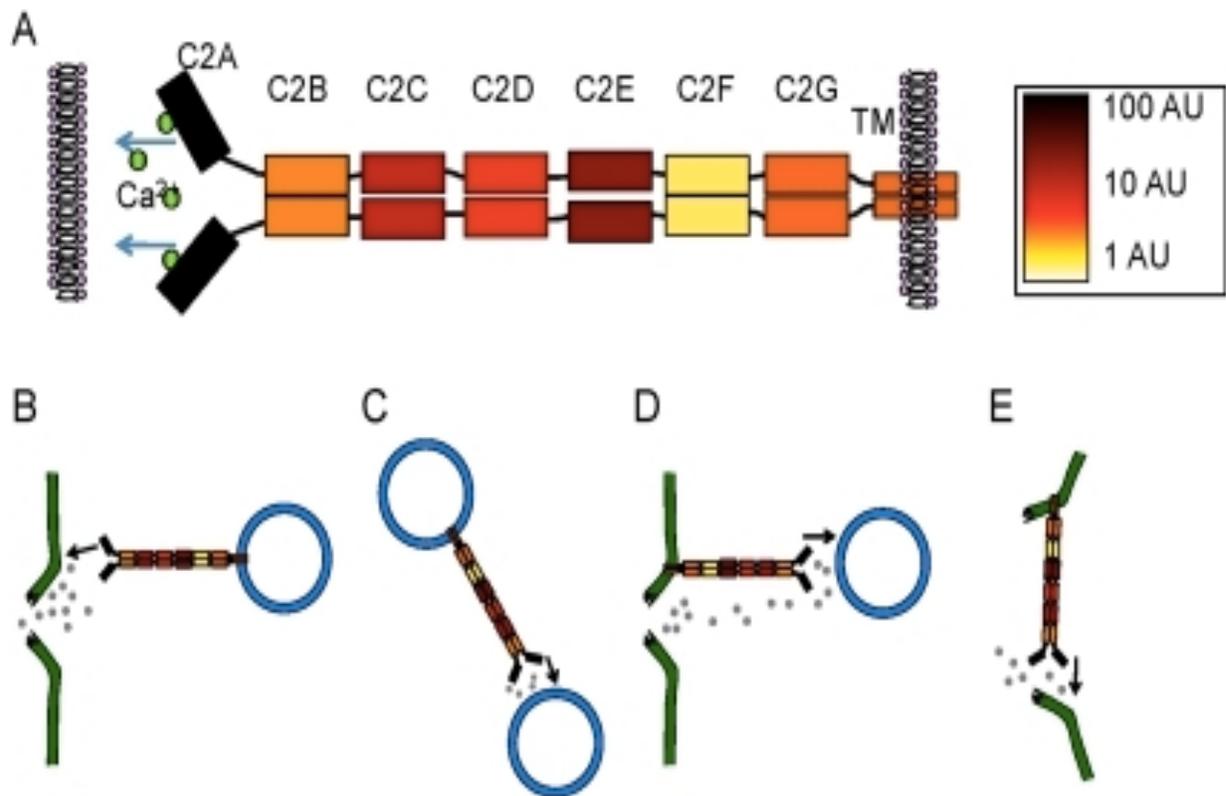


Figura 12: Unión de disferlina a: Vesículas a la membrana plasmática (B y D), vesículas con vesículas (C), y unión de dos sitios de ruptura en la membrana plasmática.(E), así promueve la formación de una barrera (disferlina-membrana) que rodea los poros de la membrana para permitir la reparación del daño.

Fuente: Xu L, Pallikkuth S, Hou Z, Mignery G, Robia S, Han R. Dysferlin Forms a Dimer Mediated by the C2 Domains and the Transmembrane Domain In Vitro and in Living Cells. PLoS ONE. 2011;6(11):e27884.

A continuación se muestra un mecanismo de reparación del sarcolema mediado por disferlina (Figura 13).

Figura 13: Mecanismo de reparación del sarcolema mediada por disferlina.

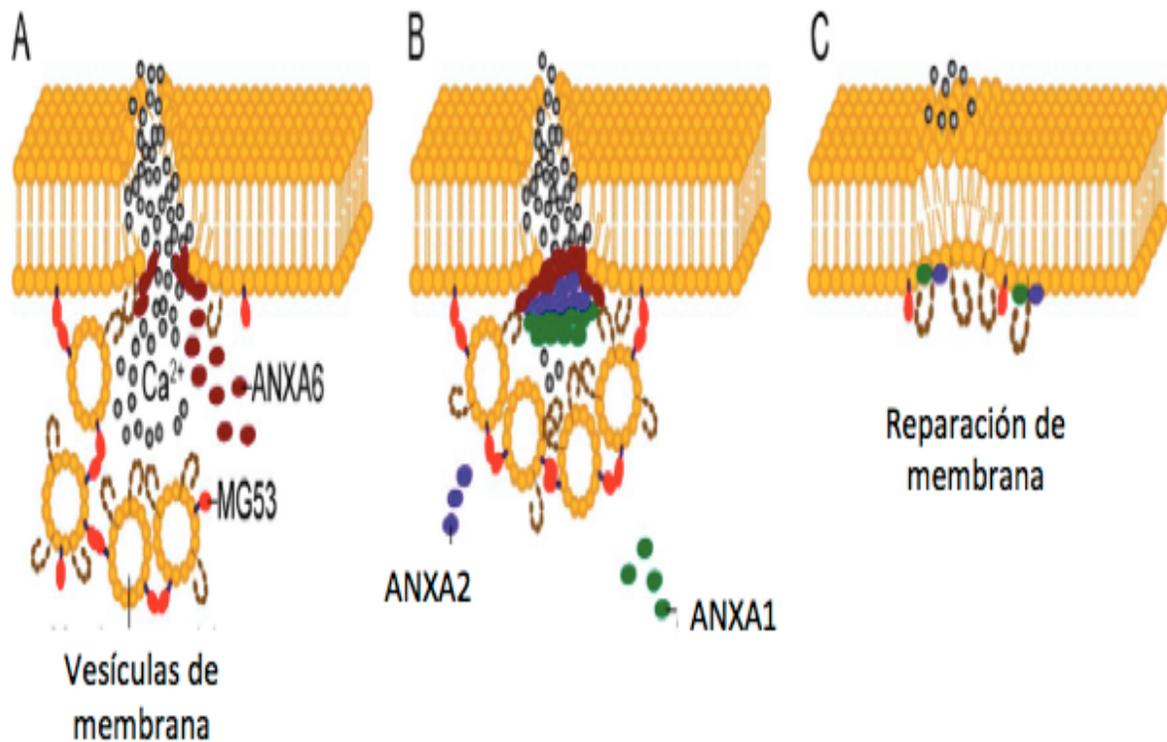


Figura 13: A. Las contracciones musculares repetitivas a menudo causan disrupción de la membrana. La mitsugumina MG53, localizada en la membrana intracelular une vesículas oligomerizadas cuando es expuesta a componentes extracelulares oxidados recluta vesículas portadoras de disferlina al sitio de daño. Simultáneamente pero de forma independiente la anexina intracelular ANXA6, se acumula en la zona de lesión de la membrana. B. Junto con disferlina ANXA6 secuencialmente recluta a la ANXA2 y ANXA1 al sitio de lesión. C. El calcio intracelular elevado, facilita la fusión de vesículas intracelulares una con la otra y con la membrana plasmática, a través de interacciones entre la disferlina, anexina y otras proteínas para formar el parche de membrana y repararla (11, 37).

Fuente: Rahimov F, Kunkel L. Cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *The Journal of Cell Biology*. 2013;201(4):499-510

Existe gran heterogeneidad alélica en estas patologías lo cual ha sido descubierta por la gran cantidad de mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, y mutaciones frameshift descritas. En la base de datos: (*Leiden muscular Dystrophy Database* <http://www.dmd.nl>) se han reportado más de 400 mutaciones deletéreas, y polimorfismos no patogénicos, 83% de las mutaciones missense en disferlina se han visto en relación con alteraciones en regiones de la proteína con aminoácidos conservados evolutivamente <sup>(32)</sup>.

Actualmente se conocen más mutaciones descritas en diferentes poblaciones debido al registro internacional de Disferlinopatías: <http://www.dysferlinregistry.org/> (*The Dysferlin Registry*), proyecto internacional donde actualmente se desarrollan estudios clínicos y se están desarrollando estrategias terapéuticas en busca de curas para pacientes con disferlinopatías. Así mismo desde el 2012 se creó UMD DYSF, una base de datos universal para disferlina, con el fin de entender el espectro mutacional en estas patologías y proveer herramientas interactivas para análisis de secuencias en *DYSF*, para diagnóstico con fines de investigación e inclusión de pacientes en ensayos clínicos terapéuticos <sup>(36)</sup>.

### 3) MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

Las disferlinopatías están caracterizadas por una debilidad muscular progresiva que envuelve los músculos proximales y distales de la cintura pélvica y escapular. La edad de aparición de la debilidad muscular varía ampliamente desde los 14 a los 73 años, pero usualmente ocurre en la adolescencia o adultez temprana. Los niveles séricos de CK están usualmente elevados, entre 10 y 100 veces los rangos normales, incluso en estadio asintomáticos de la enfermedad. La hiperCKemia caracteriza todos los fenotipos clínicos de las disferlinopatías, y es clave en la enfermedad.

Existen 3 signos básicos en estas patologías, uno de ellos es el signo de diamante: observado como una prominencia en la región antero lateral del cuádriceps al

intentar estar en pie, el signo de la cabeza del becerro por atrofia del trapecio y aumento del subescapular y signos del abombamiento por atrofia selectiva del bíceps braquial <sup>(38)</sup>.

#### 4) FENOTIPOS ASOCIADOS

- a. Distrofia muscular de cinturas (LGMD2B): Los pacientes cursan con debilidad muscular proximal la cual es más evidente en músculos de la cintura pélvica, (glúteo, tensor de la fascia lata) y en el compartimiento posterior del muslo (aductores e isquio-tibiales) generando dificultad para correr y tendencia a caminar en puntillas. La cintura escapular (supra e infra espinosos y bíceps) están usualmente comprometidos en etapas más tardías y deforma más lenta durante el curso de la enfermedad. Los músculos faciales, de la mano y cuello usualmente no están comprometidos <sup>(21,38)</sup>.
  
- b. Miopatía distal de Myoshi (MM): En este fenotipo, la debilidad muscular es más evidente en los músculos distales del miembro inferior principalmente en el compartimiento posterior (gastronemios y sóleos). La aparición generalmente ocurre entre los 15 y los 30 años, con un promedio de 19 años de edad y raramente después de los 40 años. Con el debut de los síntomas, los pacientes presentan dificultad para pararse y caminar y dificultad para bajar escaleras así como para caminar en puntillas. Puede haber una sensación inicial dolorosa en los músculos de la pantorrilla y posteriormente sufren atrofia rápida algunas veces se presenta con involucrimiento asimétrico muscular <sup>(21, 33, 38)</sup>. Entre el 10 y el 20% de los pacientes se convierten en dependientes de silla de ruedas aproximadamente 15 años después del inicio de los síntomas, en general este fenotipo presenta una evolución lenta y la mayoría logran aún deambulación en la tercera o cuarta década de la vida <sup>(38)</sup>.

- c. Fenotipo de distrofia proximal-distal: los pacientes presentan compromiso de músculos proximales tempranamente y también compromiso distal.
- d. Miopatía distal del compartimiento anterior (DACM): se caracteriza por debilidad en el músculo tibial anterior, contracturas del talón prematuras, altos valores de Ck, y biopsia muscular con datos de distrofia sin presencia de vacuolas con bordes.
- e. Miopatía Escapulo peroneal: Predominantemente en población de origen japonés.
- f. Miopatía axial con Síndrome de espina rígida: pocos pacientes tienen síntomas clínicos y signos característicos relacionados con compromiso de músculos para espinales, como dolor crónico de espalda, espina rígida, cifoescoliosis, remplazo rápido de los músculos erectos espinales por grasa, visualizado por infiltración grasa <sup>(21, 38)</sup>.
- g. Miopatía pseudometabólica: los pacientes tienen dolor intenso de los músculos proximales y distales en miembros inferiores, intolerancia al ejercicio, y mialgia posterior a actividad física.
- h. Distrofia muscular congénita reportada solo en casos aislados.
- i. HiperCKemia asintomática: existen casos reportados aun en ausencia de cambios miopáticos. En pacientes con hiperCKemia el screening para disferlinopatía debe realizarse ya que es útil para la identificación de pacientes pre sintomáticos y es un signo cardinal en el diagnóstico de estas patologías <sup>(38)</sup>.

En las disferlinopatías no es común el involucro cardiaco o respiratorio sin embargo en varias cohortes de pacientes se han reportado compromiso a estos

niveles <sup>(38)</sup>. A diferencia de la calpainopatía y las sarcoglicanopatías la prominencia escapular no es característica.

## 5) DIAGNÓSTICO:

Además de las manifestaciones clínicas ya señaladas que orientan a la patología, la biopsia muscular, usualmente muestra cambios distróficos, pero los cambios inflamatorios pueden ser prominentes, y pueden retardar el diagnóstico preciso al confundirse con una miositis. También se han encontrado depósitos amiloides vesiculares así como tinción con rojo congo positiva siendo estos hallazgos inespecíficos. La inmunohistoquímica a menudo muestra ausencia de disferlina. Las calpainopatías, pueden cursar con reducción secundaria de disferlina, así como se pueden encontrar niveles bajos de calpaína en disferlinopatías.

La tomografía computarizada y la resonancia magnética muscular pueden ser útiles para valorar la atrofia muscular, sin embargo las imágenes obtenidas por RNM son mejores en el abordaje diagnóstico ya que permiten ver cambios distróficos y mioedema en diferentes compartimientos musculares. Los músculos afectados tempranamente son el gastronemio y el aductor magnus; tardíamente los afectados son el vasto lateral y los sóleos. En etapas finales de la enfermedad se observa desgaste muscular difuso <sup>(33, 38)</sup>.

## 6) DIAGNÓSTICO GENÉTICO:

La secuenciación del DNA genómico o cDNA *de DYSF* del músculo o en sangre periférica continua siendo un reto debido al gran tamaño del gen y la ausencia de sitios hot spots. La búsqueda de mutaciones en *DYSF* continua aun así siendo el Gold Standard para el diagnóstico de disferlinopatía; a pesar de que las tecnologías de secuenciación evolucionan rápidamente, la identificación de muchas de las variaciones patógenas aún carecen de pruebas funcionales y las bases de datos para clasificación de variantes y su impacto continua en expansión a través de plataformas como UMD-DYS <sup>(32)</sup>.

La secuenciación de Sanger en los 55 exones se realiza actualmente sin embargo deleciones heterocigotas o muchas mutaciones del (*splicing*) intrónicas no pueden ser detectadas por este método. Comparado con este, el análisis de cDNA desde el RNAm del músculo, puede identificar mutaciones rápidamente y de forma más eficaz al demostrar las consecuencias funcionales de las variantes genéticas localizadas en regiones intrónicas que afectan el (*splicing*) de RNAm, o la expresión génica. Sin embargo, el cribado de mutaciones basado solo en el análisis de cDNA podría conducir a resultados falsos negativos negativos debido a que cuando hay mutaciones sin sentido o de cambio de marco de lectura puede hacer que estos transcritos sean degradados por la decadencia del ARNm escapando así a la identificación. Otra limitante es la necesidad de obtención de la muestra de tejido muscular. El tejido muscular expresa solo la isoforma 1 del gen *DYSF*. Con la finalidad de ofrecer un diagnóstico genético para todos los pacientes a lo largo del mundo se creó una iniciativa internacional financiada por (*Jaint foundation*). [www.jain-foundation](http://www.jain-foundation)).

Otros métodos usados a base de técnicas de secuenciación para el diagnóstico incluyen: WGS y WES. Actualmente se está llevando un estudio en Estados Unidos en una cohorte de pacientes con LGMD usando WES <sup>(39)</sup>.

El uso de NGS, ha demostrado que es más efectiva en cuanto al tiempo para la realización de la secuenciación y es muy útil para la identificación de mutaciones en pacientes con LGMD, entre ellas la disferlinopatías, con unas tasas de detección que oscilan entre el 35 al 40% especialmente en niños y en pacientes con formas moderadas no específicas o con presentaciones atípicas. El 36% de los pacientes con clínica de disferlinopatía son detectados por esta técnica las limitaciones de esta técnica son el potencial para no detectar otras mutaciones en regiones no codificantes y la posible presencia de regiones repetidas o deleciones que abarcan exones enteros. Se debe realizar una interpretación cuidadosa de los análisis de NGS combinados con los hallazgos clínicos y patológicos para un mejor entendimiento de las variantes genéticas encontradas (40). La AAN (*The American Academy of Neurology guidelines for LGMD*) sugiere su uso como el último recurso en el abordaje de pacientes con LGMD, sin embargo en los últimos 2 años, la

literatura internacional recomienda la NGS como primer elemento de diagnóstico en pacientes con clínica de LGMD aún por encima de la biopsia muscular <sup>(17)</sup>.

## 7) TRATAMIENTO

Actualmente no existe un tratamiento definido para las disferlinopatías. Es controversial aún la recomendación de si los pacientes deben practicar ejercicio o no. Los esteroides han sido usados para el tratamiento en pacientes y han resultado ser poco eficientes. Estudios sobre el uso de inmunoglobulinas IV han resultado exitosos sin embargo no han sido aprobados aún para su uso <sup>(40)</sup>. El rituximab un anticuerpo monoclonal dirigido en contra del CD20 de los linfocitos B, ha demostrado en varios estudios utilidad con aparente incremento de la fuerza muscular. Sin embargo tanto con la IG IV así como con el rituximab no se han demostrado efectos duraderos y los resultados se basan en opiniones y observaciones personales de los pacientes bajo tratamiento. Actualmente se están conduciendo múltiples ensayos clínicos que apuntan a la terapia génica como respuesta al tratamiento efectivo en esta patología. Entre los blancos de investigación están la transferencia génica del gen completo con resultados alentadores en ratones, aunque el mini gen o mino Dirferlina parece ser el tratamiento más prometedor <sup>(32)</sup>. Otros tratamientos que inicialmente fueron probados para distrofinopatías como la omisión exónica en *DYSF* parece ser muy prometedor especialmente para mutaciones en el exón 32, esta estrategia esta basada en AON (oligonucleótidos antisentido) los cuales enmarcarían las transcripciones del gen, por lo tanto, esconderían el exón de la maquinaria de empalme para inducir omisión- restauración del marco de lectura, aunque se generan proteínas parcialmente funcionales <sup>(41)</sup>.

## 9. DIAGNÓSTICOS DIFERENCIALES DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS:

A continuación se presentan las patologías a tener en cuenta como diagnóstico diferencial de las distrofias musculares de cinturas y en las cuales un test genético dirigido serviría para realizar el diagnóstico diferencial:

- a. **Distrofinopatías:** (Duchenne; Becker y portadoras mujeres de mutaciones en *DMD*): cerca del 17% de los pacientes diagnosticados con LGMD presentan una distrofinopatía y el 7% de los pacientes diagnosticados con distrofinopatía tienen LGMD <sup>(19)</sup>.
- b. **Distrofia Fascio- escapulohumeral FSHD:** la calpainopatía al presentar fenotipo ERb puede confundirse con la distrofia fascio escapulohumeral. Además ambas pueden presentar compromiso escapular y pélvico. En la FSHD no hay patrones específicos miopáticos en la biopsia muscular, sin embargo en las distrofias de cinturas el involucro facial es poco común y en la FSHD puede llegar a ser mínimo o aparecer en etapas tardías del curso de la enfermedad. Cerca del 8% de los pacientes diagnosticados con LGMD tienen FSHD <sup>(19)</sup>.
- c. **Distrofia de Emery Dreiffus:** puede muchas veces confundirse con LGMD, sobre todo por su presentación con compromiso cardíaco y múltiples contracturas, por lo cual sobre todo con las distrofias dominantes que presentan estas características se debe hacer el diagnóstico diferencial.
- d. **Miopatía de Bethlem:** se presenta desde la infancia por lo cual se debe hacer diagnóstico diferencial con LGMD que presenten temprana aparición.
- e. **Miopatías inflamatorias, miofibrilares y metabólicas:** presentan debilidad muscular proximal, así mismo niveles séricos elevados de Ck, se excluyen con base a la biopsia muscular, o el test genético <sup>(19, 38)</sup>.

- f. **LGMD2V:** aparición tardía de la enfermedad de Pompe: debe ser excluida por toma de muestra de sangre en papel filtro, y análisis bioquímico para Alfa-glucosidasa (GAA) y realizar tamizaje para la mutación más común en el gen *GAA* IVS1 presente hasta en un 85% de los pacientes.
- g. **Distrofia muscular congénita:** (CMD): es un grupo de trastornos en los cuales la debilidad esta presente al nacimiento. Son niños hipotónicos y a menudo pueden presentar contracturas. El 50% de los casos están relacionados con deficiencia de merosina muscular la cual puede ser observada por estudios de inmunohistoquímica. Las distrofias musculares congénitas se hereda con un patrón de herencia Autosómica recesivo <sup>(38)</sup>.
- h. **Desordenes relacionados con alteración del colágeno tipo 4:** en este grupo se incluyen la distrofia muscular congénita de Ulrich y la miopatía de Bethlem previamente mencionada que se caracteriza por aparición temprana, debilidad muscular proximal y múltiples contracturas en flexores largos de los dedos, codos y talones <sup>(38)</sup>.

**10. ABORDAJE DIAGNÓSTICO EN LGMD:** Para conocer el abordaje diagnóstico y los estudios de laboratorio a realizar en pacientes con distrofia muscular de cinturas ver (Anexo III).

**11. TEST GENÉTICOS DIRIGIDOS EN DISTROFIAS MUSCULARES. NUEVO PANORAMA EN ABORDAJE DE DISTROFIAS GENÉTICAS: NGS; ES; WES.**

Actualmente las tecnologías de diagnóstico molecular en Genética, han tomado un papel cada vez más importante en el abordaje y diagnóstico preciso de patologías extremadamente heterogéneas. Debido a la gran heterogeneidad de locus que presentan estas patologías, estas entidades se benefician del estudio molecular como primera opción incluso antes de la biopsia muscular, según los últimos estudios y revisión internacional del abordaje de distrofias musculares <sup>(17)</sup>. Actualmente el diagnóstico molecular es más relevante y las guías internacionales

han modificado el abordaje inicial de la AAN, propuesto en 2014, por un abordaje de clasificación y seguimiento dependiendo del resultado del estudio molecular. Para conocer el panorama de estas tecnologías y la utilidad de los estudios de secuenciación en las distrofias musculares ver: (Anexo IV).

## VI. OBJETIVOS

### 1) GENERAL:

1. Caracterizar mutaciones a través de la técnica de *NGS (Secuenciación de nueva generación)* en pacientes con diagnóstico clínico de distrofia muscular de cinturas remitidos al servicio de Genética del Hospital General de México y confirmar los perfiles genéticos con secuenciación de Sanger complementaria.

### 2) ESPECÍFICOS:

1. Determinar la frecuencia de mutaciones en genes relacionados con distrofias musculares de cinturas autosómicas recesivas en pacientes con fenotipos clínicos de distrofias de cinturas.
2. Brindar un diagnóstico molecular confirmatorio a los pacientes con fenotipos clínicos de distrofia muscular de cinturas.
3. Otorgar un asesoramiento genético óptimo de acuerdo al subtipo molecular identificado.
4. Realizar una correlación genotipo –fenotipo con los hallazgos recabados en esta investigación y compararlos con lo reportado en la literatura.
5. Identificar el subtipo de distrofia Autosómica recesiva más común en nuestra población y compararla con los reportes de otras poblaciones .

## VII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Las distrofias musculares del anillo óseo son entidades degenerativas musculares, que además de afectar grupos musculares principales en cintura pélvica y escapular, pueden tener manifestaciones extra musculares graves como compromiso cardiaco temprano y respiratorio los cuales de no ser tratados comprometen seriamente la supervivencia; así mismo estas patologías, conllevan una gran morbilidad en los pacientes que las padecen.

Las distrofias musculares de cinturas son subdiagnosticadas o erróneamente diagnosticadas, lo que hace que el manejo de los pacientes con este padecimiento sea en ocasiones erróneo. Al mismo tiempo, al ser entidades altamente heterogéneas en su presentación clínica y en su aparición a lo largo de la vida, el diagnóstico semiológico es complejo.

El retraso en el diagnóstico hace que la calidad de vida de estos pacientes se vea significativamente disminuida conforme progresa la enfermedad. La necesidad de un abordaje clínico molecular en este tipo de padecimientos es necesario ya que puede aportar un diagnóstico temprano y por ende un pronóstico y seguimiento adecuados de este tipo de padecimientos. Actualmente muy pocos pacientes tienen un diagnóstico genético confirmatorio de estas patologías, lo cual limita el adecuado asesoramiento genético y el seguimiento oportuno de pacientes en riesgo dentro del grupo familiar.

## VIII. JUSTIFICACIÓN:

El desconocimiento de la prevalencia real de este tipo de patologías en nuestra población limita el desarrollo de políticas en salud, encaminadas a la aplicación de tecnología actual en Genética y Biología Molecular, para la realización de diagnósticos oportunos en los pacientes con el fin de dar asesoramiento, pronóstico y medidas óptimas de rehabilitación y en un futuro no muy lejano desarrollar líneas de investigación a base de terapia génica. La ausencia de un diagnóstico exacto de estos padecimientos seguirá acarreando grandes inversiones de presupuesto en salud destinado al abordaje y seguimiento de pacientes, quienes serán asistentes frecuentes a consulta médica especializada y continuarán con un gran número de procedimientos médicos innecesarios, con diagnósticos erróneos y en su mayoría especulativos.

Por tanto, es necesario implementar el estudio molecular en pacientes con distrofias musculares, con el fin de caracterizarlos rápidamente y mejorar su seguimiento a corto, mediano y largo plazo. Así mismo es necesario contar con el perfil epidemiológico de estas patologías en México, perfil que aún es desconocido debido al alto costo de los estudios moleculares y su escasa accesibilidad a la población, debido a que no están incluidos dentro de los sistemas de salud.

El diagnóstico temprano de estas patologías, favorecerá un abordaje interdisciplinario y un seguimiento apropiado de este tipo de condiciones.

## **IX. HIPÓTESIS:**

Las mutaciones en genes relacionados con distrofias musculares de cinturas tienen una prevalencia más alta en la población Mexicana que en las poblaciones estudiadas previamente debido a que México es un país multicultural y pluriétnico. La distrofia más prevalente en este estudio será la calpainopatía acorde con los reportes previos en la literatura.

## **X. METODOLOGÍA:**

### 1) DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente trabajo fue un estudio descriptivo, observacional prospectivo.

2) POBLACIÓN Y TAMAÑO DE LA MUESTRA: La población en estudio estuvo constituida por individuos que acudieron a la consulta de la clínica de Neurogenética en el Servicio de Genética Médica del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” a los que previamente se les había realizado valoración por neurología clínica y se les había descartado otro padecimiento neurológico. 20 pacientes con diagnóstico clínico de DISTROFIAS DE CINTURAS, se incluyeron en el estudio, encontrando 6 pacientes con resultados positivos en estudio de NGS. (2 de ellos en una misma familia).

3) TIPO DE MUESTREO: el tipo de muestreo utilizado fue un muestreo por conveniencia.

### 4) CRITERIOS DE SELECCIÓN :

#### A. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

1. Individuos con criterios clínicos compatibles con Distrofia muscular de cinturas de probable origen genético.
2. Individuos con clínica de distrofia muscular de cinturas en quienes se documente endogamia o consanguinidad en la familia.
3. Individuos sometidos a ALDA score con un porcentaje de probabilidad superior al 50% de tener una distrofia muscular del anillo óseo.
4. Individuos con criterios clínicos de Distrofia muscular en quienes se haya descartado distrofinopatía por estudio molecular previo.
5. Individuos que acepten y firmen el consentimiento informado para la toma de muestra de sangre periférica. En caso de menores de edad, los tutores legales autorizaran por escrito el consentimiento informado para el estudio

molecular.

## B. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

1. Pacientes con diagnóstico genético previo de distrofia muscular ya caracterizada por cualquier otra técnica molecular.
2. Pacientes con diagnóstico clínico establecido por el servicio de Neurología de otra entidad neuromuscular claramente definida.
3. Pacientes con criterios atípicos no característicos de distrofias musculares.

## 5) VARIABLES

Tabla 1. Variables nominales o cualitativas.

<i>1. Variable</i>	<i>Definición conceptual</i>	<i>Tipo</i>	<i>Unidad de medida</i>
<b>Distrofia muscular de cinturas</b>	Desordenes neuromusculares de origen genético, cuya principal característica clínica es la debilidad muscular proximal	Nominal	Presente/ Ausente
<b>Gen ANO5</b>	Anoctamina. Relacionado con la LGMD2L	Nominal	Con mutación/ Sin mutación
<b>Gen DYSF</b>	Disferlina. Relacionado con la LGMD2B	Nominal	Con mutación/ Sin mutación
<b>Gen GAA</b>	Alfa-1-4-glucosidasa. Relacionado con la LGMD2V	Nominal	Con mutación/ Sin mutación
<b>Gen SGCB</b>	Beta-sarcoglicano. Relacionado con LGMD2E	Nominal	Con mutación/ Sin mutación
<b>Gen SGCG</b>	Gamma-sarcoglicano. Relacionado con la LGMD2C	Nominal	Con mutación/ Sin mutación
<b>Gen CAPN3</b>	Calpaína 3. Relacionado con la LGMD2A	Nominal	Con mutación/ Sin mutación
<b>Gen FKRPF</b>	Proteína relacionada con la fukutina. Relacionado con la LGMD2I	Nominal	Con mutación/ Sin mutación
<b>Gen SGCA</b>	Alfa-sarcoglicano. Relacionado con la LGMD2D	Nominal	Con mutación/ Sin mutación
<b>Gen TCAP</b>	Teletonina. Relacionado con la LGMD2G	Nominal	Con mutación/ Sin mutación

## 6). MÉTODOS

El método mediante el cual se llevó a cabo el reclutamiento de los pacientes la recopilación de la información clínica y la decisión de tomar las pruebas moleculares, constó de los siguientes pasos:

- 1) Se estableció contacto por primera vez con los pacientes que asistieron al Servicio de Genética Médica remitidos de Neurología por probable miopatía de origen genético. Durante la consulta se realizó el árbol genealógico para evaluar la presencia de familiares afectados en primer y segundo grado, se recopilaron antecedentes perinatales, posnatales y datos clínicos significativos para estas entidades. A cada paciente se le aplicó la ficha de criterios clínicos (en la primera y segunda visita en caso de no contar con todos los datos en la primera consulta, (Anexo VI), basados en el Score de riesgo y probabilidad de distrofias musculares de cinturas: ALDA herramienta diagnostica gratis disponible en internet perteneciente a la Jain Foundation <sup>(42)</sup>.
- 2) Se valoró a los pacientes mediante la exploración física para determinar el cumplimiento de criterios clínicos compatibles con distrofias musculares de cinturas. Aquellos que cumplieran con criterios clínicos y que tuvieran un alto score por ALDA para distrofias de cinturas, se seleccionaron para toma de estudio de NGS.
- 3) A los pacientes que aceptaron ser parte del protocolo de estudio de "Enfermedades Neuromusculares y Neurodegenerativas del Hospital General de México, se les explicó la finalidad de la investigación, objetivos, y beneficios se someterse al estudio genético así como probables desventajas de la técnica a utilizar. Después de aceptar ser parte del estudio se les facilitó el consentimiento informado para su lectura. (Anexo V).
- 4) Una vez firmado el consentimiento Informado, se procedió a la toma de muestra de 5 ml de sangre periférica para goteo en papel filtro y

estudio de NGS externo (Laboratorio Sanofi-Genzyme: panel de secuenciación para 10 genes relacionados con distrofias musculares de cinturas Autosómicas recesivas) y 10 ml en tubo EDTA para extracción de DNA y reserva de muestra para eventual uso confirmatorio.

- 5) En los pacientes menores de edad, el estudio también involucró a los padres para analizar el estado de portadores según la disposición y firma del consentimiento informado de los mismos.
- 6) Se realizó el estudio de NGS externo con panel para 10 genes de distrofias Autosómicas recesivas con colaboración de Genzyme México y laboratorio de análisis Quest Diagnostics.
- 7) Una vez obtenido los resultados de los pacientes, se citaron una segunda vez para entrega de resultados respectivos y en aquellos con casos positivos en el estudio de NGS, se usó la muestra almacenada de DNA, para análisis de secuenciación Sanger confirmatoria.
- 8) En los casos positivos se solicitó colaboración para a los familiares de primer grado para toma de secuenciación de Sanger e identificación de mutaciones puntuales. en padres de individuos con la patología, solo un padre accedió a dicho requerimiento.

## A. MÉTODOS Y TÉCNICAS.

### a. EXTRACCIÓN DE DNA PARA NGS:

Se obtuvieron las muestras por goteo en papel filtro. Se dejó secar muestra 2 horas a temperatura ambiente y protegida de luz ultravioleta. Se envió muestra a análisis externo en reciente para material biológico. Tiempo promedio de análisis: 2 meses a partir de recolección de la muestra, notificación vía correo electrónico.

b. EXTRACCIÓN DE DNA PARA SECUENCIACIÓN DE SANGER:

Se utilizó un kit comercial de la marca Gene All para la extracción de ADN, siguiendo el siguiente protocolo:

- 1- 900  $\mu$ l de Buffer RL por tubo de 1.5ml +300  $\mu$ l de sangre completa
- 2- Incubar la muestra 10 min a temperatura ambiente y mezclar por inversión 4 a 6 veces.
- 3- Centrifugar tubos a 12000 rpm/1 minuto a temperatura ambiente.
- 4- Retirar el sobrenadante sin perturbar el pellet.
- 5- Añadir 300  $\mu$ l de Buffer Al y mezclar por pipeteo de 65 a 6 veces hasta suspender las células.
- 6- Incubar los tubos 10 min a 37 grados.
- 7- Añadir 100  $\mu$ l de buffer PP y mezclar vigorosamente por 15" en vortex e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 8- Centrifugar la muestra por 2 min a 12000rpm.
- 9- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 1,5 ml.
- 10- Añadir 300  $\mu$ l de isopropanol y mezclar por inversión.
- 11- Centrifugar por 1 min a 12.000 rpm y descartar sobrenadante.
- 12- Añadir 300  $\mu$ l de etanol al 70% para lavar la pastilla mezclando por vortex.
- 13- Centrifugar por 1 minuto a 12.000rpm.
- 14- Descartar todo el etanol por decantación y luego aspirando con micropipeta.
- 15- Secar sobre papel absorbente con el tubo invertido de 10 a 15 minutos.
- 16- Añadir 100  $\mu$ l de Buffer RE o agua inyectable.
- 17- Guardar a -20 grados.
- 18- Cuantificar.

c. NGS: SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN:

- La reacción de secuenciación de Nueva generación fue llevada a cabo externamente en Quest Diagnostics en conjunto con Medicina Laboratorial en Brasil. Se uso secuenciador tipo Illumina miq sec- 26.

Tabla 2. Datos del Análisis de secuenciación por NGS. Cobertura media y profundidad en cada gen analizado por NGS.

<i>Gen</i>	<i>Cobertura media obtenida para el gen</i>	<i>Porcentaje base de destino con una cobertura mínima de 10x:</i>
1. Gen ANO5	167,86x	100%
2. Gen CAPN3	186,26x	100%
3. Gen DYSF	187,96x	99,92%
4. Gen FKRP	120,88x	99,46%
5. Gen SGCA	125,25X	100%
6. Gen SGCB	182,91X	100%
7. Gen SGCD	205,92X	100%
8. Gen SGCG	184,85X	100%
9. Gen TCAP	149,45X	100%
10. Gen GAA	120,72X	100%

d. SECUENCIACIÓN DE SANGER CONFIRMATORIA.

1. Una vez obtenidos los resultados por NGS se procedió a realizar confirmación dirigida a través de secuenciación tipo Sanger. Se diseñaron los juegos de oligonucleótidos necesarios y específicos para amplificar por PCR a la región(es) de interés empleando el programa Primer Blast: ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)). (43). (Ver tabla 3).

Tabla 3. Diseño de oligonucleótidos para secuenciación de Sanger.

Paciente	Oligos	Secuencia	Gen	Exón	Escala
1	DYSF26-F DYSF26-R	ACTAAGTTGGCCCTTGTGGGA(22 bases) CCAAAAGGAGGGTGCAGTCCAT(22 bases)	DYSF	26	25 nM
2	DYSF51-F DYSF51-R	GATTCAGGCCAGTGC GTTCTTC(22 bases) TCATCTCCCCTCCCCTACCTG(22 bases)	DYSF	51	25nM
3	CAPN33-F CAPN33-R CAPN314-F CAPN314-R	GAGCAGGAGTGCTCAGATCT(21 bases) CGCTGGCCCTCTTA ACTACT(22 bases) CTCCTGCTTGCTTCTGGTGACA(22 bases) GGACCCTCTGGACTTTTCGCA(21 bases)	CAPN3	3 14	25nM
4	DYSF20-F DYSF20-R	TTTGAGGTCAGCATCGGGA ACT(22 bases) GGCCTTTGAGTAGACTCTGGCA(22 bases)	DYSF	20	25nM
5	DYSF54-F DYSF54-R	CCATTGGACCTGCTGTTGAGAG(22 bases) GCGTAGATGAAGATGGCCAGGA(22 bases)	DYSF	54	25 nM

- Se estandarizaron las condiciones de PCR para obtener dichos productos empleando 40 ng de gDNA. Las reacciones de PCR se realizaron siguiendo protocolo de las recomendaciones del fabricante con kit: GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase - Promega Corporation <sup>(44)</sup>.
- Los productos de PCR se caracterizaron mediante corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1.2 %, teñidos con Midory Green.
- Los amplicones fueron visualizados en un equipo foto documentador acoplado a una lámpara de UV para su posterior purificación empleando el kit comercial MoBio siguiendo las indicaciones del fabricante.
- Se determinó la concentración de los productos purificados en Nanodrop. La reacción de secuenciación de las regiones de interés se llevó a cabo utilizando la química Big dye V 3.1 (Life Technologies). Las reacciones de secuenciación utilizaron 20 ng del producto de PCR purificado, el reactivo de Big dye, oligonucleótido y fueron llevados a un volumen final de 20  $\mu$ l.
- Las reacciones se incubaron en un termociclador modelo ABI 2720 (Perkin Helmer) acorde a las condiciones ya establecidas en nuestro laboratorio. Los productos de secuenciación se purificaron por el método EDTA-Etanol.

7. Los productos fueron sometidos a corridas de lectura en un secuenciador modelo 310-ABI (Perkin Helmer). Los resultados de la corrida fueron analizados en el software Sequencing Analysis. A partir de las secuencias obtenidas se llevaron a cabo los análisis de alineamiento en el programa Clustal-X, para comparar el resultado con una secuencia de referencia reportada en el Gen Bank y así confirmar las mutaciones encontradas por NGS.
8. Se corroboraron las mutaciones descritas en los pacientes a excepción de la mutación en *CAPN3* del paciente 4, la cual no pudo ser corroborada debido a que la secuencia fue eliminada de las bases de datos existentes, lo cual posiblemente habla de una variante inicialmente obtenida por análisis predictivo.

#### B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó estadística descriptiva para establecer frecuencias de mutaciones encontradas.

## **XI. RESULTADOS.**

### 1) CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LA MUESTRA.

Se incluyeron un total de 20 familias en las cuales algún miembro presentaba diagnóstico clínico de Distrofia Muscular de Cinturas con Score ALDA positivo y con una probabilidad mayor al 50% de tener una LGMD; 2 de los pacientes incluidos en el estudio pertenecían a una misma familia. Los fenotipos encontrados se clasificaron en 3 grupos principales entre ellos: fenotipo LGMD, fenotipo de LGMD + distrofinopatía y fenotipos atípicos. (Tabla 4).

A todos los pacientes clasificados en fenotipo de distrofinopatía + LGMD previamente se les descartó deleciones en gen *DMD* a través de análisis por MLPA para ser incluidos en el estudio.

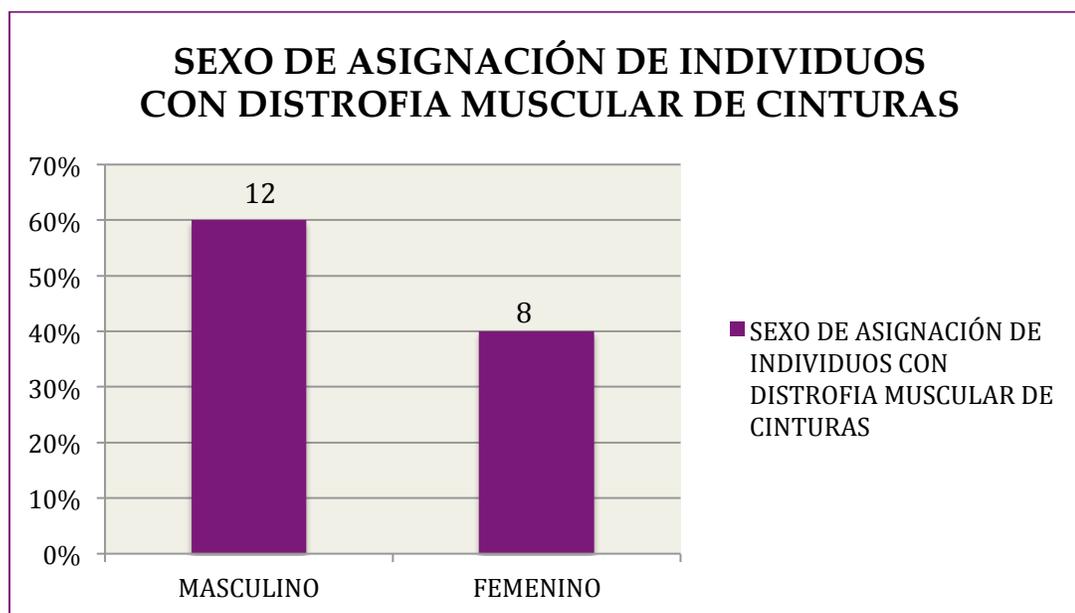
A todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión se les realizó secuenciación de Nueva Generación con un panel de 10 genes para distrofias de cinturas y en aquellos con mutaciones detectadas por este método se les realizó secuenciación Sanger complementaria para corroborar las variantes identificadas en NGS.

Del total de pacientes incluidos, el 60% fueron del sexo masculino (n: 12) y el 40% fueron del sexo femenino. (n: 8). (Figura 14).

Tabla 4. Características de la población estudiada y fenotipos clínicos.

1. Características de la población estudiada					
1.1 Sexo			Frecuencia	%	Media
		Mujeres	8	40	
		Hombres	12	60	
		Total:	20	100	
1.2. Edad		14 a 61 años			34.8
2. Fenotipos clínicos de la población estudiada					
2.1. Pacientes con fenotipos de LGMD	14(70%)	2.2. Pacientes con fenotipo de Distrofinopatía.+LGMD	4(20%)	2.3. Pacientes con fenotipo atípico	2(10%)

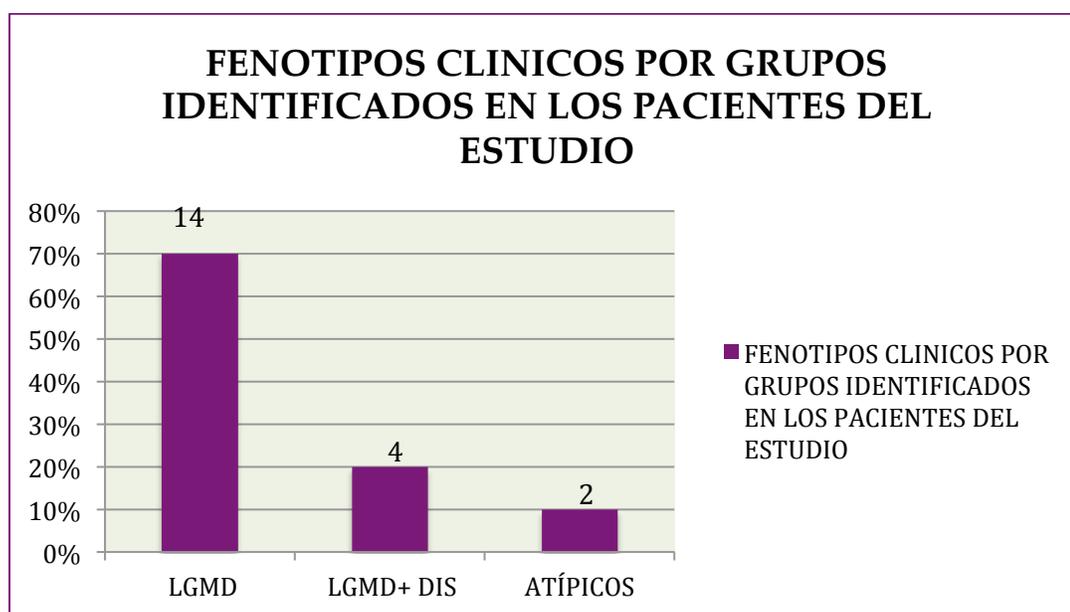
Figura 14. Frecuencia de sexo de asignación de individuos con distrofia muscular de cinturas.



## 2) HALLAZGOS CLÍNICOS

Del total de pacientes, el 70% (n: 14) presentaban fenotipos de LGMD por ALDA, el 20% (n: 4) presentaban fenotipo de distrofinopatía y/o LGMD y el 10% (n: 2) presentaban fenotipos atípicos en los cuales a pesar de tener probabilidad para LGMD, compartían características de otros tipos de distrofias. Los datos clínicos predominantes en los pacientes seleccionados fueron: debilidad muscular proximal en cintura pélvica o escapular y pérdida de fuerza muscular de predominio en músculos proximales. (Figura 15).

Figura 15. Fenotipos clínicos por grupo identificados en los pacientes del estudio.



De los 5 pacientes con resultado positivo por NGS, 1 de ellos pertenecía al grupo de fenotipos atípicos (familia 1), 2 pertenecían al grupo de fenotipo LGMD mas distrofinopatía (familia 3 y 5) y 2 pertenecían al grupo de fenotipo clásico de LGMD (familia 2 y 4). A continuación se presentan los fenotipos clínicos, bioquímicos y la clasificación por ALDA obtenida en los 5 pacientes con resultado positivo en el estudio de NGS. (Ver tabla 5).

Tabla 5. Fenotipos clínicos, electrofisiológicos y bioquímicos de los pacientes con resultados positivos en estudio NGS.

<i>Fenotipos clínicos, electrofisiológicos, bioquímicos y Score de probabilidad por ALDA, en los pacientes con resultados positivos en estudio de NGS.</i>						
<i>Familia-Paciente</i>	<i>Edad</i>	<i>Fenotipos por ALDA y asignado en grupo. de estudio</i>	<i>% de probabilidad por ALDA</i>	<i>Niveles de Ck y EGM</i>	<i>Edad de aparición de síntomas</i>	<i>Datos clínicos relevantes</i>
1-IV.5	14	FSH, LGMD2A.  Fenotipo: Atípico	80 y 11%	715/UL . Patrón miopático sugestivo de distrofia fascioescapu lo-humeral.	14	Debilidad muscular proximal en cintura escapular, escápulas aladas, debilidad facial
2-III.6	28	LGMD2B,LG MD2I- F,LGMD2C.  Fenotipo: LGMD	58, 6,86 y 1,18 %	9,818U/L. Patrón miopático de distribución proximal.	8	Debilidad muscular proximal en cintura pélvica, dolor en miembros inferiores exacerbado con ejercicio.
3-III.1	18	LGMD2B ,Becker y LGMD2A,  Fenotipo: LGMD+ Distrofinopatia.	39, 14 Y 10%.	5,415U/L. Patrón miopático de distribución proximal.	16	Debilidad proximal en miembros inferiores, imposibilidad para y debilidad menos severa en cintura escapular, contractura en tendón Aquiles.
4-III.6	61	LGMD1A, Nonaka.  Fenotipo: LGMD	56, 13%	1,236U/L. Patrón miopático distal	47	Debilidad muscular distal en miembros superiores, contracturas articulares en falanges, voz gruesa, dificultad en deglución de sólidos y líquidos.
5-IV.2	30	LGMD2L,LG MD2H,LGMD 2B y Becker.  Fenotipo: LGMD + Distrofinatía	35,21 Y 17 y 14%	5,248U/L. Patrón miopático de distribución proximal.	26	Debilidad muscular proximal en cintura pélvica, simétrica, atrofia muscular en miembros inferiores en soleo, gemelos y tibial anterior.

Ck: creatincinasa. EGM: Electromiografía. FSH: Distrofia fascioescapulo humeral

Figura 16. Imágenes de los pacientes pertenecientes a las familias 1, 4 y 5.

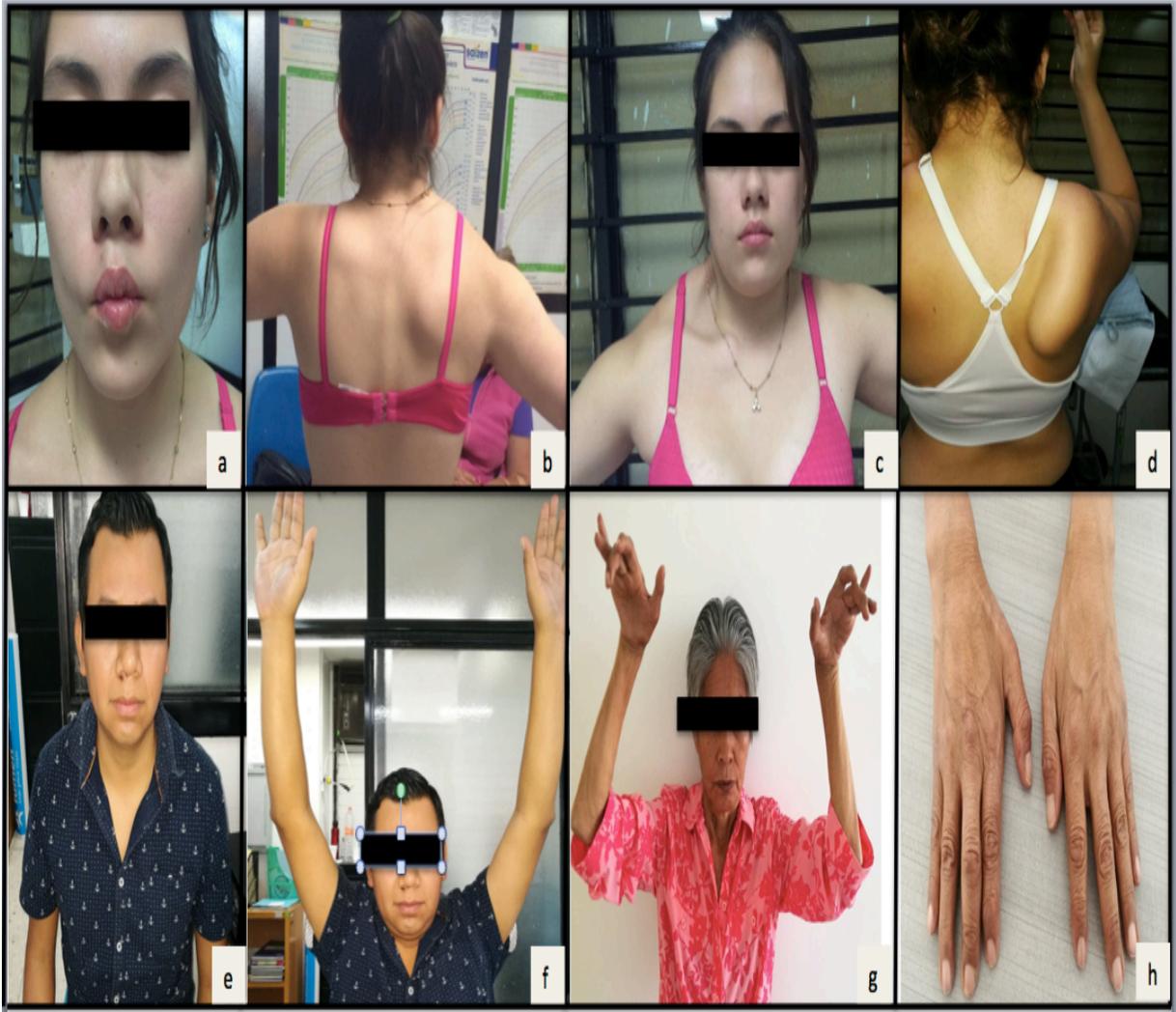


Figura 16. En a , b y c se muestran imágenes de la paciente IV.5 de la familia 1, en la primera consulta se observa leve compromiso de músculos periorales (a), escápulas aladas (b) imposibilidad de abducción completa de miembros superiores (c). Misma paciente 6 meses después de valoración inicial con progresión e debilidad escapular y aumento de angulación en escápula derecha (d). Paciente de la familia 5 con leve compromiso en fuerza muscular de cintura escapular logrando adecuada flexión y extensión de hombros (e y f). Paciente de la familia 4, con limitación a la abducción de miembros superiores, y presencia de contracturas articulares distales, (g), manos con deformidad en falanges y contracturas en flexores superficiales y profundos (h).

### 3) ESTUDIO MOLECULAR CON NGS SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS DE 10 GENES RELACIONADOS CON DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURAS.

En este estudio 25% de los pacientes (n: 5) presentaron hallazgos positivos con el panel de NGS y en el 15% (n: 3) se confirmó el diagnóstico del subtipo de distrofia por estudio molecular. De los 20 pacientes estudiados se identificaron 2 pacientes homocigotos para mutación en *disferlina* no relacionados (familias 2 y 5), un caso familiar atípico con mutación heterocigota en *DYSF* (familia 1), un paciente heterocigoto compuesto para calpaína con mutaciones raras en la población una de ellas no descrita previamente en las base de datos del NCBI (familia 3). Finalmente un paciente con variantes de significado incierto en los genes *CALPN3* y *DYSF* (familia 4).

#### FAMILIA 1

El estudio de NGS se realizó al probando y sus padres. Al momento del estudio múltiples miembros de la familia por rama paterna presentaban sintomatología similar al probando con compromiso de cintura pélvica y escapular, con gran variabilidad en la sintomatología intrafamiliar. Solo el probando y sus padres accedieron a la toma de estudio NGS.

El reporte de NGS identificó en el probando una variante con cambio de pauta en el marco de lectura (frameshift) heterocigota en el exón 26 gen *DYSF* (paciente IV. 5.) La variante se corroboró en su padre (paciente III.6) y el análisis de NGS en la madre (paciente III.7) fue negativo, lo cual confirma que la variante fue heredada por rama paterna. (Árbol genealógico familia 1. Figura 17). Según las guías ACMG<sup>(45)</sup> la variante es patogénica.

Figura. 17. Árbol genealógico familia 1.

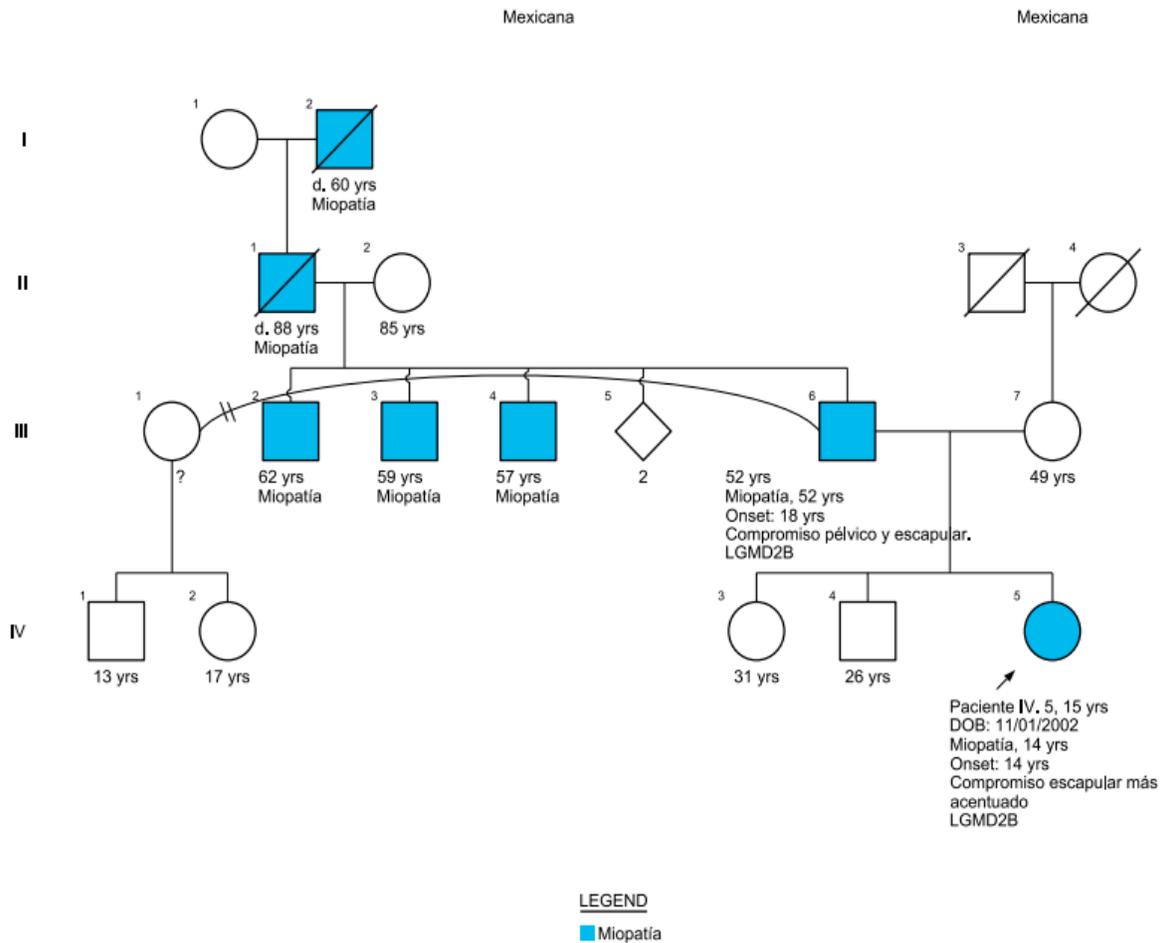


Figura 17. Familia 1. Se aprecian en la genealogía múltiples miembros de la familia por rama paterna afectados con miopatía de predominio en cintura pélvica y escapular, la genealogía sugiere una herencia Autosómica dominante. El fenotipo del probando evidencia mayor compromiso escapular que pélvico. Paciente IV.5 y III.6 Individuos con disferlinopatía, portadores de mutación heterocigota para *DYSF*. Sintomáticos.

## FAMILIA 2

En el probando (paciente III. 6) se identificó la presencia de una variante de cambio de sentido (missense) homocigota en el exón 51 del gen *DYSF*. Su hermana mayor quien presenta sintomatología similar a probando no accedió a participar en el estudio. Según las guías ACMG la variante es patogénica. (Árbol genealógico familia 2). (Figura 17).

Figura 17. Árbol genealógico familia 2.

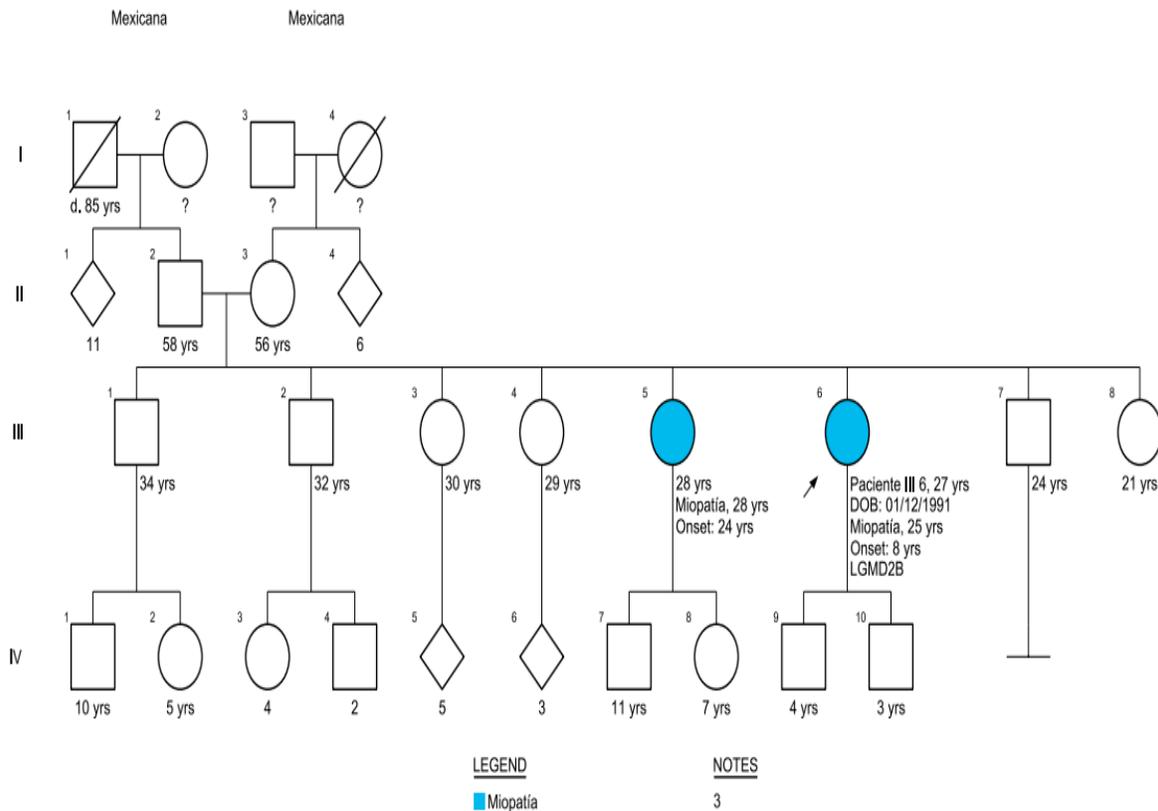


Figura. 17. Familia 2. Probando paciente III. 6 con diagnóstico de disferlinopatía confirmada por estudio molecular portador de mutación homocigota para *DYSF*. Paciente III. 5 con síntomas de miopatía sin estudio Molecular confirmatorio aún.

### FAMILIA 3

En el probando (paciente III.1), se identificaron 2 variantes en el gen *CAPN3*: la primera una variante missense heterocigota descrita como probablemente patogénica en el exón 3 del gen *CAPN3* la cual no ha sido descrita en los bancos de datos de población. Basandose en el software predictivo (*Mutation taster*)<sup>(46)</sup> la variante tienen impacto sobre la estructura de la función de la proteína. Apoyandose en las guías de ACMG: la variante es probablemente patogénica. La segunda variante identificada es una variante con cambio en la pauta de lectura (frameshift), heterocigota en el exón 14 del gen *CAPN3*, la presencia de la variante altera la pauta de lectura del RNAm, y resulta en un codón de paro de la traducción, lo cual produce un producto proteico incompleto. En la base de datos

especializada Mutation Taster la variante tiene un impacto sobre la estructura de la proteína final. Según las guías ACMG la variante es patogénica. Los padres del paciente no quisieron participar en el estudio de NGS, sin embargo el padre accedió finalmente a participar para análisis y confirmación a través de Sanger de las dos variantes presentes en el probando. En el momento del estudio ningún otro miembro de la familia cursaba con sintomatología. (Árbol genealógico familia 3). (Figura 18).

Figura 18. Genealogía de familia 3.

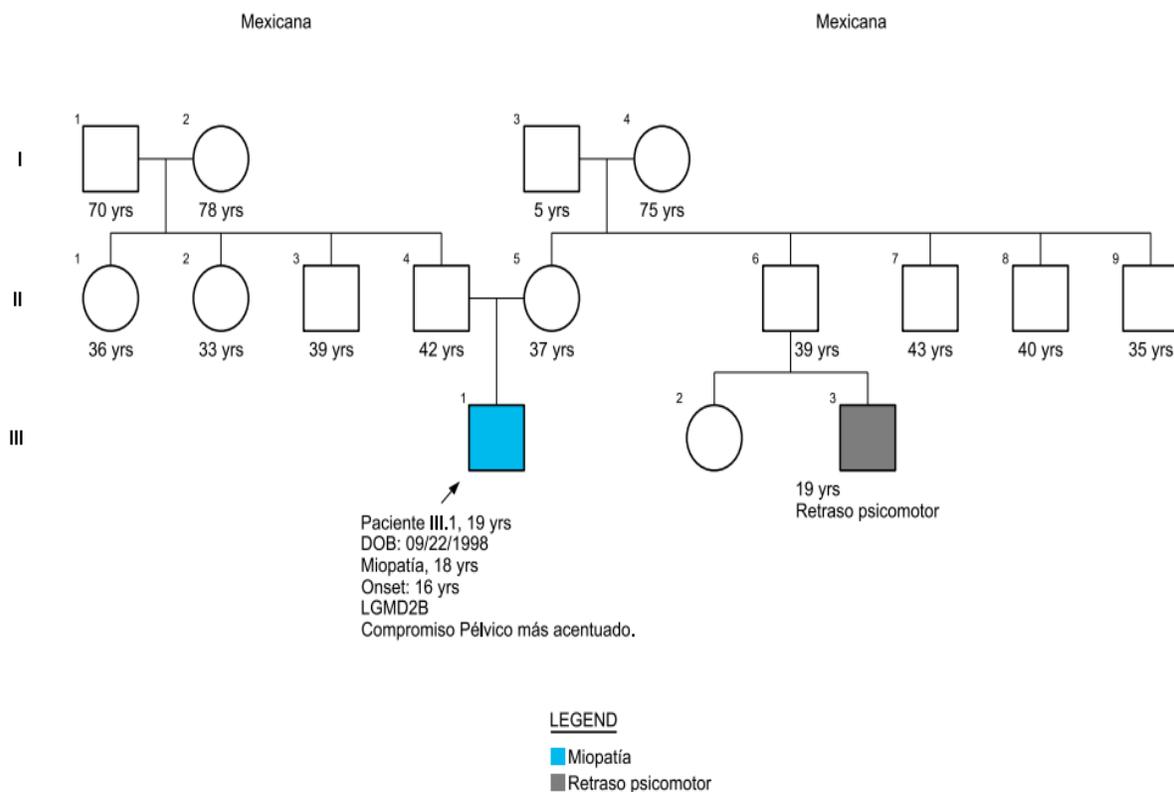


Figura 18. Familia 3. Paciente III. 1 con diagnóstico de calpainopatía confirmada por estudio molecular, heterocigoto compuesto para CAPN3. Padres portadores cada uno de mutación para CAPN3 en estado heterocigoto.

#### FAMILIA 4

Se identificó en el probando (paciente III.6) la presencia de una variante de cambio de sentido (missense) heterocigota en el exón 20 de *DYSF*, clasificada como de significado incierto según las guías ACMG. Esta variante fue corroborada posteriormente por Sanger. La segunda variante identificada fue una variante de

cambio de sentido (missense), heterocigota en el exón 9 del gen *CAPN3* de significado incierto, la cual no pudo ser corroborada por Sanger debido a que fue eliminada de la base de datos lo cual habla de una variante obtenida por predicción. Solo el probando tenía manifestaciones clínicas al momento del estudio. (Árbol genealógico familia 4). (Figura 19).

Figura 19. Árbol genealógico familia 4.

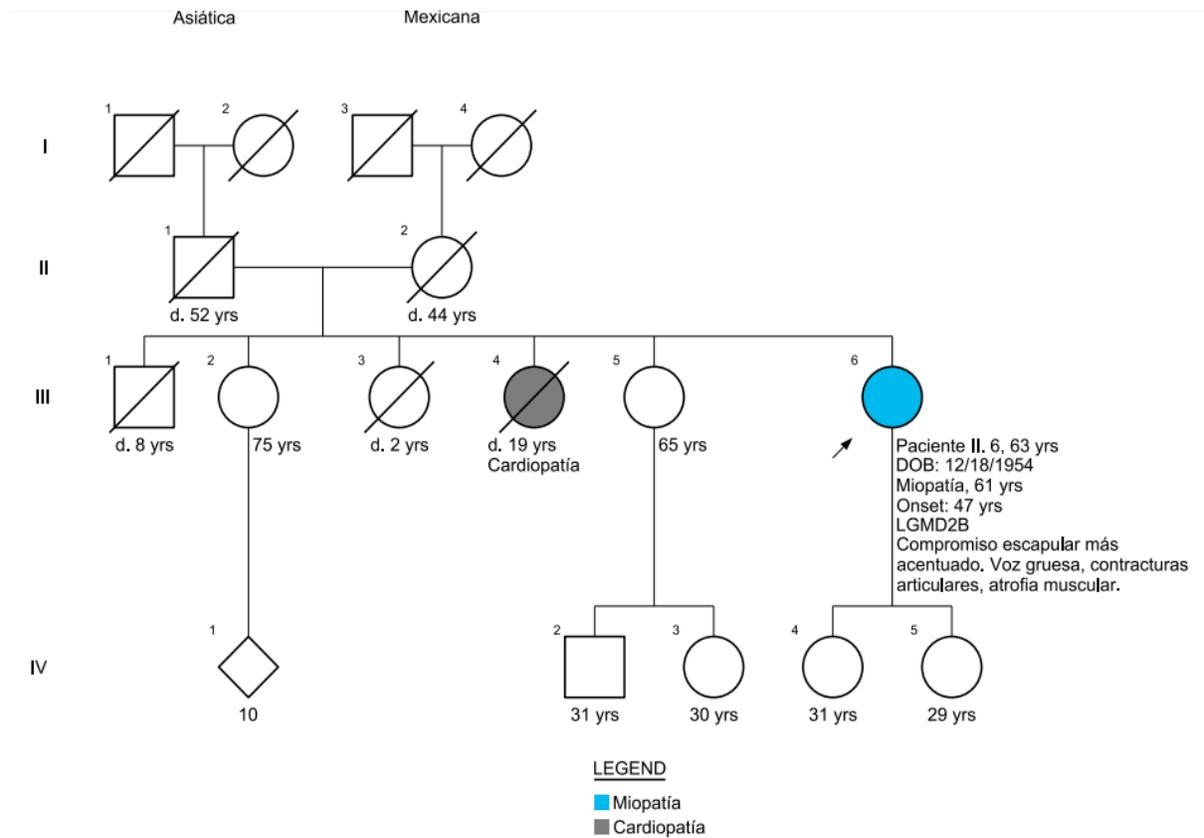


Figura 19. Familia 4. Se muestra el probando paciente III.6 quien es portador heterocigoto de una mutación en *DYSF* y presenta un fenotipo atípico asociado a dirferlina. Miembros en la familia sin manifestaciones de la enfermedad hasta el momento.

## FAMILIA 5

Se identificó en el paciente una variante missense homocigota en el exón 54 del gen *DYSF* patogénica según las guías ACMG. En esta familia existe consanguinidad en los padres del paciente debido a un antepasado común para la abuela materna y el abuelo paterno del paciente. Al momento del estudio ningún miembro de la familia presentaba manifestaciones clínicas compatibles con distrofia. Los padres no pudieron participar en el análisis debido a dificultad con la movilización desde estado de procedencia. (Árbol genealógico familia 5). (Figura 20).

Figura 20. Árbol genealógico familia 5.

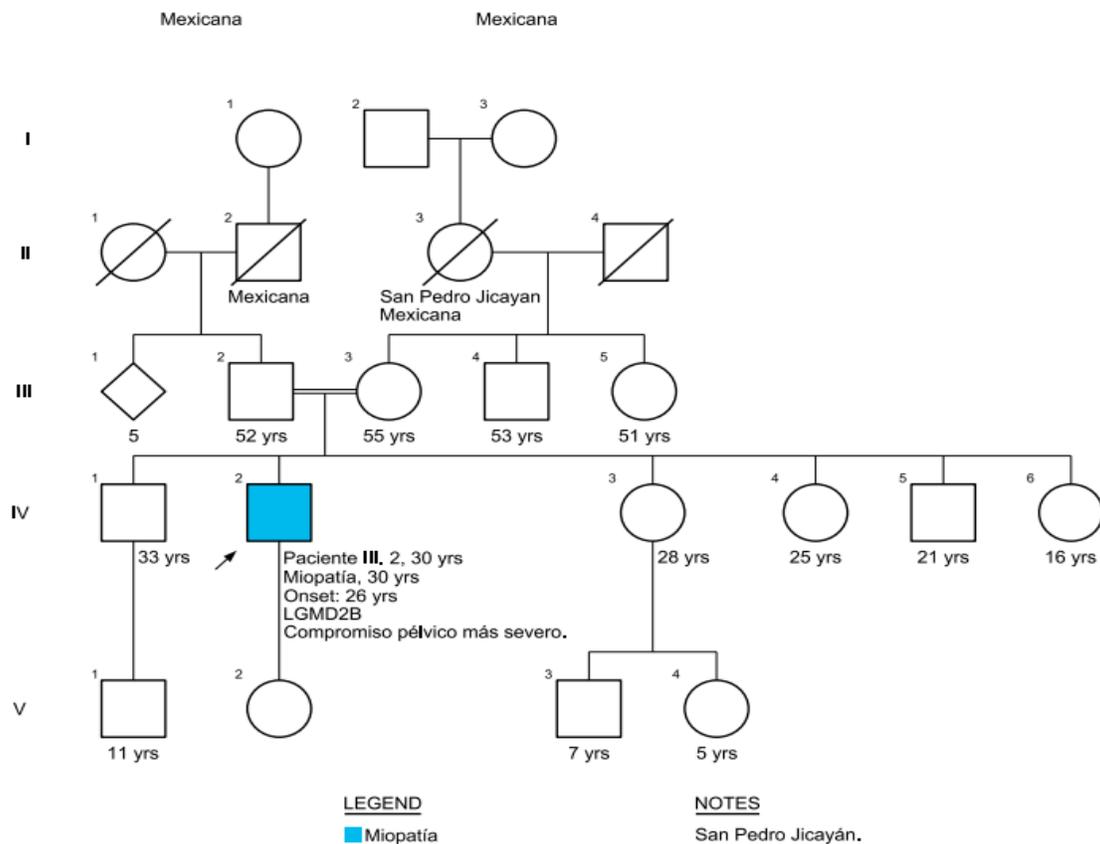


Figura 20. Genealogía que evidencia consanguinidad entre padres del probando debido a antepasado común en abuelos por ambas ramas. Probando paciente IV.2 con disferlinopatía confirmada por estudio molecular, con mutación homocigota para *DYSF*.

Tabla 6. Mutaciones identificadas en 5 pacientes con fenotipo de distrofia muscular de cinturas por Secuenciación de Nueva Generación. (NGS).

<i>Paciente</i>	<i>Mutaciones identificadas por NGS Nomenclatura NCBI</i>	<i>Nomenclatura a nivel de proteína</i>
FAMILIA 1. Paciente IV.5	NM_003494(DYSF_v001): c. 2777delG	p.(Ala927Leufs*21)
FAMILIA 2. Paciente III.6	NM_003494 (DYSF_v001): c. 4253G>A	p.(Gly1418Asp).
FAMILIA 3. Paciente III.1	NM_000070(CAPN3_v001): c.481G>A; y NM_000070(CAPN3:v001): c. 1771del.	p. (Gly161Arg) y p.(Asp591Ilefs*4)
FAMILIA 4. Paciente III.6	NM_003494(DYSF_v001): c. 1915C>T; y XM:005254703.1(CAPN3): c.467G>T	p. (Arg639Cys +)y p. (Arg156Lys).
FAMILIA 5. Paciente IV.2	NM_003494/DYSF_V001): c. 6124C>T	p. (Arg204Cys).

#### 4) ESTUDIO MOLECULAR CON SECUENCIACIÓN DE SANGER PARA CORROBORAR VARIANTES ENCONTRADAS POR NSG.

Se realizó secuenciación de Sanger a las muestras de todos los probandos con reporte previo en NGS positivo, para corroborar las variantes encontradas. En todos los pacientes las variantes fueron validadas por esta metodología. En la familia 3, en la segunda variante detectada en *CAPN3* demostró que en lugar de una delección reportada por NGS existía una inserción de una T (timina en la posición 1771 en el exón 14 del gen *CAPN3*) lo cual generaría un RNAm que codificaría una proteína con 40 aminoácidos distintos a partir del nucleótido T insertado en el exón 14, seguidos de un codón de paro, resultando en un producto proteico incompleto como se muestra en los alineamientos (Figuras 22 y 23) . En la familia 4 la variante missense en *DYSF* validada por Sanger fue descrita como de significado incierto según las guías ACMG, sin embargo al realizar un análisis en el programa PolyPhen-2 (*Prediction of functional effects of human nsSNPa*)<sup>(47)</sup>, indicó que esta mutación es probablemente patogénica con un score de 0.999.

Tabla 7. Mutaciones de NGS validadas por Secuenciación Sanger, secuencias de DNA genómico analizadas y reportes de variantes en NCBI.

<i>familia</i>	<i>Fenotipo clinico ALDA predominante</i>	<i>Secuencia de DNA analizada en Sanger</i>	<i>Resultado de Sanger</i>	<i>Reporte en NCBI</i>	<i>Validación de NGS</i>
1 IV.5	FSH y LGMD2A	NC_000002.12: g.71568307delG.	c.2777delG.p.Ala927 Leufs*21	rs74540725 1	si
2 III.6	LGMD2B, LGMD2I-F	NC_000002.12: g.71612726G>A.	c.4253G>A,p.Gly141 8Aps.	rs39812378 7	si
3 III.1	LGMD2b, Becker y LGMD2A	NC_000015.10: g.42386268G>A; NC_000015-10: g.4240376_4240377ins T	c.481G>Asp- Gly161Arg. c.1771_1772insT,p.A sp591Vals*40	No	si con cambio en segunda variante
4 III.6	LGMD1A y Nonaka	NC_000002.12:g.71553 173C>T	c.1915C>T	rs75284849 6	si
5 IV.2	LGMD2L, LGMD2 H, LGMD2B y Becker	NG_0086694.1:g.2339 75C>T	c.6124C>T,p.Arg204 2Cys	rs12190895 5	si

Figura 22. Alineamiento entre las secuencias del paciente 3 con la secuencia de DNA de referencia en el exón 14 de CAPN3. Programa Clustal-X.

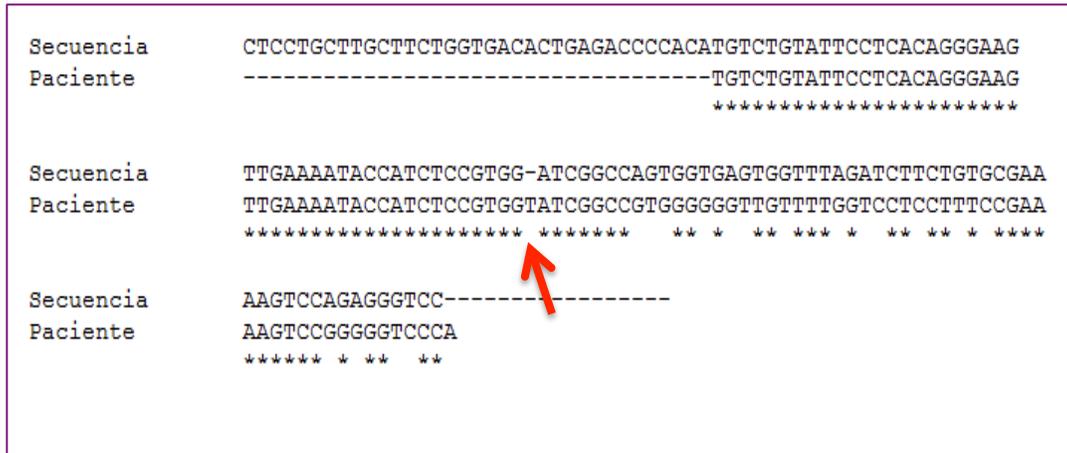


Figura 22. Analisis de alineamiento entre la secuencia obtenida por Sanger del paciente 3 y la secuencia de referencia reportada en el GenBank para el exón 14 de CAPN3. Los análisis de secuencia fueron llevados a cabo utilizando el programa bioinformático Clusta-X. La flecha roja indica la inserción de una timina en la posición c.1771-1772.

Figura 23. Alineamiento de secuencias proteicas para CAPN3 en la variante del exón 14 para CAPN3.

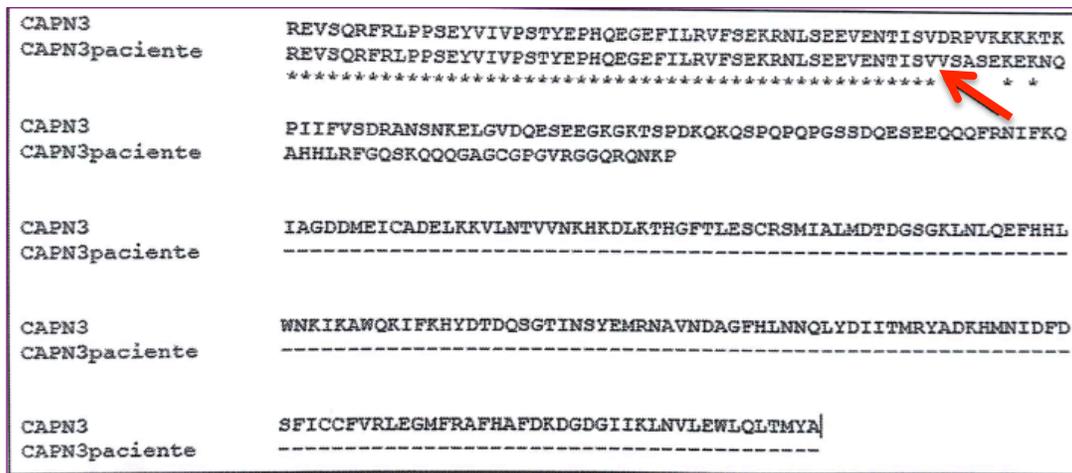


Figura 23. Análisis en silico de las secuencias a nivel de proteínas para CAPN3 reportado en el GeneBank y la secuencia obtenida en el paciente. La inserción de la T en el exón 14 de CAPN3 correría el marco de lectura y generaría un codón de paro prematuro después de 40 nuevos aminoácidos a nivel de proteína generando un producto trunco . La flecha indica el primer residuo modificado.

Figura 24: Modelo proteico de la Calpaína WT (Wylld Type) y la calpaína alterada por mutación en el exón 14 de CAPN3 en el paciente 3.

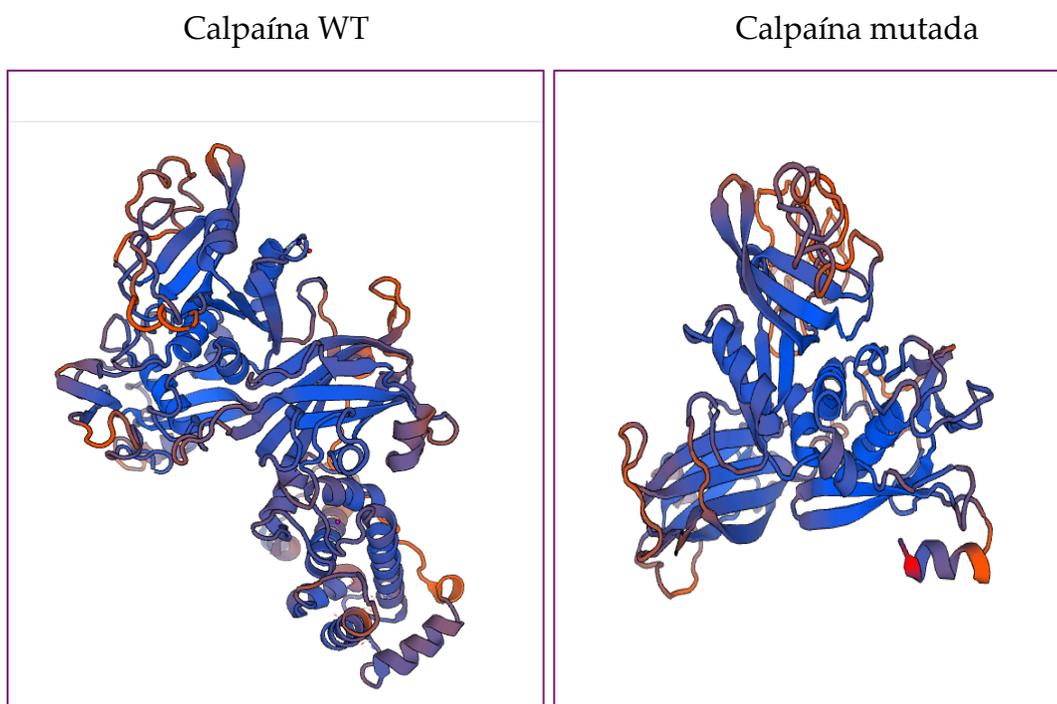


Figura 24. Predicción del modelo proteico a través de SWISS MODEL, en la cual se muestra la proteína calpaína Wylld Ttype y la proteína mutada con una alteración predominante en la subunidad catalítica-2, dentro del dominio proteasa de la Calpaína 3 debido a la Inserción de una Timina en la posición c.1771-1772, en el exón 14 de CAPN3 generando un codón de paro prematuro y una proteína truncada en el paciente 3.

(85)

A continuación se muestran los electroferogramas de las reacciones de secuenciación por metodología Sanger:

### FAMILIA 1.

Figura 25. Imagen de electroferograma paciente IV.5.

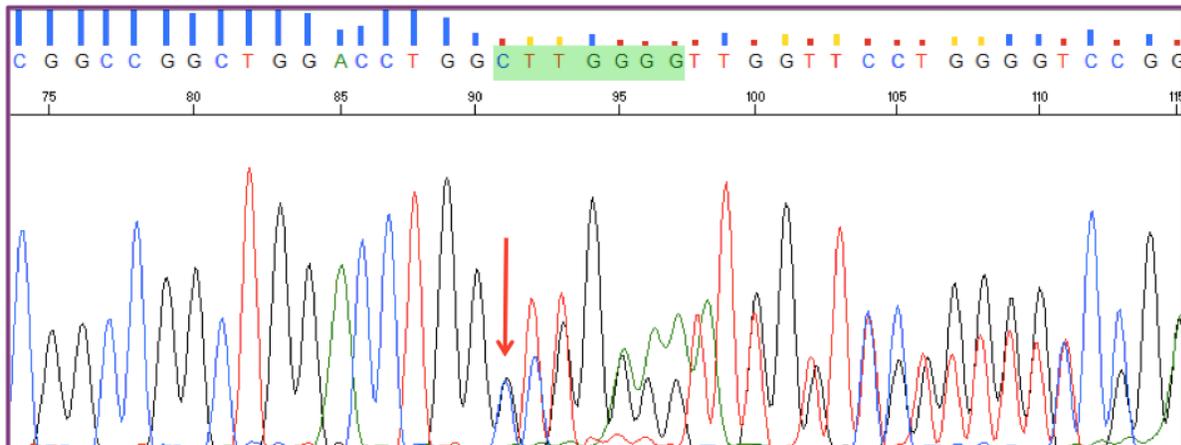


Figura 25. La flecha indica la presencia del inicio de doble señal debido a la presencia de una mutación frameshift con el corrimiento del marco de lectura. c. 2777delG en el exón 26 de DYSF en estado heterocigoto.

### FAMILIA 2

Figura 26. Imagen de electroferograma paciente III.6

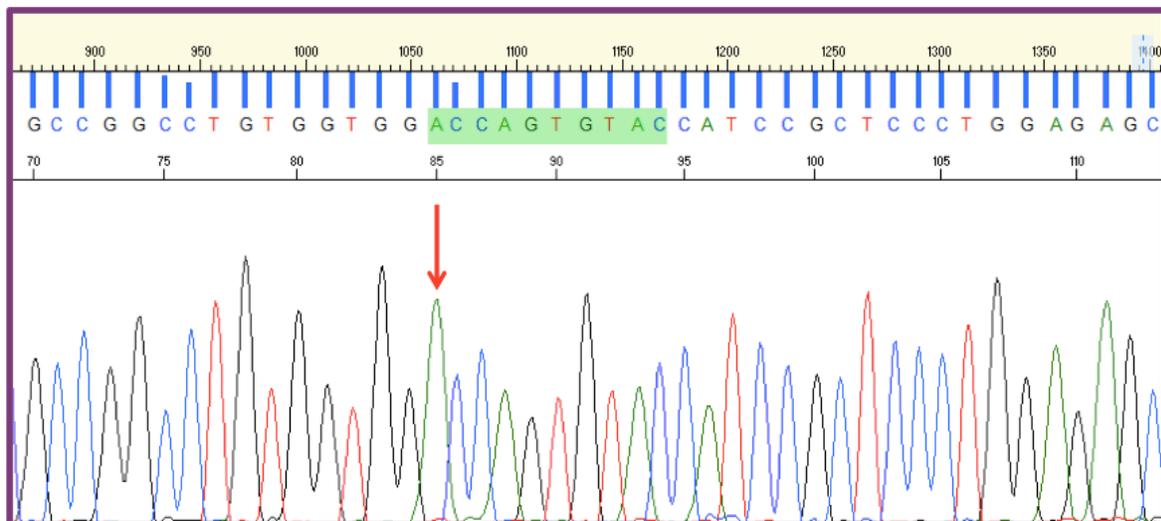


Figura 26. La flecha indica la variante missense homocigota donde se aprecia una adenina en lugar de guanina en el codón número 4253, en el exón 51 de DYSF.

### FAMILIA 3

Figura 27. Imagen de electroferograma del exón 3 de CAPN3 en el paciente III.1.

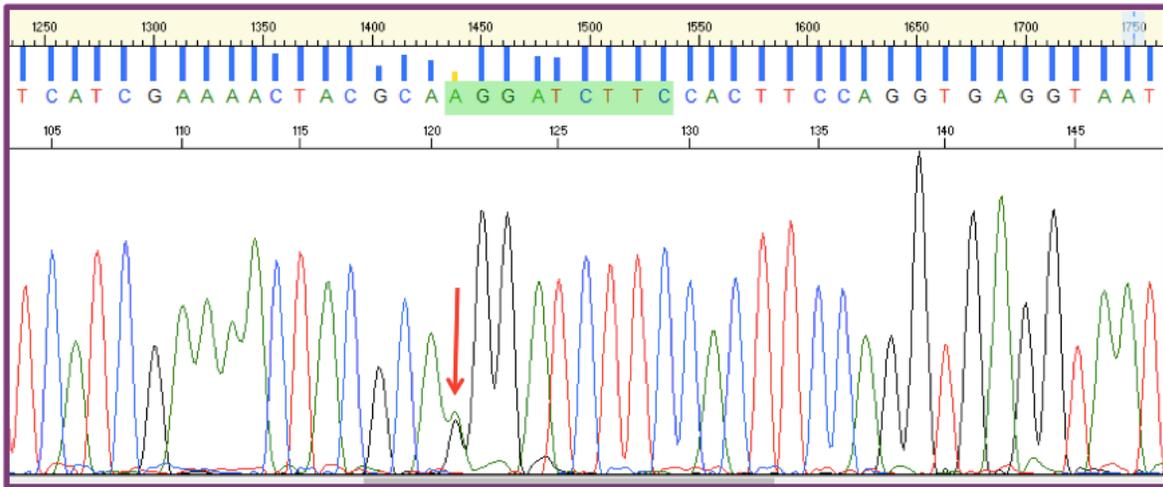


Figura 27. La flecha indica la presencia en estado heterocigoto de la variante missense c. 481G>A en el exón 3 de CAPN3. Sustitución del nucleótido Guanina por Adenina.

Figura 28. Imagen de electroferograma del exón 14 de CAPN3 del paciente III.1

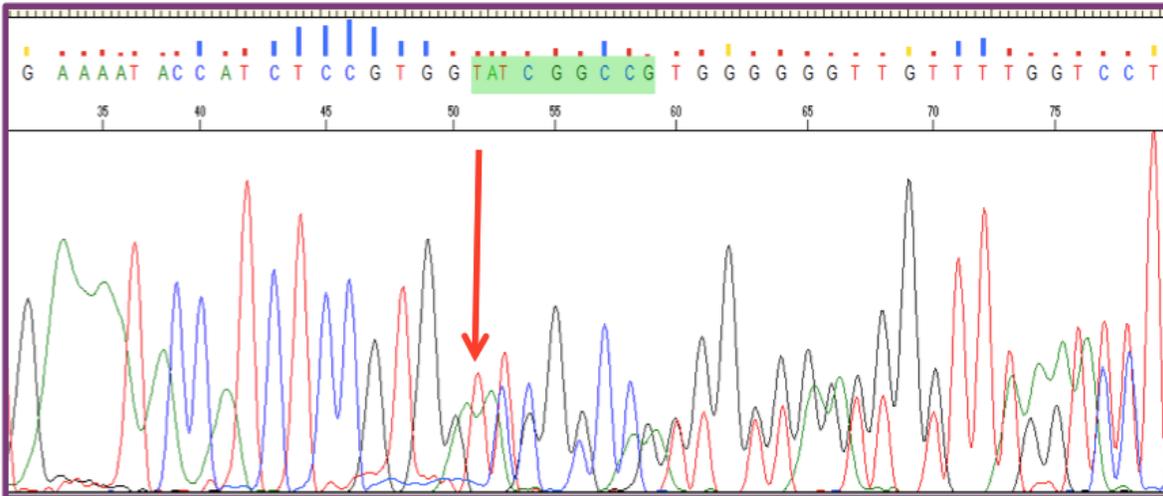


Figura 28. La flecha indica la presencia de cambio en el marco de lectura por la variante frameshift en el exón 14 de CAPN3. Se identificó por sanger una inserción de Timina en estado heterocigoto en la posición número c. 1771, la inserción de timina altera el marco de lectura resultando en codón de paro prematuro en el paciente y por ende un producto proteico incompleto.

#### FAMILIA 4

Figura 29. Imagen de electroferograma del paciente III.6

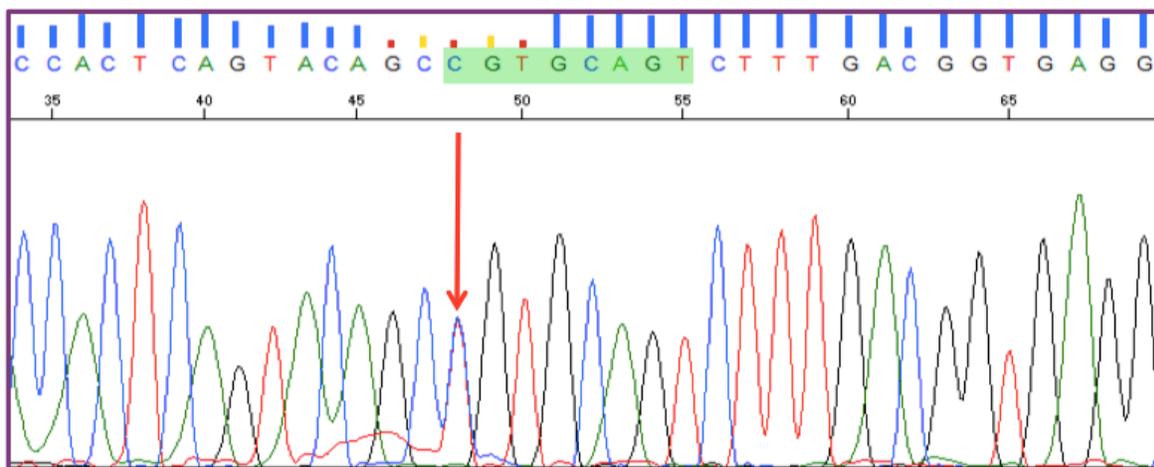


Figura 29. La flecha indica la presencia de Timina (T) y una citosina (C), lo cual genera una mutación de tipo cambio de sentido o missense, en el exón 20 del gen DYSF.

#### FAMILIA 5

Figura 30. Imagen de electroferograma del paciente IV.2

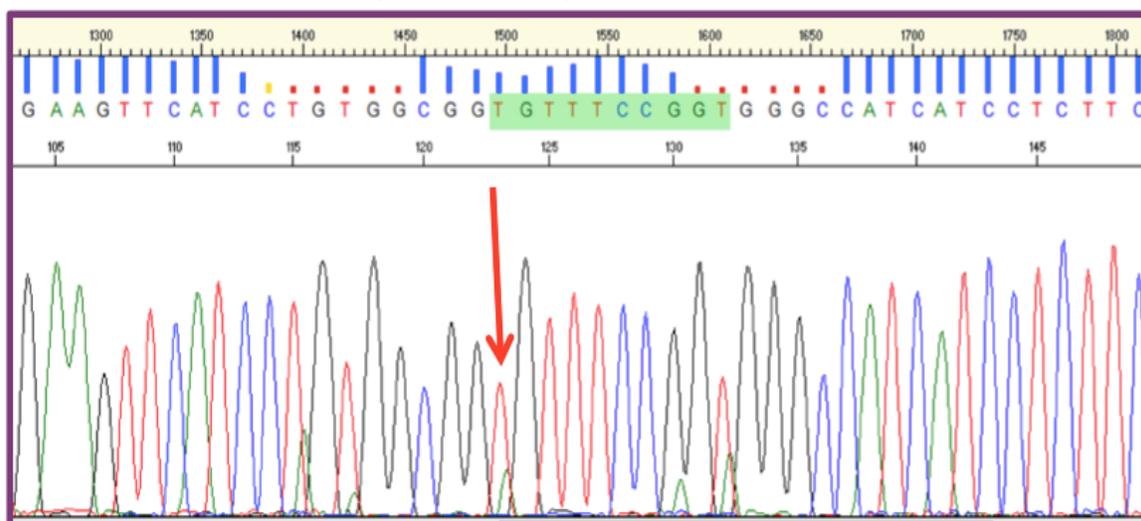


Figura 30. La flecha indica la presencia en homocigosis de la variante c.6124C>T en el exón 54 de DYSF.

## **XII. DISCUSIÓN**

En este estudio la *NGS* permitió confirmar el diagnóstico del subtipo de distrofia muscular de cinturas en el 15% de los 20 individuos sometidos al estudio molecular. Todos los pacientes incluidos en el estudio cumplían criterios diagnósticos clínicos para distrofia de cinturas y aunque no contaban con estudio de biopsia muscular e inmunohitoquímica, la prueba mostró gran sensibilidad en la detección de mutaciones en genes relacionados con distrofias recesivas.

La secuenciación de Nueva generación actualmente, esta siendo utilizada cada vez más como parte del protocolo de abordaje en pacientes con enfermedades genéticas heterogéneas; en la actualidad la *NGS* se considera el primer abordaje diagnóstico, sobre cualquier otro abordaje, en pacientes con sospecha clínica de Distrofia muscular de cinturas <sup>(17)</sup>. Los resultados de este estudio, demuestran que las nuevas tecnologías de secuenciación son útiles en el diagnóstico y clasificación de patologías heterogéneas, como las distrofias musculares en donde antes era prescindible la obtención de un estudio histopatológico previo como requisito antes del estudio genético.

Consideramos que en futuras investigaciones en pacientes con distrofias de cinturas, los paneles de genes para *NGS* debería incluirse dentro del diagnóstico de estos pacientes como uno de los primeros pasos de abordaje después de descartar las patologías más frecuentes asociadas a distrofia muscular entre ellas distrofia muscular de Duchene y Becker, sin la necesidad de un estudio histopatológico e inmunohistoquímico previo, siempre y cuando sea posible el acceso a ello, como en nuestro estudio donde la *NGS* formaba parte de un protocolo en un laboratorio externo, por lo cual no tenía ningún costo para los pacientes.

En otras series de casos donde se ha estudiado la utilidad de la NGS en pacientes con distrofias musculares, se ha reportado una sensibilidad con esta técnica para la detección de mutaciones de hasta del 40%; comparado con nuestro estudio en el cual tuvimos un porcentaje de detección del 20%, nuestra tasa de detección fue más baja; en las cohortes estudiadas previamente los paneles moleculares utilizados han sido más extensos abarcando una gran cantidad de genes relacionados con distrofias. Plataformas como (*HaloPlex Target Enrichment, System Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US*) (*motorplex*)<sup>(48)</sup>, que pueden contener hasta 98 genes han sido utilizadas, esto explicaría porque la tasa de detección reportada en la literatura fue mayor que en esta cohorte ya que en nuestro estudio solo se incluyó un panel con los 10 genes más frecuentes asociados a LGMD.

El ALDA Score ha sido una herramienta utilizada en los últimos años que ayuda en la clasificación clínica de los pacientes con distrofias de probable origen genético; esta herramienta ha mostrado una gran utilidad en cohortes de pacientes estudiadas desde el año 2012<sup>(42)</sup> y en la actualidad le es de gran ayuda al clínico para clasificar la probabilidad del subtipo de distrofia presente en el paciente, así como para clasificar la probabilidad de que el individuo sea portador de una mutación en genes relacionados con distrofias musculares de cinturas.

En nuestro estudio, el ALDA score no tuvo mucha sensibilidad para clasificar y predecir el subtipo más probable de distrofia que presentaban clínicamente los pacientes, lo cual se evidenció en que solo 2 de los 5 pacientes que tuvieron un resultado positivo en el estudio genético, tenían previamente un diagnóstico por ALDA que fue corroborado y validado en el estudio molecular. Esto se debió a que probablemente no se pudieron incluir todos los datos de las variables que el programa solicitaba; uno de los motivos fue que en varias familias, no se contaba con toda la información necesaria para llenar las variables por los pocos datos suministrados por los pacientes ó sus familiares y en otros casos no se disponía institucionalmente de recurso económico que oscilaba por encima de 1000 dólares americanos, para realizar a los pacientes la biopsia muscular y la inmunohistoquímica que eran dos de los parámetros preguntados en el test de

ALDA, motivo por el cual estas variables fueron clasificadas como desconocidas en los pacientes al llenar los datos del ALDA. Sin embargo a pesar de que los datos clínicos no estuvieron completos en los pacientes para calcular el ALDA el score utilizado en este estudio predijo el diagnóstico de disferlinopatía en 2 de los 5 pacientes que tuvieron resultado molecular positivo para mutación en *DYSF* (familia 2 y 5). Creemos que el ALDA Score, cuando es utilizado cubriendo todas las variables que solicita por paciente, puede ser una herramienta útil y debe continuarse utilizando a futuro en la clasificación de los pacientes con distrofia muscular.

En nuestro estudio la distrofia muscular más prevalente fue la disferlinopatía o LGMD2B, lo cual es diferente de lo reportado previamente en la literatura donde la calpainopatía es la distrofia de cinturas autosómica recesiva más común a nivel mundial <sup>(49, 50, 51)</sup>. En este estudio de cinco pacientes con resultado molecular positivo, cuatro presentaron mutaciones asociadas a *DYSF* y solo un paciente fue diagnosticado con mutaciones en *CAPN3*, esto nos hace pensar que posiblemente en México la prevalencia de disferlinopatía puede ser más alta que en otras poblaciones estudiadas como la italiana, donde las formas Autosómicas recesivas corresponden al 84% de los casos y de ellas el 24,7% corresponden a LGMD2A, (calpainopatía) luego LGMD2B (disferlinopatía) en el 23, 8%, seguidas del grupo de las sarcoglicanopatías en el 20.1% de los casos <sup>(48)</sup>. Los grupos étnicos en los cuales se conoce actualmente que existen mayores prevalencias de mutaciones en disferlina son población judía, con predominio de judíos afectados en la región de Libia, judíos caucásicos, y población española e italiana esta última con mutaciones fundadoras identificadas previamente <sup>(52, 53, 54)</sup>.

En este estudio el tamaño de la muestra no nos permitió generar conclusiones respecto a la frecuencia de mutaciones en *DYSF*, que resultó ser superior a la esperada para la muestra; sería un error concluir que una mayor prevalencia de mutaciones en *DYSF* es una característica común en la población mexicana con los datos que tenemos hasta el momento, por lo tanto es necesario llevar a cabo estudios a futuro donde se incluyan muestras más representativas de la población

para caracterizar con mayor precisión la prevalencia de mutaciones en los genes asociados a distrofias musculares del anillo óseo en México.

En México actualmente a través del estudio de Pantoja Meléndez y colaboradores,<sup>(20)</sup> se llevó a cabo la caracterización del perfil molecular y epidemiológico de una región con alta prevalencia de calpainopatía en una región con endogamia en el estado de Oaxaca, aunque se desconoce la prevalencia de esta patología y de otros subtipos de distrofias en otros lugares del país. Por esto es necesario ampliar el perfil epidemiológico de genotipos en nuestra población, no solo en regiones de individuos con endogamia y consanguinidad, sino también en poblaciones sin endogamia en las cuales existan individuos que cumplan criterios clínicos para distrofias musculares.

El estudio de Pantoja, ha sido el único estudio conducido en México hasta la fecha sobre distrofias musculares y nuestro estudio complementa y amplía el panorama de conocimiento con respecto a este tipo de patologías en el país, ya que muchas de las mutaciones encontradas en *DYSF* y *CAPN3*, correspondieron a casos clínicos atípicos para la patología de base y otros fueron explicados a través del hallazgo de mutaciones raras e incluso no reportadas previamente en la literatura.

En este estudio se presentó un caso atípico en la familia 1 donde tanto el probando (paciente IV:5) como su padre (paciente III.6) eran portadores de una mutación característica en población judía Askenazi<sup>(36, 55)</sup>. Ambos eran portadores de la mutación c.2779delG en el exón 26 de *DYSF* en estado heterocigoto y se presentaron con un fenotipo clínico poco usual tanto a nivel individual como intrafamiliar. Múltiples miembros de la familia mostraban características clínicas heterogéneas, así como heterogeneidad en la edad de aparición y progresión de los síntomas. El dato clínico típico en la mayoría de los familiares fue compromiso de cintura pélvica y escapular desde temprana edad generalmente en la segunda década de la vida con progresión de debilidad muscular y algunos evidenciaban compromiso facial. Inicialmente por el análisis genealógico se pensó que esta familia presentaba distrofia con patrón de herencia Autosómico dominante entre ellas la distrofia fascioescapulo -humeral la cual fue predicha por el ALDA Score en el paciente; sin embargo ante la falta de datos clínicos significativos para la FSH

y la ausencia de estudio molecular confirmatorio en México se decidió incluir a esta familia para estudio con el panel de genes por NGS ya que cumplían los criterios de inclusión originales. La paciente que consultó a nuestro servicio de Genética presentaba leve compromiso de músculos faciales y fenotipo con compromiso muscular: escapulo humeral de inicio en adolescencia, mientras su padre presentaba un fenotipo con mayor compromiso de cintura pélvica y progresión moderada; en ambos los niveles de Ck no estaban significativamente elevados e incluso en la paciente después de 6 meses de seguimiento los niveles de Ck bajaron significativamente casi el doble del reporte inicial. Se conocen casos reportados en la literatura donde individuos con mutaciones heterocigotas en *DYSF* han presentado sintomatología atípica relacionada con disferlinopatía. De luna, Domínguez y colaboradores, reportaron dos casos de portadores sintomáticos de mutaciones en *DYSF*, en una familia, con cuadros clínicos atípicos en los cuales se consideró había una penetrancia variable, similar a la penetrancia variable en casos de distrofia fascio escapulo humeral, además la genealogía evocaba una herencia autosómica dominante <sup>(56)</sup>; ambos autores concluyeron que el diagnóstico de portadores asintomáticos debería ser implementado cuando se detecta un patrón patológico en el análisis de expresión de la proteína en tejido muscular, sin embargo en nuestro caso no fue posible la realización del análisis de expresión de la proteína.

Los individuos descritos por De Luna, presentaban diferentes fenotipos: el primero un patrón de LGMD y el segundo presentaba debilidad distal en miembros inferiores a diferencia de nuestro paciente en donde el compromiso escapular es más pronunciado. A pesar de que los síntomas clínicos se presentaron después de la segunda década de la vida en los pacientes y en uno de ellos hasta la quinta, se demostró que los portadores de mutaciones en *DYSF* pueden ser más frecuentes de lo que se conoce actualmente y fenotipos clínicos atípicos pueden presentarse en las familias <sup>(56)</sup>; esto fue confirmado en nuestro estudio donde el probando y su padre portaban la misma mutación heterocigota con un fenotipo completamente diferente.

En esta familia podríamos estar ante la presencia de un nuevo fenotipo clínico asociado a disferlinopatía no reportado previamente ya que no hay datos clínicos de portadores heterocigotos de esta mutación fundadora en la literatura; sin embargo creemos que en este caso, es necesario complementar estudios moleculares en el probando con técnicas como MLPA, para descartar re arreglos no vistos por la técnica de secuenciación y que podrían explicar la presencia de síntomas en probables “portadores heterocigotos” que de corroborarse, serían heterocigotos compuestos para mutaciones en *DYSF* y no portadores heterocigotos. Así mismo consideramos, que se deberían buscar mutaciones en regiones no codificantes (regiones intrónicas y en promotores), las cuales no fueron vistas por los métodos de secuenciación empleados. Finalmente no se descarta una herencia digénica en este caso ya que la presentación del fenotipo atípico en la familia se puede deber no solo a la variante heterocigota en *DYSF* sino a otra variante que no haya sido detectada en el panel de 10 genes inicial y explique la genealogía dominante en esta familia.

Existen casos reportados en la literatura asociados a distrofias musculares recesivas con genealogía dominante como en los reportes descritos por Thompson y colaboradores en 2017 <sup>(62)</sup> donde se reportaron 3 familias portadoras de variantes patogénicas heterocigotas en *CAPN3*, asociados a calpainopatía con genealogía Autosómica dominante, sin embargo hasta la fecha no han sido reportados casos de genealogías Autosómicas dominantes relacionadas con variantes patogénicas heterocigotas en *DYSF*.

En la familia 2 el reporte de una variante homocigota patogénica en disferlina en el probando se explica por probable endogamia en los padres de la paciente, debido a que procedían de una región en pequeña en Morelia, Michoacán, México. Su hermana mayor presentaba la misma sintomatología por lo cual creemos que también puede ser portadora de la variante patogénica, sin embargo, su hermana no quiso participar en el estudio para que la variante fuera corroborada. Esta variante ya ha sido reportada en otras cohortes como causante de LGMD2B, Rosas, Gómez y colaboradores, <sup>(57)</sup> reportaron una mutación en una familia mexicana con antecedente de endogamia, mutación que fue luego encontrada en otros miembros

de la familia. La mutación está localizada en una secuencia de aminoácidos bien conservada entre los diferentes miembros de la familia de las ferlinas, a lo largo de la escala filogenética, lo cual sugiere un importante rol dentro de la proteína. La mutación afecta directamente el dominio C2D-C2F de la proteína causando una pérdida de función de la misma <sup>(57)</sup>, lo cual explica la sintomatología y la progresión típica de esta disferlinopatía.

Con respecto a la familia 3, en este estudio detectamos una mutación patológica, en el probando no descrita previamente en NCBI para el gen *CAPN3*, y otra mutación rara en la población en este mismo gen. Se comprobó que el probando era heterocigoto compuesto para *CAPN3*. A pesar de que no hay datos de consanguinidad y endogamia en los padres, creemos que ambos padres son portadores de mutación en *CAPN3*, aunque hasta el momento ningún otro miembro de la familia ha presentado síntomas asociados a sistema musculoesquelético. Los padres del paciente lamentablemente no accedieron a participar en el estudio, por motivos personales y socioeconómicos que les imposibilitaba su traslado hasta esta institución de Salud.

En el probando de la familia 3, el análisis inicial por NGS reveló una mutación en el exón 3 y otra en el exón 14. En el exón 14 de *CAPN3* donde inicialmente se reportaba una deleción, la secuenciación de Sanger reveló que existía una inserción de una T (timina), entre los codones 1771 y 1772, lo cual según análisis predictivo a través del programa Clustal-X, generaría un codón de paro y una modificación de 40 aminoácidos en la proteína ocasionando una proteína trunca. Esta variante es rara y no está reportada como variante patológica asociada a calpainopatía. Este sería el primer caso reportado a nivel mundial de un paciente heterocigoto compuesto para calpainopatía con una variante rara en el exón 3 de *CAPN3* con una prevalencia en la población inferior al 1% y otra variante patológica en el exón 14 no descrita previamente. Lo anterior podría explicar la severidad de las manifestaciones clínicas en el paciente y la rápida progresión en poco tiempo de los síntomas, ya que la bipedestación actualmente en el probando está severamente comprometida e incluso necesita un apoyo con tutor externo o silla de forma permanente. Hasta el momento el paciente no ha presentado otra

sintomatología asociada a la calpainopatía presentando un compromiso mucho más severo en músculos de cintura pélvica en comparación con los músculos de cintura escapular. Ambas mutaciones en *CAPN3*, generan alteraciones en la función y estructura de la calpaína por lo cual, es necesario seguir la vigilancia estrecha del paciente para detectar fenotipos asociados conforme avanza la entidad y así anticipar complicaciones a futuro para un óptimo manejo.

De acuerdo con la base de datos de Leiden para distrofias musculares <sup>(58)</sup>, cerca de 490 mutaciones han sido reportadas en el gen *CAPN3* hasta la fecha. El 60% de las mutaciones corresponden a mutaciones missense y aparecen eventualmente distribuidas a lo largo del gen. Sin embargo al analizar el número de alelos mutantes las mutaciones se identifican principalmente en un 80 al 90% en los exones : 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 19, 21, y 22, los cuales a su vez son más susceptibles a mutaciones espontáneas. La mayoría de las mutaciones en calpaína se ubican en los dominios IIA, IIB y III, mientras mutaciones en regiones específicas se encuentran en sitios no hot-spots y tienden a ubicarse en dominios como el IS1 e IS2 de la proteína <sup>(30)</sup>.

La mutación c.550delA abarca en promedio el 75% de los alelos mutantes para ciertos grupos poblacionales entre ellos todos los caucásicos y en países como Rusia , Croacia, Turquía, Bulgaria, Polonia, Alemania e Italia. Así mismo se ha demostrado un efecto fundador por análisis de haplotipos de esta variante en Rusia, Croacia, Bulgaria y el norte de Italia <sup>(30, 59)</sup>. El 20% de las mutaciones en el gen *CAPN3* están localizadas en regiones intrónicas, en regiones de unión intrón – exón o en otras regiones no codificantes y otras mutaciones raras en la población, han sido reportadas como mutaciones que tienen recurrencia en poblaciones específicas y son consideradas como mutaciones únicas (exclusivas); estas mutaciones se dan como consecuencia de un efecto fundador, seguidas por aislamiento genético específicamente en pequeñas poblaciones donde la acumulación de mutaciones puede ser explicada por la endogamia cultural, factores demográficos, religiosos u e incluso políticos. En nuestro estudio la mutación c.550delA no fue detectada en las familias analizadas a pesar de ser una mutación frecuente y prevalente asociada a calpainopatía; por el reporte de las

variantes encontradas en nuestro probando, probablemente estemos ante un caso de mutaciones exclusivas en México, por un efecto fundador, sin embargo ante el desconocimiento de otros pacientes con este mismo genotipo de variantes patogénicas reportadas en *CAPN3* así como el desconocimiento del perfil genético de las distrofias en México y su prevalencia, a futuro se tendrán que hacer estudios de ligamiento con más pacientes para demostrar desequilibrios de ligamiento como se ha demostrado por ejemplo el efecto fundador de otras mutaciones raras en *CAPN3*, como la mutación: c.2362\_2363delAGinsTCATCT en España <sup>(60,61)</sup>.

Con respecto a la paciente de la familia 4, la paciente presenta un caso atípico no antes descrito en relación con mutaciones en el gen *DYSF*. Originalmente el estudio de NGS reportó dos variantes de significado incierto en *CAPN3* y *DYSF*, sin embargo, la secuencia de referencia para *CAPN3* que reportaba la variante, fue eliminada de la base de datos NCBI, lo cual habla de que probablemente fue obtenida por análisis de predicción inicialmente, por lo que no fue posible elaborar una estrategia para llevar a cabo su validación por Sanger. La variante en *DYSF*, reportada inicialmente como variante de significado incierto fue sometida a análisis predictivo a través del programa PolyPhen-2 <sup>(47)</sup> el cual indicó que esta mutación es probablemente patogénica con un score de 0.999 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2/dc5eb6d8db40bbdc5ad245a7c5a4cbcf1df1c8/4903415.html>).

Como en el caso de la familia 1, este caso familiar podría corresponder a un caso nuevo de un portador heterocigoto para mutación en *DYSF*, asociado a un fenotipo clínico atípico. La paciente presentaba contracturas articulares en miembros superiores y un compromiso de cintura escapular de forma más significativa; así mismo, presentaba datos de atrofia muscular en miembros superiores e inferiores, cambios en voz y disfagia, así como depresión de músculos bitemporales. Sería deseable en este caso realizar otros estudios moleculares en búsqueda de otros genes comprometidos entre ellos el gen *GNE*, descrito en relación con miopatía de Nonaka en el *locus* 9p13, el cual es más común en población de descendencia japonesa <sup>(17)</sup>. En el probando de la familia 4 se desconocen datos de ascendencia de parientes paternos, sin embargo el fenotipo de la paciente evidencia rasgos

asiáticos y típicos de población oriental, por este motivo reforzamos la teoría de que el estudio del gen *GNE* debería realizarse a futuro. Proponemos llevar a cabo el diagnóstico diferencial en este caso con las miopatías distales con compromiso de cuerdas vocales, en las cuales aún no se han dilucidado genes causales y existen posibles candidatos a estudiar. Consideramos que la mejor opción en esta paciente es un análisis de exoma en búsqueda de otros genes candidatos, vinculados con su fenotipo clínico.

Resulta interesante el hecho de que en los pacientes con mutaciones patogénicas en *DYSF*, se ha detectado que muestran una disminución significativa en los niveles disponibles de calpaína-3 hasta en un 50% y caveolina-3 en el tejido muscular en muestras analizadas con inmunohistoquímica. Estas proteínas interactúan con disferlina y tienen roles claves en su acción, lo cual podría ser parte de la explicación de porque se han descrito casos de portadores heterocigotos sintomáticos en disferlinopatías <sup>(64)</sup>. Así mismo, se sabe que mutaciones en *CAPN3* regulan los niveles de expresión de disferlina a nivel muscular mediante la interacción con el complejo proteico entre calpaína y la proteína de diferenciación neuroblástica asociada (AHNAK) lo cual demuestra que ambas vías son interdependientes <sup>(65)</sup>. Por esta razón consideramos que esta paciente también sería candidata a análisis de expresión de proteínas en músculo a través de técnicas como Western blot y/o inmunohistoquímica tanto para calpaína así como para disferlina, con la desventaja de que se requeriría muestra de tejido muscular y en este caso, la atrofia muscular de la paciente es considerable.

El paciente de la familia 5 presentó una mutación homocigota patogénica en *DYSF*, descrita previamente en la literatura, la cual se puede explicar por la presencia de consanguinidad en padres (primos en segundo grado). Hasta el momento es el único miembro afectado en su familia y se aprovechó la posibilidad de realización de estudio a otros miembros con el fin de completar el asesoramiento genético. Esta mutación ya ha sido descrita en las bases de datos para *DYSF*, y existen reportes de esta, como en el estudio de resultados clínicos en Disferlinopatía, el cual se realizó con 139 pacientes con un seguimiento a 3 años <sup>(66)</sup>. En ese estudio se documentó la prevalencia de un alto porcentaje de mutaciones missense de 38,4%,

en la cohorte estudiada entre ellas la mutación identificada en nuestro paciente c.6124C>T,p.Arg2042Cys en el exón 54 de *DYSF*, la cual fue identificada en 5 de los pacientes analizados. Se sabe que generalmente la reducción de la expresión de disferlina a causa de mutaciones missense explica la sintomatología clínica en los pacientes, sin embargo aún falta mucho por investigar, para determinar el mecanismo por el cual estas mutaciones missense llevan al desarrollo de la enfermedad.

Se cree que las mutaciones missense causan inestabilidad en la proteína generando niveles reducidos de disferlina en el tejido. Otras investigaciones han demostrado que las mutaciones missense pueden producir niveles óptimos de disferlina pero con una localización anómala de la proteína lo cual conlleva al desarrollo del fenotipo <sup>(66)</sup>. Los fenotipos clínicos identificados en este estudio concuerdan con el fenotipo presentado en nuestro paciente en el cual fue predominante el compromiso pélvico con respecto al escapular. Así mismo la edad de presentación de los síntomas fue acorde al rango esperado. Este genotipo ha sido altamente relacionado con *LGMD2B* y en muchos casos con fenotipo de miopatía concomitante del tipo *Miyoshi+ LGMD2B* <sup>(66)</sup>.

Nuestro estudio demuestra que es necesario realizar a futuro más investigaciones para caracterizar el perfil molecular de las distrofias de cinturas en nuestra población, en donde la prevalencia de estas patologías puede ser considerablemente distinta a otros grupos poblacionales. En nuestro estudio todas las mutaciones detectadas por NGS fueron validadas por Sanger lo cual expone la alta calidad y precisión de la misma. En este estudio la NGS ayudo a caracterizar molecularmente a los pacientes y ayudó a iniciar un protocolo individualizado de diagnóstico en aquellos en los cuales los resultados no fueron 100% concluyentes.

Se debería implementar la NGS como primera medida de análisis en pacientes con fenotipos de distrofias musculares de origen genético y posteriormente continuar el abordaje individualizado en caso de que los resultados no sean concluyentes en una primera etapa. México es un lugar ideal para el estudio de estas patologías debido a la gran variabilidad genética y a la diversidad genotípica de su población.

Será necesario en un futuro próximo tener un registro y bases de datos poblacionales sobre la prevalencia real de las distrofias musculares de origen genético, pues en un futuro no muy lejano veremos las primeras aplicaciones de tratamiento revolucionarios como la terapia génica para el manejo de estas patologías, antes incurables.

### XIII. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se caracterizaron diferentes mutaciones en 2 genes (*DYSF* y *CAPN3*) relacionados con distrofia muscular de cinturas autosómicas recesivas en 5 pacientes, a través de la técnica de NGS. Se identificaron mutaciones heterocigotas en *DYSF* en individuos sintomáticos clínicamente para disferlinopatía, una de las cuales fue una mutación fundadora típica en población Judía. Así mismo se identificó una mutación para calpainopatía en un individuo no reportada previamente en la literatura.
2. Los fenotipos clínicos encontrados en varias familias de este estudio fueron fenotipos no clásicos relacionados con las distrofias reportadas con el estudio molecular. En este estudio se identificaron fenotipos con compromiso de cinturas escapular, músculos faciales, incluyendo cambios en voz y contracturas articulares asociados a disferlinopatía, los cuales no habían sido reportados previamente asociados a estas condiciones específicas.
3. Este estudio aporta conocimiento nuevo en el ámbito clínico sobre el comportamiento de las distrofias musculares de cinturas con respecto a lo conocido previamente y abre un nuevo panorama para la investigación de la historia natural de estas condiciones y su presentación clínica en diferentes etapas de la vida, tanto en pacientes portadores heterocigotos sintomáticos en distrofias musculares recesivas, como en homocigotos para estas patologías.
4. El panel de 10 genes por NGS, para el diagnóstico de distrofias musculares de recesivas utilizado en este estudio, resultó ser una herramienta útil en la clínica junto con el ALDA score, para el diagnóstico y abordaje de pacientes con fenotipo clínico y genealogía característica de distrofias musculares de origen genético. De 20 pacientes en este estudio, a 3 se les pudo confirmar

su diagnóstico con la prueba molecular y en 2 se pudo iniciar un abordaje dirigido e individualizado complementario.

5. Este estudio demostró que el análisis inicial con el panel de 10 genes debería ser extendido a otros genes relacionados con distrofias recesivas y deja la puerta abierta a futuras investigaciones, que harían más claro el panorama de la prevalencia real de las distrofias musculares en México, lo cual servirá para individualizar la atención de los paciente y mejorar considerablemente su seguimiento.
6. La disferlinopatía es la distrofia de cinturas más común detectada en los pacientes de este estudio, seguida de la calpainopatía a diferencia de los reportes previos en otras poblaciones donde la calpainopatía es la distrofia muscular recesiva más común. Estudios a futuro se deben realizar para confirmar si esta característica es típica a la población mexicana.
7. Nuestro estudio, presenta una prevalencia diferente de los subtipos de distrofias de cinturas autosómicas recesivas comparadas con otras poblaciones. Creemos que la prevalencia de portadores heterocigotos para mutaciones en genes de distrofias y la presencia de mutaciones con efecto fundador, puede ser más alta en México que en otras cohortes estudiadas.
8. En este estudio a pesar de tener una muestra pequeña de pacientes, se identificó una mutación nueva asociada a calpainopatía, lo cual nos hace pensar que la prevalencia de mutaciones como esta, es más alta en la población mexicana de lo que se ha estimado hasta la fecha. Estudios a futuro en nuestra población ayudarán a aclarar este panorama.
9. México es un sitio ideal para el estudio y caracterización de estas patologías. La historia de consanguinidad previa en la genealogía en nuestra población, puede no ser tan relevante en la selección de pacientes para un estudio genético de distrofias, como en poblaciones donde las mutaciones fundadoras son características y la genealogías son de gran relevancia.

#### **XIV. BIBLIOGRAFÍA**

- 1). Walton J, Nattrass F. On the classification, natural history and treatment of the myopathies. *Brain*. 1954;77(2):169-231.
- 2). [Internet].2018[cited 8 February 2018]. Available from: <http://www.ncl.ac.uk/media/wwwnclacuk/instituteofneuroscience/files/History.pdf>.
- 3). Meadowcroft R. John Walton – Inspiration and Founder of Muscular Dystrophy UK. *Journal of Neuromuscular Diseases*. 2015;2(s2):S5-S6.
- 4). Lo H, Cooper S, Evesson F, Seto J, Chiotis M, Tay V et al. Limb–girdle muscular dystrophy: Diagnostic evaluation, frequency and clues to pathogenesis. *Neuromuscular Disorders*. 2008;18(1):34-44.
- 5). Langman J, Sadler T, Bridges T, Leland J, Sadler-Redmond S, Tosney K et al. *Embriología Médica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2009.
- 6). Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S et al. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *Journal of Anatomy*. 2003;202(1):59-68.
- 7). Leslie P. Gartner J. *Color atlas of histology*. [Place of publication not identified]: Lippincott Williams And W; 2010.
- 8). Junqueira L, Carneiro J. *Histología Básica*. Barcelona: Masson Multimedia; 2001.
- 9). Laval S, Bushby K. Limb-girdle muscular dystrophies - from genetics to molecular pathology. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2004;30(2):91-105.
- 10). Shin J, Tajrishi M, Ogura Y, Kumar A. Wasting mechanisms in muscular dystrophy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2013;45(10):2266-2279.
- 11). Rahimov F, Kunkel L. Cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *The Journal of Cell Biology*. 2013;201(4):499-510.
- 12). Nigro V, Piluso G. Spectrum of muscular dystrophies associated with sarcolemmal-protein genetic defects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(4):585-593.
- 13). Y. Nitahara-Kasahara, H. Hayashita-Kinoh, T. Chiyo, A. Nishiyama, H. Okada, S. Takeda, T. Okada, Dystrophic mdx mice develop severe cardiac and respiratory dysfunction following genetic ablation of the anti-inflammatory cytokine IL-10, *Hum. Mol. Genet*. 23 (2014) 3990–4000.

- 14). Mechler F, Imre S, Dioszeghy P. Lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in muscle and erythrocytes in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of the Neurological Sciences*. 1984;63(3):279-283.
- 15). Roma J, Munell F, Fargas A, Roig M. Evolution of pathological changes in the gastrocnemius of thEemdx mice correlate with utrophin and beta-dystroglycan expression. *Acta Neuropathol*. 2004; 108:443–452.
- 16). Laval S, Bushby K. Limb-girdle muscular dystrophies - from genetics to molecular pathology. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2004;30(2):91-105.
- 17). Thompson R, Straub V. Limb-girdle muscular dystrophies — international collaborations for translational research. *Nature Reviews Neurology*. 2016;12(5):294-309.
- 18). Narayanaswami P, Weiss M, Selcen D, David W, Raynor E, Carter G et al. Evidence-based guideline summary: Diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Issues Review Panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. *Neurology*. 2014;83(16):1453-1463.
- 19). Angelini C, Fanin M. Limb girdle muscular dystrophies: clinical-genetical diagnostic update and prospects for therapy. *Expert Opinion on Orphan Drugs*. 2017;5(10):769-784.
- 20). Pantoja-Melendez C, Miranda-Duarte A, Roque-Ramirez B, Zenteno J. Epidemiological and Molecular Characterization of a Mexican Population Isolate with High Prevalence of Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A Due to a Novel Calpain-3 Mutation. *PLOS ONE*. 2017;12(1):e0170280.
- 21). Darras B. Neuromuscular disorders of infancy, childhood, and adolescence. Amsterdam: Elsevier/ Academic Press; 2015. Cap 34. Limb-girdle Muscular Dystrophies.
- 22). Sáenz A, Leturcq F, Cobo A, Poza J, Ferrer X, Otaegui D et al. LGMD2A: genotype–phenotype correlations based on a large mutational survey on the calpain 3 gene. *Brain*. 2005;128(4):732-742.
- 23). Nigro V, Savarese M. Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta Myologica* • 2014; XXXIII: p. 1-12.
- 24). Ramos E, Pardo S, Mas Rodríguez M, Vélez J. Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A Resulting From c.C479G and c.G1818A Mutations in the Calpain-3 Gene. *Journal of Clinical Neuromuscular Disease*. 2015;17(2):59-62.
- 25). Fanin M, Angelini C. Protein and genetic diagnosis of limb girdle muscular dystrophy type 2A: The yield and the pitfalls. *Muscle & Nerve*. 2015;52(2):163-173.
- 26). CaMPDB :: Calpain :: Overview [Internet]. Calpain.org. 2018 [cited 9 March 2018]. Available from: <http://calpain.org/overview.rb?cls=calpain>.

- 27). Ono Y, Ojima K, Shinkai-Ouchi F, Hata S, Sorimachi H. An eccentric calpain, CAPN3/p94/calpain-3. *Biochimie*. 2016;122:169-187.
- 28). Angelini C, Nardetto L, Borsato C, Padoan R, Fanin M, Nascimbeni A et al. The clinical course of calpainopathy (LGMD2A) and dysferlinopathy (LGMD2B). *Neurological Research*. 2010;32(1):41-46.
- 29). M A. Calpainopathy - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 15 February 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301490>.
- 30). Fanin M, Angelini C. Protein and genetic diagnosis of limb girdle muscular dystrophy type 2A: The yield and the pitfalls. *Muscle & Nerve*. 2015;52(2):163-173
- 31). Fanin M, Nascimbeni A, Tasca E, Angelini C. How to tackle the diagnosis of limb-girdle muscular dystrophy 2A. *European Journal of Human Genetics*. 2008;17(5):598-603.
- 32). L V. Dysferlinopathies. *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy*. 2013;04(03).
- 33). Aoki M. Dysferlinopathy [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 13 March 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1303/>.
- 34). Grose W, Clark K, Griffin D, Malik V, Shontz K, Montgomery C et al. Homologous Recombination Mediates Functional Recovery of Dysferlin Deficiency following AAV5 Gene Transfer. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e39233.
- 35). Xu L, Pallikkuth S, Hou Z, Mignery G, Robia S, Han R. Dysferlin Forms a Dimer Mediated by the C2 Domains and the Transmembrane Domain In Vitro and in Living Cells. *PLoS ONE*. 2011;6(11):e27884.
- 36). Blandin G, Beroud C, Labelle V, Nguyen K, Wein N, Hamroun D et al. UMD-DYSF, a novel locus specific database for the compilation and interactive analysis of mutations in the dysferlin gene. *Human Mutation*. 2011;33(3):E2317-E2331.
- 37). De Morrée A, Hensbergen P, van Haagen H, Dragan I, Deelder A, 't Hoen P et al. Proteomic Analysis of the Dysferlin Protein Complex Unveils Its Importance for Sarcolemmal Maintenance and Integrity. *PLoS ONE*. 2010;5(11):e13854.
- 38). Fanin M, Angelini C. Progress and challenges in diagnosis of dysferlinopathy. *Muscle & Nerve*. 2016;54(5):821-835.
- 39). Reddy H, Cho K, Lek M, Estrella E, Valkanas E, Jones M et al. The sensitivity of exome sequencing in identifying pathogenic mutations for LGMD in the United States. *Journal of Human Genetics*. 2016;62(2):243-252.
- 40). Albrecht DE, Rufibach LE, Williams BA, Monnier N, Hwang E, et al. (2012) 5th Annual Dysferlin Conference 11-14 July 2011, Chicago, Illinois, USA. *Neuromuscul Disord* 22: 471-477.

- 41). Aartsma-Rus A, Singh K, Fokkema I, Ginjaar I, van Ommen G, Dunnen J et al. Therapeutic exon skipping for dysferlinopathies?. *European Journal of Human Genetics*. 2010;18(8):889-894.
- 42). ALDA - Free Automated LGMD Diagnostic Assistant | Jain Foundation [Internet]. Jain-foundation.org. 2018 [cited 23 March 2018]. Available from: <https://www.jain-foundation.org/lgmd-subtyping-diagnosis-tool>
- 43). ACMG [Internet]. Available from: <https://www.acmg.net/>
- 44). Primer designing tool [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 2 April 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
- 45). [Internet]. 2018 Available from: <https://www.fishersci.com/shop/products/gotaq-g2-flexi-dna-polymerase-4/p-5379087>.
- 46). MutationTaster [Internet]. Mutationtaster.org. 2018 . Available from: <http://www.mutationtaster.org/>
- 47). PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNPs [Internet]. Genetics.bwh.harvard.edu. 2018 Available from: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.
- 48). Magri F, Nigro V, Angelini C, Mongini T, Mora M, Moroni I et al. The italian limb girdle muscular dystrophy registry: Relative frequency, clinical features, and differential diagnosis. *Muscle & Nerve*. 2016;55(1):55-68.
- 49). Fanin M, Nascimbeni A, Tasca E, Angelini C. How to tackle the diagnosis of limb-girdle muscular dystrophy 2A. *European Journal of Human Genetics*. 2008;17(5):598-603.
- 50). Sáenz A, Leturcq F, Cobo A, Poza J, Ferrer X, Otaegui D et al. LGMD2A: genotype-phenotype correlations based on a large mutational survey on the calpain 3 gene. *Brain*. 2005;128(4):732-742.
- 51). Fanin M, Nascimbeni A, Aurino S, Tasca E, Pegoraro E, Nigro V et al. Frequency of LGMD gene mutations in Italian patients with distinct clinical phenotypes. *Neurology*. 2009;72(16):1432-1435.
- 52). Argov Z, Sadeh M, Mazor K, Soffer D, Kahana E, Eisenberg I, et al. Muscular dystrophy due to dysferlin deficiency in Libyan Jews. Clinical and genetic features. *Brain*. 2000;123(Pt 6):1229-37.
- 53). Leshinsky-Silver E, Argov Z, Rozenboim L, Cohen S, Tzofi Z, Cohen Y, et al. Dysferlinopathy in the Jews of the Caucasus: a frequent mutation in the dysferlin gene. *Neuromuscul Disord*. 2007;17(11-12):950-4.
- 54). Cagliani R, Fortunato F, Giorda R, Rodolico C, Bonaglia MC, Sironi M, et al. Molecular analysis of LGMD-2B and MM patients: identification of novel DYSF mutations and possible founder effect in the Italian population. *Neuromuscul Disord*. 2003;13(10):788-95.

- 55). Leshinsky-Silver E, Argov Z, Rozenboim L, Cohen S, Tzofi Z, Cohen Y et al. Dysferlinopathy in the Jews of the Caucasus: A frequent mutation in the dysferlin gene. *Neuromuscular Disorders*. 2007;17(11-12):950-954.
- 56). Illa I, De Luna N, Dominguez-Perles R, Rojas-Garcia R, Paradas C, Palmer J et al. Symptomatic dysferlin gene mutation carriers: Characterization of two cases. *Neurology*. 2007;68(16):1284-1289.
- 57). Rosas-Vargas H, Gómez-Díaz B, Ruano-Calderón L, Fernández-Valverde F, Roque-Ramírez B, Portillo-Bobadilla T et al. Dysferlin Homozygous Mutation G1418D Causes Limb-Girdle Type 2B in a Mexican Family. *Genetic Testing*. 2007;11(4):391-396.
- 58). Leiden Muscular Dystrophy Pages. Available at: <http://www.dmd.nl/>.
- 59). Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Angelini C. The frequency of limb girdle muscular dystrophy 2A in northeastern Italy. *Neuromuscul Disord* 2005;15:218–224.
- 60). Urtasun M, Saenz A, Roudaut C, Poza JJ, Urtizberea JA, Cobo AM, et al. Limb girdle muscular dystrophy in Guipuzcoa (Basque Country, Spain). *Brain* 1998;121:1735–1747.
- 61). Cobo AM, Saenz A, Poza JJ, Urtasun M, Indakoetxea B, Urtizberea AT, et al. A common haplotype associated with the Basque 2362AG>TCATCT mutation in the muscular calpain-3 gene. *Hum. Biol* 2004;76:731–741.
- 62). Martinez-Thompson J, Niu Z, Tracy J, Moore S, Swenson A, Wieben E et al. Autosomal dominant calpainopathy due to heterozygous CAPN3 C.643\_663del21. *Muscle & Nerve*. 2017;57(4):679-683.
- 63). Anderson L, Harrison R, Pogue R, Vafiadaki E, Pollitt C, Davison K et al. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromuscular Disorders*. 2000;10(8):553-559.
- 64). Huang Y, de Morrée A, van Remoortere A, Bushby K, Frants R, Dunnen J et al. Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle. *Human Molecular Genetics*. 2008;17(12):1855-1866.
- 65). Harris E, Bladen C, Mayhew A, James M, Bettinson K, Moore U et al. The Clinical Outcome Study for dysferlinopathy. *Neurology Genetics*. 2016;2(4):e89.
- 66). Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, et al. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet* 2000;9:1453-9.
- 67). Gazzero E, Bonetto A, Minetti C. Caveolinopathies: translational implications of caveolin-3 in skeletal and cardiac muscle disorders. *Handb Clin Neurol* 2011;101:135-42.
- 68). Hayashi T, Arimura T, Ueda K, Shibata H, Hohda S, Takahashi M, et al. Identification and functional analysis of a caveolin-3 mutation associated with familial hypertrophic

- cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;313(1):178-84.
- 69). Messina D, Speer M, Pericak-Vance M, McNally E. Linkage of Familial Dilated Cardiomyopathy with Conduction Defect and Muscular Dystrophy to Chromosome 6q23. *The American Journal of Human Genetics*. 1997;61(4):909-917.
- 70). Peterle E, Fanin M, Semplicini C, et al. Clinical phenotype, muscle MRI and muscle pathology of LGMD1F. *J Neurol* 2013;260:2033- 41.
- 71). Vieira N, Naslavsky M, Licinio L, Kok F, Schlesinger D, Vainzof M et al. A defect in the RNA-processing protein HNRPDL causes limb-girdle muscular dystrophy 1G (LGMD1G). *Human Molecular Genetics*. 2014;23(15):4103-4110.
- 72). Bisceglia L, Zoccolella S, Torraco A, Piemontese M, Dell'Aglio R, Amati A et al. A new locus on 3p23–p25 for an autosomal-dominant limb-girdle muscular dystrophy, LGMD1H. *European Journal of Human Genetics*. 2010;18(6):636-641.
- 73). Sáenz A, Leturcq F, Cobo A, Poza J, Ferrer X, Otaegui D et al. LGMD2A: genotype-phenotype correlations based on a large mutational survey on the calpain 3 gene. *Brain*. 2005;128(4):732-742.
- 74). Ramos E, Pardo S, Mas Rodríguez M, Vélez J. Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A Resulting From c.C479G and c.G1818A Mutations in the Calpain-3 Gene. *Journal of Clinical Neuromuscular Disease*. 2015;17(2):59-62.
- 75). Darras B, Jones H, Ryan M, De Vivo D, Basil T. Darras. *Neuromuscular Disorders of Infancy, Childhood, and Adolescence: A Clinician's Approach (Second Edition)*. Academic Press; 2015. Chapter 34: Limb-girdle Muscular Dystrophies.
- 76). Nigro V, Piluso G, Belsito A, et al. Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Hum Mol Genet* 1996;5:1179-86
- 77). Piccolo F, Jeanpierre M, Leturcq F, et al. A founder mutation in the gamma-sarcoglycan gene of gypsies possibly predating their migration out of India. *Hum Mol Genet* 1996;5:2019-22.
- 78). Duggan DJ, Gorospe JR, Fanin M, Hoffman EP, Angelini C. Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy. *The New England Journal of Medicine*. 1997;336(9):618
- 79). Olive M, Shatunov A, Gonzalez L, Carmona O, Moreno D, Quereda LG, et al. Transcription-terminating mutation in telethonin causing autosomalrecessive muscular dystrophy type 2G in a European patient. *Neuromuscul Disord*. 2008;18(12):929-33.
- 80). Johnson K, Töpf A, Bertoli M, Phillips L, De Ridder W, Baets J et al. Detection of TRIM32 variants associated with LGMD2H in a large cohort of patients with unexplained limb-girdle weakness. *Neuromuscular Disorders*. 2017;27:S142-S143.

- 81). Pegoraro E, Hoffman E. Limb-Girdle Muscular Dystrophy Overview [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 22 February 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1408/>.
- 82). Mercuri E, Brockington M, Straub V, Quijano-Roy S, Yuva Y, Herrmann R et al. Phenotypic spectrum associated with mutations in the fukutin-related protein gene. *Annals of Neurology*. 2003;53(4):537-542.
- 83). Balci B, Uyanik G, Dincer P, Gross C, Willer T, Talim B et al. An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker–Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene. *Neuromuscular Disorders*. 2005;15(4):271-275.
- 84). Scrivens PJ, Shahrzad N, Moores A, et al. TRAPPC2L is a novel, highly conserved TRAPP-interacting protein. *Traffic* 2009;10:724-36.
- 85). SWISS-MODEL | Home Page [Internet]. [Swissmodel.expasy.org](https://swissmodel.expasy.org/).2018 Available from: <https://swissmodel.expasy.org/>

## **ANEXOS**

➤ ANEXO I.

**A. BASES GENÉTICAS DE LAS DISTROFIAS DE CINTURAS Y PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE CADA SUBTIPO.**

*Tabla 8. Distrofias musculares Autosómicas Dominantes.*

	<b>Gen</b>	<b>Locus</b>	<b>Proteína</b>	<b>Acción de la proteína</b>	<b>Características clínicas</b>
LGMD1A	<i>MYOT</i>	5q22-34	Componente de las bandas Z	Proteína de unión a la F-actina. Organización filamentos delgados y disco Z.	Debilidad proximal y distal. Cardiomiopatía, neuropatía, disartria debilidad facial.
LGMD1B	<i>LMNA</i>	1q11-22	Proteína de la lámina nuclear	Proteína de filamento intermedio de la lámina nuclear: interviene estabilización de la membrana y regulación transcripcional.	Amplio espectro clínico: desde lipodistrofia y neuropatía hasta compromisos cardíacos múltiples: bloqueo cardíaco, arritmias, cardiomiopatía. Debilidad escapulo-peroneal .
LGMD1C	<i>CAV3</i>	3p25.3	Componente de caveola	Estabilización de la membrana sarcolemal regulación tráfico intracelular señalización, en el músculo cardíaco y esquelético.	Debilidad muscular proximal y distal mialgias, contracciones musculares rápidas ondulantes inducidas por percusión.
LGMD1D	<i>DNAJB6</i>	7q36.3	HSP40	Proteína chaperona envuelta en el recambio proteómico y autofagia. Interactúa con BAG3 y HSP70	Debilidad muscular proximal y distal, disfagia y calambres.
LGMD1E	<i>DES</i>	6q23	Desmina	Filamento intermedio regula el sarcomero y la estructura del citoesqueleto.	Debilidad muscular proximal y distal, cardiomiopatía arritmia y compromiso respiratorio.
LGMD1F	<i>TNPO3</i>	7q32	Transportina 3	Receptor de importación nuclear de serina/ arginina	Debilidad proximal > distal , contracturas articulares.
LGMD1G	<i>HNRNPDL</i>	4q21	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear	Procesamiento del Pre mRNA y exportación nuclear.	Debilidad muscular proximal mayor la distal. Debilidad y cataratas.

*Tabla 9. Distrofias musculares Autosómicas Recesivas.*

	<b>Gen</b>	<b>Locus</b>	<b>Proteína</b>	<b>Acción de las proteína</b>	<b>Características clínicas</b>
LGMD2A	<i>CAPN3</i>	15q15-21	Calpaína 3	Cisteína- Tiol- proteasa activada por calcio no lisosomal, interviene mecanismo de reparación en cito esqueleto. Se une a la titina.	Debilidad proximal contracturas
LGMD2B	<i>DYSF</i>	2p13	Disferlina	Regulación de la fusión vesicular, reparación de membranas dañadas y receptor de tráfico vesicular	Debilidad proximal y distal con asimetría.
LGMD2C	<i>SGCG</i>	13q12	Gamma- Sarcoglicano	Conecta el sarcolema a la matriz extracelular, estabilización del complejo dextroglicano.	Debilidad proximal, compromiso respiratorio y cardiaco.
LGMD2D	<i>SGCA</i>	17q12-21	Alfa- sarcoglicano	Conecta sarcolema a la matriz extracelular.	Debilidad proximal mas compromiso respiratorio
LGMD2E	<i>SGCB</i>	4q12	Beta sarcoglicano	Conecta sarcolema a la matriz extracelular	Debilidad proximal compromiso respiratorio y cardiaco
LGMD2F	<i>SGCD</i>	5q33-34	Delta- sarcoglicano	Conecta sarcolema a la matriz extracelular.	Debilidad proximal, compromiso respiratorio y cardiaco.
LGMD2G	<i>TCAP</i>	17q11-12	Teletonina	Organización tubular, sustrato del dominio tirosina cinasa de titina.	Debilidad proximal y compromiso cardiaco.
LGMD2H	<i>TRIM32</i>	9q31-34	Contenedor de dominio tripartita 32	Ubiquitin ligasa E3.	Debilidad proximal.
LGMD2I	<i>FKRP</i>	19q13	Proteína relacionada a Fukutina.	Asociada al procesamiento del dextroglicano.	Debilidad proximal, cardiomiopatía, mialgia, hipertrofia de pantorrillas.
LGMD2J	<i>TTN</i>	2q	Titina	Múltiples sitios de unión para otras proteínas, conecta las líneas Z a las líneas M en el sarcómero.	Debilidad proximal> distal
LGMD2K	<i>POMT1</i>	9q34	Proteína O-manosil- transferasa.	Envuelta en la glicosilación del Alfa distroglicano	Debilidad proximal mas discapacidad intelectual

LGMD2L	<i>ANO5</i>	11p12-13	Anoctamina 5	No entendido por completo. Puede actuar como canal de cloro, miembro familia con 8 dominios transmembrana.	Debilidad proximal > distal, aparición adultez, miembros inferiores más comprometidos.
LGMD2M	<i>FKTN</i>	9q31	Fukutina	Glicosilación del Alfa distroglicano.	Debilidad axial y proximal mayor que distal. Bajo IQ, cardiomiopatía.
LGMD2N	<i>POMT2</i>	14q24	Proteína o- manosil-transferasa 2.	Glicosilación del Alfa distroglicano.	Hipertrofia de pantorrillas, debilidad proximal.
LGMD2O	<i>POMGnT1</i>	1p34	Proteína o. Ligada a manosa. B1, 2 N-acetilglucosaminiltransferasa	Glicosilación del Alfa distroglicano.	Hipertrofia de pantorrillas, debilidad proximal.
LGMD2P	<i>DAG1</i>	3p21	Dextroglicano	Receptor clave de membrana basal y componente de la distrofina del complejo distroglicano.	Microcefalia, discapacidad intelectual y debilidad proximal mayor a distal.
LGMD2Q	<i>PLEC1</i>	8q24	Plectina	Proteína costamérica estructural que liga el sarcomero y el sarcolema.	Debilidad proximal > distal.
LGMD2R	<i>DES</i>	2q35	Desmina	Filamento intermedio que regula el sarcomero y la arquitectura del cito esqueleto.	Debilidad proximal mayor que distal, bloqueo atrio ventricular, cardiomiopatía, compromiso facial, y respiratorio.
LGMD2S	<i>TRAPPC11</i>	4q35	Proteína de transporte particular del complejo 11	Componente del complejo TRAPP con múltiples subunidades envuelto en el tráfico intracelular de vesículas.	Debilidad proximal, compromiso en SNC.
LGMD2T	<i>GMPPB</i>	3p21	GDP- manosa fosforilasa B.	Glicosilación del Alfa distroglicano.	Hipertrofia de pantorrillas, discapacidad intelectual y cardiomiopatía.
LGMD2U	<i>ISPD</i>	7p21	Dominio isoprenoide sintasa	Dirige la o: manosilación del Alfa- distroglicano.	Debilidad proximal > distal, compromiso cardiaco
LGMD2V	<i>GAA</i>	17q25	Alfa- 1-4, glucosidasa	Enzima lisosomal, hidrólisis del glucógeno.	Debilidad proximal y axial mayor que distal.

LGMD2W	<i>LIMS2</i>	2q14	Antígenos de células senescentes tipo Lim dominio 2	Parte de la Integrina y actina del cito esqueleto.	Debilidad proximal cardiomiopatía y lengua triangular.
LGMD2X	<i>BVES</i>	6q21	Delta- sarcoglicano	Sustancia endocardial del vaso sanguíneo	Proteína transmembrana que regula la estructura, y función del músculo cardíaco y esquelético, esta envuelto en el tráfico de membrana.

Fuente: Thompson R, Straub V. *Limb-girdle muscular dystrophies — international collaborations for translational research. Nature Reviews Neurology. 2016;12(5):294-309*

## 1. DISTROFIAS MUSCULARES AUTOSÓMICAS DOMINANTES.

**LGMD1A: miotilinopatía.** Esta distrofia muscular esta causada por mutaciones en el gen *MYOT* (miotilina) ubicado en el cromosoma 5, *locus* 5q31.2. El cDNA es de 22 Kb y contiene 10 exones. Miotilina es una proteína asociada al disco Z de la célula muscular. Alteraciones en este gen se asocian también a la Miotilina Miofibrilar. Se caracteriza por aparición tardía de la sintomatología de debilidad proximal con subsecuente debilidad distal, además de disartria y voz nasal. Los niveles de Ck pueden ser normales o estar ligeramente elevados y en el estudio histopatológico de músculo se pueden evidenciar vacuolas con bordes. Por microscopia electrónica se pueden apreciar líneas Z prominentes, algunos pacientes pueden presentar compromiso cardiaco y respiratorio como cardiomiopatía y falla respiratoria <sup>(17)</sup>.

**LGMD2B: laminopatía.** Es alélica a otros desordenes multisistémicos entre ellos, la lipodistrofia, la distrofia muscular de Emery Dreifuss, síndromes progeroides, y tiene una presentación variable desde la primera a la cuarta década de la vida. Se caracteriza por cardiomiopatía y arritmias cardiacas severas con riesgo para la vida (66). En la biopsia muscular se puede evidenciar hallazgos inespecíficos, por lo cual ante un resultado incierto esta distrofia debe excluirse en el análisis genético. Algunas veces los pacientes pueden cursar con contracturas articulares y columna rígida. Los niveles de enzimas musculares pueden ser normales o estar ligeramente aumentados <sup>(23)</sup>. Esta causada por mutaciones en el gen de la Laminina *LMNA* en el cromosoma 1 *locus* 1q 22. El cDNA del gen contiene al menos 3 isoformas producto del empalme alternativo ( Laminina A- C y A $\Delta$ 10). Las isoformas A y C son constitutivas y componentes clave de la lamina fibrosa nuclear y tienen roles desde el mantenimiento mecánico de la lamina nuclear hasta en regulación génica. Los fenotipos moderados a menudo se relacionan con mutaciones truncas heterocigotas en *LMNA* mediado por un mecanismo de haploinsuficiencia <sup>(66)</sup>.

**LGMD1C: caveolinopatía.** Esta causada por mutaciones en el gen *CAV3* gen Caveolina 3, que codifica un RNAm de 1, 4 Kb con solo 2 exones. La caveolina es

una proteína específica de la membrana del músculo y el principal componente de la caveola en las células musculares en vivo <sup>(67)</sup>. La caveolinopatía se presenta típicamente con mialgias primaria, seguida de la típica presentación de músculos ondulantes desencadenado por la percusión directa con martillo para evaluación de reflejos y debilidad muscular proximal. Los niveles de enzimas musculares pueden estar moderados o altos entre 4 a 25 veces por encima de los rangos normal <sup>(67)</sup>. La presentación de la enfermedad es usualmente en la primera década de la vida, con debilidad muscular proximal, hipertrofia de pantorrillas, maniobra de Gowers positiva, y calambres musculares posterior a la actividad física <sup>(67)</sup>. También pacientes pueden presentar cardiomiopatía y arritmias cardíacas por lo cual las revisiones médicas deben formar parte del protocolo anual de seguimiento <sup>(23, 67, 68)</sup>.

**LGMD1D:** esta distrofia muscular es causada por mutaciones heterocigotas sin sentido en el gen *DNAJB6* en el cromosoma 7, *locus* 7q36.3. El gen contiene 10 exones, y codifica un miembro 6 de la familia DNA J subfamilia B: DNAJ/HSP40. Los miembros de la familia DNAJ se caracterizan por tener una zona altamente conservada de aminoácidos llamada dominio J. Esta proteína es un ejemplo de una chaperona molecular con múltiples roles en la función celular. Uno de sus roles es participar en el plegamiento proteico y el ensamblaje complejo de proteínas oligoméricas. Las mutaciones sin sentido heterocigotas en *DNAJB6* (p.Phe89Ile, p.Phe93Leu and p.Pro96Arg) están todos ubicados en el dominio rico en Gly/Phe que conduce a una eliminación insuficiente de proteínas mal plegadas y por lo tanto un mal funcionamiento en la fibra muscular <sup>(16)</sup>.

*DNAJB6* esta localizada en las líneas Z, e interactúa con BAG3. Mutaciones en BAG 3 causan miopatía miofibrilar, de hecho, los agregados proteicos están constituidos por *DNAJB6*, su ligando MFL1 y HSAP1, así como desmina, miotilina y filamina C los cuales se encuentran también en la miopatía miofibrillar <sup>(16)</sup>. Clínicamente los pacientes presentan elevación moderada de enzimas musculares. Un encuentro patológico característico de este tipo de distrofia es la presencia de **vacuolas autofágicas y agregación proteica**. Los miembros inferiores se ven más afectados

que los superiores. También mutaciones en DNAJB6 se asocian a la presentación de miopatía distal única. Algunos pacientes desarrollan hipertrofia de pantorrillas las edades de aparición oscilan entre los 25 y 50 años de edad. No se ha documentado compromiso cardiaco o respiratorio.

**LGMD1E:** Este es el término que se da a la distrofia asignada al cromosoma 6 *locus* 6 q 23, aunque se considera de forma más correcta como un tipo dominante de desminopatía o miopatía miofibrilar. También se le conoce con el nombre de miocardiopatía dilatada tipo 1F o (CMD1F) es predominante en ciertas familias de América y Finlandia <sup>(69)</sup>. La desmina es una proteína estructural envuelta en la estabilización de la membrana. En pacientes con este subtipo de distrofia se ha encontrado que los niveles de enzimas musculares pueden ser normales o estar ligeramente aumentadas, (4 veces por encima del rango normal). La biopsia muscular evidencia agregados de desmina con presencia de características de miopatía miofibrilar. Como en todas las desminopatías, LGMD1E se presenta con cardiomiopatía dilatada, y defectos de conducción cardiacos, junto a la debilidad muscular proximal, la cual empieza generalmente entre la segunda y tercera década de la vida. La biopsia muscular muestra cambios distróficos, aunque también se han observado la presencia de gránulos filamentosos subsarcolemales y peri nucleares <sup>(16, 23, 69)</sup>. Esta distrofia está en relación con la forma recesiva LGMD2R también por alteración en la desmina.

**LGMD1F:** Esta distrofia fue recientemente descubierta y documentada en una familia italo- española, determinando que la mutación con corrimiento del marco de lectura en el gen *TNPO3* transportina era la causa genética de esta patología. El gen de la transportina está compuesto por 23 exones, y codifica una proteína de 923 aminoácidos también expresada en el músculo esquelético. Las enzimas musculares pueden estar ligeramente aumentadas en rango 3-4 veces el rango normal, y los pacientes frecuentemente presentan atrofia muscular marcada en miembros inferiores principalmente del vasto lateral y del músculo ileo-psoas. Algunos individuos pueden llegar a presentar aracnodactilia, disfagia e insuficiencia respiratoria y no hay evidencia de compromiso cardiaco hasta el momento <sup>(70)</sup>.

**LGMD1G:** Esta distrofia ha sido identificada en el cromosoma 4 *locus* 4q21. Se ha identificado un defecto en el procesamiento del RNAm que codifica la proteína HNRPDL. El gen contiene 8 exones y es expresado ubicuamente. Su producto génico hace parte de la familia de ribonucleoproteínas heterogéneas las cuales participan en la biogénesis y metabolismo del RNAm. Los pacientes muestran LGMD de aparición tardía, asociada con contracturas limitantes en dedos de manos y limitaciones para la flexión de los pies <sup>(23, 71)</sup>.

**LGMD1H:** En 2010, Bisceglia y colaboradores examinaron 19 miembros de una familia italiana, con clínica de Distrofia muscular de cinturas Autosómica dominante según la genealogía. 11 miembros de la familia presentaban manifestaciones clínicas heterogéneas. A través de secuenciación del genoma identificaron un nuevo *locus* ubicado en el cromosoma 3, en la región 3p32-25. En 2 de los individuos estudiados la inmunohistoquímica evidenciaba cambios secundarios a daños mitocondrial y defectos oxidativos en la fosforilación así como múltiples deleciones en el DNA mitocondrial en el músculo esquelético; aún se continúan estudiando potenciales genes candidatos en esta región. (18) Muchos de los pacientes con este tipo de distrofia se presentan con debilidad muscular proximal progresiva, tanto en miembros superiores como inferiores, la cual aparece entre la cuarta y quinta década de la vida <sup>(23, 72)</sup>.

## **2. DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS AUTOSÓMICAS RECESIVAS.**

La prevalencia acumulativa de estas distrofias musculares es de 1:15.000 con diferencias entre ciertas regiones, dependiendo de la frecuencia de portadores y el grado de consanguinidad en algunas familias. Los primeros 8 subtipos de distrofias (LGMD2A-2H) se caracterizan por presentar mutaciones con pérdida de función en ambos alelos de un gen, lo cual resulta en los fenotipos comunes asociados a distrofias. Otros genes identificados como ocasionales en las distrofias recesivas, pueden mostrar fenotipos divergentes, y otros incluso pueden estar relacionados con desordenes complejos. Variaciones específicas en genes

ocasionales asociados a LGMD, causan otras formas aún más raras entre ellas LGMD2I-2U. Las distroglicanopatías por ejemplo exponen como alelos mutados más leves de genes relacionados con formas congénitas con involucro cerebral, pueden presentarse con una expresión menos severa con afección muscular típica de una LGMD <sup>(23)</sup>.

A continuación se revisarán los subtipos de distrofias autosómicas recesivas y sus principales características:

**CALPAINOPATÍA: LGMD2A:** Ha sido reportada como la distrofia muscular recesiva más frecuente en los grupos de poblaciones estudiadas con clínica de distrofia de cinturas. El gen responsable de esta patología es el *CAPN3*, el cual fue identificado por análisis de ligamiento en la región 15q15.1-15.3 en el cromosoma 15 y posteriormente clonado en el año 1995 <sup>(73)</sup>. El gen se comprende 53 Kb de secuencia genómica, posee 24 exones y codifica una proteína muscular específica de 94 KDa (12). Esta proteína no estructural con función tipo proteasa dependiente de calcio, está implicada en el proceso contráctil del músculo debido a que está ligada fuertemente a la titina y también participa en mecanismo de reparación del cito esqueleto. Presenta así mismo una localización nuclear lo cual sugiere que tienen un importante rol en la regulación de factores de transcripción que controlan la estabilidad muscular mediante la regulación de procesos como la apoptosis celular <sup>(74)</sup>.

Esta distrofia se caracteriza por debilidad simétrica y progresiva de los músculos de las cinturas pélvica y escapular acompañado de debilidad y atrofia. Es heredada con un patrón de herencia autosómico recesivo. Los hallazgos clínicos de la calpainopatía incluyen tendencia en los pacientes a caminar de puntillas, dificultad para correr y trotar, presencia de aleteo escapular, marcha de pato y ligera hiperlordosis. La debilidad es más proximal que distal y también se puede ver debilidad en tronco y en el área peri escapular.

**DISFERLINOPATÍA: LGMD2B:** La proteína afectada en este subtipo de distrofia es la disferlina la cual es codificada por el gen *DYSF* en el brazo corto del cromosoma 2, *locus* 2p13. La mayoría de mutaciones observadas en esta distrofia

corresponden a mutaciones con pérdida de sentido o sin sentido en el gen *DYSF*. El gen posee 233Kb de secuencia genómica y la mayor parte del transcrito está compuesto de 6911 nucleótidos contenidos en 57 exones. La disferlina es una proteína transmembrana de 230 K-Dal envuelta en el proceso de remodelación del sarcolema dependiente de calcio<sup>(12)</sup>. Dentro de las distrofias recesivas es la segunda en frecuencia después de la Calpainopatía, en Italia por ejemplo constituye el 18% de los casos de distrofias musculares<sup>(21, 23)</sup>.

Las mutaciones en *DYSF* se han asociado a un amplio rango de fenotipos entre ellos, el clásico cuadro de distrofia muscular, la distrofia muscular distal conocida comúnmente como miopatía de Miyoshi (MM) y un tercer fenotipo caracterizado por debilidad y compromiso del compartimiento tibial anterior de aparición temprana; (DMAT) incluso en el fenotipo clásico existe un amplio rango de presentación. La mayoría de pacientes presentan inicialmente debilidad en etapas tardías de la adolescencia y etapas tempranas de la adultez, sin embargo otros pueden presentarse con miopatía congénita y algunos pueden permanecer levemente afectados a lo largo de su adultez lo cual demuestra la gran variabilidad fenotípica de esta entidad<sup>(75)</sup>. La LGMD2B se presenta primero con compromiso proximal de músculos en brazos mientras que MM afecta los grupos musculares posteriores en piernas. La cardiomiopatía no es un dato común en esta entidad, y la actividad sérica de CK a menudo es muy alta (40 veces el rango normal)<sup>(21, 32)</sup>. Mutaciones en otros genes relacionados con enfermedades neuromusculares en un paciente con disferlinopatías así como la actividad física extrema, pueden modificar el patrón de expresión y presentación de la enfermedad. La biopsia muscular a menudo muestra un patrón inflamatorio inespecífico, por lo cual el análisis con Western blot es muy usado y específico. Las técnicas de NGS son actualmente las preferidas debido al amplio número de exones a analizar y la falta de conocimiento de hot spots en el gen para análisis<sup>(23, 75)</sup>.

**SARCOGLICANOPATÍAS: LGMD 2C-D-E-F.:** Las mutaciones con pérdida de función en cualquiera de los genes que codifican los 4 miembros del complejo sarcoglicano (alfa, beta, gamma y delta), causan diferentes tipos de Sarcoglicanopatía<sup>(76)</sup>. Los sarcoglicanos son componentes del complejo distrofina, y todos hacen parte de la familia de proteínas N- glicosiladas

transmembranales, con dominios intracelulares cortos, una región transmembranal única y dominios extracelulares largos conteniendo cisteínas conservadas.

La proporción de sarcoglicanopatías entre los pacientes con clínica de distrofia muscular depende de la edad, de la severidad clínica, y la población estudiada. En promedio se ha encontrado esta condición en el 20 al 25% de todos los pacientes con distrofia muscular. En las formas severas el 50 al 60% de los casos corresponden a estas entidades mientras en las formas leves solo en el 10 al 20% han sido identificadas, por esto a una aparición más temprana de estos cuadros y compromiso severo los pacientes tienen más alta probabilidad de padecer una sarcoglicanopatía <sup>(75, 76)</sup>. Las sarcoglicanopatías a menudo tienen una aparición temprana similar a la observada en la distrofia muscular de Duchenne y Becker muestran en su mayoría compromiso cardiaco y respiratorio. A continuación se revisarán las características fundamentales de cada subtipo:

**LGMD2C:** El gen *SGCG* codifica el Gamma- Sarcoglicano. El gen abarca una secuencia de 144 Kb en el cromosoma 13q12.12 y el transcrito está compuesto por 8 exones. Esta distrofia es común en Maghreb e India por alta frecuencia alélica para de la mutación 525delT y en gitanos de la C283Y. Existe ausencia del Gamma sarcoglicano en los pacientes con esta distrofia, junto a trazos de otros sarcoglicanos no mutados <sup>(23)</sup>.

**LGMD2D:** El gen *SGCA* codifica el Alfa- Sarcoglicano que abarca 10 Kb en la secuencia genómica. Está compuesto por 10 exones en total. El producto proteico consta de 387 aminoácidos con un peso molecular de 50 KDa y contiene un dominio de sarcoglicano tipo cadherina el cual está presente en los sarcoglicanos de los metazoos <sup>(23)</sup>.

**LGMD2E:** El gen Beta sarcoglicano, *SGCB* abarca 15 KB de secuencia genómica, se encuentra ubicado en el locus 4q11 y su transcrito mayor se compone de 6 exones. La proteína pesa 43 KDa y está compuesta por 318 aminoácidos.

**LGMD2F:** Este gen *SGCD* que codifica para el Delta- sarcoglicano, es el gen más grande en las distrofias musculares abarcando una secuencia genómica de 433 Kb

con su transcrito mayor abarcando 9 exones. El intrón 2 abarca aproximadamente 164 Kb, una de las secuencias más largas dentro de un gen de todo el genoma humano. La proteína tiene un peso molecular de 35 Kda igual al Gamma sarcoglicano <sup>(23, 77, 78)</sup>.

Los síntomas en las sarcoglicanopatías pueden presentarse típicamente en edades tempranas entre los 4 y los 7 años, hasta la segunda década de la vida. La falla respiratoria y cardiomiopatía son comunes y deben ser evaluadas con test de tamizaje previos entre ellos la actividad sérica de la CK la cual es muy alta. El diagnóstico se hace con la falta de expresión del sarcoglicano en la biopsia muscular y los estudios genéticos. A diferencia de otras distrofias musculares de cinturas los músculos de la pantorrilla y gemelos están bien conservados en comparación con los músculos de la cintura escapular y músculos del muslo, por lo cual muchos pacientes pueden presentarse con hipertrofia de pantorrillas. Se debe hacer el diagnóstico diferencial con la Distrofia muscular de Duchenne y Becker <sup>(35)</sup>. Otros síntomas que pueden presentarse en estas patologías, aparte de la hipertrofia de pantorrillas son la macroglosia y la lordosis lumbar. El acortamiento del tendón de Aquiles y marcha en puntas también ha sido observada en especial en estadios tempranos de la enfermedad. Con el paso del tiempo la progresión de la enfermedad puede acompañarse de contracturas articulares en especial en los flexores de la cadera, y flexores de la rodilla. La escoliosis progresiva puede empeorar los síntomas respiratorios. No se han reportados casos acompañados de discapacidad intelectual <sup>(75, 78)</sup>.

**LGD2G:** Mutaciones en *TCAP* ubicado en el locus, 17q12, producen esta distrofia muscular considerada una de las formas más raras que existen. Es causada por mutaciones en titina /Cap/teletonina. T Cap que abarca 1, 2 Kb de secuencia genómica, y consta de 2 exones en su transcrito primario. T Cap promueve una unión entre el extremo N terminal de la titina y otras proteínas que conforman los discos Z y tiene un peso molecular de 19 KDa. La teletoninopatía como es conocida solo esta descrita en un pequeño número de pacientes. Su aparición es más común en la adolescencia donde se presenta con debilidad muscular proximal y distal. Inicialmente la debilidad es de predominio proximal en la cintura pélvica con

posterior debilidad distal en miembros inferiores, se asocia a hipertrofia de pantorrillas habitualmente. El gen *TCAP* también se ha asociado a la presencia de cardiomiopatía sobre todo en pacientes estudiados en Brasil. La CK solo se eleva moderadamente en sangre cerca de 10 veces el rango normal. El diagnóstico es sugerido por la falta de expresión de teletonina en la biopsia muscular, y el análisis genético debe considerarse ya que al solo poseer 2 exones el *TCAP*, lo cual facilita el análisis <sup>(23, 79)</sup>.

**LGMD2H:** Esta distrofia fue originalmente encontrada al identificar una mutación fundadora en la población reproductivamente aislada Hutterita o secta anabaptista formada de colonos rusos en Estado Unidos. Desde la detección de esta mutación otras variantes en *TRIM32* se han asociado a LGMD2H en poblaciones no Hutteritas. El dominio tripartita 32: denominado (*Tripartite- motif containing gene*) 32 (*TRIM 32*) abarca 14 Kb de secuencia genómica en el cromosoma 9q33.1. Esta compuesto por 2 exones (el primero no codificante el segundo si) este último encargado de codificar una proteína de 72 kDa. Esta proteína *TRIM32* es una ubiquitin-ligasa E3, que pertenece a la familia de proteínas que comparten el dominio tripartita (70 en el humano aproximadamente). El dominio *TRIM* contiene a su vez 3 dominios de unión dependiente de zinc, un anillo, caja Box tipo 1 y 2 y una región superenrollada. Los pacientes a menudo se presentan con un fenotipo variable en cuanto a edad de presentación, así como una lenta progresión de debilidad proximal y atrofia, con moderado incremento de Ck sérica. El diagnóstico puede ser difícil teniendo en cuenta que se sobrepone a otras distrofias musculares. Una opción para el diagnóstico puede ser la aplicación de exoma a pacientes con distrofia muscular de cinturas de origen desconocido según el hallazgo de K. Jhonson y colaboradores en 2017 <sup>(23, 80)</sup>.

#### **LGMD2I, 2K, 2M, 2N, 2O, 2P, 2T, 2U DISTROGLICANOPATIAS:**

Los defectos en este grupo de patologías, esta dado por mutaciones en 6 genes relacionados con el funcionamiento y codificación de proteínas perteneciente al complejo distroglicano. (Figura 4). Estos genes son (*POMT1, POMT2, POMGnT1, FKTN, FKRK* y *DAG1*). Variaciones en ellos, ocasionan alteraciones en la

glicosilación del distroglicano causando así una amplia gama de fenotipos desde formas congénitas hasta formas severas con compromiso ocular y cerebral como en el Síndrome de Walker Warburg <sup>(23)</sup>.

El distroglicano esta presente en varios tejidos corporales y tienen una función primordial en los miocitos en especial en mantener la estabilidad de la membrana. El espectro fenotípico de la enfermedad es altamente variable, y la presentación de los primeros síntomas puede oscilar entre la primera y cuarta década de la vida. El subtipo 2I o LGMD2I es la forma más común. La falla respiratoria y la cardiomiopatía son características comunes a este grupos de distrofias musculares, incluso hay reportes de mioglobulinuria asociada y mialgias. La CK sérica varia dependiendo del subtipo de distroglicanopatía, y se han encontrado entre (5 a 10 veces) por encima de los rangos de normalidad, hasta valores (50 veces por encima del rango) <sup>(21)</sup>.

**LGMD2I:** Se produce por mutaciones en el gen de proteína relacionada a fukutina *FKRP* ubicado en el *locus* 19q13.32, esta compuesto por 4 exones de los cuales los primeros 3 son no codificantes. El gen abarca 12Kb de secuencia genómica. Las mutaciones conllevan a la presentación de distrofia muscular congénita con deficiencia secundaria de laminina alfa-2 y una glicosilación anormal del alfa distroglicano. Los individuos que son homocigotos o heterocigotos compuestos para variantes missense en *FKRP* tienen el fenotipo clásico. Sin embargo aquellos con variantes homocigotas o que son heterocigotos compuestos para mutaciones sin sentido (nonsense) tienen la forma congénita. (MDC1C). Las variantes más comunes hasta la fecha son 826C>A and 427C>A, se han observado en individuos con fenotipo LGMD2I y no en la forma congénita. Se cree que otros genes relacionados con el músculo intervienen tanto en la presentación de la enfermedad, como en su severidad <sup>(81)</sup>.

Es la distrofia más común de este grupo. Presenta una gran variabilidad en el fenotipo apareciendo desde temprano en la infancia hasta la edad media adulta. Puede aparecer con un fenotipo temprano, rápidamente progresivo con pérdida de deambulación en adolescencia hasta formas moderadas a leves en la adultez. La mayoría de personas con esta condición manifiestan síntomas entre la segunda y

cuarta década de la vida. El patrón de compromiso muscular es similar a el de otras distrofias, con compromiso mayor proximal que distal en los músculos de la cintura pélvica y escapular; los pacientes tienden a tener hipertrofia de pantorrillas, así como del cuádriceps y la lengua. La mayoría tienen compromiso respiratorio y el compromiso cardiaco oscila entre el 10 y el 55% de los pacientes dependiendo del tipo de mutación que presenten <sup>(82)</sup>.

**LGMD2K:** Esta causada por mutaciones missense e el gen *POMT1* ubicado en el cromosoma 9 *locus* 9q42, el gen contiene 20 exones que abarcan aproximadamente 20 Kb de secuencia genómica. Las mutaciones que permiten actividad enzimática residual se asocian a formas moderadas de la enfermedad. Diferentes alelos en *POMT1* pueden causar incluso formas congénitas de distrofia muscular, debido a defectos en la glicosilación del distroglicano :MDDGC1, hasta formas severas que se acompañan de compromiso cerebral y ocular y discapacidad intelectual como el Síndrome de Walker Walburg en cual cursa con lisencefalia tipo II, hipoplasia cerebelar pontina e hidrocefalia; los pacientes con esta patología no sobreviven más allá del primer año de vida <sup>(23, 81, 83)</sup>. La variante patogénica p.Ala200Pro es una variante fundadora ancestral identificada en la población turca.

**LGMD2M :** Se produce por mutaciones en el gen de la fukutina *FKTN*, en el cromosoma 9 *locus* 9q31.2. El gen se expande 82,989 bp y contiene 10 exones codificantes. El principal transcrito es de 7,4 Kb y codifica una proteína de 413 aminoácidos. Las formas moderadas de la enfermedad están relacionadas con mutaciones hipomórficas con pérdida de sentido en uno de los alelos del gen, mientras que las formas severas se asocian a la presencia de 2 alelos no funcionales. En las formas severas se pueden ver en caso de síndrome de Walker Walburg o distrofia muscular congénita. En este subtipo de distrofia no existe compromiso del intelecto por lo cual no hay casos de discapacidad intelectual reportados. La aparición de los síntomas a menudo ocurre temprano en la infancia y se caracteriza por compromiso simétrico y compromiso irregular de grupos musculares, los cuales se deterioran más con la presencia de enfermedades febriles agudas concomitantes. Los niveles de CK oscilan por encima de 10 a 50 veces el rango

normal. Se ha visto mejoría de síntomas con uso de esteroides. En estadios severos se ha visto compromiso cardiaco, respiratorio y contracturas articulares múltiples.  
(21, 23).

**LGMD2N:** Se produce por mutaciones en el gen *POMT2*, que está compuesto por 21 exones. Se ubica en el cromosoma 14 *locus* 14q24. Este codifica una manosil O-transferasa tipo 2; mutaciones en este gen tienen efectos dramáticos ocasionando fenotipos como el Síndrome de Walker Warburg también observado en LGMD2M y menos frecuente un fenotipo relacionado con distrofia de cinturas. Esta última se cree ocurre cuando la glicosilación del alfa distroglicano está reducida solo levemente. Las mutaciones en estos casos son generalmente por pérdida de sentido y el fenotipo se caracteriza por compromiso muscular sin afectación de cerebro. Generalmente se acompaña de niveles altos de CK sérica (23, 81).

**LGMD2O:** Es un subtipo extraño de distrofias musculares recesivas, y en 2012, Radacu y colaboradores en España describieron el primer paciente con una mutación en la región promotora del gen *POMGNT1* (que codifica para la proteína o-manosa 1,2 N-acetilglucosamiltransferasa 1): duplicación homocigota de 9pb(-83\_-75dup) lo cual produce una disminución en el RNAm del *POMGNT1* debido a una regulación negativa del promotor por el factor de transcripción ZNF202 el cual es un represor transcripcional. (23). Una mujer ha sido reportada con este tipo de distrofia, en ella los parámetros del neurodesarrollo fueron normales en la infancia; luego la debilidad muscular apareció a los 12 años y a los 19 años tuvo pérdida de la deambulación. La debilidad fue más proximal que distal, con los músculos del cuello, cadera, cuádriceps y aductores severamente afectados. Presentaba hipertrofia de pantorrillas y del cuádriceps. Tenía miopía severa sin compromiso intelectual (81).

**LGMD2P:** Esta distrofia está causada por cambios específicos en el gen del distroglicano en sí mismo *DAG1*. A diferencia de otras distroglicanopatías donde la alteración genética de base se da en genes relacionados con glicosilación del distroglicano en esta distrofia el gen en sí mismo presenta mutaciones que alteran la función y estructura del distroglicano. Campbell ha reportado una mutación

missense en el *DAG1* en un paciente con discapacidad intelectual. Esta distrofia se caracteriza por progresión lenta principalmente con compromiso proximal, y debilidad muscular la cual se presenta temprano en la infancia (dificultad para caminar y subir escaleras) asociada a discapacidad intelectual leve o moderada. Otras manifestaciones reportadas son la microcefalia, incremento moderado de musculatura en pantorrillas y contracturas en tobillos <sup>(23, 81)</sup>.

**LGMD2T:** Este tipo de distrofia esta causada por mutaciones leves en la GDP manosa- pirofosforilas tipo B codificada por el *gen GMPPB*, un gen pequeño de 2,453 pb, ubicado en el *locus* 3p21. El RNAm abarca 1, 7 KB y contiene 8 exones. Las mutaciones en este gen se han asociado a distrofias musculares congénitas con hipoglicosilación del Alfa distroglicano y también con fenotipo LGMD en 3 pacientes reportados no relacionados <sup>(33)</sup> de India, Egipto e Inglaterra este último con intolerancia al ejercicio y niveles elevados de Ck <sup>(23)</sup>.

**LGMD2U:** esta forma esta causada por alelos anómalos del *gen ISPD* que codifica para el dominio de Isoprenoide sintetasa. El *gen ISPD* abarca 333Kb y se ubica en 7p21, contienen 10 exones. Mutaciones en el *gen* alteran el patrón de manosilación del distroglicano y pueden causar WWS, así mismo diferentes mutaciones han sido asociadas a la presencia de lisencefalia severa en los pacientes. Esta distrofia es a menudo progresiva, y se caracteriza por la pérdida temprana de la deambulacion en los paciente en la adolescencia, adoptando un patrón de presentación muy similar a la DMD. Muchos pacientes pueden presentar pseudohipertrofia de varios músculos incluyendo la lengua. Las funciones cardiacas y respiratorias pueden estar comprometidas por lo cual es necesario realizar diagnóstico diferencial con las distroglicanopatías <sup>(23, 81)</sup>.

#### **OTROS SUBTIPOS:**

**LGMD2J:** Se produce por mutaciones en el *gen* de la titina uno de los genes más complejos en la especie humana. El *gen* Titina se expande 294,442bp de secuencia genómica en el cromosoma 2q31 y el transcrito mayor se compone de 363 exones. Este a su vez codifica la proteína más larga en el genoma compuesta por 38138

aminoácidos Una mutación indel en el ultimo exón de la titina de 11 pb causa distrofia muscular tibial También mutaciones en *TTN* causan cardiomiopatía autosómica dominante CMD1G, y una mutación homocigota en la región c terminal de la titina causa LGMD2J. (*FIN/maj mutacion*)<sup>(23)</sup>. La proteína titina es una proteína gigante sarcomérica que forma un sistema de filamentos continuos en las miofibrillas del músculo estriado con moléculas únicas que se expanden desde el sarcómeros a los disco Z hasta la banda M. *CAPN3*, se une a la banda M de la titina en las regiones afectadas por las mutaciones en LGMD2J y existe una deficiencia secundaria de esta en el músculo de pacientes con esta patología., incluso interacciones con la titina pueden proteger a la calpaína de degradación auto lítica y la remoción de la proteasa calpaina, revierte la patología muscular producida por la titina. Dentro de los fenotipos de las titinopatias se encuentran las distrofia muscular tibial TMD, y fenotipos cardiacos y musculares severos.<sup>(23, 81)</sup>.

**LGMD2L:** Es causada por mutaciones en el gen anoctamina 5. *ANO5*, ubicado en el cromosoma 11 *locus* 11p14.3, se expande 90,192bp y contiene 22 exones. La secuencia codificante abarca 2, 7 Kb, y codifica una proteína de 913 aminoácidos. Otros nombres alternativos para este gen son *TMEN16E* y *GDD1*. La anoctamina es una proteína de la familia de canales de cloro activados por calcio. Esta forma de distrofia es una de las más frecuentes en el norte de Europa siendo responsable del 10 al 20% de los casos de distrofias recesivas. La penetrancia es incompleta, siendo las mujeres las menos afectadas. La mutación más común en el Norte de Europa es c.191dupA en el exón 5. La presentación clínica normalmente es hasta la adultez, los pacientes muestran compromiso asimétrico de debilidad muscular con atrofia predominante en el cuádriceps y dolor posterior a la actividad física. No son comunes las contracturas articulares<sup>(21, 23)</sup>.

**LGMD2Q:** Esta forma de LGMD se produce por una mutación específica en el gen *PLEC1*, ubicado en el *locus* 8q24.3 Codifica la plectina, ya que otras mutaciones en este gen se acompañan de epidermólisis bullosa simple. En familias consanguíneas turcas se ha identificado una mutación homocigota por delección de 9pb. La delección típica afecta un codón AUG que esta presente solo en los transcritos

musculo específico de plectina mientras existen otros codones alternativos de inicio que son empalmados como un exón 2 y son pacientes que no presentan síntomas dermatológicos ya que tienen plectina en piel normal. Los pacientes con LGMD2P muestran una aparición rápida de la sintomatología con progresión lenta o no progresión de la patología <sup>(23)</sup>.

**LGMD2R:** Causada por mutaciones en el gen *DES* esta ubicado en el *locus* 2q35 contienen 9 exones y contiene 8,4 KB de DNA genómico. Contienen 9 exones. Este gen codifica para la proteína Desmina, la cual es una proteína músculo específica de la familia de filamento intermedio y está compuesta aproximadamente por 468 aminoácidos. Mutaciones con patrón de herencia autosómico dominante se asocian a la miopatía miofibrilar, mutaciones en este gen también se relacionan con LGMD1E, descrita previamente. El fenotipo clínico en los pacientes a menudo aparece en la adolescencia o inicios de la tercera década de la vida con debilidad muscular proximal y atrofia muscular no específica afectando miembros superiores e inferiores. LA CK sérica es a menudo normal. Los pacientes pueden presentar bloqueos aurículo ventriculares sin cardiomiopatía <sup>(23, 81)</sup>.

**LGMD2S:** Esta causada por mutación en el gen que codifica para la proteína del complejo de transporte particular 11, *TRAPPC11* que abarca 54,328 bp, y se ubica en el cromosoma 4, *locus*. 4q35. El RNAm es de 4,5 Kb y contiene 30 exones. Esta distrofia ha sido identificada en familias consanguíneas de origen sirio y también se han reportado casos en la población Huterita donde se han descrito casos acompañados de ataxia, movimientos hipercinéticos y miopatía.

La proteína TRAPPC11 es una proteína envuelta en el transporte anterógrado de membrana desde el retículo endoplásmico hasta el compartimiento intermedio del aparato de Golgi, (*Golgi intermediate Compartment: ERGIC*) en mamíferos. Mutaciones en esta proteína causan alteraciones en el tráfico de partículas de la célula <sup>(43)</sup>. En cuanto a la presentación clínica esta distrofia puede variar desde un fenotipo lentamente progresivo con aparición desde la infancia y niveles séricos de CK altos, hasta un síndrome caracterizado por miopatía, con compromiso

neurológico que involucra discapacidad intelectual y ataxia.

**LGMD2V:** Esta distrofia es una distrofia ocasional causada por mutaciones leves en el gen *GAA* que codifica la enzima alfa. Glucosidasa. Esta ubicado en el cromosoma 17 *locus* 17q25.3 y comprende 20 exones. Defectos en *GAA* producen la enfermedad por atesoramiento lisosomal de glucógeno tipo 2 p GSD2.: Enfermedad de Pompe y sus diversas presentaciones desde fenotipos severos al nacimiento, hasta formas atenuadas de aparición en el adulto, esta última difícil de distinguir de una distrofia muscular de cinturas clásica con progresión atenuada.

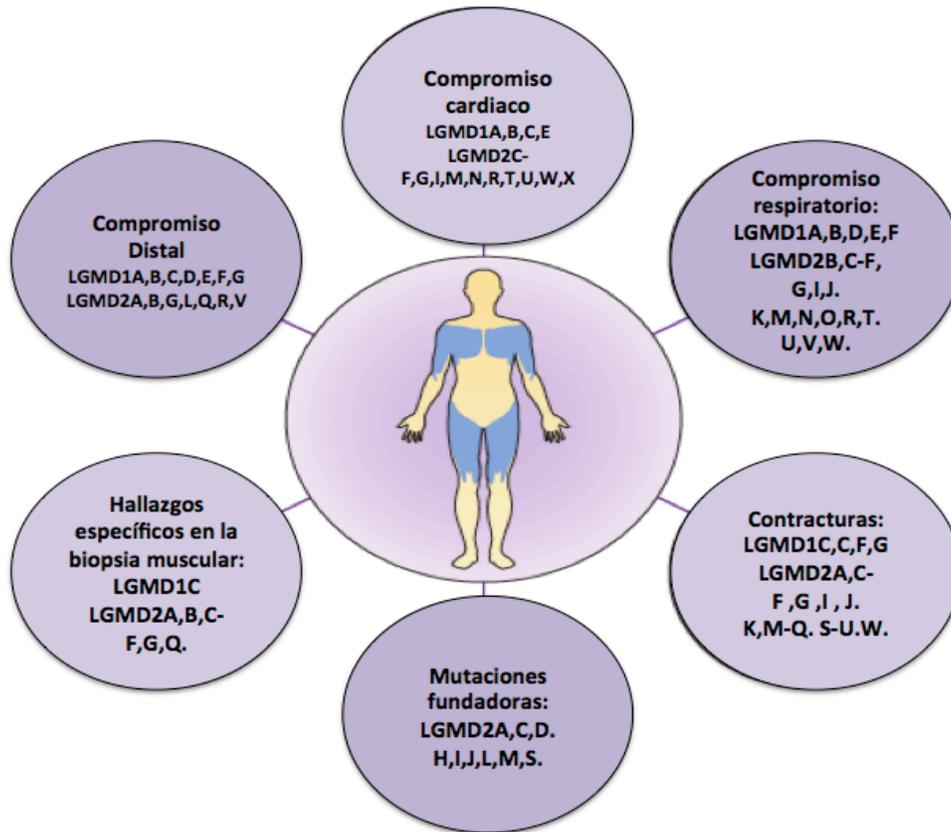
(23)

**LGMD2W:** finalmente la distrofia 2W, es causada por mutaciones en el gen *LIM* que codifica para la proteína de la familia de dominios de Antígenos de células senescentes tipo Lim 2 ( *LIMS2/PINCH2* ) ubicado en el cromosoma 2q14. El gen tienen 7 exones codificantes y codifica para una proteína de 341 aa miembro de una familia de proteínas de adhesión focal. La proteína se compone de 5 dominios LIM los cuales forman dedos de zinc que permiten la interacción con el DNA que regulan la forma celular y patrones de migración. Los pacientes con este subtipo de distrofia presentan aparición temprana de los síntomas, con macroglosia, cardiomiopatía y aumento en pantorrillas, así mismo presentan disfunción ventricular con disminución de la fracción de eyección hacia la tercera década de la vida, así como la lengua triangular que es característica de esta condición (23).

➤ ANEXO II.

**MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES  
Y CLASIFICACIÓN SEGÚN LOS SUBTIPOS DE DISTROFIAS.**

Figura 31. Manifestaciones clínicas de las Distrofias Musculares.



Aspectos clínicos de los subtipos de LGMD: Varias formas de LGMD comparten síntomas de debilidad muscular proximal, pero las presentaciones fenotípicas pueden ser muy heterogéneas. La clasificación dependiendo del fenotipo es útil ya que la clínica puede orientar la toma de decisión de uno u otro estudio molecular. Consideraciones diagnósticas diferenciales acompañan: el involucro cardíaco y respiratorio, el grado de contracturas articulares, y hallazgos específicos en la biopsia muscular, así como la debilidad distal.

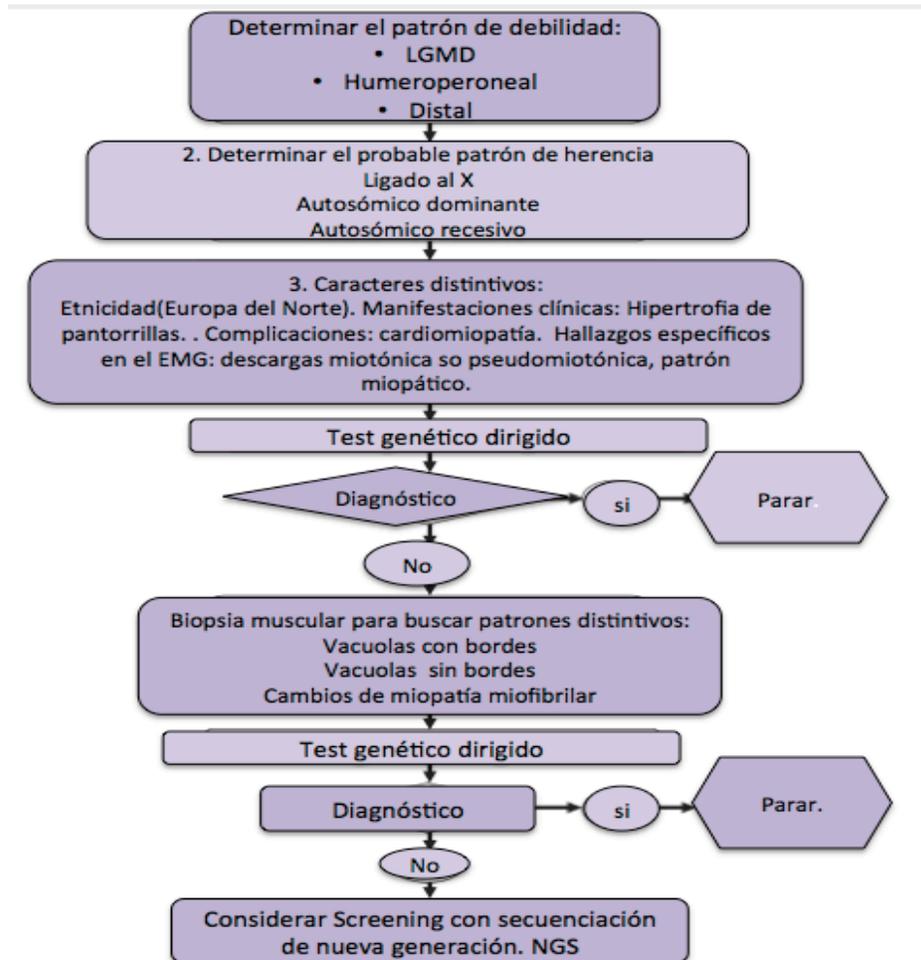
*Fuente:* Thompson R, Straub V. Limb-girdle muscular dystrophies — international collaborations for translational research. *Nature Reviews Neurology*. 2016;12(5):294-309

➤ ANEXO III:

**1. ABORDAJE DIAGNÓSTICO DE PACIENTES CON LGMD Y  
ALGORITMOS DIAGNÓSTICOS EN LGMD.**

*The American Academy of Neurology* (AAN) en 2014, publica las recomendaciones de diagnóstico, abordaje, seguimiento y tratamiento de las distrofias musculares de cinturas, a continuación se muestra el abordaje actual de las distrofias acorde con la AAN: <sup>(17)</sup>.

Figura 32. Abordaje de pacientes con LGMD.



Fuente: Narayanaswami P, Weiss M, Selcen D, David W, Raynor E, Carter G et al. Evidence-based guideline summary: Diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Issues Review Panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. *Neurology*. 2014;83(16):1453-1463

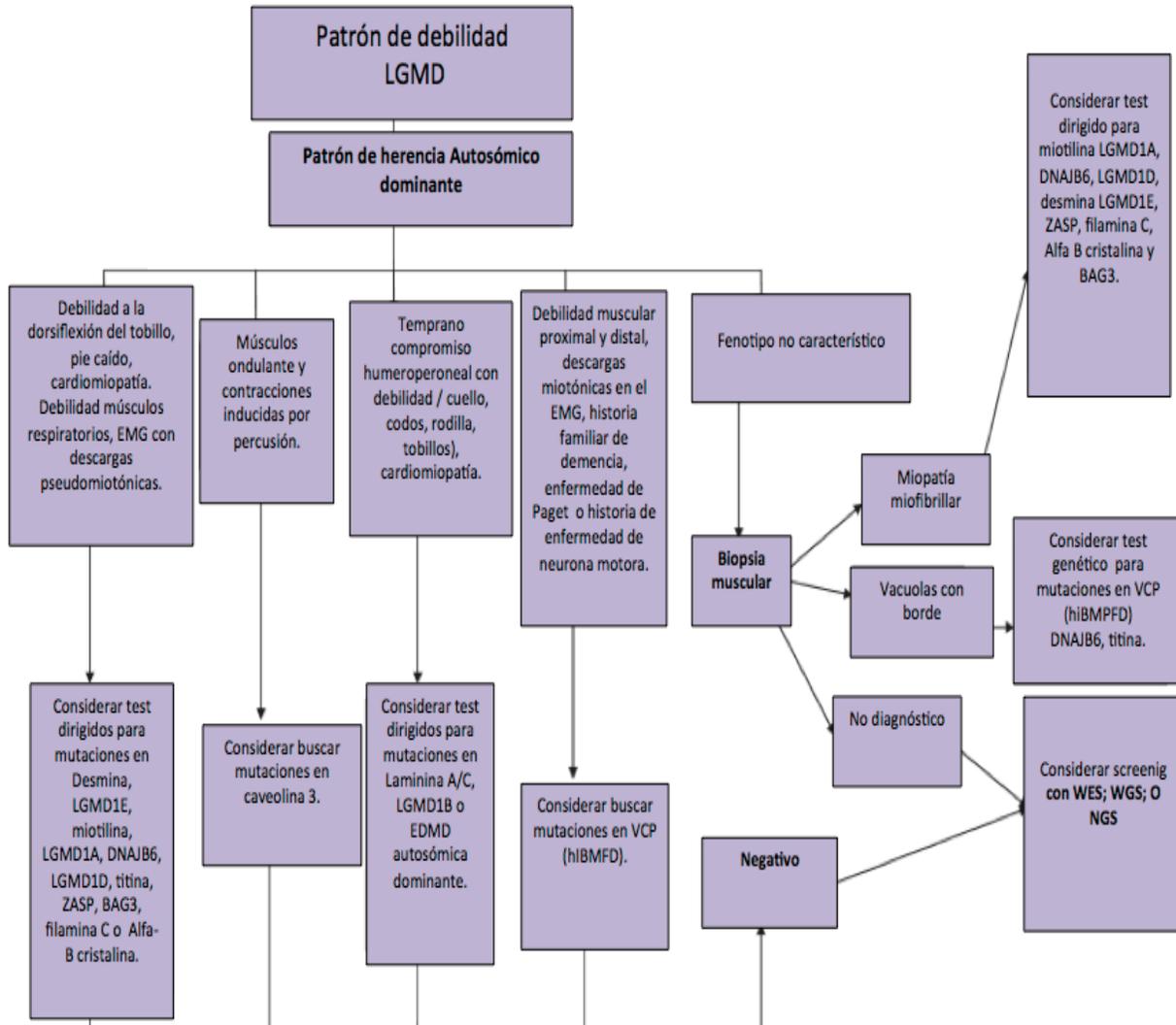
## 2. ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS DE DIAGNÓSTICO:

- a. **Niveles de creatincinasa séricos:** El grado de Ck puede ser de ayuda en la diferenciación clínica de diferentes subtipos de LGMD. CK normales o ligeramente elevados están presentes en LGMD1A, 1B, 1D, 1E, 2N-2P, 2R-2U, 2Y, 2X, moderadamente elevados en LGMD1C, 1F-1H, 2A, 2C-F, 2G, 2I-2M, y muy elevados en LGMD2B, 2A, 2C-2F, 2Q, 2V, 2W<sup>(17,19)</sup>.
- b. **Electromiografía:** La electromiografía muestra patrones miopáticos EMG usualmente en todas las distrofias musculares de cinturas, y es útil para excluir causas neurogénicas de debilidad muscular incluyendo desordenes nerviosos periféricos. En la LGMD1 cambios neuropáticos pueden observarse y en LGMD2H: puede existir un síndrome de desmielinización polineuropática.
- c. **Resonancia magnética muscular:** Es frecuentemente usada en LGMD, para evaluar la severidad y la distribución del compromiso muscular, las características sugestivas y los patrones de muchas formas de distrofias. Tienen una sensibilidad estimada del 40%. En la calpainopatía hay un compromiso temprano por ejemplo de aductores y extensores de cadera, y compartimiento posterior del muslo, mientras en disferlinopatía hay compromiso temprano de gastronemio, compartimientos anteriores y posteriores del muslo con poco compromiso de gracilis y sartorio. Los cambios musculares que se aprecian inicialmente son edema muscular y posteriormente degeneración grasa local<sup>(17,19)</sup>.
- d. **Biopsia muscular:** La mayoría de los músculos en las distrofias de cinturas muestran características distróficas, como aumento de la variabilidad del tamaño de la fibra, aumento de los núcleos centrales, fibrosis endomisial, necrosis y regeneración, pero el grado de estos cambios son variables y no siempre se correlacionan con la severidad de la enfermedad. Se han visto cambios inflamatorios con infiltrado muscular, datos clave en las

polimiositis y común a casos de disferlinopatía. Así mismo datos de miopatía miofibrilar, con inclusiones citoplasmáticas, acumulación de proteínas miofibrilares, como miotilina o desmina y  $\alpha$ -B cristalina es una característica común de LGMD dominantes como LGMD1A, 1D, 1F. Las vacuolas con bordes con verticilos membranosos filiales o cuerpos citoplásmicos eosinófilicos son una característica común de LGMD1A, 1E, 1F, 1G, 2J y 2G. Algunos pacientes con LGMD2H pueden presentar la morfología características de la miopatía sarcotubular (STM), con citoplasma típico vacuolas rodeadas de membrana <sup>(19)</sup>.

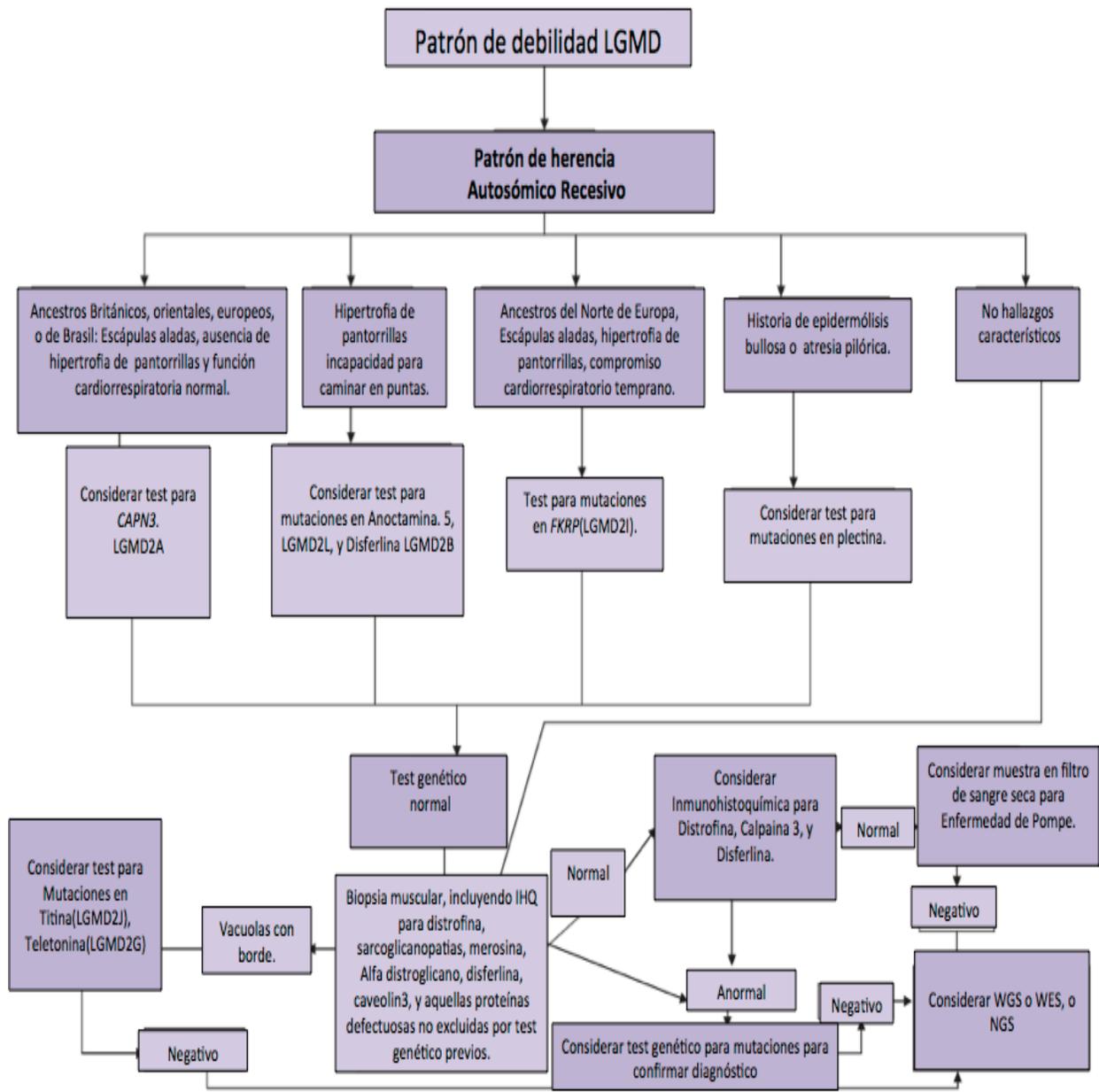
- e. **El análisis cuantitativo de proteínas,** puede sugerir el diagnóstico especialmente en caso de LGMD autosómicas recesivas donde el efecto de la mutación es de pérdida de función. En Autosómicas dominantes el efecto de la mutación y la anormal expresión proteica es difícil de detectar a menos de que se trate de una mutación con efecto dominante negativo como en el caso de una caveolinopatía.
- f. **Inmunohistoquímica:** de gran utilidad con alta especificidad para ciertos subtipos de distrofias entre ellas, caveolinopatía, la disferlinopatía, LGMD2G,y LGMD2Q, siendo menos específica para distrofias como las sarcoglicanopatías. Se debe recordar que distrofias como caveolinopatía, calpainopatía, LGMD2L y 1A tienen niveles disminuidos secundarios de disferlina <sup>(17,19)</sup>.
- g. **Western blot:** útil para identificar defectos primarios y secundarios en las proteínas en un mismo experimento. Este es el Gold Standard para el diagnóstico de LGMD2A donde la reducción de la calpaína 3 en un 94 KDa coincide en un 80% de los casos con la identificación de mutaciones en el gen <sup>(19)</sup>.

Figura 33. Abordaje de las distrofias de cinturas con Patrón de herencia Autosómico Dominante.



Fuente: Narayanaswami P, Weiss M, Selcen D, David W, Raynor E, Carter G et al. Evidence-based guideline summary: Diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Issues Review Panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. *Neurology*. 2014;83(16):1453-1463

Figura 34. Abordaje de las distrofias de cinturas con patrón de herencia Autosómica Recesiva.



Fuente: Narayanaswami P, Weiss M, Selcen D, David W, Raynor E, Carter G et al. Evidence-based guideline summary: Diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Issues Review Panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. *Neurology*. 2014;83(16):1453-1463.

➤ ANEXO IV.

**1. ABORDAJE GENÉTICO EN LAS DISTROFIAS MUSCULARES Y UTILIDAD DE LAS TECNOLOGÍAS DE SECUENCIACIÓN MODERNAS 2016.**

Las nuevas tecnologías de secuenciación están tomando cada vez más campo en el abordaje diagnóstico de las distrofias musculares de cinturas, cambiando el esquema anterior de análisis gen por gen, para permitir el análisis masivo de varios genes involucrados en estas condiciones. Esto ha permitido que las tasas de diagnóstico hayan mejorado en este tipo de patologías, comparadas con las tasas de detección previamente reportadas dentro del abordaje clásico, en donde después de estudios en músculo y técnicas de análisis proteico se procedía al estudio genético como paso final <sup>(17)</sup>.

Las distrofias musculares de cinturas tienen gran cantidad de genes involucrados con los subtipos, y algunos de estos genes poseen grandes tamaños dificultando así el análisis con técnicas como Sanger. También estas patologías cuenta con mutaciones “privadas” o particulares a ciertos grupos étnicos, lo cual hace que estas patologías sean objetivos blancos para el análisis por técnicas como NGS. En los últimos años el panorama de abordaje tomando como punto de partida los análisis de secuenciación han desplazado el abordaje previo y secuencial propuesto en el 2014 por la AAN.

En el pasado después del análisis clínico exhaustivo, el siguiente paso correspondía al inmunoanálisis de la biopsia muscular, para clasificar e identificar las proteínas asociadas y así refinar la decisión de análisis genético de uno u otro gen probablemente involucrado. Este abordaje se ha considerado obsoleto y poco efectivo, por lo cual la NGS ha cambiado la vía de diagnóstico previamente sugerida <sup>(17)</sup>.

En este abordaje nuevo, después del análisis clínico exhaustivo y la exclusión de las patologías musculares más comunes ( Becker, y FSHD, atrofia muscular espinal

tipo III y distrofia miotónica), se debe realizar panel de genes por NGS o secuenciación del exoma, inmediatamente posterior al análisis clínico y antes del análisis proteico.

Si de este análisis se deriva un diagnóstico claro, no se deben hacer más trabajos de abordaje excepto la secuenciación de Sanger complementaria para corroborar las mutaciones reportadas. Si el resultado aún así continúa siendo incierto, (no hay una mutación identificada clara, y no hay potenciales candidatos), se deben hacer estudios neurofisiológicos, e imagenológicos, así como estudios de función pulmonar y cardiovascular, biopsia muscular e inmunoanálisis. Los resultados en centros de investigación donde se realiza un análisis basado en NGS demuestran tasas de diagnóstico por encima del 60% comparado con centros en donde se realiza análisis gen por gen, siempre y cuando los clínicos estén familiarizados con los fenotipos clínicos de LGMD y se realice una adecuada selección de los pacientes <sup>(17)</sup>.

Tanto la WES como WGS proveen una aproximación en la identificación potencial de nuevas mutaciones en cohortes de pacientes en donde tanto el análisis comprensivo gen por gen como el análisis partiendo de NGS aún no ha sido conclusivo. Estas dos metodologías han sido blanco de múltiples investigaciones internacionales, y proyectos de descubrimiento de nuevos genes asociados a distrofias musculares entre ellos: NeurOmics en la unión Europea y MYO-SEQ esta último utilizando WES más el abordaje inicial anterior de Gen por Gen en 1000 pacientes con fenotipo de LGMD <sup>(17)</sup>.

➤ ANEXO V.



## CONSENTIMIENTO INFORMADO

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR CON NGS Y SU UTILIDAD EN EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES MEXICANOS CON DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURAS

**Investigador(es) Principal:** Dra. María del refugio Rivera Vega.

**Responsable protocolo de Investigación:** Dra. Valentina Martínez Montoya

Dirección del investigador. Unidad de Genética, Unidad 501. Hospital General De México “Dr. Eduardo Liceaga”. Dr. Balmis 169, Colonia Doctores, Cuauhtémoc, Ciudad de México.

Teléfono de contacto del investigador: 27892000

### INTRODUCCIÓN

Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento, y entenderlo claramente. Pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga.

Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la salud, la Declaración de Helsinki y las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética. Para decidir si participa o no en este estudio, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los riesgos y beneficios con el fin de tomar una decisión informada. Este formato de consentimiento informado le dará información detallada acerca del estudio de investigación que podrá comentar con su médico tratante o con algún miembro del equipo de investigadores adjuntos al proyecto. Al final se le pedirá que forme parte del proyecto y de ser así, bajo ninguna presión o intimidación, se le invitará a firmar este consentimiento informado.

### **Procedimiento para dar su consentimiento:**

Usted tiene el derecho a decidir si quiere participar en esta investigación, y puede solicitar todo el tiempo que requiera para considerar esta invitación.

El investigador le explicará ampliamente los beneficios y riesgos del proyecto sin ningún tipo de presión y tendrá todo el tiempo que requiera para pensar solo, o con quien usted decida consultarlo y decidir su participación o no, informando al investigador sobre ello. Esta decisión no tendrá efecto alguno sobre su atención médica en el Hospital, ni sobre su trato como paciente de la institución. Al final de esta explicación, usted debe entender los siguientes puntos:

1. La justificación y los objetivos de la investigación.
2. Los procedimientos que se utilizarán y su propósito, incluyendo la identificación de que son procedimientos experimentales.
3. Los riesgos o molestias previstos.
4. Los beneficios que se pueden observar.
5. Los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para el sujeto.
6. Garantía para recibir respuestas a las preguntas y aclarar cualquier duda sobre los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento de la materia.
7. La libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio, sin que por ello se generen perjuicios en su atención y el tratamiento de su patología de base.
8. La seguridad de que no se va a identificar al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relativa a su privacidad.
9. El compromiso de proporcionar información actualizada obtenida durante el estudio, aunque esto podría afectar la disposición para continuar con su participación en el estudio.
10. La disponibilidad de tratamiento médico y compensación a que legalmente tiene derecho, en el caso de que ocurran daños causados directamente por la investigación.

Puede solicitar más tiempo o llevar a casa este formulario antes de dar una decisión final en los días futuros.

## INVITACIÓN A PARTICIPAR Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

*Estimado Sr. (a)* \_\_\_\_\_

**El Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”** le invitan a participar en este estudio de investigación que tiene como objetivo:

Identificar Mutaciones en pacientes de nuestro hospital con clínica de Distrofia Muscular de Cinturas que cumplan con los criterios de inclusión, con la finalidad de:

- Determinar Mutaciones más comunes en México asociadas a este tipo de padecimientos.
- Dar diagnóstico oportuno a los pacientes y asesoramiento adecuado a las familias con individuos con estas condiciones.
- Establecer los individuos portadores en la familias.

Usted y/o su familiar fue invitado al estudio debido a que cuenta con las características clínicas compatibles con Distrofia Muscular de Cinturas .

### **PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO:**

Su participación en el estudio consiste en una entrevista personal que se hará durante una valoración posterior a la consulta de primera vez, donde se profundizará sobre su condición médica, e historia familiar . Así mismo se le tomará una muestra de sangre venosa. Se le pide únicamente acudir en una ocasión para la realización de estos procedimientos.

Las responsabilidades de los participantes del estudio son:

- Informar sobre cualquier cambio en el estado de salud
- Informar sobre cambios de domicilio.
- Acudir a recoger su resultado de forma personal una vez se le contacte.

### **RIESGOS E INCONVENIENTES:**

El reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación en Salud, señala que la obtención de muestras biológicas implica un riesgo mínimo dentro de la investigación. Los riesgos de la obtención de la muestra sanguínea son: posibilidad de sangrado mínimo o moretón en el sitio de la punción, mareo o sensación de desmayo y raramente punción arterial. El personal que le tomará la muestra es un personal entrenado para disminuir así, el riesgo de posibles complicaciones. Los datos de su identidad y su información médica no serán revelados en ningún caso como lo estipula la ley. Las muestras de sangre que se obtienen para el estudio se identifican con un código que garantiza el anonimato de las mismas y este código solo podrá ser revelado por el Médico Genetista responsable del proyecto de investigación.

Toda información que proporcione y que exista en mi expediente clínico es confidencial y solo será utilizada con fines de investigación. Así mismo mis datos no serán revelados a familiares no autorizados y / o personas que soliciten el mismo sin mi consentimiento.

### **BENEFICIOS POTENCIALES:**

La identificación de mutaciones en genes relacionados de distrofias musculares de cinturas no solo permitirá hacer un diagnóstico oportuno en el paciente sino que permitirá hacerle un seguimiento adecuado dependiendo del tipo de patología que padezca, evitando complicaciones a futuro. Así mismo se podrá brindar un asesoramiento genético a la familia, se podrán identificar potenciales portadores y se podrán identificar familiares pre-sintomáticos que estén en riesgo de padecer la misma patología, estableciendo así riesgo de recurrencia según el caso. A futuro una vez se cuente con el tratamiento disponible en el país, acceder a este será mucho más fácil con un estudio molecular confirmatorio de la condición específica.

### **CONSIDERACIONES ECONÓMICAS:**

La participación en este estudio no demanda ningún pago por parte del participante, así como tampoco involucrará remuneración económica al paciente que decida participar voluntariamente. Todos los procedimientos que deriven mi participación incluyendo el almacenamiento y procesamiento de mi muestra para

obtención de DNA así como los métodos de análisis que se deriven no tendrán ningún costo.

### **COMPENSACIÓN**

Si sufre algún tipo de lesión como consecuencia directa de la participación en este estudio, todo el equipo de la investigación le proporcionará el tratamiento inmediato necesario para su atención, y se referirá si lo amerita al especialista en Medicina que requiera. El Hospital General de México no brinda ningún otro tipo adicional de compensación incluyendo la económica para cubrir el daño.

### **ALTERNATIVAS A SU PARTICIPACIÓN:**

La participación en este estudio es completamente voluntaria. Usted puede decidir o no participar en el estudio.

### **POSIBLES PRODUCTOS COMERCIALES DERIVADOS DEL ESTUDIO:**

Los materiales serán propiedad del hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga. En caso de que un producto comercial se derive de tal investigación, tal insumo serán propiedad del hospital o de quien este asigne. En tal caso usted no recibirá una compensación en forma de beneficio financiero.

### **ACCIONES A SEGUIR DESPUÉS DEL TÉRMINO DEL ESTUDIO**

Una vez se le contacte para informar sobre los resultados del estudio, usted podrá reclamar los resultados de sus análisis clínicos y de las conclusiones del estudio a Los doctores: María del Refugio Rivera Vega o Dra. Valentina Martínez Montoya en la Unidad de Genética 501. Nuevo Edificio Piso 3.

Todo proceso de investigación es complejo y toma tiempo. El proceso de entrega de resultados será entre 6 y 8 semanas para el estudio de NGS una vez se tome la muestra y 4 semanas para el estudio de Sanger confirmatorio. En cualquier momento podrá contactar al médico Genetista responsable del protocolo o al Médico genetista tratante para resolver las dudas sobre este estudio y mi participación en el.

El obtener el resultado final del proyecto puede tomar varios meses a partir de la fecha en que decida la participación voluntaria.

## **PARTICIPACIÓN Y RETIRO DEL ESTUDIO:**

Su participación es VOLUNTARIA. Si no decide participar en ningún momento la relación con el Hospital General de México ni su atención como paciente se verá afectada en ningún sentido, tanto en los procedimientos que tienen derecho como paciente como en su tratamiento y seguimiento oportunos. Si decide participar tienen la libertad para retirar su consentimiento y su participación en cualquier momento sin perjudicar su atención en el hospital. Si decide retirar su muestra de DNA, se le entregará personalmente e incluso si así lo desea se desechará en presencia suya.

## **CONFIDENCIALIDAD Y MANEJO DE LA INFORMACIÓN:**

Su nombre no será usado en ninguno de los estudios. Las muestras biológicas obtenidas no contendrán ninguna información personal y se codificará con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación.

Por disposición legal las muestras biológicas, incluyendo la sangre, son catalogadas como residuos peligrosos biológico-infecciosos y por esta razón durante el curso de la investigación, su muestra no podrá serle devuelta a menos de que retire su consentimiento de participación. Es posible que sus muestras biológicas así como su información médica y/o genética puedan ser usadas para otros proyectos de investigación análogos relacionados con la enfermedad en estudio. Las muestras no podrán ser usadas para estudios de investigación que no estén relacionados con condiciones distintas a las estudiadas en este proyecto. Sus muestras podrán ser almacenadas por los investigadores hasta por 10 años. Los códigos que identifican su muestra estarán solo disponibles a los investigadores titulares, quienes están obligados por Ley a no divulgar su identidad. Estos códigos serán guardados en un archivero con clave. Solo los investigadores tendrán acceso. Su confidencialidad será protegida como lo marca la Ley. Será mantenida asignando códigos a su información. El código es un número de identificación que no incluye datos personales. Ninguna información sobre su persona será compartida con otros sin autorización, excepto:

- Si es necesario para proteger sus derechos y bienestar (por ejemplo, si ha sufrido una lesión y requiere tratamiento de emergencia); o es solicitado por la Ley.

Monitores o auditores del estudio podrán tener acceso a la información de los participantes. Si usted decide retirarse del estudio, podrá solicitar el retiro y destrucción de su material biológico y de su información

- Todas las hojas de recolección de datos serán guardadas con las mismas medidas de confidencialidad, y solo los investigadores titulares tendrán acceso a los datos que tienen su nombre.
- Los datos científicos obtenidos como parte de este estudio podrían ser utilizados en publicaciones o presentaciones médicas.
- Su nombre y otra información personal serán eliminados antes de usar los datos.
- Si usted lo solicita su médico de cabecera (si no es el mismo que dirige el protocolo) será informado sobre su participación en el estudio.

#### **PARA ESTUDIOS GENÉTICOS.**

Su material genético no será usado con fines distintos a los mencionados en este documento, solo para proyectos de investigación relacionados con la enfermedad en estudio. Si el investigador desea usarlo con fines distintos deberá notificarlo y solicitarle su firma en un documento similar al que usted está leyendo.

#### **IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES.**

Si usted tiene preguntas sobre el estudio puede ponerse en contacto con los Doctores que dirigen la investigación en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” al (teléfono 27892000).

## DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que he tenido y todas han sido respondidas satisfactoriamente.

Para poder participar en el estudio, estoy de acuerdo en los siguientes puntos:

- Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente.
- Los objetivos generales, particulares del reclutamiento y los posibles daños e inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.
- Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mis muestras biológicas, de 10ml aproximadamente de sangre venosa, para ser utilizada en este estudio. Así mismo, mi información médica y biológica podrá ser utilizada para mismos fines.
- Estoy de acuerdo, en caso de ser necesario, que se me contacte en el futuro si el proyecto requiere recolectar información adicional o si encuentran información relevante para mi salud.
- Mi firma también indica que he recibido por duplicado este consentimiento informado.

Responda las siguientes preguntas:

PREGUNTAS	SI	NO
a. ¿Ha leído y entendido la forma de consentimiento informado, en su lenguaje materno?		
b. ¿Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y de discutir este estudio?		
c. ¿Ha recibido usted respuestas satisfactorias a todas sus preguntas?		
d. ¿Ha recibido suficiente información acerca del estudio y ha tenido el tiempo suficiente para tomar la decisión?.		
<p>e. ¿Entiende que su participación es voluntaria y que es libre de suspender su participación en este estudio en cualquier momento sin tener que justificar su decisión y sin que esto afecte su atención médica o sin la pérdida de los beneficios a los que de otra forma tenga derecho?</p> <p>f. ¿Autoriza se de acceso a sus registros médicos para este estudio de investigación y para propósitos regulatorios</p> <p>a....., sus representantes, los auditores, oficinas regulatorias del estudio y otras agencias gubernamentales de salud en México y posiblemente otras agencias de salud en otros países.</p>		
g. ¿Entiende los posibles riesgos , algunos de los cuales son aún desconocidos, de participar en este estudio?		
h. ¿Entiende que puede no recibir algún beneficio directo de participar en este estudio?		
i. ¿Entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales a los que es acreedor de otra forma como sujeto en un estudio de investigación?		
j. ¿Entiende que el médico participante en el estudio puede retirarlo del mismo sin su consentimiento, ya sea debido a que usted no siguió con los requerimientos del estudio o si el médico participante en el estudio considera que médicamente su retiro es en su mejor interés?		
k. ¿Entiende que el estudio puede ser suspendido por el patrocinador del estudio en cualquier momento?		
l. ¿Entiende que usted recibirá un original firmado y fechado de esta Forma de Consentimiento, para sus registros personales?		

Declaración del Paciente: Yo: \_\_\_\_\_

Declaro que es mi decisión participar en el estudio. Mi participación es voluntaria.

He sido informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios e mi atención médica. Si suspendo mi participación, recibiré el tratamiento médico habitual al que tengo derecho en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" y no sufriré perjuicio en mi atención médica o en futuros estudios de investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en el estudio. Puedo obtener los resultados de mis exámenes clínicos si los solicito. Debo informar a los investigadores de cualquier cambio en mi estado de salud o en la ciudad donde resido, tan pronto como sea posible.

He leído y entendido toda la información que me han dado sobre mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad para discutirlo y hacer preguntas. Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.

_____ Nombre del participante	_____ Firma del participante	_____ Fecha
_____ Representante legal Del Participante(si aplica)	_____ Firma del representante legal	_____ Fecha
_____ Nombre del investigador Que explicó el Documento.	_____ Firma del investigador	_____ Fecha
_____ Nombre del testigo 1	_____ Firma del testigo 1	_____ Fecha

Relación con el participante y dirección:

---

---

Nombre del Testigo 2

---

Firma del testigo 2

---

Fecha

Relación con el participante y dirección:

---

Lugar y fecha: \_\_\_\_\_

(El presente documento es original y consta de 11 páginas).

➤ ANEXO VI.



**TEST DE ALDA UTILIZADO EN CONSULTA CLÍNICA DE  
GENÉTICA, PARA CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LAS  
DISTROFIAS MUSCULARES.**

**Modificada para recolección de datos en los pacientes del Hospital General de  
México 2016-2019.**

**1 DATOS PERSONALES:**

Nombre:

Edad:

Fecha de Nacimiento:

Teléfonos de contacto:

Lugar de Nacimiento:

Domicilio :

Teléfono personal:

Tutor legal o contacto en caso de emergencia:

NÚMERO DE CASO: \_\_\_\_\_

**2. GENEALOGÍA:**

Familiares afectados con sintomatología similar:

\_\_\_\_\_ Edad de inicio:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Edad de inicio:

\_\_\_\_\_

Otros:

Valoraciones previas por Neurología o especialidades afines:

\_\_\_\_\_ fecha:

\_\_\_\_\_ fecha:

\_\_\_\_\_ fecha:

\_\_\_\_\_ fecha:

Diagnósticos excluidos previamente:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### **3. ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS:**

#### **PERINATALES:**

- Producto de Gestación:
- Datos de hipo movilidad fetal:
- Hipotonía al nacimiento:
- Peso, talla y perímetro cefálico al nacimiento:
- Contracturas articulares al nacimiento:
- Distres respiratorio al nacimiento:
- Anomalías congénitas al nacimiento y tratamiento actuales por estas anomalías:

### **4. NEURODESARROLLO**

#### **MOTRICIDAD FINA Y GRUESA Y SÍNTOMAS MUSCULO ESQUELÉTICOS EN INFANCIA**

- Sostén cefálico:
- Sedestación:
- Gateo y apoyo en 3 puntos:
- Apoyo en dos puntos:
- Bipedestación:
- Coordinación y marcha:

- Patrones anormales de marcha en infancia:
- Alteraciones en fuerza muscular y debilidad en infancia:
- Compromiso de músculos faciales:

**LENGUAJE, INTERACCIÓN SOCIAL:**

- Juego vocálico:
- Balbuceo:
- Monosílabos
- Bisílabos:
- Frases:
- Vocabulario al año:
- Vocabulario a los 2 años:
- Interacción con pares:
- Desempeño social y rendimiento escolar:

**5. PATOLÓGICOS Y CONDICIONES MÉDICAS EN INFANCIA( con inicio de las mismas):**

---



---



---



---



---



---



---



---

**3. ESTUDIOS DE LABORATORIO Y GABINETE PREVIOS A CONSULTA:**

**ESTUDIO, RESULTADO Y FECHA:**

1.	
2.	
3.	
4.	
5.	
6.	

**EXAMEN FÍSICO: ESCALA MRC(Medical Research Council) PARA EVALUACIÓN DE PACIENTES CON CLÍNICA DE DISTROFIA MUSCULAR.**

**MRC: puntaje:**  
**Miembros superiores:**  
**Miembros Inferiores:**  
**Otros:**

**7. ALDA PARA SCORE DE RIESGO:**

**ALDA - Free Automated LGMD Diagnostic Assistant**

*<https://www.jain-foundation.org/lgmd-subtyping-diagnosis-tool>*

1. IDENTIFICACIÓN L PACIENTE CON CÓDIGO ASIGNADO POR MÉDICO TRATANTE O INVESTIGADOR PARA EL SISTEMA ELECTRÓNICO: \_\_\_\_\_
2. Género: F:\_\_\_ M:\_\_\_\_\_
3. Consanguinidad parental: SI:\_\_\_ NO:\_\_\_ Desconocida:\_\_\_\_\_
4. Existen individuos de la familia con síntomas parecidos al paciente: Si:\_ No: \_\_\_\_\_

Respuesta anterior si:

Relación con el probando: \_\_\_\_\_ Severidad de los síntomas comparados con el probando: Leve:\_\_\_\_\_ Moderado:\_\_\_\_\_ severos:\_\_\_\_\_

Relación con el probando: \_\_\_\_\_ Severidad de los síntomas comparados con el probando: Leve:\_\_\_\_\_ Moderado:\_\_\_\_\_ severos:\_\_\_\_\_

Relación con el probando: \_\_\_\_\_ Severidad de los síntomas comparados con el probando: Leve:\_\_\_\_\_ Moderado:\_\_\_\_\_ severos:\_\_\_\_\_

Relación con el probando: \_\_\_\_\_ Severidad de los síntomas comparados con el probando: Leve:\_\_\_\_\_ Moderado:\_\_\_\_\_ severos:\_\_\_\_\_

5. Descendencia:  
Finlandesa: Norte de Europa: Japonesa: Desconocida:
6. Existen otras condiciones de LGMD excluidas por otros test genéticos:  
Si:\_\_\_No:\_\_\_\_\_.

7. Edad de aparición de los síntomas:  
 Antes de los 5: \_\_\_ 5 a 12 : \_\_\_ 13 a 25: \_\_\_ Después de 25: \_\_\_  
 Desconocido: \_\_\_
8. Debilidad distal:  
 -Primaria:  
 - Comparable o menor que la debilidad proximal:  
 - Ninguna o mucho menor que la debilidad proximal o de aparición tardía.  
 - Desconocida:
9. Debilidad facial:  
 Si: \_\_\_ No: \_\_\_ Desconocida: \_\_\_
10. Compromiso cardiaco:  
 Si: \_\_\_ No: \_\_\_ Desconocida: \_\_\_
11. Compromiso respiratorio  
 Si: \_\_\_ No: \_\_\_ Desconocida: \_\_\_
12. Ojos afectados:  
 Si: \_\_\_ No: \_\_\_ Desconocida: \_\_\_
13. Síntomas en SNC  
 Afectado: \_\_\_ Normal: \_\_\_ Desconocido: \_\_\_
14. Escapulas aladas:  
 Pronunciadas: \_\_\_ Moderadas: \_\_\_ NO: \_\_\_ Desconocido: \_\_\_
15. Hipertrofia de pantorrillas:  
 Pronunciadas: \_\_\_ Moderadas: \_\_\_ NO: \_\_\_ Desconocido: \_\_\_
16. Calambres / dolor muscular:  
 Con el ejercicio Intolerancia al mismo: \_\_\_  
 Sensación de quemadura y dolor muscular: \_\_\_  
 Ausencia de dolor o ardor : \_\_\_
17. Contraturas:  
 Pronunciadas: \_\_\_ Moderadas: \_\_\_ NO: \_\_\_ Desconocido: \_\_\_
18. Desgaste muscular y debilidad muscular asimétricas:  
 Pronunciadas: \_\_\_ Moderadas: \_\_\_ NO: \_\_\_ Desconocido: \_\_\_
19. Tasa de progresión:  
 Rápida: \_\_\_ Moderada: \_\_\_ Lenta: \_\_\_ Desconocida: \_\_\_
20. Biopsia con cambios distróficos:  
 Si: \_\_\_ No: \_\_\_ Desconocida: \_\_\_
21. Biopsia con datos de inflamación:

Si:\_\_\_ No:\_\_\_ Desconocido:\_\_\_

22. Biopsia con vacuolas o cuerpos de inclusión:

Si:\_\_\_ No:\_\_\_ Desconocido:\_\_\_

23. CPK niveles

<200 :\_\_\_\_\_ 200 a 500:\_\_\_\_\_ 500 a 2000:\_\_\_\_\_  
2000 a 7000:\_\_\_\_\_ >7000:\_\_\_\_\_

24. Caminata en puntillas o contracturas en tendón de Aquiles:

Si:\_\_\_ No:\_\_\_ Desconocido:\_\_\_

25. Tiene el paciente pie caído:

Si:\_\_\_ No:\_\_\_ Desconocido:\_\_\_

26. Se para en los dedos o en puntas:

Si:\_\_\_ No:\_\_\_ Desconocido:\_\_\_

27. Fuerza del cuádriceps:

- Más afectados que otros músculos proximales:\_\_\_
- Afectado comparable con otros músculos temporales:\_\_\_
- Selectivamente comprometido:\_\_\_\_\_

28. CONTRACTURAS repetidas desencadenadas con percusión muscular:

Si:\_\_\_ No:\_\_\_ Desconocido:\_\_\_

29. Crecimiento de la lengua:

Si:\_\_\_ No:\_\_\_ Desconocido:\_\_\_

30. Circunferencia de la cabeza:

Pequeña:\_\_\_\_\_ Grande:\_\_\_\_\_ Desconocida:\_\_\_\_\_

(valores con respecto a parámetros de referencia)

31. Debilidad del cuello:

Si:\_\_\_ No:\_\_\_ Desconocido:\_\_\_

32. Brazos o piernas más afectadas.

Brazos:\_\_\_\_\_ Piernas:\_\_\_\_\_ Desconocido:\_\_\_\_\_

33. Contracturas en dedos:

**SCORE ALDA: REPORTE FINAL:** \_\_\_\_\_

➤ **ANEXO VII:**

# REGISTRO INTERNACIONAL DE DISFERLINOPATÍAS PARA PACIENTES INSCRIPCIÓN OPCIONAL OFRECIDA A LOS PACIENTES DE ESTA INVESTIGACIÓN CON DIAGNOSTICO POSITIVO DE DISFERLINOPATÍA LGMD2B.

## Registration Medical Questionnaire (III) for the Medical Doctor "The International Dysferlinopathy Registry"

Patient's First Name _____	Patient's Last Name _____	Born on _____ DD/MM/YYYY
----------------------------	---------------------------	-----------------------------

Filled in by Dr. / Prof. \_\_\_\_\_  
Doctor's Name

- This patient is my patient.  
 This patient is NOT my patient [please check the box and send this blank questionnaire back to the registry].

### 1. CURRENT CLINICAL DIAGNOSIS

Please indicate the current clinical diagnosis for this patient:

- Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2B (LGMD2B)
- Limb Girdle Muscular Dystrophy (undetermined LGMD type)
- Miyoshi myopathy
- Proximodistal form of dysferlinopathy
- Distal Myopathy with Anterior Tibial onset (DMAT)
- HyperCKemia
- Asymptomatic
- Other (please specify): \_\_\_\_\_

### 2. MUTATIONAL ANALYSIS OF THE DYSEFERLIN GENE

- I DO NOT have any result of mutational analyses of the dysferlin gene for this patient.  
 Please note that the registry website provides both, a list of laboratories offering tests for the clinical diagnosis of dysferlinopathies and a list of laboratories performing genetic testing for dysferlinopathies. The Jain Foundation ([www.jain-foundation.org](http://www.jain-foundation.org)) can also help guide physicians with patients with an unclear diagnosis.
- I DO have results of mutational analyses of the dysferlin gene for this patient.  
 Please note that information in this section is crucial for the registry. You can choose to fill in this section yourself or to send us a copy of the genetic report for this patient. If you choose to send the genetic report, please make sure that the report contains all the information required below.
- To help you answer this section, you can consult the International Dysferlinopathy Registry website ("Links and Resources for Research and Medical Doctors") and/or the Human Genome Variation Society guidelines ([www.hgvs.org/](http://www.hgvs.org/)). Please enter disease-causing mutations only. Examples of annotating mutations in the standard HGVS nomenclature are: c.855+1delG; c.2997G>T; c.4872\_4876delinsCCCC, etc. If the sequence of reference is not the one indicated below, please specify the accession number of the sequence of reference used to describe the variant. It is also very important for the registry to know where the analysis was performed.

#### MUTATION #1

Dysferlin genetic report attached  Yes  No      Date of analysis: Year: \_\_\_\_\_ Month: \_\_\_\_\_  
 Medical centre / lab where the analysis was performed: \_\_\_\_\_  
 Mutation nomenclature at the DNA level (following hgvs guidelines): \_\_\_\_\_  
 Mutation nomenclature at the protein level (following hgvs guidelines): \_\_\_\_\_  
 Sequence of reference was:  NM\_003494.2  other (please specify): \_\_\_\_\_  
 This mutation was detected at:  a homozygous state  a heterozygous state  
 Detection method was: \_\_\_\_\_

#### MUTATION #2

Dysferlin genetic report attached  Yes  No      Date of analysis: Year: \_\_\_\_\_ Month: \_\_\_\_\_  
 Medical centre / lab where the analysis was performed: \_\_\_\_\_  
 Mutation nomenclature at the DNA level (following hgvs guidelines): \_\_\_\_\_

Mutation nomenclature at the protein level (following hgvs guidelines): \_\_\_\_\_

Sequence of reference was:  NM\_003494.2  other (please specify): \_\_\_\_\_

This mutation was detected at:  a homozygous state  a heterozygous state

Detection method was: \_\_\_\_\_

#### MUTATION #3

Dysferlin genetic report attached  Yes  No Date of analysis: Year: \_\_\_\_\_ Month: \_\_\_\_\_

Medical centre / lab where the analysis was performed: \_\_\_\_\_

Mutation nomenclature at the DNA level (following hgvs guidelines): \_\_\_\_\_

Mutation nomenclature at the protein level (following hgvs guidelines): \_\_\_\_\_

Sequence of reference was:  NM\_003494.2  other (please specify): \_\_\_\_\_

This mutation was detected at:  a homozygous state  a heterozygous state

Detection method was: \_\_\_\_\_

### 3. BIOLOGICAL ANALYSIS OF THE DYSFERLIN PROTEIN

I DO NOT have any result of biological analyses of the dysferlin protein for this patient.

I DO have results of biological analyses of the dysferlin protein for this patient.

You can choose to fill in this section yourself or to send us a copy of the dysferlin protein biological report for this patient. If you choose to send a report, please make sure that the report contains all the information required below.

#### PROTEIN ANALYSIS RESULT #1

Dysferlin protein analysis report attached  Yes  No Date of analysis: Year: \_\_\_\_\_ Month: \_\_\_\_\_

Medical centre / lab where the analysis was performed: \_\_\_\_\_

Level of dysferlin: \_\_\_\_\_

Tissue:  biopsy  blood monocytes  other (please specify): \_\_\_\_\_

Detection method was:  immunohistochemistry  western blot  other (please specify): \_\_\_\_\_

#### PROTEIN ANALYSIS RESULT #2

Dysferlin protein analysis report attached  Yes  No Date of analysis: Year: \_\_\_\_\_ Month: \_\_\_\_\_

Medical centre / lab where the analysis was performed: \_\_\_\_\_

Level of dysferlin:

Tissue:  biopsy  blood monocytes  other (please specify): \_\_\_\_\_

Detection method was:  immunohistochemistry  western blot  other (please specify): \_\_\_\_\_

### 4. BIOLOGICAL ANALYSIS OF THE CREATINE KINASE PROTEIN

I DO NOT have any result of biological analyses of the creatine kinase protein for this patient.

I DO have results of biological analyses of the creatine kinase protein for this patient.

You can choose to fill in this section yourself or to send us a copy of the CK protein biological report for this patient. If you choose to send a report, please make sure that the report contains all the information required below.

Level of CK in blood: \_\_\_\_\_ IU/L, Year: \_\_\_\_\_ Month: \_\_\_\_\_ CK report attached  Yes  No

Level of CK in blood: \_\_\_\_\_ IU/L, Year: \_\_\_\_\_ Month: \_\_\_\_\_ CK report attached  Yes  No

Level of CK in blood: \_\_\_\_\_ IU/L, Year: \_\_\_\_\_ Month: \_\_\_\_\_ CK report attached  Yes  No

Please send this Registration Medical Questionnaire (III) correctly filled in by e-mail (contact@dysferlinregistry.org), or by post to: The International Dysferlinopathy Registry; Inserm UMR S910, Aix-Marseille Université, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, FRANCE.

