UAB
Universitat Autònoma de Barcelona

Abordaje multidisciplinar para el diagnóstico y caracterización de enfermedades musculares raras

Laura Llansó Caldentey

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons: https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons: https://creativecommons.org/licenses/?lang=es

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license: https://creativecommons.org/licenses/?lang=en

TESIS DOCTORAL

Abordaje multidisciplinar para el diagnóstico y caracterización de enfermedades musculares raras

Tesis doctoral presentada para optar al grado de Doctor

Doctoranda:

Laura Llansó Caldentey

Directora:

Dra. Montserrat Olivé Plana

Tutor:

Dr. Luis Antonio Querol Gutiérrez



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

Barcelona, 2026

AGRADECIMIENTOS

Per un metge en formació és important l'esforç, la curiositat i la dedicació, però també topar-se amb les persones adequades al llarg del camí. Aquests anys he tingut la sort de conèixer persones brillants, amb grans coneixements, però aquest no és l'únic tret que defineix un bon metge. Durant la residència i anys posteriors he tingut la sort de conèixer varietat de professionals bons i competents, propers amb els pacients i bons comunicadors, bons docents, bons investigadors, bons companys. D'aquestes persones del camí m'emporto ensenyaments i maneres de fer que finalment puc encaixar com un mosaic per dissenyar una manera de fer i practicar la Medicina.

En primer lloc gràcies a tu, Montse, mentora i persona imprescindible pel desenvolupament d'aquesta tesi. Considero un honor haver treballat amb tu, aprenent del teu ull clínic, del teu coneixement infinit de patologia, i de la teva manera meticulosa de fer. Perquè ets una dona de ciència, però darrere aquesta "serietat" hi ha una gran docent, amb valor humà i esperit col·laborador, que fa que sigui agradable treballar amb tu. Valoro enormement el teu esforç el darrer any per ajudar-me a avançar aquest projecte tot i les dificultats. Gràcies per inculcar-me la passió per les miopaties i guiar-me en aquest món amb tanta saviesa i tanta paciència.

Gràcies a tot l'equip del servei de Neurologia i companys de residència del Clínic. Agrair als meus coR, els residents grans i petits, als especialistes i tutors, amb qui m'he format com a neuròloga. Junts hem treballat en equip i hem rigut. Especial menció a Antonio, Diana, Jordi, Almu, Alejandro, Gerard, Dani, Álvaro, Valle, Marta, Richi, per compartir tants bons moments junts. ¡Porque aún echo de menos el día de Andalucía con el despacho lleno de banderas verdiblancas y fotos de celebridades sureñas!

Gràcies a tot el grup d'electromiografia del Clínic, amb qui vaig començar a formar-me en neuromuscular i respecto enormement. Especialmente gracias a ti, Aida, por plantar en mi la semilla y ofrecerme esa rotación externa que me motivó para seguir esta senda. A todo el equipo, incluyendo Judith, Laura, Michela, Aurora, Dani, Lorena, Ari, por crear un ambiente de trabajo tan cómodo y amigable y enseñarme con paciencia esos primeros meses. A Josep Valls, per la seva passió per la electrofisiologia que ens guiava constantment a fer-nos preguntes i dirigir els mètodes per obtenir resposta. Y a ti, David, a quien considero no solo uno de mis primeros profesores de neurología como resi mayor, sino un mentor en mis últimos años en el mundo del neuromuscular y un buen amigo, que siempre tiene buenos consejos, y por qué no, algunos cotilleos para compartir.

A todo el equipo de Neuromuscular de Sant Pau, donde he aprendido enormemente y me he sentido como en casa desde mi llegada. Vosotros me habéis transmitido la pasión por este trabajo, el diagnosticar de forma dirigida, el no pasar por alto los detalles, el insistir en cerrar los casos aunque cueste años, y a tener una visión global del paciente. Aquí ha nacido mi interés por la investigación traslacional, clínica y básica. Especial mención a Eduard y Rosi, por vuestras ideas y colaboración constante en el laboratorio. Espero que sigamos haciendo muchas cosas juntos. A Luis, por su incansable energía y sus buenas ideas en la búsqueda de respuestas, que siempre tiene un segundo de su tiempo para dar consejos. A los "junior" del grupo, por hacerlo todo siempre fácil y ayudarnos entre nosotros. Gràcies Marta, per la teva ajuda infinita en aquest llarg procés de dipositar. Y a los no tan junior, especialmente Janina, per la teva manera simpàtica i sàvia de compartir els teus coneixements. Gracias al equipo de Genética, Pia, Lidia, y Alba, quienes son un pilar más del grupo y han tenido un papel fundamental en esta tesis.

A la meva família, especialment als meus pares i germans, per haver-me recolzat tots aquests anys. Als meus germans grans per valorar la meva introspecció i concentració, i per proposar sempre plans bojos o divertits i voler desviar-me del "bon" camí. Al Joan, per entendre'm a mitges treballant en un àmbit molt diferent, que sempre tens bones propostes i m'ensenyes a pensar amb ambició. A tu, Mamà, per recolzar-me sempre en les decisions que he pres i restar pes a sortir de la zona de confort, com has fet tantes vegades. Papá y Begoña, por vuestro apoyo incondicional siempre que lo necesito. I als meus tiets interessats per la Medicina, que no són pocs.

A la meva parella, Alex, el major suport a casa, per confiar en mi, escoltar-me sempre i tenir paciència. Gràcies per treure'm l'estrès de sobre, ajudar-me a relativitzar els problemes i acompanyar-me en aquest camí de canvi, que hem caminat junts i encara ens queda en endavant.

ABREVIACIONES

AVSF – *autophagic vacuoles with sarcolemmal features*

CASQ1 – calsecuestrina 1

CES – *clinical exome sequencing*

CK – creatina quinasa

CMA – *chaperone-mediated autophagy*

CNV – *copy number variant*

DHPR – *dihydropyridine receptor*

ECC – *excitation-contraction coupling*

HLA – *human leucocyte antigen*

HMGCR – 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG)-coenzima A reductasa

IF – inmunofluorescencia

IH – inmunohistoquímica

IVCT – *in vitro contracture test*

LAMP – *lysosome-associated membrane protein*

LGMD – *limb-girdle muscular dystrophy*

LRS – *long-read sequencing*

MAA – *myositis-associated antibodies*

MAC – *membrane attack complex (C5b-9)*

MHC – *major histocompatibility complex*

mRNA – ARN mensajero

MSA – *myositis-specific antibodies*

NGS – *next-generation sequencing*

PLIN4 – perilipina 4

PMCA – *plasma membrane* Ca^{2+}*-ATPase*

RM – resonancia magnética

RNAseq – *RNA sequencing*

RS – retículo sarcoplasmático

RyR – receptor de rianodina (RyR1, RyR2)

SERCA – *sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase*

SNV – *single nucleotide variant*

SRP – *signal recognition particle*

UPS – *ubiquitin-proteasome system*

VUS – *variant of uncertain (or unknown) significance*

WB – western blot

WES – *whole-exome sequencing*

WGS – *whole-genome sequencing*

XMEA – *X-linked myopathy with excessive autophagy*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la anatomía del músculo esquelético **20**

Figura 2. Estructura de la tríada muscular **21**

Figura 3. Diagrama de los filamentos e interacciones actina-miosina **22**

Figura 4. Mecanismo de ECC en la fibra muscular **23**

Figura 5. Esquema resumen del sistema de control de calidad de proteínas **29**

Figura 6. Biopsia muscular de características distróficas de paciente afecto de distrofia muscular de Becker **33**

Figura 7. Dibujo esquemático de la fibra muscular con las localizaciones celulares de proteínas asociadas a varios tipos de distrofias musculares de cinturas **35**

Figura 8. Biopsia muscular de un paciente afecto de miopatía miofibrilar por mutación en el gen de la desmina **38**

Figura 9. Biopsia muscular de un paciente afecto de miopatía congénita por variantes bialélicas en *RYR1* **39**

Figura 10. Esquema de la familia proteica de las perilipinas humanas (PLIN1-5) y sus hélices anfipáticas **43**

Figura 11. Esquema que representa los subtipos de miopatías inflamatorias idiopáticas y los autoanticuerpos asociados **46**

Figura 12. Resonancia magnética muscular corporal de varios pacientes afectos de disferlinopatía **53**

Figura 13. Comparación de la secuenciación con tecnología de lecturas cortas y de lecturas largas **59**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de las isoformas SERCA en humanos y resto de mamíferos **24**

Tabla 2. Comparación de la nomenclatura anterior de LGMD con el sistema de clasificación actual **34**

Tabla 3. Principales miopatías distales: clasificación molecular y características de cada subtipo **37**

Tabla 4. Clasificación de las miopatías congénitas según el patrón histológico, genes relacionados, proteínas defectuosas y patrones de herencia **40**

ÍNDICE

RESUMEN **12**

ABSTRACT **15**

1. INTRODUCCIÓN **18**

1.1. Anatomía y fisiología de la fibra muscular **19**

1.2. Homeostasis del calcio y acoplamiento excitación-contracción **21**

1.2.1. Estudios *in vitro* de la homeostasis del calcio 26

1.3. Sistema de control de calidad de proteínas **27**

1.3.1. Sistema ubiquitina-proteasoma 29

1.3.2. Autofagia mediada por chaperonas 30

1.3.3. Macroautofagia 30

1.4. Epidemiología de las enfermedades musculares **31**

1.5. Miopatías hereditarias **31**

1.5.1. Clasificación de las miopatías hereditarias 32

1.5.1.1. Distrofias musculares 32

1.5.1.2. Miopatías distales 35

1.5.1.3. Miopatías miofibrilares 36

1.5.1.4. Miopatías congénitas 38

1.5.1.5. Canalopatías 41

1.5.1.6. Miopatías metabólicas 41

1.5.1.7. Otras miopatías hereditarias: miopatías vacuolares autofágicas .. 41

1.5.1.7.1. Miopatías con vacuolas autofágicas de características sarcolemales 42

1.5.1.7.2. Miopatía vacuolar autofágica por expansiones en *PLIN4* .. 42

1.6. Miopatías inflamatorias idiopáticas **44**

1.6.1. Clasificación 45

1.6.2. Tratamiento 47

1.6.3. Asociaciones con alelos de HLA 47

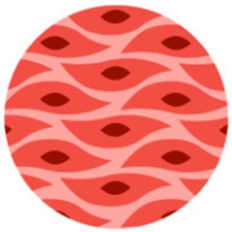
1.6.4. Miopatía necrotizante inmunomediada 48

1.6.4.1. Miopatía necrotizante inmunomediada con anti-SRP 48

1.6.4.2. Miopatía necrotizante inmunomediada con anti-HMGCR 49

1.7. Diagnóstico de las enfermedades musculares **50**

1.7.1. Caracterización clínica 50
1.7.2. Marcadores analíticos 51
1.7.3. Estudios electrofisiológicos 51
1.7.4. Biopsia muscular 51
1.7.5. Estudios de imagen muscular 52
1.7.6. Estudios genéticos 54
1.7.6.1. Técnicas de secuenciación masiva del ADN (NGS) 55
1.7.6.2. Estudio de variantes estructurales y CNVs 56
1.7.6.3. Estudio de mutaciones dinámicas 57
1.7.6.4. Más allá del NGS: *Long-read sequencing* 57
1.7.6.5. Secuenciación del mRNA (RNAseq) 60
2. HIPÓTESIS 61
3. OBJETIVOS 63
4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES 65
4.1. Primer trabajo 66
4.2. Segundo trabajo 85
4.3. Tercer trabajo 108
5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS 124
6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN 131
7. CONCLUSIONES 142
8. LÍNEAS DE FUTURO 144
9. BIBLIOGRAFÍA 146



RESUMEN

RESUMEN

Las miopatías son enfermedades primarias del músculo estriado que comportan en la mayoría de pacientes debilidad y atrofia muscular progresivas. La marcada variabilidad clínica y etiológica que las caracteriza, junto a su baja prevalencia, dificultan su diagnóstico. Pueden ser adquiridas o hereditarias, presentar un curso agudo o crónico, y asociarse o no a sintomatología sistémica. Estas características comportan un hándicap en el diagnóstico diferencial por lo que se requiere de herramientas diagnósticas específicas y una aproximación multidisciplinar que abarque conocimiento clínico, anatomopatológico, radiológico y genético. A pesar de los avances en técnicas de secuenciación masiva del ADN en las últimas décadas que han permitido aumentar el rendimiento diagnóstico, la tasa diagnóstica actual de las miopatías hereditarias se restringe al 30-60%. Obviando limitaciones técnicas que se van supliendo con nuevos avances en el área de la genética molecular, es previsible que muchos de los casos sin diagnosticar se deban a nuevos genes por descubrir y nuevos fenotipos clínicos asociados a genes ya conocidos.

Esta tesis doctoral se centra en la caracterización integral de distintas miopatías, dos de ellas vacuolares hereditarias y una tercera adquirida, inmunomediada, con especial enfoque en factores predisponentes genéticos, con el objetivo de identificar potenciales nuevos genes relacionados con miopatías hereditarias y nuevas correlaciones genotipo-fenotipo en genes ya conocidos, así como ampliar el conocimiento fisiopatológico en un subtipo de miopatía necrotizante inmunomediada. Para ello, después de un estudio riguroso de las características clínicas, radiológicas e histológicas de estas enfermedades, se han utilizado técnicas de secuenciación de nueva generación o de lecturas largas del ADN.

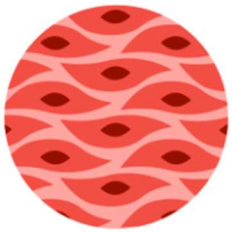
En el primer artículo que incluye esta tesis doctoral se describe una nueva miopatía hereditaria de inicio en la edad adulta tras la identificación de una variante homocigota en el gen *ATP2A2*, nunca antes asociado a enfermedad muscular. Este gen codifica el canal del retículo sarcoplasmático SERCA2, relacionado con el transporte y homeostasis de calcio en la fibra muscular. En el estudio se demuestra la patogenicidad de la variante en el gen identificado mediante la íntima relación con los hallazgos de biopsia muscular y evidencia funcional *in vitro* de alteración de actividad del canal SERCA2.

El segundo artículo de la tesis corresponde a la descripción detallada de dos familias españolas afectas de una miopatía vacuolar hereditaria causada por expansiones en el

gen que codifica la perilipina 4. Esta miopatía se describió en una familia en 2004 pero no fue hasta 2020 que se identificó exitosamente el defecto genético subyacente, una expansión compleja en la región anfipática del exón 5 del gen *PLIN4* que escapa fácilmente de las técnicas diagnósticas habituales. Hasta nuestra publicación solo se habían descrito cuatro familias con distintos tamaños de la expansión y diferentes fenotipos clínicos, con características histológicas comunes y particulares de esta enfermedad. Este artículo no solo amplía la descripción del espectro clínico y genético de la miopatía por expansiones en *PLIN4*, sino que profundiza en su descripción anatomopatológica y permite clasificarla en el grupo de miopatías vacuolares autofágicas con características sarcolemales. Además, demuestra el importante rol de la biopsia muscular para facilitar la identificación de nuevos pacientes y para guiar el estudio molecular adecuando las técnicas de secuenciación necesarias para detectar la expansión, especialmente en la era actual que prioriza la secuenciación del ADN de nueva generación frente a la patología muscular.

Por último, en el tercer artículo que compone esta tesis doctoral se ha realizado un estudio exhaustivo de una serie multicéntrica de pacientes jóvenes afectos de una miopatía necrotizante inmunomediada por anticuerpos anti-HMG-CoA-reductasa (HMGCR), no asociada a la toma previa de estatinas y con un fenotipo de curso crónico que simula una distrofia muscular de cinturas. Se realizó una descripción de la clínica, marcadores analíticos, patrón de imagen muscular y biopsia muscular, seguida de una secuenciación de exoma con foco especial en genes relacionados con la biosíntesis del colesterol, para indagar sobre una posible predisposición genética que provoque una sobreexpresión y pérdida de tolerancia inmunitaria de la enzima HMGCR. Respecto al estudio genético, destaca la ausencia de variantes patogénicas en este grupo de genes nunca analizados con anterioridad. Además, se realizó un análisis de haplotipo que evidenció el mismo alelo HLA de riesgo compartido con las formas típicas de la enfermedad que se presentan en adultos expuestos a estatinas.

En resumen, esta tesis doctoral pretende mejorar la caracterización clínica, genética, histológica y radiológica de varias miopatías, así como ampliar el conocimiento fisiopatológico sobre las bases moleculares que las causan. Siguiendo este objetivo principal, se ha identificado y descrito un nuevo gen implicado en una miopatía hereditaria vacuolar asociada a defectos en la homeostasis del calcio intracelular y del complejo excitación-contracción, se ha ampliado la descripción miopatológica y el espectro clínico-genético de la miopatía por expansiones en *PLIN4*, y se ha expandido el conocimiento molecular del fenotipo crónico de la miopatía necrotizante inmunomediada asociada a anti-HMGCR.



ABSTRACT

ABSTRACT

Myopathies are primary diseases of striated muscle that, in most patients, lead to progressive muscle weakness and atrophy. The marked clinical and etiological variability that characterizes these disorders, along with their low prevalence, makes diagnosis challenging. Myopathies may be acquired or inherited, can follow an acute or chronic course, and can be associated or not with systemic symptoms. These features represent a handicap in the differential diagnosis, which requires specific diagnostic tools and multidisciplinary approach encompassing clinical, histopathological, radiological, and genetic knowledge. Despite advances in recent decades in DNA sequencing techniques that have improved diagnostic yield, the current diagnostic rate for hereditary myopathies remains limited to 30-60%. Beyond the technical limitations that are progressively being resolved through advances in molecular testing, it is likely that many undiagnosed cases are attributable to as-yet undiscovered genes or to novel clinical phenotypes linked to already known genes.

This doctoral thesis focuses on the comprehensive characterization of several primary muscle diseases –two hereditary vacuolar myopathies and one acquired inflammatory myopathy– with a particular emphasis on genetic predisposing factors. Our goal has been to identify potential new genes related to hereditary myopathies, to establish novel genotype-phenotype correlations in diseases caused by mutations in already known genes, as well as to expand the understanding of the pathophysiological mechanisms of a subtype of immune-mediated necrotizing myopathy. To this end, after a rigorous evaluation of the clinical, radiological, and pathological features of these diseases, next-generation sequencing and long-read DNA sequencing techniques, together with functional *in vitro* tests, were employed.

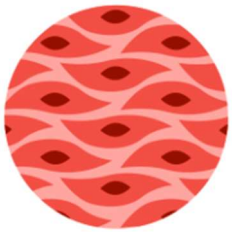
The first article included in this thesis describes a new adult-onset hereditary myopathy following the identification of a homozygous variant in *ATP2A2*, a gene not previously associated with muscle disease. This gene encodes the sarcoendoplasmic reticulum calcium pump SERCA2, involved in calcium transport and homeostasis in muscle fibers. The study demonstrates the pathogenicity of the identified variant through its close correlation with muscle pathology findings and functional evidence of impaired mutant channel activity.

The second article provides a detailed description of two Spanish families with a hereditary vacuolar myopathy caused by repeat expansions in the gene encoding perilipin 4. This myopathy was first described in a family in 2004, but the underlying genetic defect, a complex expansion in the amphipathic region of exon 5 of the *PLIN4*

gene, was not successfully identified until 2020. This expansion is frequently missed by standard diagnostic techniques. Prior to our publication, only four families had been reported worldwide, each with different expansion sizes and different clinical phenotypes but sharing common and disease-particular histological features. This article not only broadens the description of the clinical and genetic spectrum of *PLIN4*-related myopathy, but also provides an in-depth histopathological characterization, allowing its classification within the group of autophagic vacuolar myopathies with sarcolemmal features. Moreover, it highlights the crucial role of muscle biopsy in identifying new patients and guiding molecular studies by selecting the appropriate genetic methods needed to identify the expansion –a feature particularly relevant in the current era that prioritizes next-generation DNA sequencing over muscle pathology analysis.

Finally, the third article of this thesis presents a comprehensive study of a multicentric series of young patients affected by immune-mediated necrotizing myopathy associated with anti-HMG-CoA reductase (HMGCR) antibodies, never exposed to statins and exhibiting a chronic course mimicking a limb-girdle muscular dystrophy. The study includes a detailed description of the clinical, blood biomarkers, muscle imaging, and muscle pathology findings, followed by exome sequencing with a specific focus on genes related with cholesterol biosynthesis, aiming to explore potential genetic predispositions that lead to overexpression and immune loss of tolerance of the HMGCR enzyme. The genetic analysis reveals no pathogenic variants in this group of genes, which had never been previously examined in this disease. Additionally, haplotype analysis identified the same HLA risk allele shared with typical adult-onset, statin-associated forms of the disease.

In summary, this doctoral thesis seeks to improve the clinical, genetic, muscle pathology, and muscle imaging characterization of several myopathies, as well as to expand the molecular understanding of their underlying mechanisms. In pursuit of this objective, a novel gene involved in a hereditary vacuolar myopathy associated with defects in intracellular calcium homeostasis and the excitation–contraction coupling has been identified and described; the myopathological description and clinical-genetic spectrum of *PLIN4*-related myopathy have been expanded; and new molecular insights have been gained into the chronic phenotype of anti-HMGCR-associated immune-mediated necrotizing myopathy.



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Anatomía y fisiología de la fibra muscular

El músculo esquelético representa aproximadamente el 35% del peso corporal y su función contráctil principal permite el movimiento, mantener la postura corporal y estabilizar las articulaciones. Es un tipo de músculo estriado, unido al hueso mediante tendones, formado principalmente por células cilíndricas multinucleadas con capacidad contráctil, las fibras musculares o miocitos, que se organizan paralelamente en fascículos, a su vez organizados para formar el músculo en su conjunto. El tejido conectivo especializado que rodea el músculo constituye el endomisio, el perimisio, y el epimisio.

La unidad contráctil básica de la fibra muscular es el sarcómero, formado por filamentos finos de actina y filamentos gruesos de miosina entrelazados entre sí (Figura 1). Entre los filamentos se añaden otros elementos estabilizadores como la gigante proteína titina, la tropomiosina y la nebulina. Los discos o líneas Z representan los extremos laterales de cada sarcómero y sirven de anclaje para los filamentos de actina, titina y nebulina, pero también tienen un papel en otros procesos celulares como señalización o recambio de proteínas (1). Cada fibra muscular contiene múltiples sarcómeros dispuestos de forma paralela que, tras el incremento en la concentración intracelular de calcio provocado por el estímulo eléctrico de la neurona motora, ejercen una contracción rápida y sincrónica en condiciones fisiológicas.

Los músculos se componen de varios tipos de fibras, diferenciadas por sus características fisiológicas y bioquímicas. Así, se clasifican en fibras tipo 1 o fibras lentas (rojas), con alta actividad oxidativa, que son más resistentes a la fatiga pero de contracción lenta, y en fibras tipo 2 o fibras rápidas (blancas), que contienen elevada actividad glucolítica y son más rápidas pero fatigables.

Los elementos celulares que forman la fibra muscular son el sarcolema o membrana celular, el sarcoplasma o citoplasma de la fibra, y los núcleos, que son múltiples y se localizan en la periferia de la fibra. El complejo distrofina-glicoproteína es un complejo multiproteico que une el citoesqueleto de actina con la matriz extracelular y es imprescindible para el mantenimiento de la estabilidad estructural de la fibra muscular y la resistencia del sarcolema a fuerzas mecánicas de estrés (2–4). En el interior del citoplasma se sitúan los sarcómeros y organelas como las mitocondrias, que mediante la cadena respiratoria mitocondrial y la oxidación de ácidos grasos obtienen energía en forma de moléculas de ATP. También se localizan los lisosomas, vesículas donde se

degradan porciones de citoplasma bajo un pH ácido, y los proteasomas, estructuras donde se degradan proteínas ubiquitinizadas. Además, en el citoplasma se encuentran los gránulos libres de glucógeno, que proporcionan una fuente de energía rápida para la fibra, y múltiples proteínas necesarias para la actividad muscular.

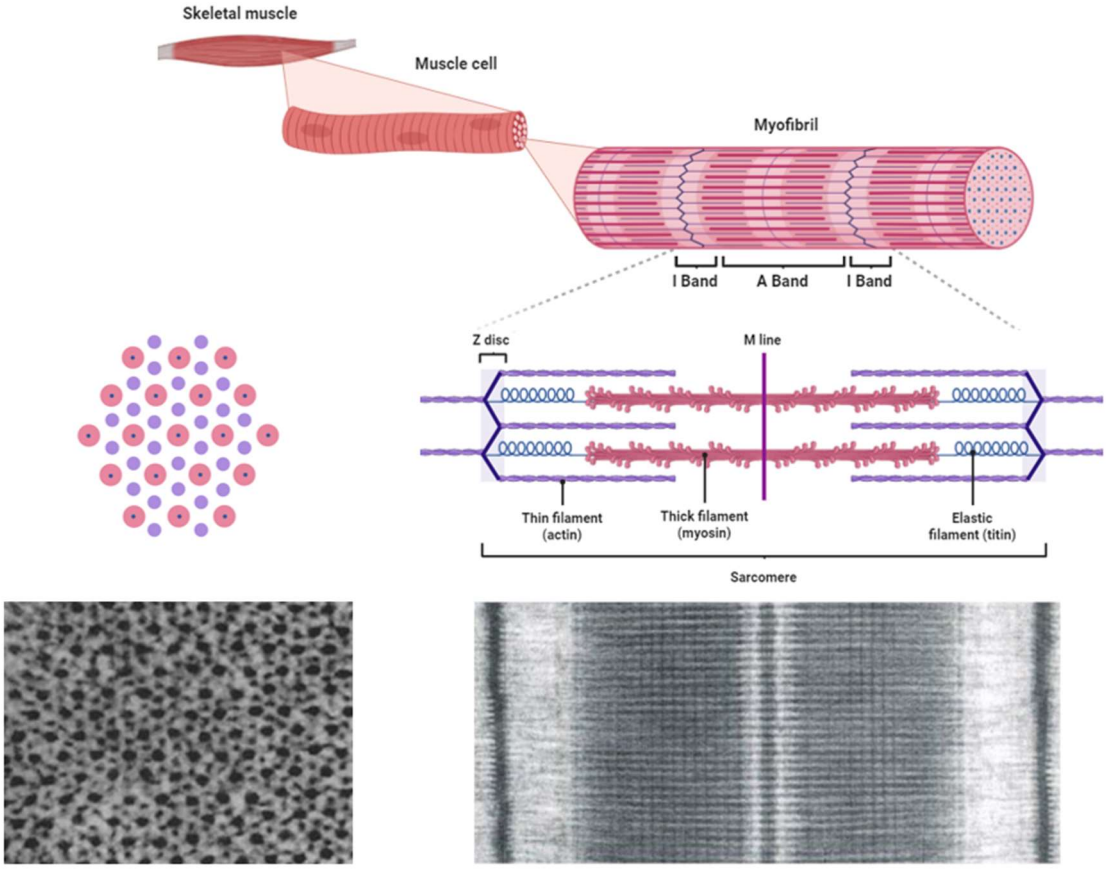


Figura 1. Esquema de la anatomía del músculo esquelético. Se representa la forma y distribución de las fibras musculares y los sarcómeros, compuestos principalmente por filamentos de actina y miosina. El disco Z, compuesto principalmente por α-actinina, ancla los filamentos de actina y de titina. Las imágenes de microscopía electrónica muestran una sección transversal (izquierda) y longitudinal (derecha) de un sarcómero, en las cuales se pueden observar con distintas electrodensidades la banda A, línea M, banda I y el disco Z. Figura creada con BioRender (https://www.biorender.com/), incluyendo imágenes de microscopía electrónica procedentes de la publicación por Squire, Glob Cardiol Sci Pract, 2005 (5).

Por último, el retículo sarcoplasmático es una forma especializada de retículo endoplasmático que rodea los sarcómeros y constituye un almacén fisiológico de calcio intracelular íntimamente relacionado con los túbulos transversos para formar las tríadas. Estas estructuras inician y modulan cambios en las concentraciones de calcio intracelular para permitir la interacción de los filamentos de actina y miosina que van a derivar en la contracción y relajación de los sarcómeros.

1.2. Homeostasis del calcio y acoplamiento excitación-contracción

La tríada muscular es la estructura especializada compuesta de un túbulo transverso o túbulo T, formado a partir de una invaginación del sarcolema, y dos cisternas terminales del retículo sarcoplasmático (RS) alrededor del sarcómero (Figura 2). Constituye la base anatómica necesaria para el mecanismo de acoplamiento de excitación-contracción (ECC, *excitation-contraction coupling*). Esta estructura facilita la transferencia de iones de calcio (Ca^{2+}) entre retículo y citoplasma, necesaria para que la transmisión del estímulo eléctrico desde el nervio resulte en la contracción de los sarcómeros y la fibra muscular. La homeostasis del Ca^{2+} es esencial para el correcto ECC y funcionamiento de la fibra muscular.

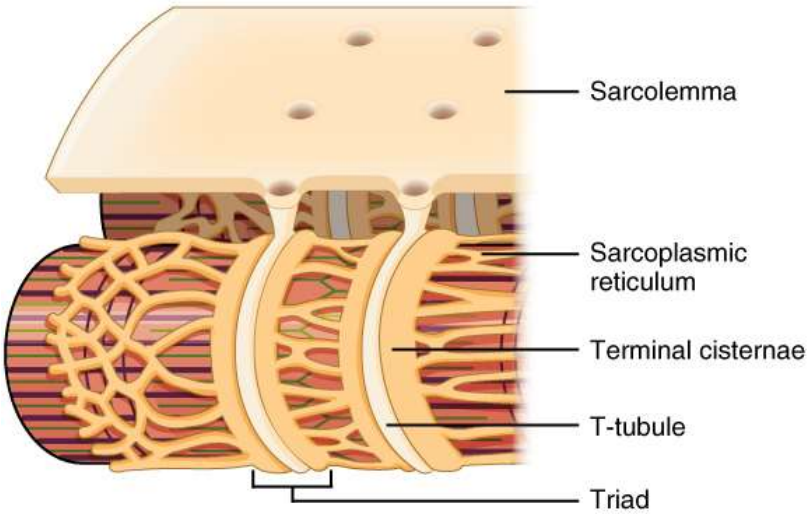


Figura 2. Estructura de la tríada muscular

Imagen obtenida del libro *Anatomy and Physiology*, 2016. Fuente: OpenStax (https://openstax.org)

En el mecanismo de ECC participan principalmente canales iónicos situados en la membrana de los túbulos T o del RS en la tríada, que se activan al despolarizarse la membrana celular. Entre estos destacan los receptores dihidropiridínicos (DHPR) en la membrana del túbulo T, unos canales de Ca^{2+} mediados por voltaje que introducen iones de Ca^{2+} desde el espacio extracelular al citosol, y a su vez interaccionan con y activan los receptores de rianodina (RyR), otros canales de Ca^{2+} que liberan calcio desde el RS al citosol. En el músculo esquelético, los receptores de rianodina expresados son RyR1, y en el músculo cardíaco RyR2, codificados por los genes *RYR1* y *RYR2*, respectivamente. Por otro lado, las ATPasas de calcio del retículo sarcoendoplásmico (SERCA por sus siglas en inglés, *sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPases*) transportan Ca^{2+} de forma activa en dirección opuesta al interior del RS para permitir la relajación muscular.

De esta manera, al activarse los canales DHPR y RyR tras la despolarización del sarcolema, se produce una entrada masiva de iones de Ca^{2+} al citoplasma que va a iniciar una cascada de eventos que finalizarán con la contracción de la fibra muscular. El aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} puede llegar a ser 10 veces superior a los niveles basales en reposo (6). Los iones de Ca^{2+} se unen a la troponina, provocando un cambio conformacional en la tropomiosina y permitiendo la interacción mecánica entre los filamentos de actina y miosina con la consecuente contracción de los sarcómeros (Figura 3). El paso siguiente, la relajación muscular, solo es posible con una reducción rápida de los niveles de Ca^{2+} citosólico que permitirá el cese de la interacción entre los filamentos de actina y miosina. En este proceso actuarán principalmente los canales SERCA, responsables del 70% de reducción de la concentración máxima de Ca^{2+} (7), de los cuales existen hasta 11 isoformas en distintos tejidos (SERCA1a-b, SERCA2a-c y SERCA3a-f) (8). Los canales SERCA son bombas de Ca^{2+} localizadas en la membrana del RS que transportan de forma activa mediante hidrólisis de una molécula de ATP dos iones de Ca^{2+} desde el citosol al interior del RS. Así, permiten la relajación muscular mediante la reducción de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático, y preparan la célula para sucesivas contracciones gracias a la recuperación de los almacenes fisiológicos de Ca^{2+} en el interior del RS (Figura 4).

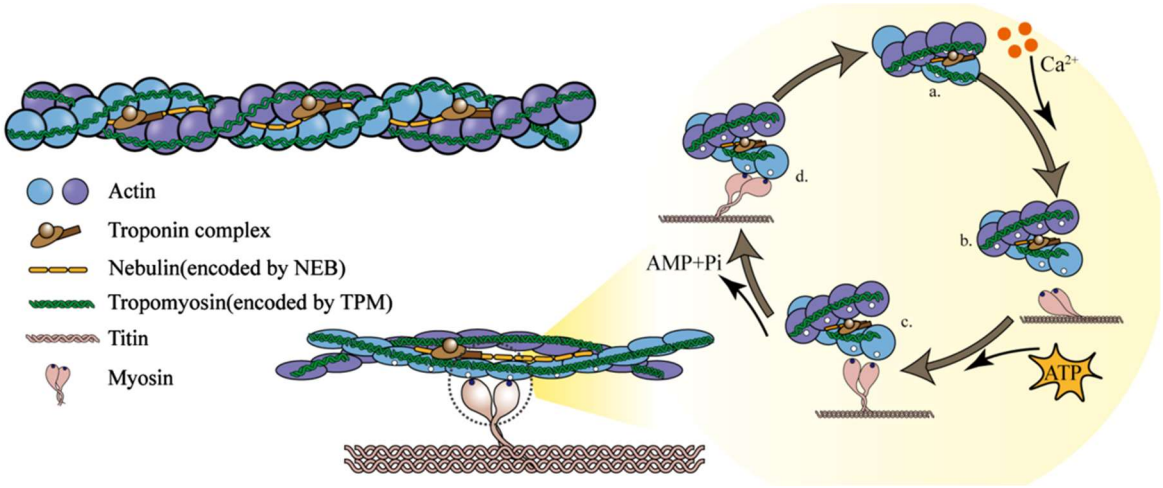


Figura 3. Diagrama de la composición de los filamentos e interacciones actina-miosina. La troponina y la tropomiosina actúan como interruptores proteicos que regulan las interacciones actina-miosina en respuesta a cambios en la concentración de Ca^{2+} dentro de la fibra muscular. (a, b) Cuando los impulsos nerviosos alcanzan las fibras, el Ca^{2+} es liberado del RS e interactúa con los complejos de troponina, nebulina y tropomiosina, lo que provoca cambios conformacionales en los filamentos de actina para exponer los sitios de unión a la miosina. (c, d) El ATP se descompone en ADP y fosfato inorgánico, liberando así energía que causa un cambio conformacional en la cabeza de miosina, la cual se une a la actina para formar un puente muscular y se deslizan entre sí. La actina creará nuevos puentes musculares y así sucesivamente se repiten los pasos previos, provocando una interacción constante entre actina y miosina para generar la contracción muscular. Figura extraída de Zhang *et al.* J Transl Med, 2024 (9).

La calsecuestrina 1, codificada por el gen *CASQ1*, es otra proteína del RS implicada en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular que actúa como "tampón" de unión a Ca^{2+}, de modo que al adoptar una estructura polimérica puede unirse a 70-80 iones de Ca^{2+}, y a su vez modula la apertura del receptor de rianodina o RyR (10,11). Por último, cabe mencionar STAC3, una proteína específica de músculo esquelético que permite la correcta formación de las tríadas y regula la interacción entre DHPR y RyR1 (12), y los canales PMCAs (*plasma membrane Ca^{2+}-ATPases*) que transportan Ca^{2+} de forma activa hacia el compartimento extracelular (Figura 4).

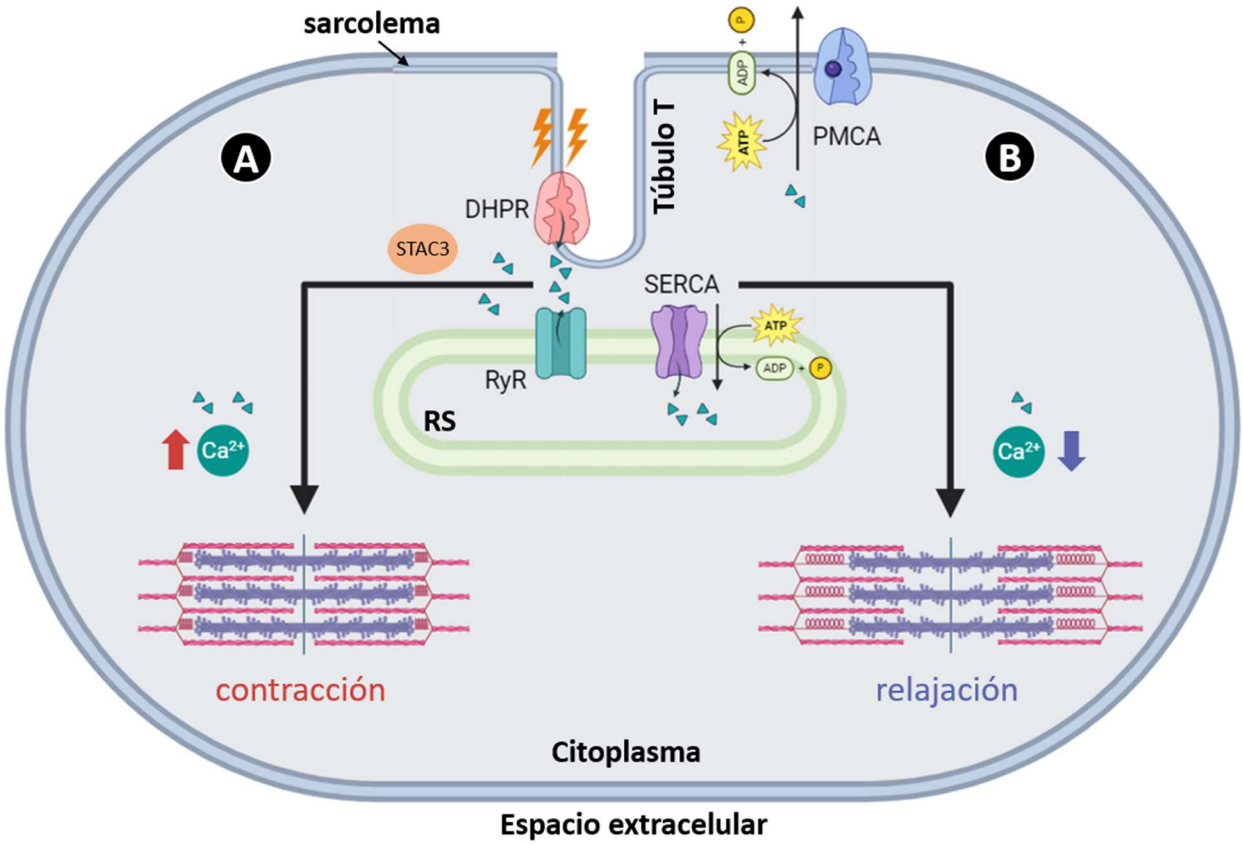


Figura 4. Mecanismo de ECC en la fibra muscular. A) Tras el potencial de acción nervioso que activa el receptor dihidropiridínico (DHPR) situado en el túbulo T, se produce la entrada de iones de Ca^{2+} desde el espacio extracelular y se transmite un cambio conformacional del receptor de rianodina (RyR) situado en la membrana del RS, resultando en la liberación rápida de Ca^{2+} del RS y la contracción del sarcómero. En músculo esquelético, STAC3 facilita este proceso mediante interacción con DHPR y RyR1. B) Tras la contracción del sarcómero, se produce una reducción de las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} gracias a la acción del canal SERCA situado en la membrana del RS, una ATPasa que introduce dos iones de Ca^{2+} por cada molécula de ATP hidrolizada. En menor medida, el canal PMCA en la membrana celular también expulsa iones de Ca^{2+} al espacio extracelular mediante hidrólisis de ATP. Esta reducción de la concentración de calcio citosólico resulta en la relajación del sarcómero. ECC: *excitation-contraction coupling*. PMCA*: plasma membrane Ca^{2+}-ATPase*. SERCA: *sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase*. RS: retículo sarcoplasmático. Figura original creada con BioRender.

Los canales SERCA1, SERCA2 y SERCA3 están codificados por tres genes muy conservados evolutivamente entre especies, el *ATP2A1, ATP2A2* y *ATP2A3,* respectivamente (8). La expresión de las distintas isoformas de SERCA depende principalmente del tejido, y se ve afectada por las fases del desarrollo embrionario y el desarrollo postnatal (13–15). La isoforma SERCA1b únicamente se expresa en periodo fetal en las fibras rápidas o de tipo 2 del músculo esquelético. Las isoformas que se expresan en adultos incluyen SERCA1a, que se expresa de forma casi exclusiva en fibras rápidas o de tipo 2 del músculo esquelético; SERCA2a, que se expresa principalmente en fibras lentas o de tipo 1 del músculo esquelético y en el músculo cardíaco; SERCA2b, expresada débilmente y de forma ubicua en todos los tejidos, incluyendo piel, corazón y músculo liso; SERCA2c, una isoforma específica de músculo cardíaco, células hematopoyéticas y monocitos; y por último, las isoformas SERCA3a-3f que se expresan débilmente en células no musculares (8,16–19) (Tabla 1). Es importante mencionar que, a pesar de que el gen *ATP2A3* codifica 6 tránscritos a nivel de mRNA, solamente existen datos a nivel de proteína traducida sobre las isoformas SERCA 3a, 3b y 3c.

Isoforma	Músculo esquelético		Músculo cardiaco	Músculo liso	Células no musculares
	Fibras lentas	Fibras rápidas			
SERCA 1a	-	+++++	-	-	-
SERCA 2a	+++	-	++++	+	-
SERCA 2b	+	+	+	+	+
SERCA 2c	-	-	++++	-	+++
SERCA 3a	-	-	-	-	+
SERCA 3b	-	-	-	-	+
SERCA 3c	-	-	-	-	+

Tabla 1. Distribución de las isoformas SERCA en humanos y resto de mamíferos. Se representa la expresión proteica en etapa adulta en distintos tejidos (SERCA1b no se incluye debido a que únicamente se expresa en etapa fetal en fibras rápidas del músculo esquelético). En músculo esquelético, SERCA1a se expresa en fibras rápidas y SERCA2a en fibras lentas. SERCA2b es la única isoforma ubicua que se expresa en todos los tejidos de forma débil. Tabla adaptada de Periasamy *et al.* Muscle Nerve, 2007 (8), con información adicional de Dally *et al*. Biochem J, 2006 (18) y Gélébart *et al*. Biochem Biophys Res Commun, 2003 (17).

Las isoformas SERCA2 que se expresan a nivel de músculo cardíaco y esquelético difieren únicamente en la longitud del extremo C-terminal, que proporciona al canal distintas velocidades de transporte y afinidades por Ca^{2+}. Mutaciones en SERCA1 (gen *ATP2A1)* causan la enfermedad de Brody. Se trata de una enfermedad muscular de

herencia autosómica recesiva, caracterizada por episodios de rigidez muscular inducida por ejercicio, llamada pseudomiotonía, que empeora con temperaturas frías. Los pacientes comúnmente sienten calambres o mialgias generalizadas. Típicamente tienen una apariencia atlética y no desarrollan debilidad o atrofia muscular, por lo que se considera una enfermedad relativamente benigna. La mayoría de mutaciones asociadas a enfermedad de Brody resultan en un mecanismo de haploinsuficiencia, dado que comportan una reducción de la cantidad de proteína SERCA1 en el músculo (20). Además, provocan un déficit de actividad del canal que resulta en una alteración de la homeostasis celular de Ca^{2+} por una recaptación deficitaria por parte del RS y un aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} en las fibras musculares, lo que explica la dificultad para la relajación muscular que presentan los pacientes (20).

Hasta 2025, no se había descrito ninguna miopatía causada por mutaciones en otro canal SERCA, particularmente en el gen *ATP2A2* (canal SERCA2), ya que el canal SERCA3 no se expresa en células musculares. Sin embargo, mutaciones heterocigotas en el gen *ATP2A2* se relacionan con dos enfermedades cutáneas autosómicas dominantes, la enfermedad de Darier-White y la a*crokeratosis verruciformis.* La enfermedad de Darier es una enfermedad cutánea que produce pápulas y placas en áreas palmoplantares y seborreicas, también llamada queratosis folicular (21). Su forma alélica a*crokeratosis verruciformis* se caracteriza por un trastorno de la queratinización de las capas cutáneas más externas (22). A pesar de conocerse más de 270 variantes genéticas en *ATP2A2* causantes de enfermedad de Darier, nunca hasta la fecha se han reportado como causantes de enfermedad muscular, con o sin asociación a enfermedad dermatológica (21,23,24).

Existen varias miopatías hereditarias causadas por mutaciones en otras proteínas que participan en el mecanismo de ECC, en su mayoría los canales de Ca^{2+} descritos. Por ejemplo, mutaciones dominantes en *CACNA1S*, que codifica la principal subunidad (α-1S) del receptor DHPR, causan raramente susceptibilidad a la hipertermia maligna y, más frecuentemente, parálisis periódica hipopotasémica. Más recientemente se han descrito formas autosómicas recesivas de miopatía congénita grave (25). Por otro lado, mutaciones en *RYR1* causan un espectro de fenotipos musculares de inicio y gravedad muy variables, con herencia dominante o recesiva. Las formas clásicas de herencia autosómica dominante son la miopatía congénita con *cores* centrales, llamada así por sus características histopatológicas, y la susceptibilidad a la hipertermia maligna ante exposición a anestésicos halogenados o relajantes musculares despolarizantes. Por otro lado, existen formas leves que cursan con rabdomiólisis post-esfuerzo o incluso

hiperCKemia aislada, y formas autosómicas recesivas que se asocian a miopatías congénitas más graves y de inicio más precoz con oftalmoparesia (26–31).

Las mutaciones en *RYR1* pueden producir ganancia o pérdida de función, implicando un aumento o reducción de la liberación de Ca^{2+} al citosol (32,33). En general, existe una correlación de los fenotipos miopatía central *core* y susceptibilidad a la hipertermia maligna con variantes genéticas que causan ganancia de función en RyR1, ya sea por hipersensibilidad del canal (reducción del umbral de activación) o por una fuga espontánea y constante de Ca^{2+} desde el RS (*leaky channel*). En la hipertermia maligna causada por mutaciones en *RYR1* o *CACNA1S*, se produce un estado hipermetabólico debido a un flujo continuo de Ca^{2+} saliente (vía RyR1) y entrante (vía SERCA) del RS, que implica un consumo excesivo de moléculas de ATP. Esta susceptibilidad a la hipertermia maligna se puede evaluar con el test de contractura *in vitro* que se describirá más adelante en el apartado de "Estudios *in vitro* de la homeostasis del calcio" (34).

Además, mutaciones heterocigotas en *CASQ1* se han asociado a una miopatía vacuolar con agregados proteicos de calsecuestrina (35), a susceptibilidad a hipertermia maligna en modelos murinos (36) y posiblemente en humanos según un estudio que identificó una variante común en 16 de 205 individuos afectos (37) y, por último, a miopatía con agregados tubulares (38,39). Estudios funcionales *in vitro* de las mutaciones descritas en humanos han evidenciado una alteración de la capacidad de calsecuestrina de almacenar Ca^{2+} en el RS por disfunción de su polimerización fisiológica (38–40). Por último, mutaciones en *STAC3* se han descrito como causantes de una miopatía congénita en indios nativos americanos (41), mientras que mutaciones en los canales PMCAs, codificados por cuatro genes en total, no se han asociado a enfermedad muscular hasta la fecha, sino a trastornos del desarrollo intelectual (42), sordera (43) y ataxia espinocerebelosa (44).

1.2.1. Estudios *in vitro* de la homeostasis del calcio

El transporte de Ca^{2+} intracelular se puede analizar mediante la exposición de una célula contráctil, como una fibra de músculo esquelético o de músculo cardíaco, a un campo eléctrico, KCl o bien a cafeína en un cultivo celular. El estímulo eléctrico provoca una despolarización de la membrana que simulará el mecanismo fisiológico de la inervación de una motoneurona sobre una fibra muscular, es decir, provocará el aumento rápido de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular para permitir la contracción sincrónica de los sarcómeros y la fibra muscular (12,45). Otra forma de provocar la despolarización de la membrana es exponer la fibra muscular a una solución de alta concentración de KCl

(12,46). Por otro lado, la exposición de las fibras musculares a concentraciones crecientes de cafeína provoca una apertura masiva de los receptores de rianodina (RyR) provocando un aumento del Ca^{2+} intracelular derivado de su salida del RS (35,47).

Las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} resultantes de dichos estímulos se pueden medir de forma dinámica y a tiempo real con microscopía confocal usando el marcador fluorescente de Ca^{2+} Fluo-4-AM. Con esta metodología se pueden medir las concentraciones citosólicas basales (*baseline*), la amplitud, el tiempo al pico (*time to peak*), la duración y la caída (*decay*) del flujo de Ca^{2+} intracelular (45). Además, las condiciones de los experimentos en cuanto a frecuencia e intensidad del estímulo son modificables y reproducibles a la perfección. Para ello se requiere un cultivo celular de miotubos, las fibras musculares diferenciadas.

La exposición a cafeína también se utiliza en los estudios IVCT (*in vitro contracture test*) que examinan la respuesta a cafeína o halotano de fascículos de músculo maduro de pacientes, con el objetivo de estudiar la susceptibilidad a la hipertermia maligna (34,48) principalmente asociada a mutaciones en *RYR1,* o menos frecuentemente a *CACNA1S*. En estos estudios IVCT, la respuesta positiva provoca una contractura muscular debido a una sobrecarga citosólica de Ca^{2+} tras activación de RyR1.

A pesar de la complejidad de estas técnicas y de requerir de laboratorio y personal especializado, son de gran utilidad ante la sospecha de susceptibilidad genética a la hipertermia maligna (genes *RYR1, CACNA1S,* y posiblemente *CASQ1*) y de enfermedad de Brody asociada a disfunción del canal SERCA1 (gen *ATP2A1*). En ambas entidades clínicas se ha descrito una elevación persistente de las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} en las fibras musculares (49,50). Asimismo, estas técnicas se usan en investigación básica de fibrilación auricular en miocardiocitos (45).

1.3. Sistema de control de calidad de proteínas

El sistema de control de calidad de proteínas y organelas celulares es un mecanismo fisiológico imprescindible para mantener la homeostasis celular y minimizar el efecto tóxico de proteínas agregadas o mal plegadas y organelas defectuosas (51,52).

Todas las células del cuerpo mantienen un equilibrio entre la síntesis y la degradación de proteínas. En el músculo esquelético, la síntesis proteica se ve reforzada en condiciones de ejercicio llevando a una hipertrofia muscular, mientras que la degradación proteica ocurre en condiciones de desuso, denervación, anorexia o

enfermedad crónica, llevando a atrofia muscular. El sistema de control de calidad de proteínas, también llamado proteostasis, es un proceso celular fisiológico que permite reparar proteínas defectuosas o eliminarlas mediante proteólisis. Fallos en este sistema de proteostasis se asocian a muchas enfermedades neurodegenerativas por mal plegamiento y consecuente agregación proteica (53).

Inicialmente, las proteínas chaperonas detectan las proteínas mal plegadas e intentan repararlas mediante replegamiento o desplegamiento. Si la reparación falla, las chaperonas señalan las proteínas defectuosas para ser degradadas selectivamente mediante dos posibles mecanismos, el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS por sus siglas en inglés, *ubiquitin-proteasome system*) y la autofagia mediada por chaperonas (CMA por sus siglas en inglés, *chaperone-mediated autophagy*). Ambos mecanismos solamente pueden degradar proteínas de forma individual. En el primer caso se degradan en el interior del proteasoma, mientras que la CMA implica una translocación de proteínas seleccionadas al lisosoma mediante el canal *lysosome-associated membrane protein 2A* (LAMP-2A), donde van a ser degradadas. Por otro lado, la microautofagia implica la traslocación directa de pequeñas porciones de citoplasma al lumen lisosomal mediante la invaginación de su membrana, sin precisar la participación de chaperonas. Cabe destacar que las hidrolasas y enzimas proteolíticas lisosomales se activan en condiciones del pH ácido lisosomal. El ambiente ácido se logra mediante bombas de protones llamadas ATPasas vacuolares, cuyo ensamblaje y correcto funcionamiento dependen de la proteína VMA21 (54).

En caso de que las proteínas mal plegadas escapen la vigilancia de las chaperonas y la degradación selectiva, tienden a formar pequeños agregados que se unen para crear agregados insolubles de mayor tamaño, los cuales ya no son accesibles al UPS, CMA ni a la microautofagia. Llegados a ese punto, la eliminación de agregados proteicos requiere del tercer mecanismo de control de calidad, la macroautofagia, que permite eliminar grandes porciones de citoplasma, pudiendo incluir proteínas y organelas. La llamada agrefagia es el mecanismo celular que intenta degradar agregados proteicos anómalos. En la Figura 5 se muestra un esquema resumen de lo explicado en este apartado.

A continuación, se explicarán en mayor profundidad los tres sistemas de control de calidad de proteínas. En cada apartado se describirán brevemente algunas miopatías hereditarias debidas a disfunción primaria de la autofagia, si bien la clasificación de las miopatías hereditarias se detallará más adelante.

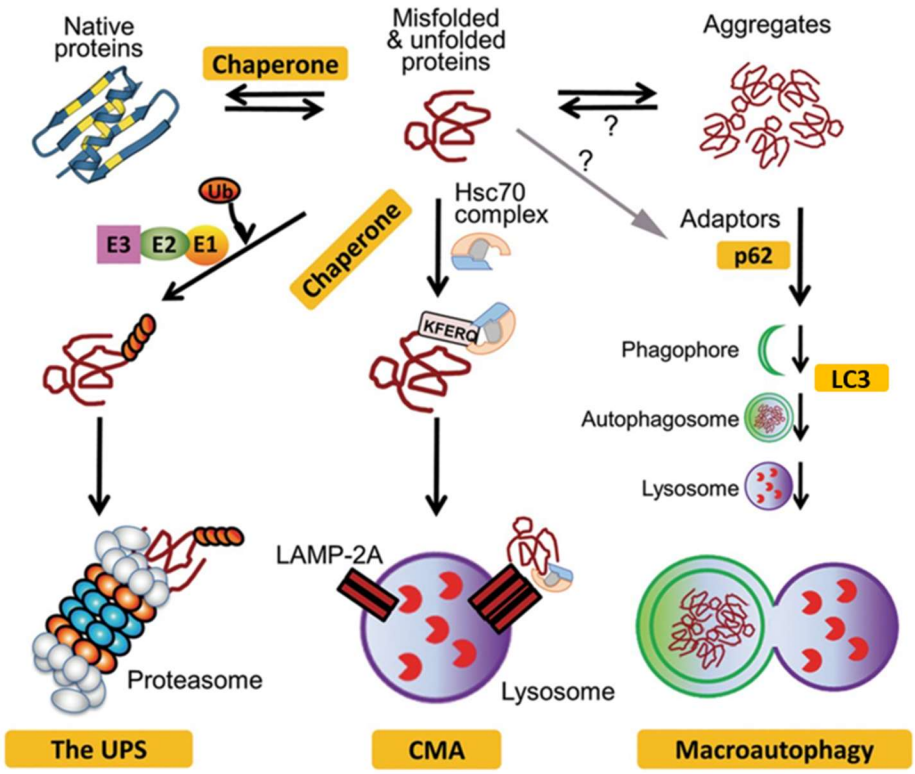


Figura 5. Esquema resumen del sistema de control de calidad de proteínas en la célula. Las chaperonas ayudan a desplegar y replegar proteínas, y dirigir las proteínas no reparables hacia el proteasoma o el lisosoma para la degradación mediada por el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) o el sistema de autofagia mediada por chaperonas (CMA), respectivamente. En caso de escapar de la degradación selectiva por UPS o CMA, las proteínas pueden formar agregados insolubles por interacciones hidrofóbicas, y éstos ser degradados por la vía de la macroautofagia que finaliza en el lisosoma. Hsc70: *heat shock cognate 70*. LAMP-2A: *lysosome-associated membrane protein 2A*. Ub: ubiquitina. Figura adaptada de Wang *et al.* Circ Res, 2013 (51).

1.3.1. Sistema ubiquitina-proteasoma

El UPS es un proceso selectivo, sustrato específico, que implica la ubiquitinación previa de proteínas para su degradación posterior en el proteasoma. La ubiquitinación es un proceso de modificación postraduccional que se realiza mediante una cascada de reacciones enzimáticas catalizada por la enzima activadora de ubiquitina (E1), seguida de la enzima que conjuga ubiquitina (E2) y las enzimas ligasas de ubiquitina (E3). En algunos casos, la enzima E4 alarga la cadena de ubiquitinas que marcan la proteína diana. Las ligasas de ubiquitina E3 son el punto crítico del proceso ya que son las únicas enzimas sustrato específicas. La mayoría de proteínas celulares se degradan mediante el UPS, el cual no solo involucra proteínas defectuosas no reparadas, sino también proteínas normales que se desean degradar en un proceso fisiológico de regular la expresión proteica.

1.3.2. Autofagia mediada por chaperonas

La autofagia mediada por chaperonas marca selectivamente las proteínas citosólicas que contienen un residuo o motivo específico, la secuencia KFERQ, con el complejo proteico *heat shock cognate 70* (Hsc70) (55). Esta unión dirige las proteínas al lisosoma por su afinidad con el canal LAMP-2A, una proteína de membrana lisosomal que permitirá su entrada al lumen lisosomal para su degradación final (56,57). Se cree que, a pesar de ser un mecanismo de control de proteínas menos empleado que el UPS, la CMA tiene una gran importancia en la homeostasis celular debido a que hasta el 30-40% de las proteínas en mamíferos contienen el motivo KFERQ en su secuencia primaria (56,58), por lo que potencialmente pueden exponer el residuo en caso de mal plegamiento, modificaciones postraduccionales o cambios conformacionales (59), y desencadenar la autofagia mediada por chaperonas. De interés, el sistema CMA se activa de forma constitutiva en células con alteración de la macroautofagia tanto en situaciones basales como de estrés celular, lo que evidencia una comunicación cruzada entre la CMA y la macroautofagia (60).

1.3.3. Macroautofagia

La macroautofagia es un proceso de degradación de grandes porciones de citoplasma, pudiendo incluir proteínas y organelas, mediante la formación de vesículas limitadas por membrana llamadas autofagosomas, que se fusionan con los lisosomas donde se degrada su contenido (51,52,61,62). Como hemos mencionado previamente, es el único mecanismo fisiológico que permite degradar agregados proteicos no accesibles a los otros sistemas de proteostasis, y es el único mecanismo que permite degradar organelas defectuosas. A nivel biológico, tiene una gran importancia en condiciones de desnutrición, dado que permite la autodigestión celular para reciclar macromoléculas y obtener aminoácidos para la síntesis de proteínas esenciales. También permite eliminar patógenos intracelulares como bacterias (63).

Varias proteínas participan en este proceso activando la macroautofagia en condiciones de estrés celular como ayuno o ejercicio físico, y tienen un papel importante en la homeostasis del músculo cardíaco y esquelético (p.ej: beclina 1, BCL-2, AMPK, ATG5, ATG7, entre otras). Estudios en modelos murinos transgénicos con deleción de estos genes han demostrado una disminución de formación de autofagosomas que deriva en intolerancia al ejercicio (64), disfunción cardíaca (65,66), mayor tamaño de infarto cardíaco en respuesta a isquemia (67), o empeoramiento de la miocardiopatía miofibrilar asociada a la variante R120G en *CRYAB* (68,69). La proteína LC3/ATG8 es esencial para la formación del fagoporo y crecimiento del autofagosoma, y se localiza en su

membrana para secuestrar material degradable mediante su interacción con otras proteínas receptoras como p62/secuestosoma 1 (SQSTM1), la cual se une a agregados proteicos y material marcado con cadenas de poliubiquitina (51,52). Una vez sellado, LC3 y el resto de proteínas ATG se disocian del autofagosoma, que se transportará por el citoesqueleto celular y se fusionará finalmente con el lisosoma.

1.4. Epidemiología de las enfermedades musculares

Las miopatías constituyen un grupo muy heterogéneo de enfermedades primarias del músculo esquelético que comportan en la mayoría de los pacientes una debilidad y atrofia muscular progresivas de gravedad y evolución variable. Se manifiestan en cualquier etapa de la vida, desde un inicio congénito hasta la edad adulta tardía. A pesar de la dificultad de agrupar epidemiológicamente las miopatías, en su conjunto son consideradas enfermedades raras, con una prevalencia que varía entre 1.13 – 2.11 por cada 100 000 habitantes en las miopatías congénitas (70), 2.4 – 33.8 por cada 100 000 en las miopatías inflamatorias (71), y 19.8 – 25.1 por cada 100 000 habitantes en las distrofias musculares (72). Por todo ello, el diagnóstico es complejo y requiere de una valoración clínica minuciosa, con el soporte de un amplio abanico de técnicas adicionales.

1.5. Miopatías hereditarias

Las miopatías hereditarias constituyen un grupo amplísimo de enfermedades que incluyen las distrofias musculares, las miopatías congénitas y las miopatías metabólicas, entre muchas otras. Las primeras son las más frecuentes y se caracterizan por un curso progresivo y hallazgos histológicos distróficos. Pueden debutar en la infancia, como la distrofia muscular de Duchenne, o en la edad adulta, como la distrofia oculofaríngea. La progresión y pronóstico difiere ampliamente según la enfermedad. En total existen más de 300 genes causantes de miopatías hereditarias y, agrupadas colectivamente, estas enfermedades tienen una prevalencia de hasta 1 de cada 4500 individuos en la población general (73,74).

La mayoría de las miopatías hereditarias no disponen de tratamiento específico ni curativo de la enfermedad, si bien hay avances constantes de posibles tratamientos dirigidos y múltiples ensayos clínicos en desarrollo, varios de ellos basados en terapia génica (75–81). Además, algunas miopatías hereditarias disponen de tratamiento

modificador del curso de la enfermedad, como sucede en la distrofia muscular de Duchenne, la enfermedad de Pompe, la miopatía mitocondrial por déficit de timidina quinasa 2, o el déficit de múltiples acil-coenzima A deshidrogenasas. Por ello, es indispensable alcanzar el diagnóstico molecular y conocer el gen causante de determinada miopatía, no únicamente para ofrecer consejo genético, sino también para conocer y tratar las complicaciones asociadas a una determinada enfermedad, y para seleccionar pacientes candidatos a tratamiento o a futuros ensayos clínicos.

1.5.1. Clasificación de las miopatías hereditarias

No resulta sencillo hacer una clasificación de las miopatías genéticamente determinadas, por la gran variedad de genes involucrados y la variabilidad clínica e histológica que las caracterizan. En una clasificación basada en características clínicas e histológicas, hablamos de distrofias musculares, miopatías distales, miopatías miofibrilares, miopatías congénitas, canalopatías y miopatías metabólicas hereditarias. Otras enfermedades musculares, como las miopatías con vacuolas autofágicas, así como la miopatía causada por expansiones en *PLIN4*, si bien no constituyen un gran grupo diferenciado, se describirán en este apartado por el protagonismo que tienen en esta tesis.

1.5.1.1 Distrofias musculares

Las distrofias musculares son enfermedades degenerativas del músculo esquelético con un patrón histológico común que se define por fenómenos celulares de necrosis, regeneración, fagocitosis y sustitución fibroadiposa progresiva del tejido muscular (82) (Figura 6). Muchas de estas enfermedades se deben a defectos en proteínas que conducen a una pérdida de integridad del sarcolema por un desequilibrio entre fragilidad y mecanismos de reparación de membrana (83). El grupo de distrofias musculares incluye las distrofinopatías, las distrofias musculares congénitas y las distrofias musculares de cinturas, entre otras (distrofias miotónicas, distrofia facioescapulohumeral, distrofia oculofaríngea, distrofia muscular Emery-Dreifuss, etc).

Las **distrofinopatías** son debidas a defectos en la distrofina, proteína codificada por el gen *DMD* en el cromosoma X, el gen más grande del genoma humano (2.2 Mb) y el primer gen asociado a una distrofia muscular que se identificó y secuenció en 1986 (84,85). Mientras que la distrofia muscular de Duchenne está causada por defectos genéticos graves en la distrofina, mayoritariamente deleciones *frameshift* que alteran la pauta de lectura y producen una ausencia de proteína, la distrofia muscular de Becker

es la forma clínica más leve causada por variantes o deleciones *in-frame* en *DMD* que producen una distrofina más corta pero parcialmente funcional.

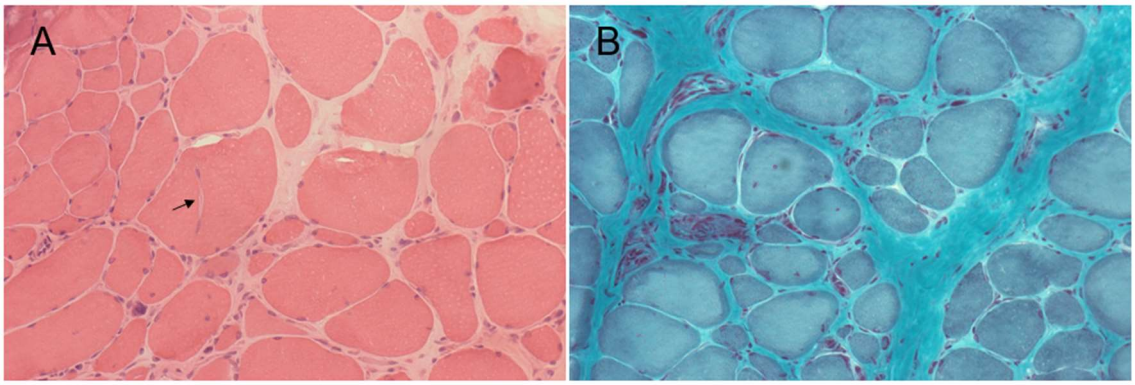


Figura 6. Biopsia muscular de características distróficas de paciente afecto de distrofia muscular de Becker. Las tinciones hematoxilina-eosina (A) y tricrómico de Gomori (B) muestran variabilidad del tamaño de las fibras, importante fibrosis con aumento del tejido conectivo endomisial y fenómenos de *splitting* (flecha). Figura original a 20X.

Las **distrofias musculares congénitas** (DMC) se definen por el inicio antes de los dos años de edad o bien por la falta de adquisición de deambulación autónoma. Clínicamente son muy heterogéneas y están producidas por defectos genéticos en múltiples proteínas, desde proteínas estructurales de la lámina basal y matriz extracelular hasta enzimas de glicosilación del α-distroglicano o proteínas de la membrana nuclear, entre otras (86). Muchas DMC son condiciones alélicas con miopatías de presentación más tardía, como las distrofias musculares de cinturas.

Las **distrofias musculares de cinturas** (LGMD, *limb-girdle muscular dystrophies*) son un grupo heterogéneo de miopatías hereditarias caracterizadas por debilidad muscular progresiva de inicio proximal en pacientes con adquisición de marcha autónoma, frecuente elevación de CK séricas, biopsia muscular distrófica, y cambios degenerativos progresivos en la RM muscular. Además, deben estar descritas en al menos dos familias no relacionadas. Algunas formas se asocian a afectación cardíaca y respiratoria. El término genérico LGMD fue acuñado por primera vez en 1954 por Walton y Nattrass, para diferenciarlas de las distrofinopatías ligadas al X, de la distrofia miotónica y la distrofia facioescapulohumeral (87). Posteriormente, tras el descubrimiento del defecto molecular de varias de ellas, surgió la primera clasificación en 1995 (88), basada en un modelo alfanumérico que las distinguía según el modelo de herencia (LGMD1 para la herencia dominante, LGMD2 para la herencia recesiva, seguido de letras en orden alfabético según orden cronológico del descubrimiento del gen o locus cromosómico). Sin embargo, el creciente número de *loci* genéticos identificados dificultaba mantener esta nomenclatura, a la vez que no contemplaba aspectos relacionados con los

mecanismos moleculares y patogenéticos, ni la importante variabilidad clínica. Por ello, la nueva clasificación internacional propuesta y aceptada en 2017 ha cambiado la nomenclatura de las formas dominantes (1 a D) y las formas recesivas (2 a R), y se ha añadido un número correspondiente al orden cronológico en que se identificó el gen. Además, al lado se menciona el gen o la proteína mutada. La nueva clasificación excluye algunos subtipos de LGMD que no se consideran en la actualidad (89) (ver Tabla 2).

Nombre previo	Gen	Nueva nomenclatura LGMD	Razón para exclusión
LGMD 1A*	*MYOT*	**Miopatía miofibrilar**	Debilidad distal
LGMD 1B*	*LMNA*	**Emery–Dreifuss *muscular dystrophy (EDMD)***	Alto riesgo de arritmias cardiacas; fenotipo Emery–Dreifuss
LGMD 1C*	*CAV3*	***Rippling muscle disease***	Signos clínicos principales: *rippling muscle* y mialgias
LGMD 1D	*DNAJB6*	**LGMD D1 *DNAJB6-related***	
LGMD 1E*	*DES*	**Miopatía miofibrilar**	Falso enlace genético; debilidad distal y cardiomiopatía
LGMD 1F	*TNP03*	**LGMD D2 *TNP03-related***	
LGMD 1G	*HNRNPDL*	**LGMD D3 *HNRNPDL-related***	
LGMD 1H*	?	**No confirmado**	Falso enlace genético
LGMD 1I	*CAPN*	**LGMD D4 *calpain3-related***	
LGMD 2A	*CAPN*	**LGMD R1 *calpain3-related***	
LGMD 2B	*DYSF*	**LGMD R2 *dysferlin-related***	
LGMD 2C	*SGCG*	**LGMD R5 *γ-sarcoglycan-related***	
LGMD 2D	*SGCA*	**LGMD R3 *α-sarcoglycan-related***	
LGMD 2E	*SGCB*	**LGMD R4 *β-sarcoglycan-related***	
LGMD 2F	*SGCD*	**LGMD R6 *δ-sarcoglycan-related***	
LGMD 2G	*TCAP*	**LGMD R7 *telethonin-related***	
LGMD 2H	*TRIM32*	**LGMD R8 *TRIM 32-related***	
LGMD 2I	*FKRP*	**LGMD R9 *FKRP-related***	
LGMD 2J	*TTN*	**LGMD R10 *titin-related***	
LGMD 2K	*POMT1*	**LGMD R11 *POMT1-related***	
LGMD 2L	*ANO5*	**LGMD R12 *anoctamin5-related***	
LGMD 2M	*FKTN*	**LGMD R13 *Fukutin-related***	
LGMD 2N	*POMT2*	**LGMD R14 *POMT2-related***	
LGMD 2O	*POMGnT1*	**LGMD R15 *POMGnT1-related***	
LGMD 2P	*DAG1*	**LGMD R16 *α-dystroglycan-related***	
LGMD 2Q	*PLEC*	**LGMD R17 *plectin-related***	
LGMD 2R*	*DES*	**Miopatía miofibrilar**	Debilidad distal
LGMD 2S	*TRAPPC11*	**LGMD R18 *TRAPPC11-related***	
LGMD 2T	*GMPPB*	**LGMD R19 *GMPPB-related***	
LGMD 2U	*ISPD*	**LGMD R20 *ISPD-related***	
LGMD 2V*	*GAA*	**Enfermedad de Pompe**	Enfermedad conocida, cambios histológicos
LGMD 2W*	*PINCH2*	***PINCH-2 related myopathy***	Reportado en una familia
LGMD 2X*	*BVES*	***BVES related myopathy***	Reportado en una familia
LGMD 2Y*	*TOR1AIP1*	***TOR1AIP1 related myopathy***	Reportado en una familia
LGMD 2Z	*POGLUT1*	**LGMD R21 *POGLUT1-related***	
Miopatía de Bethlem recesiva	*COL6A1-A3*	**LGMD R22 *collagen 6-related***	
Miopatía de Bethlem dominante	*COL6A1-A3*	**LGMD D5 *collagen 6-related***	
Laminin α2-related muscular dystrophy	*LAMA2*	**LGMD R23 *laminin α2-related***	
POMGNT2-related muscular dystrophy	*POMGNT2*	**LGMD R24 *POMGNT2-related***	

Tabla 2. Comparación de la nomenclatura anterior de LGMD con el sistema de clasificación actual. Las entidades que ya no se consideran LGMD se marcan con asterisco y se indica el motivo de su exclusión. Tabla modificada de Straub *et al.* Neuromuscul Disord, 2018 (89).

Por último, si bien el patrón histológico distrófico es un requisito en una enfermedad muscular progresiva para ser considerada como LGMD, existen algunas excepciones incluidas en la clasificación actual que no presentan rasgos distróficos, como por ejemplo la miopatía relacionada con DNAJB6 (LGMD D1, gen *DNAJB6*) (90) o transportina 3 (LGMD D2, gen *TNPO3*) (91).

En la figura 7 se muestran las diferentes proteínas codificadas por genes mutados en distintas formas de LGMD.

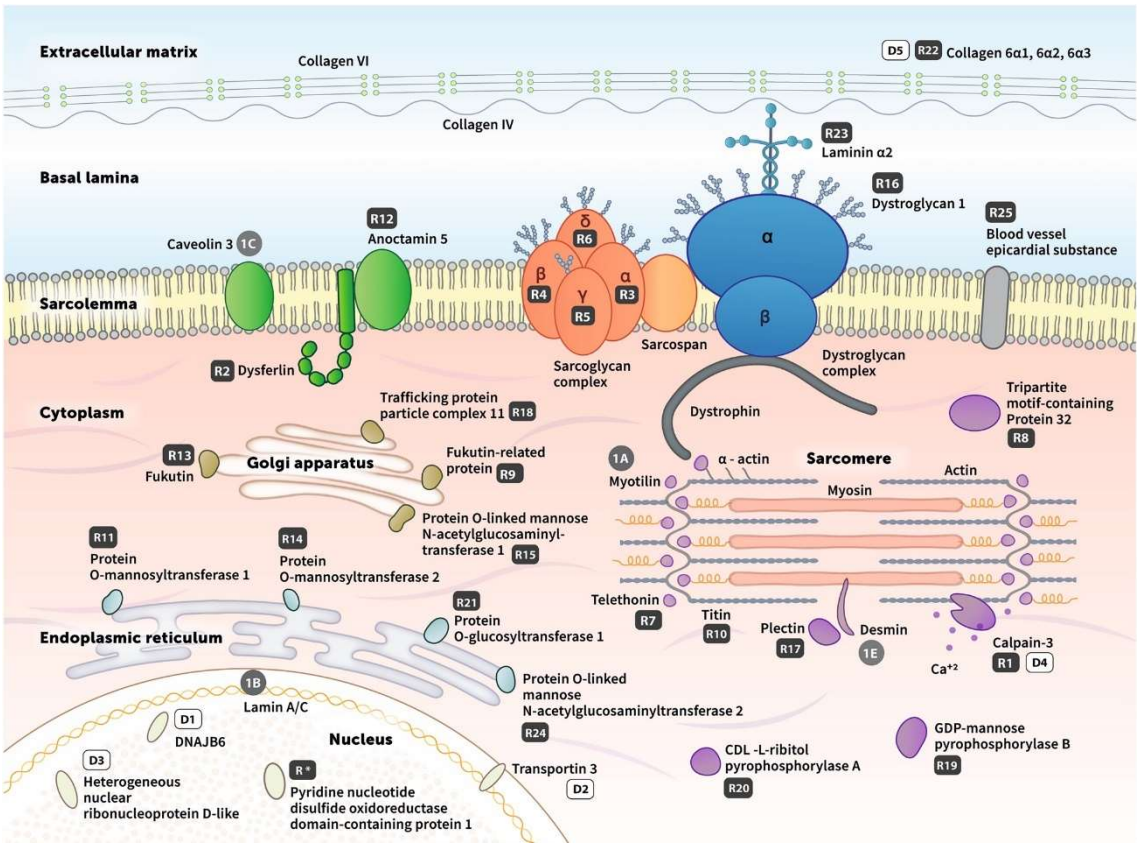


Figura 7. Dibujo esquemático de la fibra muscular con las localizaciones celulares de proteínas asociadas a varios tipos de distrofias musculares de cinturas. Se incluyen subtipos según la clasificación actual (89) (R# para formas autosómicas recesivas, D# para formas autosómicas dominantes), así como las formas dominantes retiradas de la clasificación previa (1# en círculos). No se muestran las formas recesivas retiradas de la clasificación previa. Figura extraída de Georganopoulou *et al.* Protein J, 2021 (92).

1.5.1.2. Miopatías distales

El grupo de las miopatías distales incluye enfermedades musculares la gran mayoría hereditarias que cursan con debilidad y atrofia muscular progresivas de inicio y predominio distal, con gran variabilidad en cuanto a edad de inicio, gravedad y progresión. De forma similar a las distrofias de cinturas o las distrofias musculares congénitas, las miopatías distales se deben a defectos en múltiples genes que codifican

proteínas localizadas tanto a nivel del sarcolema, como el sarcómero o el núcleo. Estas enfermedades altamente heterogéneas se clasifican en base a edad de inicio, distribución de la debilidad, características histopatológicas y modo de herencia. La mayoría de ellas tienen una herencia autosómica dominante, si bien hay formas descritas autosómicas recesivas, ligadas al cromosoma X, e incluso una forma digénica. Además, existen miopatías distales por mutaciones en genes que también se asocian a formas de debilidad proximal (p.ej. *DYSF*, *ANO5*, *TTN*, *TCAP*, *CAV3*, *VCP*, entre otros). Desde la primera descripción por Lisa Welander, se han descrito más de 20 diferentes formas de miopatías distales (93) (Tabla 3). Actualmente hay una falta de consenso en cuanto a su nomenclatura y clasificación, y no es posible definirlas de forma homogénea a nivel histopatológico. Mientras que algunas de ellas se caracterizan por un patrón distrófico, como la miopatía de Miyoshi por mutaciones en *DYSF* o la miopatía distal causada por mutaciones en *ANO5*, otras presentan vacuolas ribeteadas como aspecto principal, mientras que otras muestran un patrón de miopatía miofibrilar.

1.5.1.3. Miopatías miofibrilares

Las miopatías miofibrilares son un grupo de enfermedades con gran heterogeneidad clínica y genética que se definen por los hallazgos miopatológicos, caracterizados por focos de degradación miofibrilar que se inicia a nivel del disco Z y provoca acumulación de productos resultantes de dicha degradación miofibrilar en forma de agregados proteicos (94–96) (Figura 8). Estos agregados corresponden a una expresión anómala y ectópica de múltiples proteínas, incluyendo proteínas del disco Z y proteínas asociadas como desmina, miotilina, αB cristalina, ZASP y filamina C, entre muchas otras. Desde el punto de vista genético, la gran mayoría son de herencia dominante resultado de mutaciones en genes que codifican proteínas estructurales del disco Z o estrechamente relacionadas (*FLNC, MYOT, DES, LDB3*), o elementos que las regulan directamente mediante plegamiento o recambio mediado por chaperonas (*BAG3, CRYAB, HSPB8, DNAJB6, DNAJB4*). A nivel clínico, pueden presentar debilidad proximal o distal. Si bien muchas de ellas se asocian a debilidad de inicio en la edad adulta y lenta progresión, hay formas con un inicio infantil o juvenil, y formas con importante y precoz afectación cardíaca y/o respiratoria. La propuesta de clasificación actual se basa en las características descritas y pone el foco de la fisiopatología en la disrupción del disco Z, considerando miopatías miofibrilares puras las “disco-Z-patías”, para distinguirlas del término más amplio “miopatías con patología miofibrilar” (96).

Gene/protein	*Disease*	*Inheritance*	*Age at onset*	*Initial symptoms*	*CK levels*	*Muscle pathology*	*Other phenotypes*
ACTN2/α actinin2	Distal actininopathy	AD	Adulthood	Anterior lower leg weakness	Slightly to mildly elevated	Rimmed vacuoles Inclusion bodies Sarcomeric disorganization	Congenital myopathy Dilated CM 1AA Hypertrophic CM 23
ADSSL1/adenylosuccinate synthase-like 1	Adenylosuccinate synthase 1-related distal myopathy	AR	Late childhood or adolescence	Posterior lower leg weakness	Mildly elevated	Myopathic, rimmed vacuoles, nemaline rods MFM?	–
ANO5/anoctamin 5	Distal anoctaminopathy	AR	Adolescence-early adulthood	Posterior lower leg weakness	Very high	Dystrophic	LGMD R12, GDD Asymptomatic hiperCK emia
CRYAB/αB-crystallin	Alpha-Bcrystallinopathy	AD/AR	Adulthood	Anterior lower leg weakness	Normal or slightly elevated	MFM	Fatal infantile hypertonic MFM Dilated CM 1II Cataract
DES/desmin	Desminopathy	AD/AR/*de novo*	Early adulthood	Anterior lower leg weakness Cardiac conduction blocs	Variable	MFM	Dilated CM 1I Scapuloperoneal syndrome,
DNAJB6/DNAJB6	DNAJB6-related distal myopathy	AD	Adulthood	Posterior lower leg weakness	Normal or slightly elevated	MFM/rimmed vacuoles	LGMDD1
DNM2/dynamin 2	Dynamin related centronuclear myopathy	AD	Neonatal or childhood, rarely adulthood	Hand and lower leg weakness	Normal or slightly elevated	Central nuclei, radial strands, type 1 predominance	Axonal CMT, type 2 M Lethal congenital contracture syndrome 5 Severe neonatal myopathy
DYSF/dysferlin	Miyoshi myopathy	AR	Early adulthood	Posterior lower leg	Very high	Dystrophic ± inflammation	LGMDR2
FLNC/filamin C	Distal filaminopathy	AD	Early to middle age	Hand and lower leg	Normal or slightly elevated	Dystrophic, possible nemaline rods	MFM Familial hypertrophic CM restrictive CM
GNE/GNE	GNE myopathy. Previously known as nonaka myopathy/Distal myopathy with rimmed vacuoles	AR	Early adulthood	Anterior lower leg	Slightly elevated	Rimmed vacuoles	
MATR3	Vocal cord and pharyngeal distal myopathy	AD	Middle age	Anterior lower leg	Normal or slightly elevated	Rimmed vacuoles	FALS
MYH7/myosin heavy chain beta	Laing distal myopathy	AD	Childhood	Anterior lower leg	Normal or slightly elevated	Type 1 atrophy Cores/pseudocores	MSM, CM
MYOT/myotilin	Myotilinopathy	AD	Middle age	Anterior lower leg weakness	Normal or slightly elevated	MFM, rimmed vacuoles, inflammatory infiltrates.	LGMD1A
NEB/nebulin	Distal nebulin myopathy	AR	Childhood to early adulthood	Anteriorlower leg weakness	Normal or slightly elevated	Myopathic with or without nemaline rods	Arthrogryposis multiplex congenita, lethal multiple pterygium syndrome, core rod myopathy
PLIN4/perilipin 4	PLIN4 related myopathy	AD	Adulthood	Anterior lower leg weakness	Normal or slightly elevated	Rimmedvacuoles Sarcolemmalp62 andubiquitin-expression	–
SQSTM1+TIA1	Digenic distal myopathy with rimmed vacuoles	AD	Adulthood	Hands, finger extensors-weeakness	Normal or slightly elevated	Rimmed vacuoles Sarcoplasmic aggregates	PD, FALS,FTD
TIA1	Welander distal myopathy	AD	Adulthood	Wristandfinger extensors weakness	Normal or slightly elevated	Rimmed vacuoles	FALS,FTD
TTN/titin	Udd distal myopathy/Titinopathy	AR/AD	Early onset (AR) Late onset (AD)	Anteriorlower leg weakness often)	Normal or slightly elevated	Myopathic, rimmed vacuoles	LGMDR10, HMERF, CM, emery–Dreifuss like muscular dystrophy without cardiomyopathy, congenital recessive titinopathies
VCP/valosin containing protein	VCP distal myopathy	AD	Adulthood	Anterior lowers leg	Normal or slightly elevated	Rimmed vacuoles inclusion bodies	IBMPFD DFT and/or FALS 6 CMT2Y Others: HSP, parkinsonism, Huntington'sdiseasephenocopies
LDB3/zasp (lim domain-binding 3)	Zaspopathy/Markesbery-griggsmyopathy	AD	Middle age	Anterior lower leg	Normal or slightly elevated	MFM	Dilated CM Hypertrophic CM Left ventricular noncompaction

Tabla 3. Principales miopatías distales: clasificación molecular y características de cada subtipo. *ARVD: arrhythmogenic right ventricular dysplasia; CM: cardiomyopathy; CMT: Charcot Marie Tooth; FALS: familial amyotrophic lateral sclerosis; DFT: frontotemporal dementia; GDD: gnathodiaphyseal displasia; HMERF: hereditary myopathy with early respiratory failure; LCS: lethal congenital syndrome; LGMD: limb-girdle muscular dystrophy; MSM, myosin storage myopathy; PD: Paget disease; MFM myofibrillar myopathy; IBMPFD: inclusion body myopathy with early-onset Paget disease of the bone and frontotemporal dementia; HSP: hereditary spastic paraplegia.* Tabla extraída de Paradas, Carbonell, Llansó, Olivé. Encyclopedia of the Neurological Sciences. Elsevier, 2025 (97).

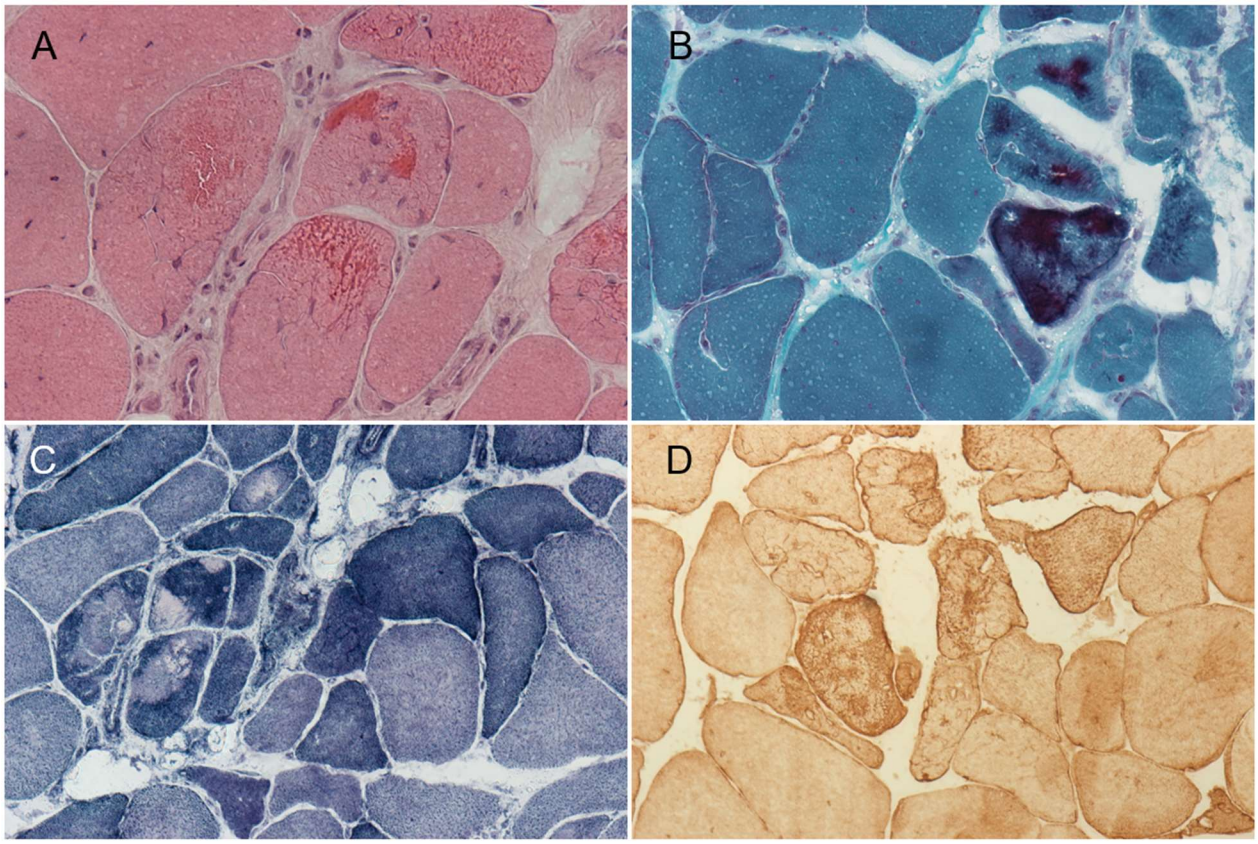


Figura 8. Biopsia muscular de un paciente afecto de miopatía miofibrilar por mutación en el gen de la desmina. La tinción hematoxilina-eosina (A) muestra variabilidad del tamaño de las fibras, aumento de núcleos internos y fibras con depósitos eosinofílicos, mal delimitados, de apariencia oscura con tricrómico modificado de Gomori (B), que sugieren agregados proteicos. (C) En la reacción de NADH se observa ausencia de actividad oxidativa en las áreas visualizadas previamente. (D) Inmunohistoquímica para desmina que muestra depósitos proteicos en múltiples fibras. Figura original a 20X (B-D) y 40X (A).

1.5.1.4. Miopatías congénitas

Las miopatías congénitas son enfermedades musculares definidas por las lesiones histológicas observadas en las biopsias musculares. Se caracterizan clínicamente por un inicio en período neonatal o infantil generalmente, que cursan con síntomas como debilidad, contracturas articulares, hipotonía neonatal, dificultades para la succión y llanto débil. Es característico que presenten un retraso del desarrollo motor y características fenotípicas como paladar ojival y facies miopática. El curso es lentamente progresivo o bien pueden presentar estabilización con el paso de los años. A nivel histopatológico, existen varios patrones bien definidos que permiten clasificar las miopatías congénitas en los siguientes subtipos: las miopatías nemalínicas (con bastones nemalínicos o *rods*), las miopatías con defectos de la actividad oxidativa llamados *cores* (miopatías con *cores* centrales, *multicores* y *multiminicores*), las miopatías centronucleares (núcleos centrales), y la desproporción congénita del tipo de

fibras (atrofia y predominio de fibras tipo 1) (Figura 9, Tabla 4). Algunos autores incluyen también la miopatía con almacenamiento de miosina. Fuera de las formas más comunes, existen otras miopatías congénitas no incluidas en la clasificación histológica, generalmente caracterizadas por alteraciones estructurales raras (98).

Los genes relacionados con las miopatías congénitas son múltiples y codifican proteínas involucradas en distintos procesos y estructuras celulares, como el mecanismo de ECC, algunos de ellos brevemente descritos en el apartado "Homeostasis del calcio y acoplamiento excitación-contracción" (p.ej. *RYR1, STAC3, CACNA1S*), el sarcómero *(ACTA1, NEB, TPM2, TPM3, TNNT1, TTN),* el tráfico de membranas y mantenimiento de la tríada muscular (*MTM1, DNM2, BIN1, SPEG*), entre otros (4).

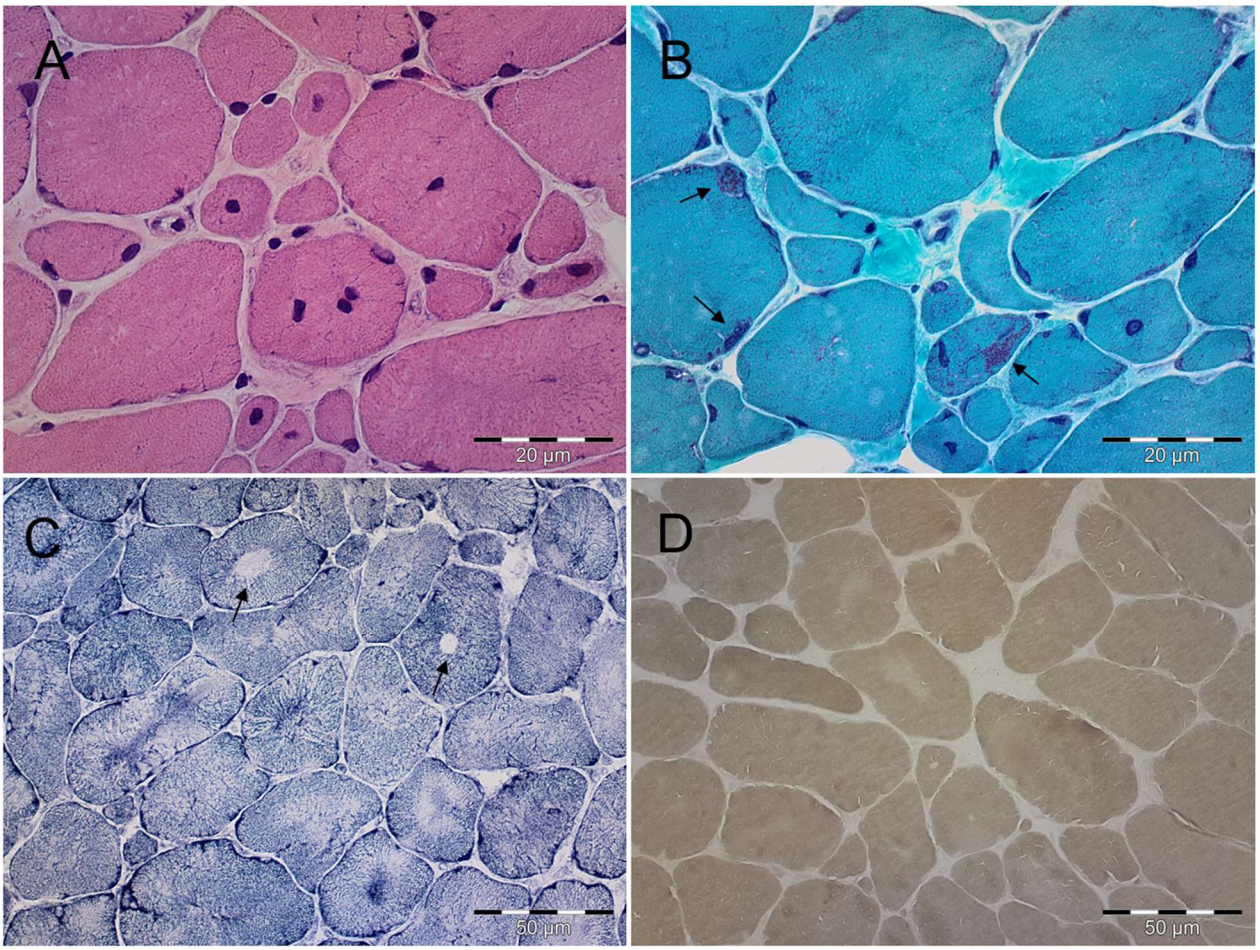


Figura 9. Biopsia muscular de un paciente afecto de miopatía congénita por variantes bialélicas en *RYR1,* con varios hallazgos histológicos típicos de miopatía congénita. (A) Hematoxilina-eosina que muestra variabilidad del tamaño de las fibras, abundantes núcleos centrales, únicos o múltiples, y marcada fibrosis endomisial. (B) Tricrómico de Gomori donde se observan bastones nemalínicos de tinción rojiza en algunas fibras (flechas). (C) La tinción NADH muestra dos fibras con *cores* centrales (flechas), áreas bien delimitadas con ausencia de actividad oxidativa, y otras fibras con borramiento de actividad o bien incremento en el área central. (D) ATPasa 4,35 que muestra uniformidad de fibras tipo 1. Figura original.

Patrón histológico	Gen	Proteína	Herencia
Enfermedad con central *cores (CCD)*	***RYR1*** >90%	Receptor de rianodina 1	AD > AR
	MYH7	Cadena pesada de miosina 7	AD
Enfermedad con *multiminicores (MmD)*	***SEPN1*** ~50%	Selenoproteína N	AR
	RYR1 ~20%	Receptor de rianodina 1	AR
	MYH7	Cadena pesada de miosina 7	AD, raramente AR(99)
	MEGF10	Factor de crecimiento epidérmico múltiple 10	AR
	TTN	Titina	AR
	ACTA1	α-actina	AR
	*MYH2**	Cadena pesada de miosina 2	AD, AR
Miopatía centronuclear *(CNM)*	***MTM1*** *>50%*	Miotubularina	XLR
	DNM2	Dinamina 2	AD
	BIN1	Anfifisina 2	AR > AD
	RYR1	Receptor de rianodina 1	AR
	TTN	Titina	AR
	SPEG	*Striated muscle-enriched protein kinase*	AR
	CCDC78	*Coiled-coil domain-containing protein 78*	AD
Miopatía nemalínica *(NM)*	***NEB***	Nebulina	AR
	ACTA1	α-actina	AD (*de novo*) > AR
	TPM2	Tropomiosina 2 (beta)	AD, AR
	TPM3	Tropomiosina 3 (alfa)	AD, AR
	KBTBD13	*Kelch repeat and BTB domain-containing protein 13*	AD
	TNNT1	Troponina T lenta	AR
	CFL-2	Cofilina 2	AR
	KLHL40	*Kelch-like family member 40*	AR
	KLHL41	*Kelch-like family member 41*	AR
	LMOD3	Leiomodina 3	AR
	MYPN	Miopaladina	AR
	MYOB18	Miosina 18B	AR
Desproporción congénita del tipo de fibras *(CFTD)*	*RYR1* ~20%	Receptor de rianodina 1	AR
	ACTA1 ~10%	α-actina	AD
	TPM2	Tropomiosina 2 (beta)	AD > AR
	TPM3	Tropomiosina 3 (alfa)	AD > AR
	SEPN1	Selenoproteína N	AR
	MYH7	Cadena pesada de miosina 7	AD
	LMNA	Lamina A/C	AD
	ZAK	Triple quinasa ZAK	AR
	SPEG	*Striated muscle-enriched protein kinase*	AR

Tabla 4. Clasificación de las miopatías congénitas según el patrón histológico, genes relacionados, proteínas defectuosas y patrones de herencia. Los genes más frecuentemente implicados en cada subgrupo se resaltan en negro. De ellos, los genes directamente relacionados con el mecanismo de acoplamiento excitación-contracción y/o ensamblaje de las tríadas son *RYR1, MTM1, BIN1, DNM2, SPEG, CCDC78* y *SEPN1*. *Variantes en *MYH2* se asocian a presencia variable de *cores* pero no suelen clasificarse en este subgrupo histológico, debido a que la característica predominante es la atrofia selectiva o ausencia de fibras tipo 2A. AD: autosómica dominante. AR: autosómica recesiva. XLR: ligada al X recesiva. Tabla original, con información procedente de revisiones por Sewry *et al*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2017 (100); Jungbluth *et al*. Nat Rev Neurol, 2018 (32); Rossi *et al.* J Gen Physiol, 2022 (33).

1.5.1.5. Canalopatías

Las canalopatías musculares, por otro lado, incluyen un conjunto de enfermedades causadas por mutaciones en genes que codifican canales iónicos celulares, como los canales de cloro (*CLCN1*), sodio (*SCN4A*), calcio (*CACNA1S*) y potasio (*KCNJ18, KCNJ2*). Clínicamente pueden cursar con rigidez muscular y dificultad para la relajación (miotonía), o episodios agudos de debilidad flácida. Se subdividen en las miotonías congénitas, paramiotonías congénitas y las parálisis periódicas hiper e hipopotasémicas. El espectro de fenotipos clínicos asociados a canalopatías se ha expandido en paralelo a la evolución de las técnicas moleculares, incluyendo presentaciones pediátricas y miopatías congénitas, por lo que existe un solapamiento etiológico entre las canalopatías y las miopatías congénitas (101).

1.5.1.6. Miopatías metabólicas

Por último, las miopatías metabólicas hereditarias se deben a múltiples defectos del metabolismo celular causados por mutaciones en genes de distintas vías celulares, ya sea la cadena respiratoria mitocondrial o fosforilación oxidativa (miopatías mitocondriales primarias), la beta-oxidación de ácidos grasos (miopatías lipídicas), o el metabolismo del glucógeno (glucogenosis). En todas ellas la consecuencia principal en la célula es el déficit en la producción de energía, y por ello pueden afectar a otros órganos y sistemas. Estas enfermedades se caracterizan por intolerancia al ejercicio o debilidad muscular fija, con síntomas y signos muy heterogéneos y gravedad variable (102), y no son el objeto de estudio de esta tesis doctoral.

1.5.1.7. Otras miopatías hereditarias: miopatías vacuolares autofágicas

Diversos defectos genéticos en el sistema de control de calidad de proteínas y la vía de la autofagia descritos previamente, en general relacionados con una disfunción primaria de la actividad lisosomal o bien de la fusión normal entre autofagosomas y lisosomas, causan miopatías vacuolares autofágicas. Histológicamente se caracterizan por el acúmulo de vacuolas en las fibras musculares con marcadores de autofagia y marcadores lisosomales como LC3, p62/SQSTM1, NBR1, LAMP-1, LAMP-2 y fosfatasa ácida, entre otros.

1.5.1.7.1. Miopatías con vacuolas autofágicas de características sarcolemales

Un subgrupo de las miopatías vacuolares autofágicas se distingue por la presencia de marcadores de membrana celular en la membrana de las vacuolas, como la actividad acetilcolinesterasa o la presencia de proteínas como distrofina, sarcoglicanos, merosina o caveolina-3. Estas entidades han sido históricamente denominadas miopatías con vacuolas autofágicas de características sarcolemales (AVSF por sus siglas en inglés, *autophagic vacuoles with sarcolemmal features*). En este grupo de miopatías con AVSF se incluye la enfermedad de Danon (mutaciones en *LAMP2*) y la miopatía ligada al X con exceso de autofagia (XMEA por sus siglas en inglés, mutaciones en *VMA21*) (54,103–109). La enfermedad de Danon, también ligada al cromosoma X, cursa clínicamente con la tríada de debilidad de musculatura esquelética, miocardiopatía hipertrófica y disfunción cognitiva. Histológicamente, se caracteriza por vacuolas AVSF y ausencia de la proteína LAMP-2 lisosomal. En la enfermedad de Pompe o glucogenosis tipo II, causada por mutaciones bialélicas en la alfa glucosidasa ácida lisosomal (gen *GAA*), solo una minoría (<15%) de las fibras musculares presenta algunos marcadores de membrana (103).

Sin pertenecer a esta clasificación de las miopatías con AVSF que solo incluye las mencionadas enfermedades hereditarias, es importante recalcar que las miopatías tóxicas por colchicina y cloroquina presentan vacuolas autofágicas en las fibras musculares de características similares a las miopatías con AVSF, debido a defectos adquiridos de la actividad lisosomal (110), por lo que deben considerarse en el diagnóstico diferencial desde el punto de vista histológico.

1.5.1.7.2. Miopatía vacuolar autofágica por expansiones en *PLIN4*

Las perilipinas son las proteínas más abundantes localizadas en la superficie de las gotas lipídicas, y se expresan de forma fisiológica en humanos y otros organismos como levaduras. Existen cinco tipos de perilipinas humanas que se expresan dependiendo del tejido (PLIN1-5), y todas ellas tienen una estructura similar que incluye una región repetitiva con una unidad básica de 33 aminoácidos que al formar una hélice anfipática permite su unión a las gotas lipídicas. De esta forma, fisiológicamente, pueden adoptar una forma soluble localizada en el citosol, y una forma con estructura helicoidal que se une a las gotas lipídicas. Variaciones de la estructura proteica permiten la especialización de cada perilipina en relación con las necesidades metabólicas de los diferentes tejidos. En concreto, la perilipina 4 (PLIN4) se localiza principalmente en adipocitos donde tiene una función de almacenamiento y metabolismo de triacilglicerol

(111–115), pero es también la perilipina más expresada en músculo esquelético, aunque de forma débil, donde se expresa principalmente en la región subsarcolemal de las fibras musculares oxidativas o tipo 1 (116). Si bien la función molecular concreta de la perilipina 4 en tejido muscular sigue siendo enigmática, evidencia reciente en cultivos de adipocitos humanos muestra que PLIN4 se une y regula la estabilidad de las gotas lipídicas en condiciones de incremento de tensión de su membrana cuando existe una síntesis rápida de triacilglicerol (117). Además, a nivel poblacional, el análisis de exoma completo de extensas cohortes ha mostrado que variantes patogénicas con pérdida de función en *PLIN4* se correlacionan con distribución anómala de grasa corporal, obesidad y dislipemia en humanos, lo cual sugiere que la haploinsuficiencia de *PLIN4* se asocia a perfil metabólico y aumento del riesgo cardiovascular (118,119).

La perilipina 4 está codificada por el gen *PLIN4*, el cual consta de una secuencia repetitiva en tándem de 29 a 31 repeticiones muy similares, pero no idénticas, de 99 nucleótidos, correspondientes a 33 aminoácidos cada una. Esta región se localiza en el exón 5 y codifica el dominio helicoidal anfipático de la proteína, que en condiciones normales está formado por ~1000 aminoácidos (29-31 x 33 aminoácidos) (120). La hélice anfipática es un dominio altamente conservado entre especies, especialmente largo en la perilipina 4 respecto al resto de perilipinas, y le confiere propiedades hidrofóbicas que permiten la unión a las gotas lipídicas (113). Los detalles sobre la estructura y secuencia del dominio anfipático de las distintas perilipinas humanas, en especial la perilipina 4, se describen en la Figura 10.

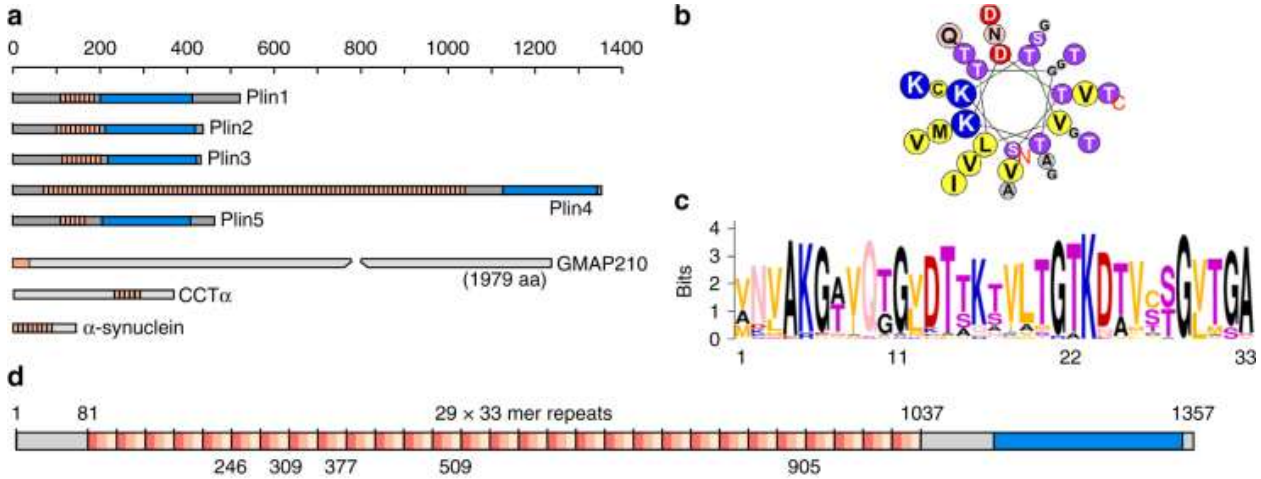


Figura 10. Esquema de la familia proteica de las perilipinas humanas (PLIN1-5) y sus hélices anfipáticas. Las regiones anfipáticas se representan en naranja, y son repeticiones de 33 aminoácidos (33-mer) que en secuencia de ADN corresponden a repeticiones de 99 nucleótidos. En azul se representa el dominio "4-helix bundle" que comparten todas las perilipinas en el extremo C-terminal. (A) El dibujo muestra cómo la perilipina 4, o PLIN4, es la perilipina humana más larga con la mayor hélice anfipática. Abajo se

representan las proteínas α-sinucleína y CCTα (*CTP-phosphocholine cytidylyltransferase α*), las cuales también tienen dominios anfipáticos de menor longitud (repeticiones de 11 aminoácidos). (B) Esquema de la conformación helicoidal que adopta una única repetición de 33 aminoácidos de PLIN4, es decir, una hélice formada por 11 veces x 3 aminoácidos. (C) Alineación de la secuencia normal de 29-31 x 33 aminoácidos de la proteína PLIN4 humana. Los distintos tamaños de los aminoácidos representados indican que cada secuencia de 33-mer repetida consta de unos aminoácidos determinados de forma más frecuente que otros. (D) Representación de la PLIN4 humana, son su dominio helicoidal anfipático en naranja. Figura extraída de Čopič *et al.* Nat Commun, 2018 (113).

Recientemente, se han descrito expansiones de esta secuencia de *PLIN4* de hasta 39, 40 y 50 repeticiones (39x, 40x, 50x 99 nucleótidos) como causa de una miopatía vacuolar de herencia autosómica dominante, que se ha definido como miopatía con vacuolas autofágicas ribeteadas ubiquitina-positivas (121–123). Se han descrito dos fenotipos, una miopatía distal y una miopatía proximal o de cinturas.

1.6. Miopatías inflamatorias idiopáticas

Un grupo claramente diferenciado de las miopatías hereditarias lo constituyen las miopatías adquiridas, que incluyen las miopatías inflamatorias idiopáticas, las miopatías tóxicas (causadas por fármacos, drogas o alcohol), las traumáticas y las miopatías en contexto de otras enfermedades sistémicas incluyendo infecciones, alteraciones metabólicas o endocrinas, malabsorción, enfermedad crítica, amiloidosis, etc.

Las miopatías inflamatorias idiopáticas, también llamadas miositis, constituyen un grupo heterogéneo de entidades autoinmunes con distintas manifestaciones clínicas y pronóstico. Aunque la diana principal de la autoinmunidad es el músculo esquelético, se consideran enfermedades sistémicas ya que pueden afectar a otros órganos como la piel, el pulmón y las articulaciones. Además, en algunos casos pueden ser secundarias a neoplasias sistémicas formando parte de síndromes paraneoplásicos. La prevalencia de estas enfermedades oscila entre 2.4 y 33.8 por cada 100 000 habitantes (71).

A diferencia de las miopatías hereditarias, por lo general se caracterizan por debilidad de más rápida instauración con elevación sérica de CK y respuesta variable a tratamiento inmunosupresor. Otras características comunes son los hallazgos de la electromiografía, que muestra abundante actividad espontánea en reposo, y la evidencia de inflamación y/o necrosis junto a sobreexpresión de MHC-I en la biopsia muscular.

1.6.1. Clasificación

Las miopatías inflamatorias idiopáticas se clasifican en distintos grupos, que incluyen la dermatomiositis, la miopatía necrotizante inmunomediada, la miositis por cuerpos de inclusión, el síndrome antisintetasa y la llamada *overlap myositis* o miositis solapada con otras enfermedades autoinmunes sistémicas. Esta clasificación surge en base a diversas manifestaciones clínicas musculares y/o extramusculares, perfiles inmunológicos y e histológicos distintos, así como respuesta variable al tratamiento inmunosupresor (124,125).

De acuerdo con las últimas guías internacionales publicadas en 2022 sobre los anticuerpos relacionados con miositis, y en línea con estudios previos clínico-serológicos, estos se clasifican en dos tipos: específicos y asociados a miositis (126,127). Los anticuerpos específicos de miositis (MSA, por sus siglas en inglés) son específicos de cada subgrupo de miositis y es extremadamente raro que coexistan entre ellos (128). Por ejemplo, la miopatía necrotizante inmunomediada se asocia a la presencia de anticuerpos anti-3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (o HMG-CoA reductasa, para simplificar HMGCR en adelante) o anti-*signal recognition particle* (SRP) en el 60-87% de los casos (129,130). La dermatomiositis se asocia a múltiples anticuerpos específicos como el anti-Mi2, anti-TIF1γ, anti-NXP2, anti-MDA5 y anti-SAE, que están presentes en el 70-80% de los pacientes. El síndrome antisintetasa se asocia a los anticuerpos específicos contra las tRNA sintetasas (Jo-1, PL7, PL12, EJ, OJ, KS, Zo, Ha). Este síndrome incluye síntomas extramusculares como poliartritis, afectación cutánea con manos de mecánico, fiebre, fenómeno de Raynaud y enfermedad pulmonar intersticial. En concreto, los anticuerpos contra no-Jo-1 se asocian a un diagnóstico más tardío, peor pronóstico y mayor fibrosis pulmonar (128,131). La miositis por cuerpos de inclusión (IBM por sus siglas en inglés, *inclusion body myositi*s) se ha asociado a anticuerpos contra *cytosolic 5'-nucleotidase 1A* o anti-cN1A, que se describieron inicialmente como anticuerpos poco sensibles pero altamente específicos, presentes en el 30-70% de casos de IBM y muy raramente en otras miopatías inflamatorias (132,133). No obstante, estudios posteriores ponen en entredicho cada vez más la especificidad de dichos anticuerpos, ya que se encuentran presentes en muchos pacientes con enfermedad reumatológica sin diagnóstico definitivo de IBM (134).

Algunos anticuerpos MSA relacionados con dermatomiositis se presentan en pacientes con riesgo incrementado de cáncer, especialmente anti-TIF1γ en adultos, aunque el incremento de riesgo es muy variable según un metaanálisis y dos grandes cohortes americanas y europeas de miositis (OR = 4.2-27.2) (128,135,136). Además, anti-NXP2

se asocia a malignidad en dermatomiositis en adultos según diferentes estudios (136,137), lo cual no se ha confirmado en la mayor cohorte europea de 1637 pacientes en la que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas (128). Por último, el último estudio mencionado encontró una asociación no descrita previamente con cáncer en pacientes con presencia de anticuerpos anti-Mi2 (OR = 2.5) (128). Por último, la segunda categoría de autoanticuerpos son los llamados anticuerpos asociados a miositis (MAA, por sus siglas en inglés), que incluyen los anti-PMScl, anti-Ku, anti-U1RNP, anti-Ro60, anti-Ro52, anti-La, anti-FR, entre otros. Dichos anticuerpos suelen estar presentes en el contexto de una enfermedad autoinmune sistémica como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, etc. Un resumen de los anticuerpos MSA y MAA se muestra en la Figura 11.

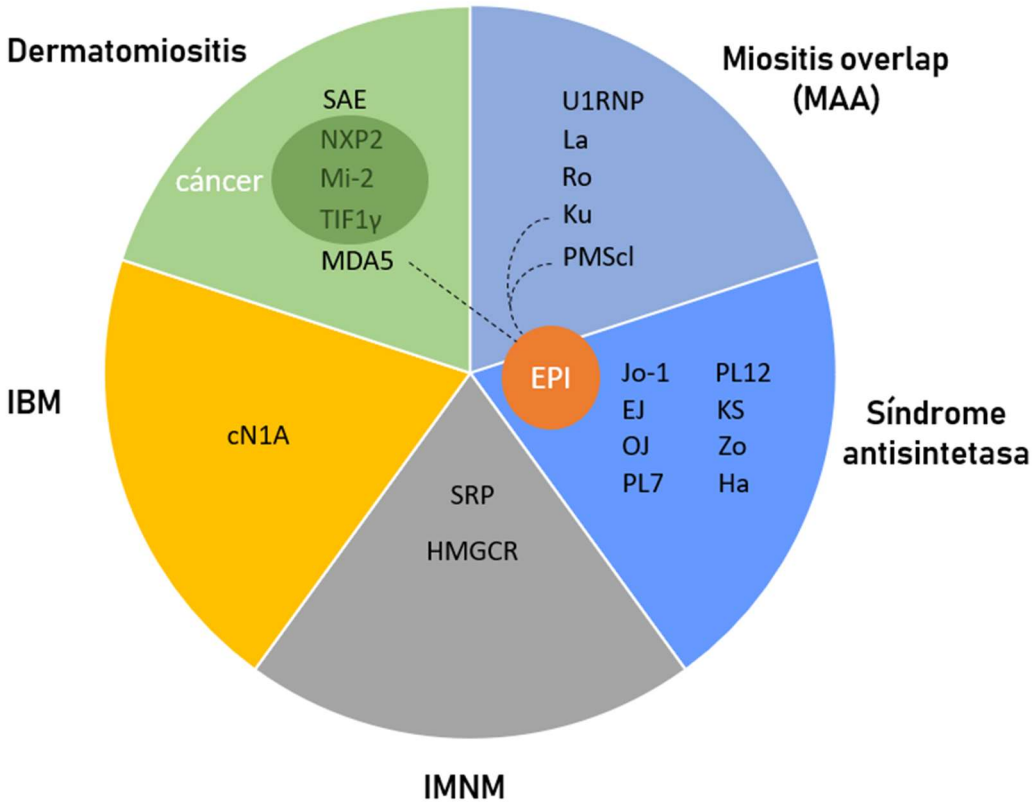


Figura 11. Esquema que representa los subtipos de miopatías inflamatorias idiopáticas y los autoanticuerpos asociados. Los grupos dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión (IBM, *inclusion body myositis*), miopatía necrotizante inmunomediada (IMNM, *immune-mediated necrotizing myopathy*) y síndrome antisintetasa presentan anticuerpos específicos (MSA, *myositis-specific antibodies*). La miositis *overlap* o de solapamiento con otras enfermedades autoinmunes sistémicas presenta frecuentemente anticuerpos asociados a miositis (MAA, *myositis-associated antibodies*). Se muestran las asociaciones de determinados anticuerpos con cáncer y con enfermedad pulmonar intersticial (EPI). Figura original.

1.6.2. Tratamiento

En cuanto al tratamiento de las miopatías inflamatorias idiopáticas, en todas las formas salvo la IBM, se recomienda un tratamiento inmunosupresor precoz, generalmente basado en corticoterapia a dosis 0.5-1mg/Kg/día las primeras 4-6 semanas con el inicio concomitante de un fármaco inmunosupresor con el objetivo de reducir la dosis de corticoides durante el seguimiento. Además, en casos graves de inicio con importante debilidad o disfagia, es recomendable administrar pulsos endovenosos de corticoides o inmunoglobulinas endovenosas, que también se utilizan como segunda línea de tratamiento en casos refractarios a corticoterapia. Un metaanálisis en 2022 que incluía 26 estudios analizó el efecto del fármaco anti-CD20 rituximab en todas las miopatías inflamatorias exceptuando la IBM, mostrando una tasa de respuesta del 65% global y en pacientes refractarios, por lo que, ante ausencia de ensayos clínicos aleatorizados, la evidencia actual sugiere que el rituximab es una alternativa terapéutica muy eficaz y relativamente segura (138).

1.6.3. Asociaciones con alelos de HLA

En algunos subgrupos de miopatías inflamatorias se han descrito asociaciones con determinados alelos o polimorfismos del HLA, el complejo mayor de histocompatibilidad o MHC que interviene en el proceso de presentación y reconocimiento de antígenos, por lo que existen factores inmunogenéticos de riesgo o protectores hacia fenotipos clínicos concretos de miositis (139). Por ejemplo, en la miopatía necrotizante inmunomediada asociada a anticuerpos anti-HMGCR se reconoce el HLA clase II DRB1*11:01 como factor de riesgo en adultos, especialmente cuando están expuestos a estatinas (140,141). No obstante, la literatura no ofrece evidencia definitiva sobre si existe un HLA de riesgo en población pediátrica con miopatía necrotizante inmunomediada con anti-HMGCR, aunque se ha descrito posible asociación con el alelo DRB1*07:01 en series inferiores a 10 pacientes (142,143). En el caso de la miopatía necrotizante con anticuerpos anti-SRP se ha descrito asociación con los alelos B*5001 y DQA1*0104, así como otros HLA de riesgo se han relacionado con otros anticuerpos específicos de miositis (139). No obstante, los estudios de HLA en población japonesa con miopatía necrotizante autoinmune difieren notablemente respecto a los de población caucásica, ya que los primeros describen relación con el alelo DRB1*08:03 independientemente del anticuerpo asociado y no encuentran una asociación significativa con el alelo DRB1*11:01 en las formas asociadas a anti-HMGCR (144). Además, dicho estudio japonés, basado en una cohorte de 237 pacientes adultos y 13 pediátricos, describe una asociación significativa del alelo C*03:04 en población joven con anti-HMGCR (OR 5.8,

p=0.0074) que, curiosamente, en el total de la cohorte sólo se asociaba significativamente a la exposición previa a estatinas (OR 2.3, p=0.026) pero no a los anticuerpos anti-HMGCR (OR 1.5, p=0.32) (144).

1.6.4. Miopatía necrotizante inmunomediada

La miopatía necrotizante inmunomediada representa aproximadamente el 12-25% de las miopatías inflamatorias autoinmunes (145,146). Afecta predominantemente a mujeres. Las estimaciones de prevalencia de la enfermedad son muy variables, teniendo en cuenta una incidencia creciente de diagnósticos en los últimos años relacionado a un mayor reconocimiento de la enfermedad, el creciente uso de estatinas y la reclasificación diagnóstica en muchos casos previamente tildados de polimiositis. En un estudio epidemiológico estadounidense, la prevalencia en el condado de Olmsted, Minnesota en 2010 era de 1.85 por cada 100.000 habitantes, diez veces menor que la de IBM en la misma población (147).

Existen dos grandes grupos de miopatía necrotizante inmunomediada, la asociada a anticuerpos anti-SRP y la asociada a anticuerpos anti-HMGCR. Ambas se caracterizan por una debilidad proximal subaguda con un gran incremento de niveles de CK séricas (1.000-20.000 U/L) y, generalmente, ausencia de clínica cutánea o extramuscular. En los casos graves puede haber clínica bulbar, cardíaca o respiratoria. La biopsia muscular es característica al mostrar abundantes fibras necróticas, fibras regenerantes, inflamación escasa a expensas de macrófagos o linfocitos CD8+, y variable sobreexpresión de MHC-I en la membrana de las fibras musculares (148).

1.6.4.1. Miopatía necrotizante inmunomediada con anti-SRP

La miopatía necrotizante asociada a anti-SRP suele presentarse con cuadros más graves respecto a la relacionada a anti-HMGCR, dado que se asocia a mayor debilidad de extremidades, cervical y bulbar, y tiene más riesgo de miocardiopatía e insuficiencia respiratoria (128,145,149,150). No obstante, se han descrito formas de curso crónico y lentamente progresivo que pueden simular una distrofia de cinturas (151). El título de anticuerpos anti-SRP se correlaciona con los niveles de CK séricas (152). A pesar de las diferencias en la gravedad de inicio, ambas formas presentan similar pronóstico y respuesta a tratamiento inmunosupresor, que en la mayoría de casos requiere más de un fármaco, y la evolución es menos favorable en pacientes que debutan más jóvenes (153,154).

1.6.4.2. Miopatía necrotizante inmunomediada con anti-HMGCR

La miopatía necrotizante inmunomediada con anti-HMGCR representa alrededor del 7.2% del total de miopatías inflamatorias en individuos adultos según la suma de cinco estudios de cohortes (147 de 2039 pacientes) (141,145,146,155,156). Se asocia a exposición previa a estatinas en el 70-75% de los casos según diversos estudios, especialmente en el subgrupo de edad mayor de 50 años (141,154,155,157,158). Sin embargo, algunas series europeas difieren mostrando una tasa de exposición únicamente del 44% (159) y, especialmente en pacientes de etnia asiática, la prevalencia de exposición a estatina farmacológica es mucho menor, del 13 al 24% según dos estudios que incluyen 84 pacientes (144,146). Curiosamente, en el citado estudio japonés se objetivó la misma tasa de exposición a estatinas que en las miopatías necrotizantes seronegativas (23-24%) (144). HMGCR es una enzima crucial en la vía intracelular de la biosíntesis del colesterol, inhibida de forma competitiva por las estatinas en pacientes tratados por hipercolesterolemia. Tiene una localización citoplasmática cercana al retículo endoplasmático y es ubicua, ya que está presente en todos los tejidos. El título de anticuerpos anti-HMGCR se correlaciona con la gravedad de la miopatía considerando tanto los niveles de CK séricas como las escalas de fuerza muscular *Medical Research Council* (MRC) (159,160) o *Myositis Disease Activity Assessment* (MYOACT) (146), por lo que se ha sugerido su rol directamente patogénico. No obstante, mientras que el estudio citado de Werner *et al.* (160) mostró que la reducción del título de anticuerpos disminuye con el tratamiento en paralelo con la mejoría clínica, el estudio de Ge *et al.* (146) no evidenció una correlación entre la reducción de los niveles de anticuerpo con una mejoría de marcadores clínicos o analíticos al seguimiento. El tratamiento consiste en retirar la estatina e iniciar inmunosupresión con corticoides, inmunoglobulinas u otros fármacos ahorradores de corticoides, presentando habitualmente una buena respuesta clínica.

La hipótesis etiopatogénica principal que se postula en la literatura de esta enfermedad asociada a estatinas es que las estatinas, al inhibir competitivamente la enzima HMGCR, provocan un aumento compensatorio de su expresión, una localización incorrecta (del citosol al sarcolema), o bien cambios conformacionales que podrían crear nuevos epítopos proteicos susceptibles de romper la tolerancia inmunológica y activar la respuesta inmune humoral. Se cree que una combinación de estos factores puede promover la síntesis de anticuerpos anti-HMGCR en pacientes expuestos a estatinas, especialmente en individuos predispuestos con un HLA de riesgo (148,161). Los anticuerpos anti-HMGCR, así como los anti-SRP, han demostrado patogenicidad *in vitro* en cultivos de mioblastos, produciendo atrofia de fibras, aumento de citoquinas

proinflamatorias y alteración de la fusión de mioblastos, sugiriendo un posible mecanismo inductor de necrosis por alteración de la regeneración muscular (162). No obstante, los estudios realizados hasta la fecha con biopsias de pacientes muestran solamente una expresión robusta de HMGCR en la membrana de las fibras que sufren necrosis o degeneración, en contraste con una expresión débil y dispersa en el resto de fibras sanas (155,163). Por ello, existen controversias sobre el rol realmente patogénico de los anticuerpos anti-HMGCR y el mecanismo de inducción de necrosis en esta miopatía necrotizante, dependiente de anticuerpos o de una posible activación de la cascada del complemento (164,165).

Para introducir el subgrupo de pacientes que se han estudiado en esta tesis doctoral, es importante destacar la variabilidad fenotípica de esta enfermedad. En los últimos años, se ha descrito un subgrupo infrecuente de pacientes con miopatía necrotizante con anticuerpos anti-HMGCR, generalmente niños o adultos jóvenes sin toma previa de estatinas, que simula una distrofia muscular por su progresión lenta, crónica y mala respuesta a fármacos inmunosupresores (143,166–168).

1.7. Diagnóstico de las enfermedades musculares

1.7.1. Caracterización clínica

Como ya se ha mencionado, las miopatías pueden ser clasificadas a grandes rasgos en adquiridas o hereditarias. Se caracterizan por síntomas y signos como debilidad, atrofia o hipertrofia, dolor muscular, rampas, rigidez, dificultad para la relajación o miotonía, etc. Además, en algunos casos se acompañan de ptosis palpebral con o sin debilidad oculomotora, visión doble (diplopia), debilidad facial, disfagia o disartria por afectación de la musculatura bulbar, o debilidad axial. También pueden asociarse a deformidades músculo-esqueléticas como escápula alada, escoliosis, hiperlordosis, paladar ojival o retracciones articulares. Por último, pueden presentar síntomas secundarios a afectación de la musculatura respiratoria o cardíaca, que en algunos casos puede ser muy grave e incluso desproporcionada al grado de afectación muscular esquelética.

Conocer el conjunto de signos y síntomas típico de cada miopatía es de especial utilidad para dirigir correctamente el abordaje diagnóstico, que puede diferir según la sospecha clínica. Un diagnóstico definitivo permitirá aplicar un tratamiento precoz en caso de miopatías tratables como las inflamatorias y otras miopatías adquiridas de etiología tóxico-metabólica, al igual que en algunas miopatías hereditarias.

1.7.2. Marcadores analíticos

A nivel bioquímico, el principal biomarcador utilizado es la creatina quinasa (CK) en sangre, que puede ser normal o elevada. Otros marcadores musculares menos específicos son la aldolasa, AST, ALT, LDH, la mioglobina y el lactato. Además, la elevación sérica del factor de crecimiento y diferenciación 15 (GDF-15) es altamente sensible y específica para identificar una miopatía mitocondrial primaria y diferenciarla de otras miopatías (169,170). Otros estudios bioquímicos pueden ser de utilidad en el diagnóstico de miopatías metabólicas, como el perfil de acilcarnitinas en plasma y de ácidos grasos en orina, o el test de ejercicio para analizar las curvas de lactato y amonio.

1.7.3. Estudios electrofisiológicos

Los estudios electrofisiológicos son de utilidad en el diagnóstico de enfermedades musculares para ayudar a topografiar la lesión a nivel de músculo y descartar otras enfermedades neuromusculares que pueden cursar con sintomatología similar, como las neuropatías motoras o los trastornos de la unión neuromuscular. La electromiografía en las miopatías puede mostrar patrones de contracción miopáticos caracterizados por reclutamiento precoz, potenciales de unidad motora polifásicos, de duración y amplitud reducida, con o sin actividad espontánea en reposo. No obstante, en algunas miopatías es característico encontrar patrones electromiográficos mixtos, de aspecto neurógeno y miógeno, como es el caso de la IBM, las miopatías miofibrilares y muchas miopatías distales con vacuolas ribeteadas.

1.7.4. Biopsia muscular

La miopatología, o anatomía patológica del músculo esquelético, es un pilar esencial en el diagnóstico de las enfermedades musculares, aunque su uso se está viendo condicionado por la (re)evolución de la genética y cambios en el algoritmo diagnóstico en muchas miopatías (171). La biopsia muscular se basa en el estudio morfológico, histoquímico e inmunohistoquímico del tejido muscular. La biopsia del músculo elegido se puede realizar con técnica abierta, mediante cirugía y anestesia local, que es más invasiva pero obtiene mayor cantidad de muestra, o con técnica cerrada mediante aguja. Tras la extracción del músculo, es recomendable el transporte en una gasa húmeda y su rápida congelación con isopentano enfriado en nitrógeno líquido. En general, los estudios histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos se realizan sobre secciones congeladas de 5-10 µm que se cortan del bloque congelado con un criostato. En algunas ocasiones, parte de la muestra es fijada en formol y posteriormente incluida en parafina. Además, la obtención de tejido muscular ofrece la posibilidad de un análisis morfológico

ultraestructural mediante microscopía electrónica, que requiere de un procesamiento especial para fijar el material e incluirlo en resinas.

Los estudios inmunohistoquímicos permiten estudiar la expresión proteica de forma cualitativa mediante inmunohistoquímica (IH) o inmunofluorescencia (IF). Estas técnicas marcan mediante una reacción enzimática o un fluorocromo la unión específica entre un anticuerpo y su antígeno. De esta forma podemos observar al microscopio la abundancia y localización de determinada proteína, y compararlo respecto a músculo control. No obstante, hay que tener en cuenta que existen proteínas que por su gran tamaño o degradación fisiológica no se pueden medir con estas técnicas (por ejemplo, titina o calpaína 3). Por otro lado, se puede realizar un estudio semicuantitativo de la expresión proteica en músculo mediante western blot (WB), que permite cuantificar la abundancia de determinada proteína y también calcular su peso molecular. Este segundo aspecto permite identificar proteínas de un tamaño anormal, pudiendo ser de mayor peso molecular debido a una expansión o duplicación, o de menor peso debido a una deleción. Estos estudios nos permiten hacer una correlación entre histología, genética y clínica en muchas miopatías. Se han utilizado en esta tesis doctoral para analizar la expresión de proteínas codificadas por nuevos genes no asociados previamente a miopatías (SERCA2), para confirmar el tamaño incrementado de proteínas debido a expansiones (PLIN4), o para analizar el estudio de expresión en músculo de un autoantígeno asociado a miopatía necrotizante inmunomediada (la enzima HMGCR).

Por último, la biopsia muscular permite obtener material para realizar estudios *in vitro*, incluyendo cultivos celulares de mioblastos y miotubos, de gran utilidad para profundizar y validar mutaciones nuevas, así como hacer estudios de secuenciación del ARN mensajero en tejido muscular, que se describirá en el apartado de técnicas genéticas.

1.7.5. Estudios de imagen muscular

La resonancia magnética (RM) muscular corporal ha sido incorporada en las últimas décadas con un papel diagnóstico en muchos casos y también como marcador de progresión que puede ser de utilidad en ensayos clínicos o en la práctica clínica habitual (172). La RM muscular permite determinar el grado y patrón de atrofia muscular e infiltración grasa, pudiendo mostrar la afectación o preservación selectiva de algunos músculos (Figura 12), y la presencia de inflamación o edema en algunos casos, especialmente en las miopatías inflamatorias, aunque no de forma exclusiva (173–179). Las secuencias más utilizadas son el T1 para valorar infiltración grasa, y el *Short Tau Inversion Recovery* (STIR) para valorar edema muscular.

A pesar de no ser una técnica utilizada en esta tesis doctoral, la ecografía muscular también ha ganado protagonismo en los últimos años como estudio de imagen muscular, con evidentes beneficios en cuanto a tiempo de exploración, comodidad y coste, aunque presenta limitaciones anatómicas y es una técnica con menos resolución que requiere un conocimiento especializado del explorador (180,181).

Dichas técnicas radiológicas pueden ser útiles también para guiar la biopsia muscular, especialmente en casos extremos de afectación subclínica o bien de atrofia muscular grave donde es preferible biopsiar un músculo relativamente preservado sin infiltración grasa completa.

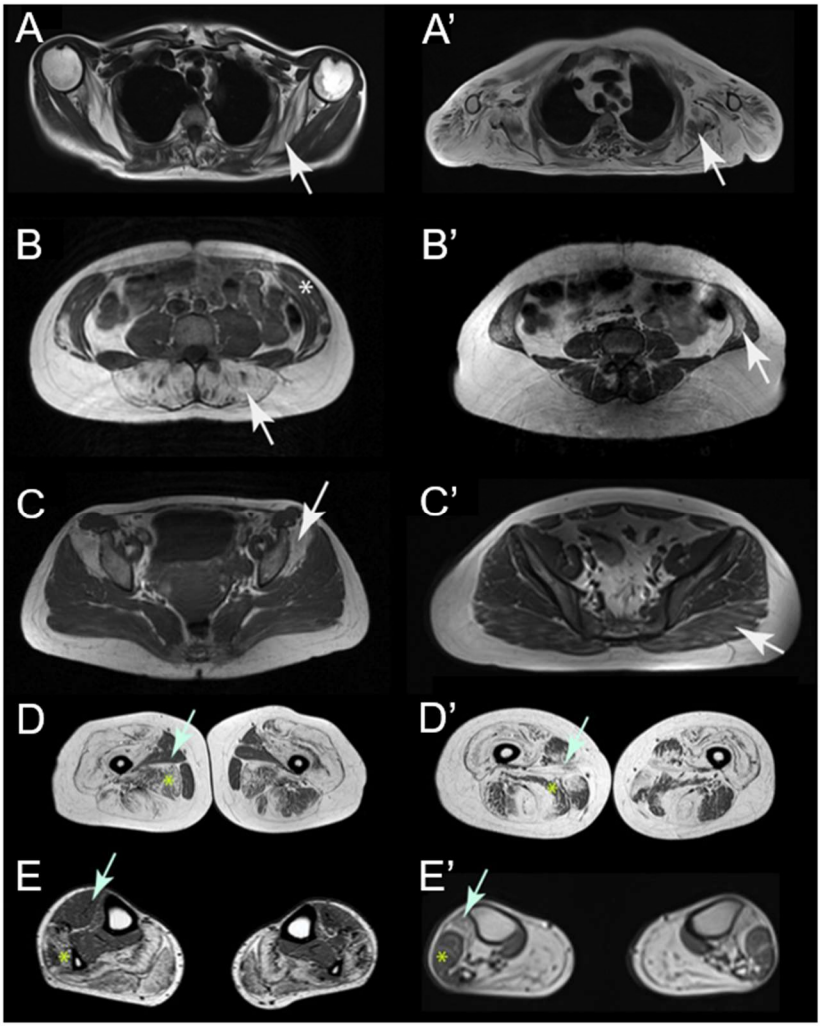


Figura 12. Resonancia magnética muscular corporal de varios pacientes afectos de disferlinopatía. En la columna izquierda se muestran secuencias T1 con el patrón característico de afectación muscular en esta enfermedad, de utilidad en el diagnóstico diferencial (A – E). Las imágenes de la columna derecha (A' – E') muestran algunas excepciones o desviaciones del patrón de imagen de pacientes afectos. A: El músculo subescapular (flecha) tiende a ser el músculo más afecto de la cintura escapular. A': Ejemplo de un paciente con afectación severa de todos los músculos periescapulares, mientras que el subescapular está relativamente preservado en ambos lados. B: Los músculos paravertebrales (flecha) están más afectos

que los músculos abdominales (asterisco). B': Ejemplo de un paciente con los músculos abdominales más afectos (flecha) que los paravertebrales. C: El glúteo menor (flecha) está habitualmente más afecto que el glúteo mayor. C': Ejemplo de un paciente que presenta un mayor reemplazo graso, leve, en el glúteo mayor (flecha). D: El aductor mayor (asterisco) está igual o más afecto que el aductor largo (flecha). D': Ejemplo de un paciente con una afectación más severa del aductor largo que del aductor mayor. E: Los músculos peroneos (asterisco) están igual o más afectos que el tibial anterior (flecha). E': Ejemplo de un paciente con los músculos peroneos no afectados, a pesar del reemplazo graso severo del tibial anterior. Imagen adaptada de Llansó *et al.* Neuromuscul Disord, 2023 (182).

1.7.6. Estudios genéticos

En el caso de las miopatías hereditarias, el diagnóstico definitivo se alcanza con la identificación molecular del defecto genético concreto. El poder establecer un diagnóstico genético definitivo impacta directamente en el paciente y sus familiares, en el manejo clínico y consejo genético, y es imprescindible para poder incluirlo en ensayos clínicos presentes o futuros que utilicen tratamientos dirigidos. La aplicación de técnicas de secuenciación masiva o de nueva generación del ADN (*Next-Generation Sequencing* o NGS) ha permitido optimizar el diagnóstico de enfermedades musculares hereditarias en las últimas décadas (183–185). Estas nuevas técnicas permiten detectar nuevas variantes y nuevos genes responsables de enfermedades musculares, así como nuevos fenotipos producidos por mutaciones en un mismo gen.

El estudio del material genético humano comprende la genómica, la aproximación más utilizada para el estudio del ADN, y la transcriptómica, usada para el estudio del ARN mensajero (mRNA). Además, la proteómica es la técnica que estudia las consecuencias finales a nivel de proteína. En el área de la genómica, el uso de las técnicas de NGS ofrece grandes ventajas en tiempo y coste respecto a la secuenciación Sanger gen por gen usada en el pasado, y ha permitido la identificación de nuevos genes causantes de miopatías. Unos ejemplos recientes son el descubrimiento de mutaciones bialélicas truncantes en *TRIP4* y *ASCC1* como causa de una nueva miopatía congénita grave (186,187), o mutaciones puntuales en el gen *HMGCR* como causa de una nueva distrofia muscular de cinturas de herencia recesiva (188,189). Sin embargo, sólo hasta un 30-60% de pacientes con sospecha de miopatía hereditaria recibe un diagnóstico molecular definitivo mediante el uso de técnicas de NGS (190–193). Además, surgen ciertos inconvenientes que hay que considerar ante el desafío que supone interpretar el gran número de variantes que se suelen identificar, muchas de ellas de significado incierto.

Las variantes genéticas pueden producirse por deleción, duplicación o expansión de pares de bases, por reordenamientos estructurales, por alteraciones de la metilación o

por simple sustitución de un nucleótido por otro. Estos cambios en la secuencia del ADN producen diferentes consecuencias en la proteína, ya sea ausencia o reducción de la expresión, ganancia o pérdida de función. Hablamos de variante *nonsense* o truncante cuando codifica un codón de parada y por tanto un mRNA truncado que no se traduce a proteína; variante *frameshift* cuando una deleción o duplicación altera la pauta o marco de lectura; *in-frame* cuando una deleción o duplicación preserva el marco de lectura; y de variante *missense* o puntual cuando implica la sustitución de un aminoácido por otro. Según el tipo de mutación, se puede predecir hasta cierto punto la consecuencia que tendrá sobre la proteína traducida. Además, las variantes tienen mayor riesgo de patogenicidad cuando se localizan en dominios evolutivamente conservados y dominios funcionales de la proteína, y como menos frecuente sea la variante a nivel poblacional. Se consideran variantes "raras" cuando la frecuencia alélica es inferior a 0.05 (gnomAD v.2.1.1).

Para ayudar en la interpretación o complementar el estudio genético, las consecuencias de las variantes en una determinada proteína pueden estudiarse con diferentes técnicas que incluyen el estudio de la expresión proteica mediante IH, IF y/o WB, la secuenciación del mRNA (RNAseq) o los estudios funcionales, entre otros.

1.7.6.1. Técnicas de secuenciación masiva del ADN (NGS)

El panel de genes, la secuenciación del exoma y la secuenciación del genoma son las tres principales técnicas de NGS disponibles. El panel de genes es muy usado en la práctica clínica habitual y permite analizar un gran número de genes implicados en una misma patología a la vez, lo que supone analizar aproximadamente el 1,5% del ADN humano. El exoma, cada vez más en auge, analiza principalmente el material genético codificante del ADN, los exones, y sus regiones intrónicas flanqueantes. El análisis de exoma puede ser clínico (CES, *clinical exome sequencing*: estudio focalizado de unos 5.000 genes con OMIM asociado) o completo (WES*, whole exome sequencing*: estudio de unos 20.000 genes, con y sin OMIM asociado). Secuenciar el exoma representa estudiar aproximadamente el 23% del ADN y tiene beneficios respecto al panel de genes, como la detección de variantes únicas de nucleótidos (SNVs, *single nucleotide variants*) y la posible detección de variaciones del número de copias de uno o más exones (CNVs, *copy number variants*), así como de pequeñas inserciones o deleciones (llamadas "indels"). Además, a diferencia del panel de genes, el exoma permite reanalizar en un futuro el material secuenciado si es necesario. No obstante, la secuenciación del exoma no permite analizar regiones intrónicas profundas, identificar variantes en regiones repetitivas ni en pseudogenes, ni tiene sensibilidad suficiente para

detectar todas las CNVs. Por último, la secuenciación del genoma completo (WGS, *whole-genome sequencing*) incluye el análisis de todo el material genético del genoma humano, tanto el codificante como el no codificante, pero no está generalmente disponible en contexto clínico asistencial (194–196). A pesar de los beneficios de las técnicas NGS, todavía hay ciertos cambios genéticos que no pueden ser detectados con la secuenciación del exoma o genoma, de los que hablaremos más adelante.

La American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) publicó en 2015 una recomendación de clasificación y terminología estandarizada para describir las variantes genéticas identificadas en estudios de NGS. Según dicha terminología, las variantes se clasifican en benignas, probablemente benignas, de significado incierto (*variant of uncertain significance* o VUS), probablemente patogénicas, y patogénicas (197). Estas cinco categorías propuestas se basan en distintas evidencias de clasificación de variantes, como la frecuencia poblacional, predictores de patogenicidad, datos funcionales del efecto sobre la proteína, etc. Cabe destacar que esta clasificación afecta solamente a genes causantes de trastornos mendelianos, es decir, enfermedades de herencia monogénica.

Pese a ser técnicas adecuadas para detectar SNVs y pequeñas inserciones o deleciones, las técnicas de NGS tienen limitaciones para detectar variantes estructurales complejas (como algunas CNVs, grandes deleciones y duplicaciones, inversiones, translocaciones) y otras variantes genéticas como mutaciones dinámicas (expansiones de nucleótidos o tripletes en tándem) o alteraciones epigenéticas (alteraciones de metilación). Por ello, en especial cuando se sospecha determinada patología hereditaria causada por estos mecanismos moleculares, hay que guiar el estudio genético hacia técnicas alternativas que las permita identificar, lo cual complica y a su vez puede alargar el algoritmo diagnóstico. A continuación se detallan algunas de estas técnicas, de gran importancia en determinadas miopatías, con especial énfasis en la secuenciación de lecturas largas.

1.7.6.2. Estudio de variantes estructurales y CNVs

Para detectar variantes genéticas estructurales la técnica más utilizada es el MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification).* Un ejemplo de la utilidad diagnóstica del MLPA es en el caso de las distrofinopatías, causadas en el 75% de los casos por grandes deleciones o duplicaciones del gen *DMD*, por lo que constituye el test genético de elección en esta patología (198). Otras técnicas que permiten identificar variantes estructurales son el microarray de hibridación genómica comparativa (aCGH) y el mapeo

de genoma óptico (OGM) (73,199). Además, existen programas específicos de NGS que pueden analizar CNVs incrementando la tasa diagnóstica en casos seleccionados (200). El desarrollo de un test genético piloto basado en NGS ("The Lantern Focused Neuromuscular Panel") que incluye la secuenciación de múltiples genes junto al análisis concomitante de CNVs, se aplicó recientemente en un estudio de 6473 pacientes con sospecha de distrofia muscular de cinturas o fenotipos clínicos similares identificando CNVs en un 7.5% de los casos con diagnóstico molecular definitivo (95 de 1266 pacientes) (201). Estos defectos se encontraron en los genes *DMD, EMD, CAPN3, ANO5, SGCG, COL6A2, DOK7* y *LAMA2,* y suponían tanto deleciones como duplicaciones de un único exón, multi exón o del gen completo.

Estos resultados demuestran la utilidad de añadir el estudio de CNVs para aumentar el rendimiento diagnóstico en miopatías hereditarias, ya sea combinando programas de análisis de NGS o añadiendo técnicas específicas como el MLPA. También se hace patente que las CNVs pueden afectar a múltiples genes asociados a miopatías. En este contexto, cabe destacar que, en caso de mutaciones patogénicas en heterocigosis en genes de herencia autosómica recesiva y alta sospecha clínica de que dicho gen sea el responsable, estas técnicas son útiles para identificar una posible deleción del otro alelo, o incluso para diagnosticar deleciones homocigotas (200,201).

1.7.6.3. Estudio de mutaciones dinámicas

El estudio de mutaciones dinámicas por expansiones de nucleótidos o tripletes se realiza mediante *repeat-primed* PCR (RP-PCR) y/o Southern Blot (73,198). Un ejemplo de la utilidad de estas técnicas radica en el diagnóstico de la distrofia miotónica tipo 1 y tipo 2 (genes *DMPK y CNBP*), la distrofia muscular oculofaríngea (gen *PABPN1*) o la miopatía oculofaríngea distal (gen *LRP12,* entre otros). Además, las contracciones de microsatélites D4Z4 en la distrofia facioescapulohumeral tipo 1 también se pueden analizar con estas técnicas (202).

1.7.6.4. Más allá del NGS: *Long-read sequencing*

La secuenciación de lecturas largas, o *long-read sequencing* (LRS), se denomina así para diferenciarla de la secuenciación masiva de lecturas cortas (*short-read*) de las técnicas NGS. A diferencia de las técnicas de NGS que fragmentan el ADN nativo en fragmentos cortos (~150 pares de bases) y después lo amplifican y secuencian, el LRS es una técnica novedosa que permite secuenciar grandes fragmentos de ADN de decenas de kilobases (1 Kb= 1000 pares de bases). Esto permite evitar sesgos de

amplificación de segmentos cortos y analizar de forma concomitante varios defectos genéticos y epigenéticos (73,203).

Esta técnica tiene alta rentabilidad dado que permite diagnosticar defectos genéticos complejos que no puede abarcar el NGS convencional, que incluyen: expansiones de repeticiones en tándem, variantes estructurales, diferenciar variantes en genes o sus pseudogenes que comparten regiones de alta homología, identificar si dos variantes de un gen autosómico recesivo están localizadas en *cis* (mismo alelo) o en *trans* (diferente alelo), y alteraciones de la metilación (Figura 13). Como el NGS, el LRS puede aplicarse al genoma completo o puede usarse para una secuenciación dirigida de genes específicos o *loci* del ADN. Las dos principales plataformas usadas de LRS son Oxford Nanopore Technologies (ONT) y Pacific Biosciences (PacBio).

Respecto a la RP-PCR habitualmente usada para el análisis de las expansiones, el LRS permite identificar el tamaño preciso de expansiones largas, interrupciones puntuales dentro de expansiones en tándem, y analizar en paralelo varias regiones repetitivas de diferentes genes. Estas propiedades son de utilidad en el diagnóstico de la distrofia miotónica, y en el diagnóstico diferencial de la distrofia oculofaríngea y la miopatía oculofaríngea distal, por la posibilidad de analizar múltiples regiones repetitivas de varios genes a la vez relacionados con dicho fenotipo (204–208). Además, el LRS con plataforma ONT ha permitido identificar nuevas expansiones patogénicas de regiones en tándem de gran longitud, como la expansión del gen *PLIN4*, que por su naturaleza altamente repetitiva y gran tamaño es relativamente refractaria a técnicas de NGS (73,203).

Todas estas propiedades indican que esta nueva tecnología va a revolucionar el diagnóstico genético de las enfermedades hereditarias, incluyendo las miopatías. Como limitaciones, cabe destacar su coste elevado, aproximadamente 2-5 veces superior a las técnicas de NGS en la actualidad (209). Esto limita la accesibilidad de esta técnica y hace que en la actualidad esté todavía limitada a contextos de investigación, aunque su empleo va en aumento y ya se usa con secuenciación dirigida y complementaria a NGS en algunos entornos clínicos (209). La incorporación progresiva de esta tecnología previsiblemente aumentará la tasa diagnóstica de las miopatías hereditarias o miopatías genéticamente determinadas, simplificando el algoritmo diagnóstico y reduciendo el retraso diagnóstico, permitiendo además aumentar el conocimiento fisiopatológico de estas enfermedades (73,203).

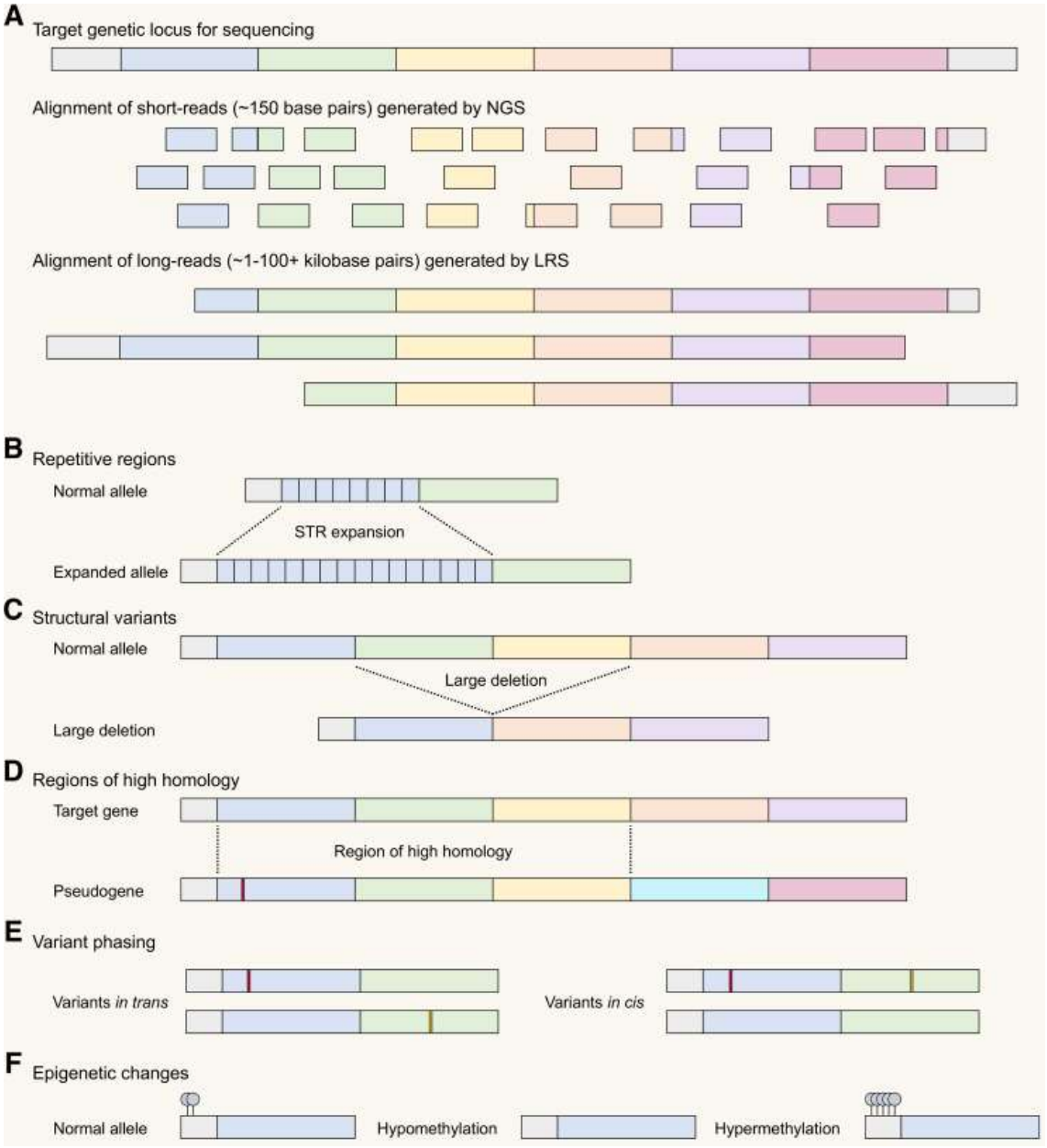
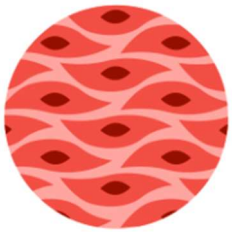


Figura 13. Comparación de la secuenciación con tecnología de lecturas cortas (NGS, *next-generation sequencing*) y de lecturas largas (LRS, *long-read sequencing*) para detectar variantes genéticas complejas. (A) Esquema que muestra la alineación de lecturas cortas generada por NGS y de lecturas largas generada por LRS. La longitud más larga de lecturas facilita la secuenciación de (B) expansiones de regiones repetitivas en tándem (STR, *short tandem repeat*) y (C) grandes variantes estructurales. En (D) se muestra como LRS permite la distinción de regiones genómicas que comparten regiones de alta homología, permitiendo detectar si una variante aparentemente patogénica (en rojo) está situada en el gen diana o en su pseudogen correspondiente. (E) La tecnología LRS permite determinar la fase de dos variantes relativamente distantes en un mismo gen, para establecer si están en *cis* o en *trans*, de interés en el contexto de enfermedades de herencia recesiva. Con la tecnología NGS, determinar la fase en variantes distantes requiere la segregación familiar de las mismas. (F) Además de las ventajas que suponen las lecturas largas, el LRS también facilita el análisis concomitante de cambios epigenéticos como la metilación del ADN. Figura extraída de Yeow *et al.* BMJ Neurol Open, 2025 (73).

1.7.6.5. Secuenciación de mRNA (RNAseq)

La tasa diagnóstica de las miopatías hereditarias puede aumentar hasta un 14.3 – 35% adicional añadiendo el análisis del transcriptoma mediante la secuenciación del mRNA (RNAseq) en músculo (210,211). El RNAseq permite identificar fenómenos de *splicing* aberrante, expresión aberrante y expresión monoalélica. En un estudio retrospectivo de 247 familias con enfermedad neuromuscular hereditaria, la tasa diagnóstica aislada del exoma fue del 34%, mientras que la integración con secuenciación de genoma y/o RNAseq aumentó la tasa hasta el 62% (212). En él demostraron que las variantes patogénicas de *splicing* aberrante son 9 veces más frecuentes que variantes patogénicas en nuevos genes (36% vs. <4% de las nuevas familias diagnosticadas, respectivamente). Por ello, el RNAseq tiene un gran potencial para diagnosticar miopatías hereditarias de forma complementaria a estudios de NGS, particularmente cuando existe gran sospecha clínica y anatomopatológica de defectos en un gen concreto.



HIPÓTESIS

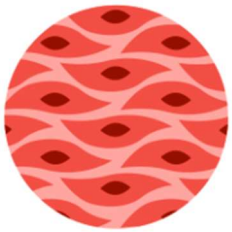
2. HIPÓTESIS

Hipótesis principal:

Las miopatías son un grupo de enfermedades muy infrecuentes y heterogéneas a nivel clínico, anatomopatológico y etiológico, lo que dificulta su diagnóstico. Una rigurosa caracterización clínica, radiológica, patológica y genética permite mejorar la tasa diagnóstica, ampliar el conocimiento fisiopatológico sobre las bases moleculares que las causan y potencialmente descubrir nuevos genes relacionados con miopatías hereditarias.

Hipótesis secundarias:

1. Existen miopatías hereditarias no filiadas de las cuales aún desconocemos el gen responsable.
2. Podemos mejorar la identificación del defecto genético de enfermedades musculares raras gracias a una caracterización rigurosa de los pacientes y familiares seguido de técnicas de secuenciación masiva (NGS) o de secuenciación de lecturas largas del ADN (LRS), con apoyo de estudios funcionales para demostrar la patogenicidad de las variantes genéticas identificadas.
3. Es posible que exista una susceptibilidad genética que desencadene una respuesta inmune contra la enzima HMGCR relacionada con genes de la vía de biosíntesis del colesterol, en los pacientes jóvenes con miopatía necrotizante inmunomediada asociada a anticuerpos anti-HMGCR, de curso crónico y sin exposición previa a estatinas.



OBJETIVOS

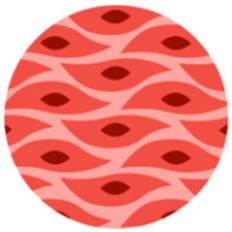
3. OBJETIVOS

Objetivo principal:

Identificar las bases moleculares de miopatías no filiadas genéticamente, ampliar el conocimiento clínico, radiológico y anatomopatológico de miopatías no descritas o poco conocidas, y establecer nuevas correlaciones genotipo-fenotipo de miopatías hereditarias o con predisposición genética.

Objetivos secundarios:

1. Describir las características clínicas, miopatológicas y de imagen muscular de pacientes afectos de enfermedades musculares no filiadas o recientemente descritas.
2. Aplicar técnicas moleculares avanzadas (NGS, LRS) y utilizar estudios de expresión proteica y estudios funcionales *in vitro* para confirmar la patogenicidad de variantes identificadas en genes nuevos.
3. Caracterizar las alteraciones miopatológicas en enfermedades musculares no descritas o recientemente descritas.
4. Realizar secuenciación de exoma dirigido a genes de la biosíntesis del colesterol y el análisis de haplotipo en una serie de pacientes jóvenes afectos de miopatía necrotizante inmunomediada con anticuerpos anti-HMGCR de curso crónico y sin exposición previa a estatinas, con el objetivo de identificar posibles variantes genéticas comunes o un HLA de riesgo que predispongan a la enfermedad.



COMPENDIO DE PUBLICACIONES

4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES

4.1. Primer trabajo

- **Título**: A homozygous *ATP2A2* variant alters sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase 2 function in skeletal muscle and causes a novel vacuolar myopathy

- Publicado en la revista *Neuropathology and Applied Neurobiology* en 2025 (Q1)

- Referencia bibliográfica:

  Llansó L, Ravenscroft G, Aceituno C, Gutiérrez A, Parmar J, Gallano P, Caballero-Ávila M, Carbayo Á, Vesperinas A, Collet R, Blanco R, Laing N, Hove-Madsen L, Gallardo E, Olivé M. *A Homozygous ATP2A2 Variant Alters Sarcoendoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase 2 Function in Skeletal Muscle and Causes a Novel Vacuolar Myopathy.* Neuropathol Appl Neurobiol. 2025 Feb;51(1):e70000. doi: 10.1111/nan.70000. PMID: 39817497.

Neuropathology and Applied Neurobiology

WILEY

Neuropathology and Applied Neurobiology
JOURNAL OF THE BRITISH NEUROPATHOLOGICAL SOCIETY

ORIGINAL ARTICLE

A Homozygous *ATP2A2* Variant Alters Sarcoendoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase 2 Function in Skeletal Muscle and Causes a Novel Vacuolar Myopathy

Laura Llansó[1,2] | Gianina Ravenscroft[3] | Cristina Aceituno[4,5] | Antonio Gutiérrez[6] | Jevin Parmar[3] | Pia Gallano[7,8] | Marta Caballero-Ávila[1,2] | Álvaro Carbayo[1,2] | Ana Vesperinas[1,2] | Roger Collet[1,2] | Rosa Blanco[1,8] | Nigel Laing[3] | Leif Hove-Madsen[4,5] | Eduard Gallardo[1,8] | Montse Olivé[1,2,8]

[1]Department of Neurology, Neuromuscular Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Barcelona, Spain | [2]Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain | [3]Harry Perkins Institute of Medical Research, and Centre for Medical Research, University of Western Australia, Perth, Australia | [4]Biomedical Research Institute Barcelona (IIBB-CSIC) and Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain | [5]Cardiovascular diseases, Biomedical Network Research Centre on Cardiovascular Diseases (CIBERCV), Madrid, Spain | [6]Department of Neurology, Hospital Insular de Gran Canaria, Islas Canarias, Spain | [7]Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Barcelona, Spain | [8]Neuromuscular diseases, Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain

Correspondence: Montse Olivé (molivep@santpau.cat)

Received: 23 May 2024 | **Revised:** 13 November 2024 | **Accepted:** 30 December 2024

Funding: This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III co-funded by ERDF/FEDER (Una manera de hacer Europa) under grant FIS PI21/01621 awarded to MO, and 'Fundación Isabel Gemio'. LL is supported by a Grífols-funded grant (Beca de formación en enfermedades neuromusculares Isabel Illa). Whole human genome sequencing for this study was provided by the Garvan Sequencing Platform at the Garvan Institute of Medical Research. GR is supported by an Australian National Health and Medical Research Council (NHMRC) EL2 Investigator Grant (APP2007769). This work was also supported by funding from the Australian NHMRC (APP2002640), and PID2020-116927RB-C21 to LH. LL, MC, AC, AV, RC, EG, and MO are members of the European Reference Network for Neuromuscular Diseases.

Keywords: *ATP2A2* | Darier disease (DD) | sarcotubular myopathy | sarcoendoplasmic reticulum (SR) | sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase (SERCA) | vacuolar myopathy | western blot (WB) | whole genome sequencing (WGS)

ABSTRACT

Aims: Sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase 2 (SERCA2), encoded by *ATP2A2*, is a key protein involved in intracellular Ca^{2+} homeostasis. The SERCA2a isoform is predominantly expressed in cardiomyocytes and type I myofibres. Variants in this gene are related to Darier disease, an autosomal dominant dermatologic disorder, but have never been linked to myopathy. We describe four patients suffering from a novel myopathy caused by a homozygous *missense* variant in *ATP2A2*.

Methods: We studied a family with four individuals suffering from an adult-onset skeletal myopathy. We evaluated the clinicopathological phenotype, muscle imaging, and genetic workup including whole genome sequencing and segregation analysis. SERCA2 expression in skeletal muscle was assessed. Functional studies to evaluate Ca^{2+} handling in patient myotubes in response to electrical stimulation or caffeine exposure were performed.

Results: Four sisters developed slowly progressive proximal weakness in adulthood. Biopsy findings showed small vacuoles restricted to type I myofibres. Ultrastructural analysis showed sarcotubular dilation and autophagic vacuoles. Genome sequencing revealed a homozygous variant in *ATP2A2* (c.1117G > A, p.(Glu373Lys)) which segregated with the disease. Immunohistochemistry suggested that there was SERCA2 mislocalisation in patient myofibres. Western blotting did not show changes in the amount of

Laura Llansó and Gianina Ravenscroft should be considered as first co-authors.

© 2025 British Neuropathological Society.

protein. In vitro functional studies revealed delayed sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} reuptake in patient myotubes, consistent with an altered pumping capacity of SERCA2 after cell stimulation.

Conclusions: We report a novel adult-onset vacuolar myopathy caused by a homozygous variant in *ATP2A2*. Biopsy findings and functional studies demonstrating an impaired function of SERCA2 and consequent Ca^{2+} dysregulation in slow-twitch skeletal myofibres highly support the pathogenicity of the variant.

Summary

- We describe a novel hereditary vacuolar myopathy due to a homozygous variant in *ATP2A2* (c.1117G > A, p.(Glu373Lys)) that encodes the sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase 2.
- SERCA2 is highly expressed in type I (slow-twitch) skeletal myofibres and cardiac tissue.
- To date, pathogenic variants in *ATP2A2* have been related to a skin disorder called Darier disease but never to primary skeletal muscle disease before.
- Muscle pathology in SERCA2-related myopathy is characteristic: vacuoles are exclusively located in type I fibres and are limited by membranes; some of them are autophagic; and T-tubule and sarcoplasmic reticulum (SR) dilation is distinctive.
- Segregation analyses and in vitro Ca^{2+} handling studies showing significantly delayed SR Ca^{2+} reuptake highly support the pathogenicity of the variant, which results in an impaired excitation-contraction coupling in skeletal muscle.

1 | Introduction

Sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPases (SERCA) are Ca^{2+} pumps located in the sarcoendoplasmic reticulum (SR) membrane. SERCA pumps are encoded by three genes in humans (*ATP2A1*, *ATP2A2* and *ATP2A3*) that generate multiple mRNA splice variants and 10 protein isoforms (SERCA1a,b; SERCA2a–c and SECA3a–f) [1–4]. Together with the highly related SERCA1 and SERCA3 isoforms encoded by *ATP2A1* and *ATP2A3*, respectively, SERCA2 belongs to the large family of P-type cation pumps that couple ATP hydrolysis with active Ca^{2+} transport across membranes. SERCA channels are 110-kDa transmembrane proteins that specifically maintain low cytosolic Ca^{2+} concentrations by actively transporting Ca^{2+} from the cytosol into the SR, having an important role in excitation-contraction coupling in muscle. Thus, they carry out a dual function by lowering cytosolic Ca^{2+} concentrations to allow muscle relaxation, and, by restoring Ca^{2+} stores in the SR, they allow subsequent myofibre contraction. The opposite function of Ca^{2+} release to the cytosol is performed by ryanodine receptors (RYR1 in skeletal muscle), also located in the SR membrane. The *ATP2A1–3* gene family is highly conserved among species, as SERCA pumps are present in all living organisms including plants, yeast, invertebrates and mammals [5]. Although the main function of SERCA is to control cytosolic Ca^{2+}, it also plays a vital role in other cellular functions including cell growth and differentiation in invertebrates, plants and yeast [6–8]. The main SERCA regulatory proteins are sarcolipin and phospholamban [9].

SERCA isoform levels depend on tissue-specific expression and alternative splicing; the abundance of these isoforms also changes during development and in normal ageing [1–4]. For instance, in human adults, SERCA1a is predominantly present in fast-twitch (type II) skeletal myofibres, while SERCA2a is found mostly in slow-twitch (type I) skeletal myofibres and myocardial tissue. SERCA2b is ubiquitously expressed in all tissues at low levels, including smooth muscle and skin, and SERCA3 isoforms are expressed in a variety of non-muscle cells [5, 10]. In addition, numerous studies of animal skeletal muscle have shown that extrinsic factors such as induced denervation or chronic low-frequency electrical stimulation influence the expression pattern of SERCA isoforms [11–14]. The ubiquitous SERCA2b isoform is the SERCA pump with the highest Ca^{2+} affinity but with a lower turnover rate of the pump, due to a 2b-tail that stabilises the E1 structural conformation of the protein with high-affinity Ca^{2+}-binding sites facing the cytoplasm [15].

To date, over 270 heterozygous pathogenic *ATP2A2* variants disrupting critical functional domains of SERCA2 have been associated with Darier disease (DD, OMIM 124200), a skin condition also called keratosis follicularis [16, 17]. DD is an autosomal dominant disease characterised by dysfunction in keratinocyte adhesion leading to hyperkeratotic papules in seborrheic areas, palmoplantar pits, and distinctive nail abnormalities. Ca^{2+} dysregulation, endoplasmic reticulum stress and abnormal protein folding leading to cellular apoptosis and acantholysis in keratinocytes are the main mechanisms described in DD pathophysiology [18–22].

On the other hand, biallelic variants in the *ATP2A1* gene cause Brody disease (OMIM 601003), a rare autosomal recessive myopathy characterised by exercise-induced muscle stiffness. Patients with Brody disease frequently have an athletic appearance and suffer from muscle cramps and generalised myalgia, with worsening symptoms upon exposure to cold temperatures. Nevertheless, they rarely develop muscle wasting or weakness [23–28].

While *ATP2A1* biallelic variants are linked to Brody disease, mutations in *ATP2A2* have never been reported to be causative of muscle disease, and DD is not associated with muscle weakness.

We herein report a family with four affected sisters suffering from progressive proximal muscle weakness associated with a homozygous missense pathogenic variant located in exon 9 of *ATP2A2*. We describe the clinical and myopathological phenotype and provide in vitro functional studies supporting the pathogenicity of the identified variant.

2 | Materials and Methods

2.1 | Patients

We have clinically characterised four affected siblings from a single family originating from the Canary Islands, Spain (Figure 1; II:1, II:2, II:3 and II:4). Patients presented with an autosomal recessive slowly progressive proximal myopathy. Symptom onset was variable between the third and fourth decades. We performed pedigree analysis, neurological examination, including muscle strength evaluation according to the Medical Research Council (MRC) grading scale, cardiac evaluation comprising ECG and cardiac ultrasound, serum CK levels from all affected individuals and EMG in individuals II:1 and II:3.

Sample collection was performed after written informed consent from the patients according to the Declaration of Helsinki.

2.2 | Muscle Biopsy

Muscle biopsy was performed in two affected individuals, from the left biceps brachii muscle in individual II:1 and the left quadriceps muscle in patient II:4. The samples were immediately frozen in liquid-cooled isopentane. Cryostat sections were processed for routine histological and histochemical techniques, and cholinesterase and acid phosphatase activity. In addition, muscle sections from individual II:1 were processed for SERCA2, SERCA1, RYR1, p62, LC3, caveolin-3, dystrophin, and dysferlin immunohistochemistry or immunofluorescence using standard procedures. In addition, SERCA2 western blot (WB) was performed on the sample from individual II:1 as previously described [29]. A summary of the antibodies used in the present study is provided in Tables S1 and S3. Finally, a small sample of muscle from individual II:1 was fixed in 2% glutaraldehyde, postfixed with 1% osmium tetroxide, and embedded in Araldite. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and viewed with a JEOL 1011 electron microscope.

2.3 | Muscle MRI

Whole-body muscle magnetic resonance imaging (MRI) was performed in 3 patients. The MRI protocol included T1-weighted (T1w), short-T1 inversion recovery (STIR), and T2-weighted (T2w) sequences.

2.4 | Molecular Genetics

The proband was initially tested for a panel that includes 137 genes associated with muscular dystrophies, congenital myopathies and congenital myasthenic syndromes with negative results. Subsequent clinical exome sequencing detected no candidate variants.

Whole genome sequencing (WGS) was performed at the Kinghorn Centre for Clinical Genetics, on genomic DNA isolated from all four affected sisters, the unaffected sister, and the unaffected parents. The Illumina DNA PCR-free library preparation kit is what was used for the library preparation and sequencing was performed using a S4 300 cycle flow cell on the NovaSeq 6000 sequencer.

WGS data processing was performed by the Centre for Population Genomics following the DRAGEN GATK best practices pipeline. Reads were aligned to the hg38 reference genome using Dragmap (v1.3.0). Cohort-wide joint calling of single nucleotide variants (SNVs) and small insertion/deletion (indel) variants was performed using GATK HaplotypeCaller (v4.2.6.1) with '—dragen-mode' enabled. Variants were annotated using VEP 105, and loaded into the web-based variant filtration platform, Seqr [30]. Sample sex and relatedness quality checks were performed using Somalier (v0.2.15) [31].

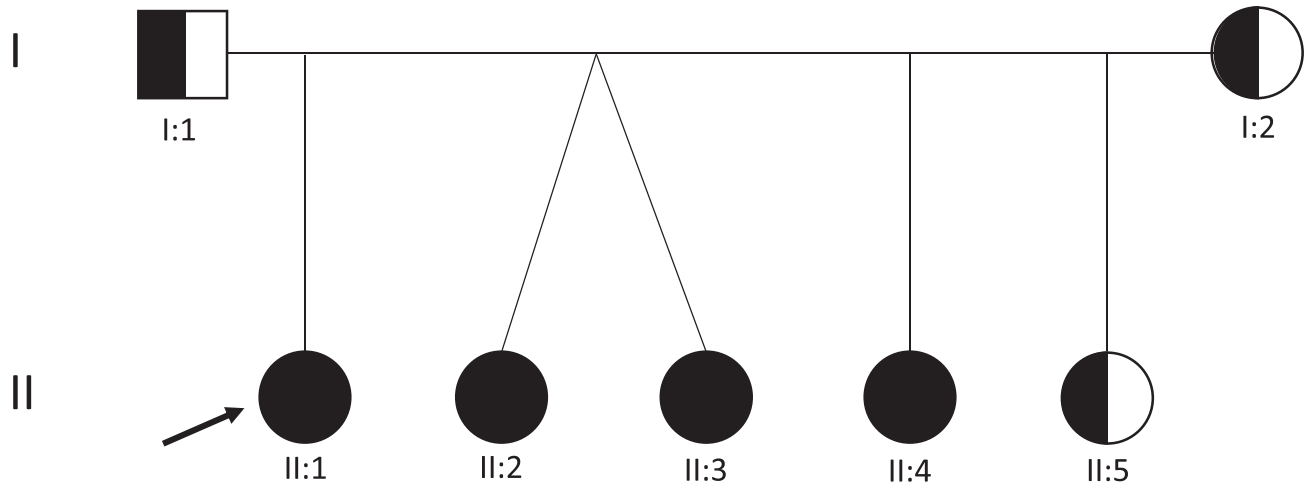


FIGURE 1 | Family pedigree with *ATP2A2* mutations causing a proximal vacuolar myopathy. Black symbols represent affected members who are homozygous for the variant p.(Glu373Lys). The black and white symbols represent unaffected members who are heterozygous carriers of the variant.

Within Seqr, variant curation was performed, running a filter for all recessive, rare (allele frequency < 0.001 in gnomAD and TOPMed) coding and likely coding changes (including extended splice region variants) with high call quality (genotype quality 20 and allele balance of 0.25).

2.5 | Multiple Sequence Alignment

To examine the conservation of the p.Glu373Lys substitution, multiple sequence alignment of SERCA2 orthologs was performed. SERCA2 protein sequences for each species were retrieved from the UniProt database (https://www.uniprot.org/) using their respective accession codes (Table S2). Alignments were performed using the default MAFFT algorithm in Jalview v2.11.3.2 (https://www.jalview.org/).

2.6 | Protein Structure Modelling and *in Silico* Mutagenesis

The experimentally determined protein structure of SERCA2 [32] was retrieved from the RCSB Protein Data Bank, Accession 5ZTF (https://www.rcsb.org/). The three-dimensional structure was visualised using PyMol v2.5.2 (https://pymol.org/2/). To investigate the effect of the variant on three-dimensional protein structure, *in silico* mutagenesis for the identified missense substitution was performed through the PyMol 'mutagenesis' function.

2.7 | Functional Studies to Assess Ca^{2+} Kinetics After Sarcolemmal Depolarization in Myoblasts and Myotubes

For cell culture studies, primary myoblasts from patient II:1's muscle were isolated, cultured and differentiated as previously described [33]. Briefly, we performed various cultures with increasing days of incubation with 15% FBS proliferation medium and with differentiation low serum medium (10–11 days of culture in total). To measure cytoplasmic Ca^{2+}, cell cultures were incubated with 2 μM Fluo-4 (Invitrogen) for 20 min at RT, followed by wash (twice) with a physiological buffer containing 132 mM NaCl, 0.33 mM NaH_2PO_4, 4 mM KCl, 4 mM $NaHCO_3$, 2 mM $CaCl_2$, 1.6 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 5 mM glucose and 5 mM pyruvic acid. pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Experiments were performed at room temperature. Images (256 × 256 pixels) were recorded with a resonance scanning confocal microscope Leica SP5 AOBS (Wetzlar, Germany) and a HCX PL APO CS 20.0 × 0.70 IMM objective at a frame rate of 52 images/s.

Electrical field stimulation (15 V, 2 ms square pulses) was used to elicit Ca^{2+} transients using a Hugo Sachs Elektronik stimulator type 223 (Harvard Apparatus). The stimulation frequency was increased stepwise by reducing the stimulation interval from 20 s to 10 s, 3 s, and 1 s. To measure Ca^{2+} release from the SR, cells were exposed transiently to 10 mM caffeine for 9 s. A custom-made algorithm was used to detect myotubes that responded to field stimulation or caffeine exposure and to determine the baseline, amplitude, time to peak, duration and decay of the Ca^{2+} signals as previously described [34].

3 | Results

3.1 | Clinical Phenotype

The proband is a 54-year-old woman (II:1) from a small town located in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. She was born from healthy, apparently unrelated parents from the same town. Symptom onset was at the age of 30 when she first noticed difficulty in doing squats. She was previously a sporty person and she did not have other medical issues. Pelvic weakness slowly progressed over time. Twenty years after the initial symptoms, she started having some difficulties raising her arms. Currently, she has difficulties climbing stairs and cannot run or jump. Despite her motor difficulties, she continues to perform exercise 5 times per week. She has three other affected sisters, twins aged 51 and a 49-year-old with similar symptoms, and a 36-year-old asymptomatic sister (Figure 1). The proband had a twin brother who died suddenly at 6 months of age.

On the proband's first evaluation at 54 years of age, her muscle strength on the MRC scale was 4−/5 for right shoulder abduction, 4/5 for left shoulder abduction, 4/5 for external arm rotation bilaterally, 4/5 for right and 4+/5 for left wrist extension, 4/5 for the finger extensors and short thumb abductors. The rest of the muscle groups in the upper limbs were preserved. In the lower limbs, muscle strength was 4/5 for right hip flexion, 4+/5 for left hip flexion, 4/5 for hip abduction, 4/5 for left knee flexion, 3/5 for foot dorsiflexion, 4/5 for foot plantar flexion; her strength was 5/5 in the rest of the muscles. She had mild atrophy in the right medial gastrocnemius, mild winged scapulae and bilateral ankle contractures. The glutei medii muscles were weaker than glutei maximus muscles, as was true in her affected sisters. Deep tendon reflexes were globally diminished. Sensation in all its modalities was intact. She had a Gowers sign when standing up from the chair and floor. She had a waddling gait when walking at a fast pace.

The twin sisters, despite being younger than the proband, were more severely affected. Details on the MRC scale from the proband and her twin sisters are available in Table S3. The onset of weakness in all sisters ranged from 23 to 40 years. None of them had facial, bulbar or respiratory weakness. None had skin lesions. None had previous episodes of malignant hyperthermia or muscle stiffness. Cardiac workup, including ECG and cardiac ultrasound, did not show any abnormality. Physical examination of the affected sisters revealed mild scapular winging and variable degrees of limb-girdle weakness, more pronounced in the lower limbs, with milder distal weakness affecting the anterolateral leg compartments and finger extensors of the forearms. They also had mild ankle contractures and calf atrophy. No axial weakness was detected.

3.2 | Laboratory and Electrodiagnostic Studies

The maximum CK level in the proband (II:1) was 900 IU/L, and in the other three affected sisters 533 IU/L (II:2), 900 IU/L (II:3) and 537 IU/L (II:4). Nerve conduction studies in patients II:1 and II:3 were normal. Needle electromyography showed myopathic changes with abundant spontaneous activity at rest in the upper

and lower limbs, as well as in paraspinal muscles. A dry blood spot screening for Pompe disease was negative.

3.3 | Muscle Pathology and Western Blotting

Muscle biopsy of individuals II:1 and II:4 showed increased variability in fibre size, increased number of internal nuclei and abundant small vacuoles exclusively located in type I (slow-twitch) muscle fibres. Some of the vacuoles appeared limited by a membrane as revealed with anticholinesterase histochemistry and with dystrophin, dysferlin, and caveolin-3 immunohistochemistry, suggesting they originated from the T-tubules. The sites occupied by the vacuoles were devoid of oxidative enzyme activity. Moreover, acid phosphatase enzyme activity and LC3 immunoreactivity were increased at the site of the vacuoles (Figure S1). ATPase activity revealed a mild type II myofibre predominance in individual II:1, similar to the healthy control biceps muscle [35, 36]. P62 immunoreactivity was observed at the site of vacuoles. Muscle biopsy findings are shown in Figure 2.

Ultrastructural analysis in the sample from individual II:1 revealed proliferation and dilatation of T-tubules, some of them leading to membrane-limited vacuoles containing membrane debris. There was sarcoplasmic reticulum proliferation with honeycomb-like structures and some autophagic vacuoles (Figure 3). Immunohistochemistry to assess SERCA2 expression and localization showed less protein abundance in the cytoplasm but increased immunoreactivity at the sarcolemma and the site of the vacuoles (Figure 4A,B). Western blot for SERCA2 did not show differences regarding the total amount or molecular weight of the protein in the patient compared with a healthy control (Figure 4E), suggesting an intracellular redistribution of the protein. SERCA1 expression in the same sample was no different from a control biceps muscle (Figure 4C,D). RYR1 immunofluorescence did not reveal different expression in patient muscle compared with control muscle (data not shown).

3.4 | Muscle MRI

Muscle MRI showed variable degrees of atrophy and fat replacement in pelvic and thigh muscles with a notable sparing and hypertrophy of adductor longus, gracilis and rectus femoris muscles in all patients. In the leg compartments, calf muscles were more affected than the anterior compartment muscles. Mild involvement of the scapular girdle was present in all sisters, mainly affecting deltoids, infraspinatus and subscapularis muscles. Thoracic and lumbar paravertebral muscles were also moderately involved. Whole-body T1w muscle images from three sisters are shown in Figure 5. Of note, mild asymmetry in strength evaluation (see Table S3) correlated with mild asymmetry observed in muscle MRIs of the patients (weaker right arm abduction with deltoid muscles in A and B, gluteus asymmetry in G, or weaker left knee flexion with hamstring muscles in J).

3.5 | Molecular Genetics

No candidate variants were identified after sequencing a panel of 137 myopathy-causative genes, nor after exome sequencing. Genome sequencing identified a homozygous missense variant in exon 9 of *ATP2A2* (c.1117G > A, p.(Glu373Lys)) in the four affected sisters. Sanger sequencing showed the youngest unaffected sister and both parents were heterozygous carriers of the same variant. *ATP2A2* displays missense constraint (Z = 7.02), and this variant is present once in gnomad v4 (allele frequency of 0.00000159).

3.6 | Protein Modelling

Multiple sequence alignments were performed for SERCA2 orthologs across nine species (Figure 6A), anchored to the human SERCA2 protein sequence. The identified missense substitution affects a highly conserved amino acid residue, conserved till fruit fly. The 'mutagenesis' function on PyMol was used to predict changes in SERCA2 protein structure and/or folding upon substituted amino acid residue incorporation into the sequence (Figure 6B). Both the wild-type glutamine and substituted lysine residues have side chains of similar length. However, the glutamine side chain is polar and uncharged, while the lysine residue is positively charged. Interestingly, amino acid substitution resulted in no changes to the polar contacts on either the side chain or protein backbone (Figure 6B).

3.7 | Functional Studies to Assess Ca^{2+} Kinetics After Sarcolemmal Depolarization in Myoblasts and Myotubes

In vitro functional studies were performed in patient myoblasts and myotubes to assess the kinetics of intracellular Ca^{2+} transport in response to electrical field stimulation or transient caffeine exposure. Myoblasts did not respond to field stimulation or caffeine exposure, neither from the patient nor from healthy controls (see Figure S2). In myotubes, functional studies revealed that Ca^{2+} reuptake into the SR was slower in those from the patient compared with healthy controls. Thus, when subjected to electrical field stimulation every 20 s, both the peak and baseline fluorescence were higher in myotubes from the patient compared with healthy controls. By contrast, the amplitude was smaller and the time to peak and the decay of the Ca^{2+} transient was slower in myotubes from the patient (Figure 7A). Moreover, when stimulated at increasingly shorter stimulation intervals, myotubes from the patient only responded to each stimulus with a stimulation interval of 20 s. At shorter intervals, the slow Ca^{2+} removal from the cytosol resulted in a tetanic response of the Ca^{2+} signal in most myotubes from the patient. Wilcoxon's rank-sum test showed that the numbers of tetanic responses at 20 s, 10 s, 3 s and 1 s were significantly higher in myotubes from the patient than in those from healthy controls ($p = 0.01$). Figure 7B shows the average Ca^{2+} signals from 10 control myotubes and 13 patient myotubes stimulated at 20 s, 10 s, 3 s and 1 s intervals. Figure 7C summarises the ability of myotubes to respond to the stimulation pulses at different pacing intervals and the fraction of myotubes exhibiting a tetanic response. Importantly, Ca^{2+} accumulation was not perturbed by the stimulation protocol as Ca^{2+} levels always returned to baseline when myotubes from the patient were left at rest before the next pacing interval (Figure S3).

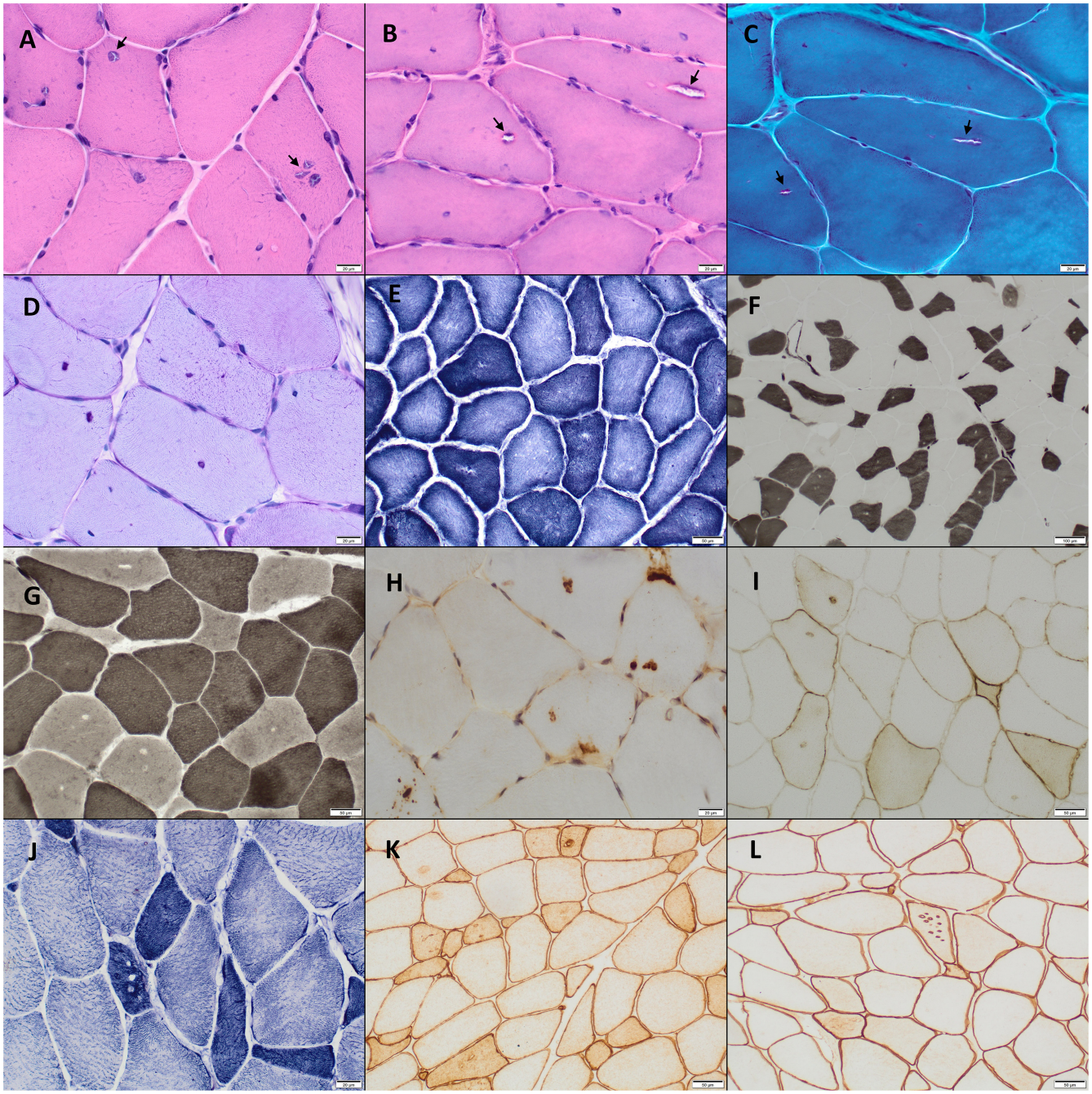


FIGURE 2 | Muscle biopsy findings. A-H: images from patient II:1 (proband). J-L: images from patient II:4. (A, B) Haematoxylin-eosin stain shows increased variability in myofibre size, increased numbers of internal nuclei, and single or multiple vacuoles (arrows) exclusively located in type I myofibres. Some vacuoles appear optically empty, and others are filled by granular basophilic material. (C) The vacuoles have a reddish appearance on the modified Gömöri stain. (D) PAS stain shows positivity inside some of the vacuoles, suggesting the presence of glycogen. (E, J) Oxidative enzyme activity is absent in the areas occupied by the vacuoles, as revealed with NADH reaction. (F) ATPase at pH 4.35 shows the presence of the vacuoles exclusively in type I (slow-twitch) myofibres. (G) Note the absence of vacuoles in type II myofibres shown by ATPase at pH 9.4. (H) p62 immunoreactivity is observed at the site of some vacuoles. (I) Cholinesterase activity is increased at the site of vacuoles. (K) Caveolin-3 and (L) dystrophin immunohistochemistry show some of the vacuoles limited by a membrane. Moreover, caveolin-3 appears to be more abundant in the cytoplasm of some myofibres.

To determine more directly the Ca^{2+} accumulating capacity of the SR in myotubes from the patient and healthy controls, myotubes were exposed to two consecutive caffeine pulses (which release the SR Ca^{2+} content into the cytosol) as outlined in Figure 8A. Analyses of the amplitude and decay of the caffeine-induced Ca^{2+} transients (Figure 8B) revealed that the amplitude of the Ca^{2+} transient elicited by the first caffeine exposure was significantly larger in patient myotubes than that in healthy controls, suggesting that myotubes from the patient have a greater Ca^{2+} storage capacity. By contrast, the decay of the Ca^{2+} transient during 10 s after the first caffeine pulse was almost negligible in the patient while myotubes from healthy controls were able to reduce the Ca^{2+} transient by 49 ± 8%, suggesting that the Ca^{2+} reuptake rate

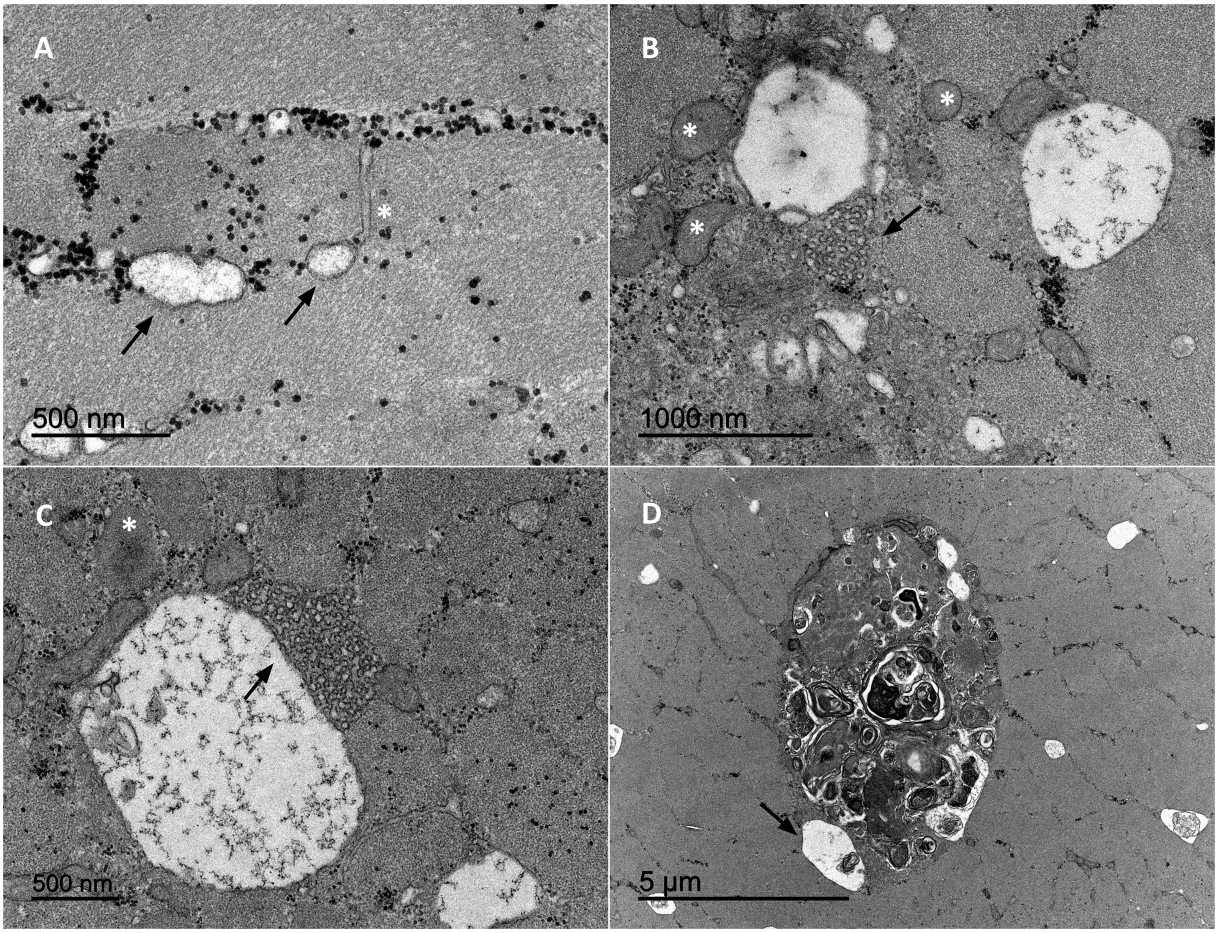


FIGURE 3 | Electron microscopy images. Ultrastructural analysis of the sample from individual II:1. Image (A) shows a T tubule (asterisk) next to membrane-bound vacuoles (arrows) and numerous glycogen granules. (B) Two large vacuoles, in combination with distended sarcoplasmic reticulum (asterisks), and honeycomb-like structures (arrow) corresponding to the proliferation of the tubular system. Similar findings are shown in image (C) at higher magnification. (D) A large autophagic vacuole containing myelin-like figures and residual bodies. Some clear vacuoles are seen at the periphery (arrow).

is strongly impaired in the patient myotubes. Consequently, the Ca^{2+} level after 10 s was dramatically higher in the patient than in healthy controls, explaining why most myotubes from the patient displayed a tetanic response when stimulated every 10 s, whereas myotubes from healthy controls did not produce a tetanic response to consecutive stimulation pulses (see Figure 7C). Moreover, the response of control myotubes to the caffeine pulses was consistent, while the response of myotubes from the patient was more heterogeneous with some displaying a very slow decay of the Ca^{2+} transient and lack of response to the second pulse while others showed a moderate decay of the first caffeine transient and a clear response to the second caffeine pulse (see Figure S4), explaining why 20% of the myotubes responded to all pulses when stimulated every 10 s and only 60% showed a clear tetanic response (see Figure 7C).

4 | Discussion

The present study reports a Spanish family with four individuals affected with a novel autosomal recessive proximal myopathy caused by a variant in *ATP2A2*, the gene which encodes the Ca^{2+} channel SERCA2. Despite no known consanguinity, the homozygous variant inherited in trans and the same geographical origin of both progenitors, a small town on a Canary Island, hints at possible consanguinity. The disease is clinically characterised by adult-onset proximal weakness affecting lower and upper limbs, moderately high CK levels, and absence of cardiac or skin involvement. Muscle biopsy revealed membrane-limited vacuoles only present in type I (slow-twitch) myofibres, where SERCA2a is enriched. Acid phosphatase activity and LC3 immunoreactivity were increased at the vacuoles, indicating they are autophagic. Under electron microscopy, dilatation of the tubular system, proliferation of SR and some autophagic vacuoles were characteristically seen. Immunohistochemistry of SERCA2 suggested a redistribution of the protein in patient myofibres whereas WB revealed normal protein levels.

The Ca^{2+} handling in vitro studies performed in patient myotubes demonstrated an impaired function of SERCA2 resulting in altered Ca^{2+} homeostasis, which is highly suggestive that the biallelic variant is pathogenic even though it does not have a protein destabilising effect and is not located in known important functional or structural domains of the protein. Based on the functional studies, we presume that the *ATP2A2* substitution

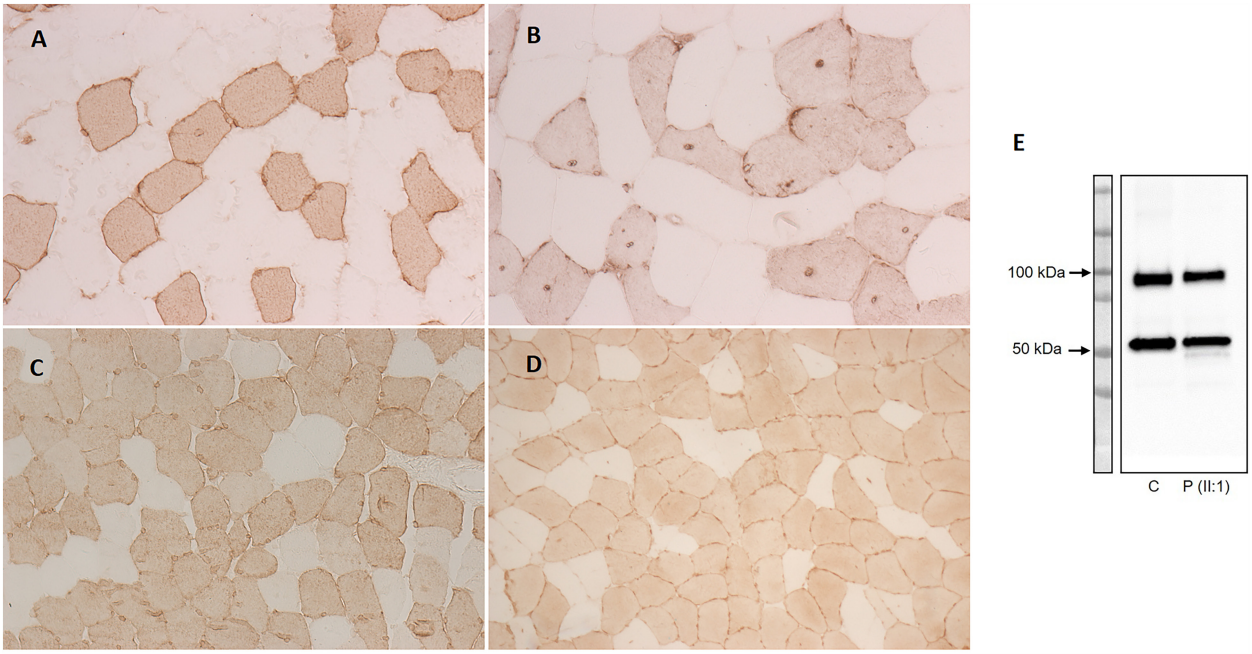


FIGURE 4 | SERCA2 and SERCA1 expression in patient muscle compared with healthy controls. The same type of muscle (biceps brachii) are compared. Immunohistochemical analysis for SERCA2 in control muscle (A) and patient II:1 muscle (B) reveals a less intense immunoreactivity at the cytoplasm and increased immunoreactivity at the site of the vacuoles and in some subsarcolemmal areas in patient type I myofibres, suggesting a redistribution of the protein. Immunohistochemistry for SERCA1 in control muscle (C) and patient muscle (D) shows a similar mosaic pattern of expression representing type II myofibres. Note the absence of vacuoles in D (type II myofibres) and the predominance of SERCA1-positive fibres both in the patient and the control muscle. (E) Western blotting for SERCA2 (~110 kDa) does not show differences regarding the total amount of protein or molecular weight, in patient muscle (P) compared with the control (C). Desmin (~54 kDa) was used as a muscle protein loading control. Images A, B and C are at 20× magnification. Image D is at 10× magnification. Antibody details and dilutions are described in Table S1.

causes dysfunction of the SERCA2a pump in skeletal muscle and leads to proximal vacuolar myopathy. Neither patient nor control myoblasts responded to electrical field stimulation or caffeine exposure, despite SERCA2 being expressed in human primary myoblasts in a much higher proportion than SERCA1, especially under our differentiating culture conditions (10^{-5} SERCA2 vs. 10^{-8} SERCA1 mRNA (AU) in 7-day culture) [37]. Even though the ion transport machinery is already expressed before myotube formation, the lack of response may be due to the excitation-contraction coupling complex not being sufficiently structurally developed in myoblasts because the junction of the SR, T-tubules and the sarcomere (also called the triad) takes place in a final phase of myofibril maturation [38]. In developing myotubes, SERCA2 expression is also much more abundant than SERCA1 (10^{-3} vs. 10^{-6} in 10-day culture) [37]. Thus, we can infer that the perturbed Ca^{2+} handling recorded in patient myotubes, compared with healthy controls, is likely due to the presence of mutant SERCA2 pumps.

This novel myopathy should be included in the group of disorders of excitation-contraction coupling and Ca^{2+} homeostasis abnormalities, to which several congenital myopathies belong [39, 40]. SERCA2 is critical for muscle relaxation to pump Ca^{2+} back into the SR after the closure of RYR1 channels. Our in vitro studies prove that cultured patient myotubes have increased cytosolic Ca^{2+} levels after repeated contractions, as happens in the gain-of-function *RYR1* mutations leading to 'leaky channels', which are generally linked to central core disease [41, 42]. Despite this similarity in resting Ca^{2+} concentrations, muscle pathology and phenotype are different in SERCA2-related myopathy compared with RYR1-related disease. Also, we did not find differences in RYR1 protein expression as a consequence of SERCA2 dysfunction.

Interestingly, despite SERCA2a expression in cardiac tissue, our patients did not have a cardiomyopathy. The medical record of the early sudden death of a brother is remarkable and may raise suspicion of a malignant arrhythmia, but detailed medical information is not available. The absence of objectifiable cardiomyopathy to date is surprising and should be explored in families with the same condition. Given that cardiac muscle expresses a higher amount of SERCA2a than slow-twitch skeletal myofibres [5], a possibility is that the pump's functional impairment may not sufficiently affect Ca^{2+} homeostasis in cardiomyocytes to cause cardiac dysfunction. Likewise, neither of the sisters had skin or nail abnormalities that could relate the myopathy with DD or represent a phenotypic overlap between DD and proximal myopathy. The clinical phenotype of pure skeletal myopathy and the findings reported here suggest the possibility that c.1117G > A variant only (or mainly) affects the synthesis and/or function of the isoform SERCA2a, which is expressed at higher levels in type I skeletal myofibres, while SERCA2b is widely expressed in other tissues including the skin. However, in our opinion, no genetic explanation can as yet support this hypothesis as the missense variant c.1117G > A is localised in exon 9 and the only difference between *ATP2A2* transcripts a and b is the 20th exon. A larger exon 20 leads to an extra 11th transmembrane domain in isoform 2b that forms the 2b-tail [43]. Another

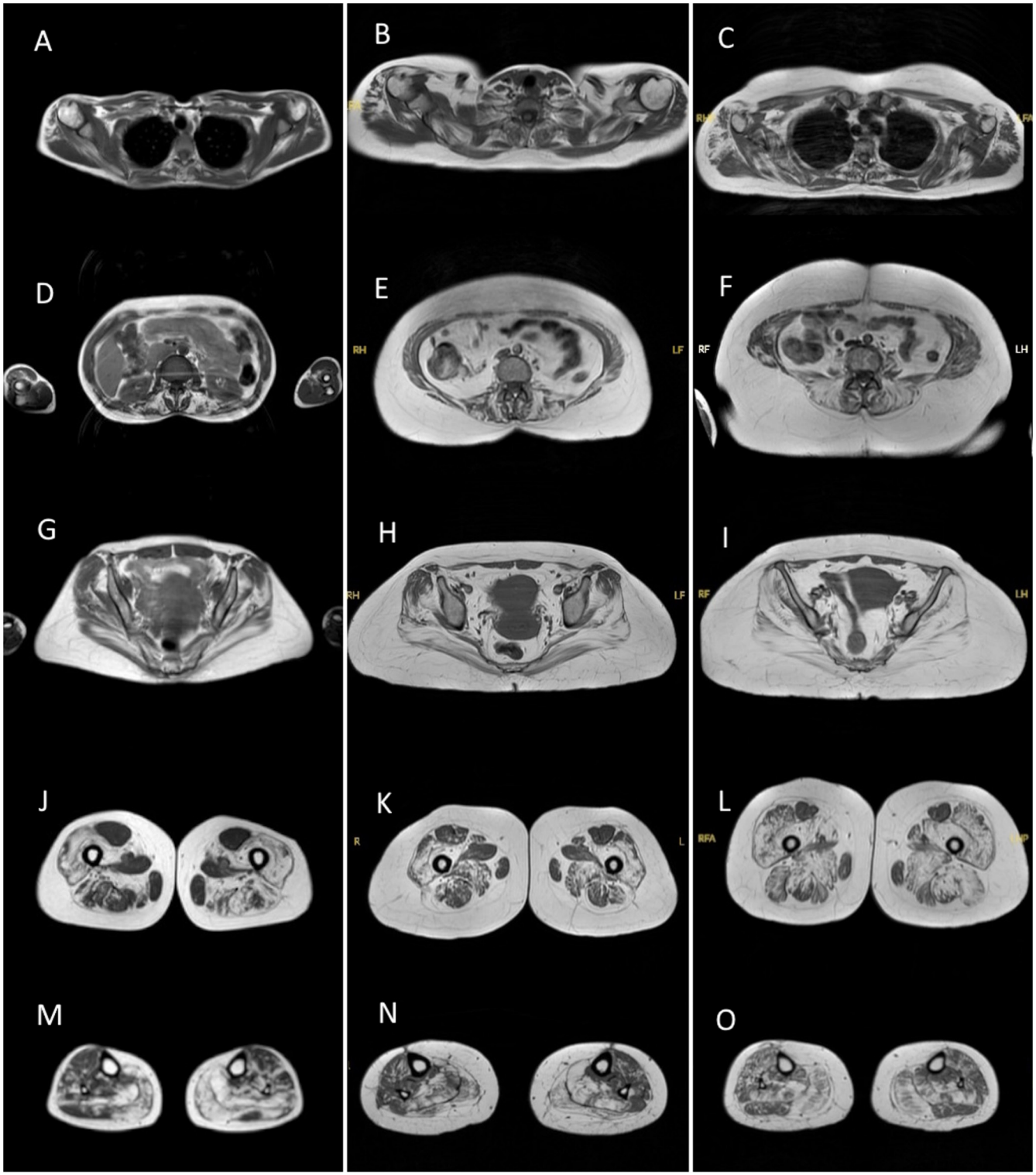


FIGURE 5 | **Whole-body muscle MRI from three patients.** T1-weighted images from patients II:1 (54 years old), II:2 and II:3 (51-year-old twins) are shown in each column revealing a similar pattern of muscle involvement. (A–C) Scapular girdle sequences show mild fat replacement mainly affecting deltoids, infraspinatus, and subscapularis muscles. (D–F) Thoracic and lumbar images show the involvement of paravertebral muscles in all siblings. (G–L) Moderate to severe degree of atrophy and fat replacement in pelvic and thigh muscles, predominantly in glutei, vasti muscles and posteromedial compartments. Note the remarkable sparing and hypertrophy of adductor longus, rectus femoris and gracilis muscles, present in all sisters. (M–O) At the leg level, calf muscles (soleus and gastrocnemii) are more affected than the anterolateral compartment. Finally, note the mild asymmetry of involvement present in some muscles (deltoids in A and B, glutei muscles in G and I, hamstring muscles in K and L, soleus in N, leg anterior compartment in O).

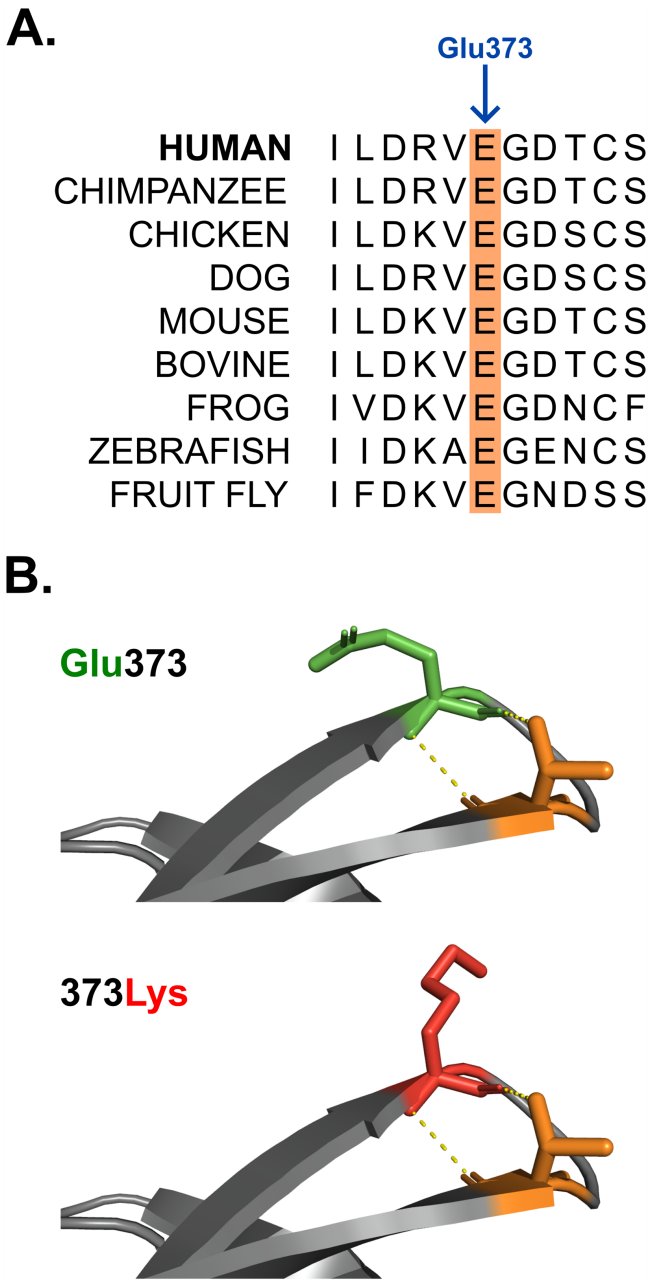


FIGURE 6 | *In silico* investigation of the *ATP2A2* p.Glu373Lys substitution. (A) Multiple sequence alignment of SERCA2 orthologs shows conservation of the identified variant in different species (E = glutamic acid). (B) The effect of the identified substitution on three-dimensional SERCA2 structure. The wild-type residue is coloured green and the mutant residue in red. Polar contacts with the Thr376 residue (orange) are shown with a yellow dotted line.

explanation of the absent skin involvement in our patients could be the physiologically slower Ca^{2+} transport rate of SERCA2b attributable to the 2b-tail, which seems to be beneficial for keratinocytes [15, 44]. A recent study of a Darier-causing variant proved that skin mutant cells exhibit lower Ca^{2+} affinity and a higher transport rate, leading to skin disease [45]; thus, it could be stated that the variant found in our study causes a decrease in the activity of both SERCA2 isoforms, but results in pathology only in skeletal myofibres, without pathological consequences in keratinocytes. Either way, the absence of cardiomyopathy should be further explored as cardiac muscle expresses the same SERCA pump.

Of the 270 variants in *ATP2A2* associated with DD, there are many missense variants in addition to essential splice site variants, frameshift and nonsense variants. This suggests that in DD a likely mechanism may be haploinsufficiency. *ATP2A2* is under loss-of-function constraint (pLI = 1, gnomAD) supporting the data from DD that haploinsufficiency is likely to be associated with disease. Given that SERCA2 protein abundance is not reduced in our patient skeletal muscle, this suggests that the mutant protein produced from the variant is likely behaving as a functional hypomorph, or via a toxic gain of function.

Sarcotubular myopathy resulting from variants in *TRIM32* [46–49] should be included in the differential diagnosis of the disease described here, due to its similar histological findings in mice and human muscle, including autophagic vacuoles and dilated sarcotubular structures. Variants in *TRIM32*, which encodes the Tripartite Motif-Containing Protein 32, cause an autosomal recessive muscular dystrophy called limb-girdle muscular dystrophy R8 or sarcotubular myopathy (LMGDR8/STM). TRIM32 is a multifunctional protein with an E3 ubiquitin ligase activity that regulates the degradation of many target proteins [50]. In mouse primary skeletal myotubes, TRIM32 participates in cellular Ca^{2+} transport by a ubiquitin-independent binding to SERCA1 via its NHL repeats, which enhances SERCA activity and increases the Ca^{2+} level in the SR [51]. This is a very interesting finding because it could link pathophysiological mechanisms triggering vacuole formation both in TRIM32 deficiency and SERCA2a functional deficiency. Also, SERCA pumps and TRIM32 may be correlated with each other via notch signalling in skeletal muscle [52–54]. Clinically comparable to the patients described in this study, patients with *TRIM32* variants normally develop progressive weakness of the lower limbs with no cardiac or respiratory symptoms.

Finally, a discussion of the clinical and histological differences with Brody disease (OMIM 601003) caused by an autosomal recessive deficiency of SERCA1 merits consideration. Brody's myopathy usually manifests in childhood and is characterised by exercise-induced muscle stiffness and myalgia, with no associated muscle weakness. As SERCA1 is only expressed in fast-twitch myofibres, muscle stiffness in Brody disease manifests as impaired relaxation after intense and phasic contractions. Notably, our patients with a homozygous *ATP2A2* variant do not have muscle stiffness, maybe because type II myofibres are healthy and patients can perform phasic and intense exercise normally. Regarding histopathology, the largest published cohort of Brody disease [28] showed selective atrophy of type II myofibres in 76% of the patients, while our muscle biopsies do not have selective atrophy of any myofibre type. Interestingly, vacuoles and sarcotubular dilatation have not been described in Brody myopathy biopsies. While SERCA1 immunohistochemistry shows reduced protein abundance in half of the samples of Brody disease (6/12), western blot is considered a more sensitive technique to assess SERCA1 expression since all tested patients (10/10) show a severe reduction or absence of the protein. This contrasts with our findings and suggests different genetic mechanisms underlying *ATP2A1*- and *ATP2A2*-related

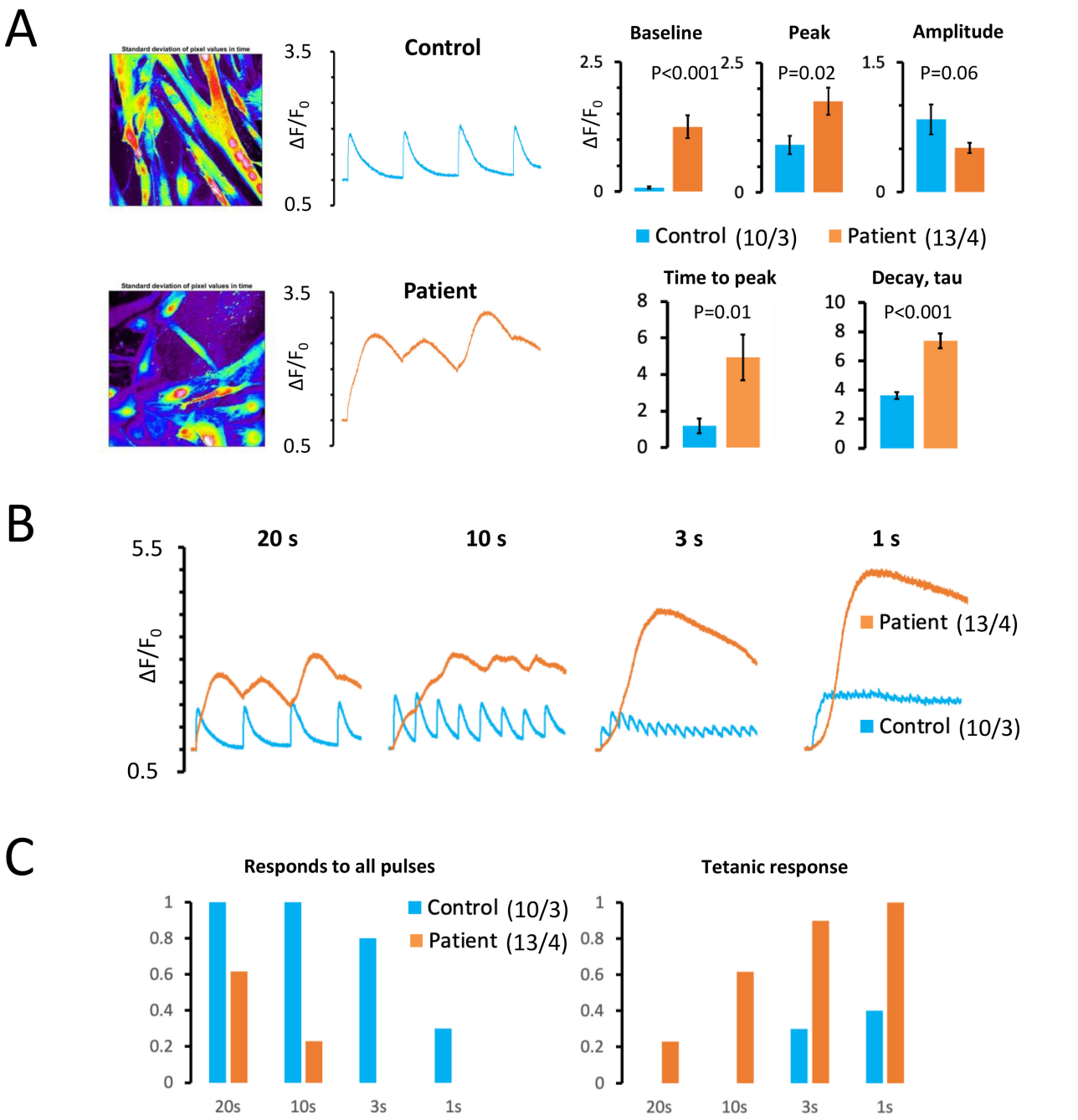


FIGURE 7 | Functional studies showing intracellular Ca^{2+} transients in patient's and control myotubes after electrical field stimulation. (A) Images of a field of myotubes from a control and the patient are shown on the left. Mean Ca^{2+} traces for 10 myotubes from healthy controls and 13 myotubes from the patient, subjected to electrical field stimulation at 20 s intervals, are shown in the centre and mean values for baseline Ca^{2+} and the peak, amplitude, time to peak and decay time constant (tau) of the Ca^{2+} transients are shown on the right. (B) Mean Ca^{2+} traces for myotubes from controls and the patient subjected to field stimulation at decreasing stimulation intervals. Numbers in parentheses indicate the number of myotubes and image fields analysed respectively. (C) The fraction of myotubes that responded to all stimulation pulses is shown on the left for the different stimulation intervals (given below bars), and the fraction of myotubes showing a tetanic response is shown on the right.

myopathies. SERCA activity in Brody has been assessed in four cases in which it was reduced, but a variety of techniques have been used that include total SERCA activity or whole muscle homogenates. Therefore, these studies on mature myofibres cannot distinguish between SERCA isoforms, unlike cultured myotubes which have enriched SERCA2 expression. Lastly, in vitro contraction tests performed in four Brody cases indicated positive results (delayed relaxation) after caffeine and halothane exposure suggesting increased cytosolic Ca^{2+} concentrations, similar to our experimental findings. Overall, clinical differences may be explained by the myofibre selective expression of the mutated SERCA isoforms, while aberrant Ca^{2+} handling seems a common feature of both diseases. On the other hand, myofibre vacuolization is remarkable in our reported pathology compared with the absence of vacuoles in Brody disease.

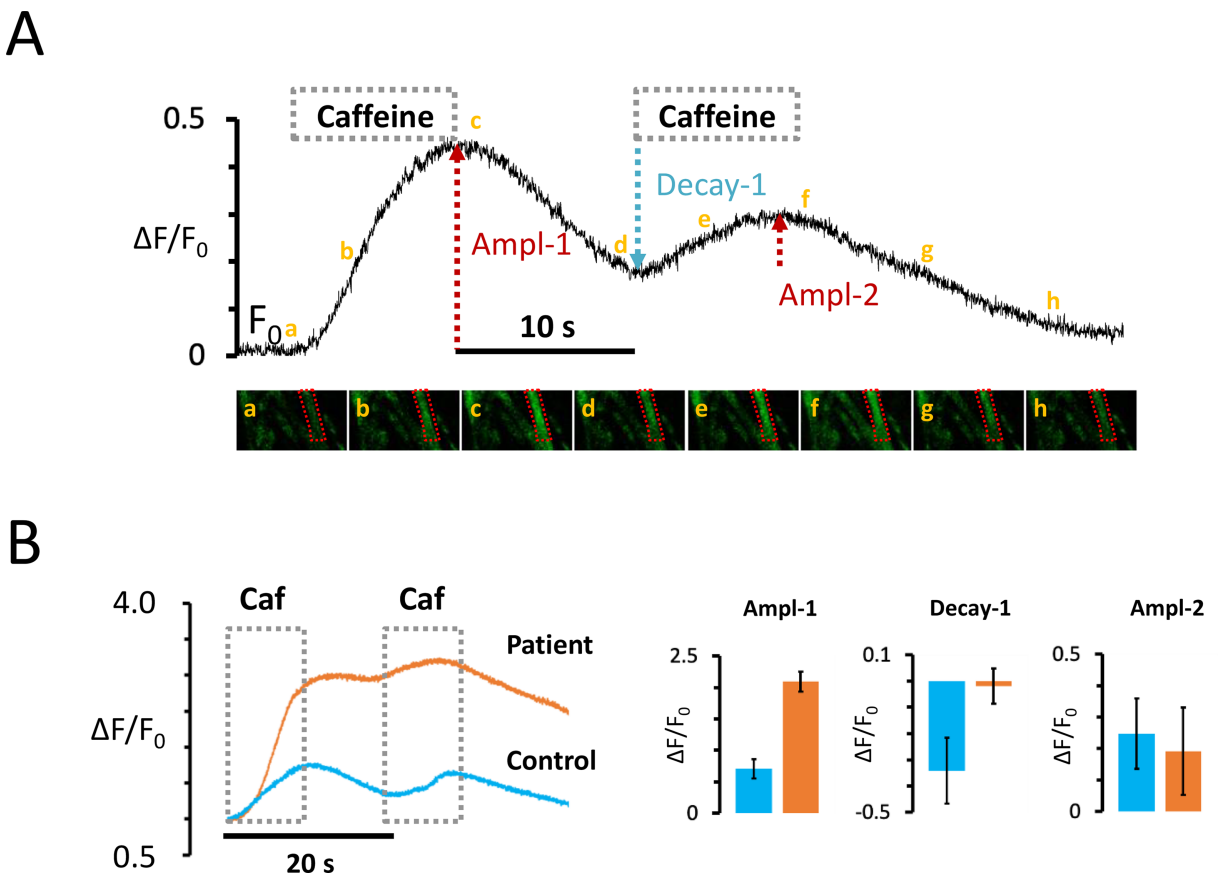


FIGURE 8 | Functional studies showing intracellular Ca^{2+} transients in patient's and control myotubes after caffeine exposure. (A) Representative Ca^{2+} recording from a control myotube subjected to two consecutive caffeine applications (indicated with grey boxes). The amplitude (Ampl-1) and decay (Decay-1) of the first caffeine-induced Ca^{2+} transient and the amplitude (Ampl-2) of the second transient were measured as indicated. (B) Mean Ca^{2+} traces for 10 myotubes from healthy controls and 13 myotubes from the patient are shown on the left. The mean amplitude and decay of the first transient as well as the amplitude of the second transient are shown on the right.

5 | Conclusions

We report a novel adult-onset autosomal recessive vacuolar myopathy caused by a homozygous variant in *ATP2A2*, characterised by limb-girdle weakness. Biopsy shows the presence of vacuoles restricted to type I myofibres, corresponding to dilatation and proliferation of the T-tubule system. Given that SERCA2 is abundant in type I myofibres and the muscle pathology is highly restrictive to these same myofibres, the variant found in *ATP2A2* is likely causative of the muscle disease in this family. Assessment of Ca^{2+} dynamics in vitro in cultured control and patient myotubes showed a clear reduction of the SERCA2 pumping capacity and higher resting Ca^{2+} levels in the patient myotubes, further supporting the pathogenicity of the biallelic c.1117G > A variant leading to an altered excitation-contraction coupling in skeletal muscle.

It remains to be seen whether other variants in *ATP2A2* also lead to a myopathic phenotype. We recommend this gene be included in genomic investigations in patients with myopathy, especially when the muscle pathology shows similar features to those described here. The identification of additional patients with SERCA2-related myopathy will clarify the genotype–phenotype correlations associated with *ATP2A2* variants.

Author Contributions

Conceptualization: M.O., G.R., E.G. and N.L. Methodology: M.O., G.R., C.A., J.P., E.G., L.H.M., L.L. and R.C. Investigation: M.O., G.R., L.H.M., C.A., A.G., E.G., L.L., C.A., P.G., J.P., R.C., M.C.A., A.C. and A.V. Funding acquisition: M.O. and G.R. Supervision: M.O., G.R., N.L. and E.G. Writing – original draft: L.L., G.R., L.H.M. and M.O. Writing–review and editing: M.O., G.R., N.L., L.H.M., E.G. and L.L. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgements

We are extremely grateful to all the family for the collaboration in this project. We further thank the electron microscopy core facility at the Universitat de Barcelona and the Department of Medicine at the Universitat Autònoma de Barcelona.

Ethics Statement

The study was approved by the ethics committees of the participating institutions.

Consent

Written consent to perform muscle biopsy and NGS studies were taken from the corresponding individuals, as well as consent for publication from the affected individuals.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Data Availability Statement

The data supporting the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

References

1. M. Arai, N. R. Alpert, D. H. MacLennan, P. Barton, and M. Periasamy, "Alterations in Sarcoplasmic Reticulum Gene Expression in Human Heart Failure. A Possible Mechanism for Alterations in Systolic and Diastolic Properties of the Failing Myocardium," *Circulation Research* 72, no. 2 (1993): 463–469.

2. C. J. Brandl, N. M. Green, B. Korczak, and D. H. MacLennan, "Two Ca^{2+} ATPase Genes: Homologies and Mechanistic Implications of Deduced Amino Acid Sequences," *Cell* 44, no. 4 (1986): 597–607.

3. C. J. Brandl, S. deLeon, D. R. Martin, and D. H. MacLennan, "Adult Forms of the Ca^{2+} ATPase of Sarcoplasmic Reticulum. Expression in Developing Skeletal Muscle," *Journal of Biological Chemistry* 262, no. 8 (1987): 3768–3774.

4. A. Hovnanian, "SERCA Pumps and Human Diseases," *Sub-Cellular Biochemistry* 45 (2007): 337–363.

5. M. Periasamy and A. Kalyanasundaram, "SERCA Pump Isoforms: Their Role in Calcium Transport and Disease," *Muscle & Nerve* 35, no. 4 (2007): 430–442.

6. R. R. Zwaal, K. Van Baelen, J. T. Groenen, et al., "The Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase Is Required for Development and Muscle Function in *Caenorhabditis elegans*," *Journal of Biological Chemistry* 276, no. 47 (2001): 43557–43563.

7. C. C. Subbaiah and M. M. Sachs, "Maize Cap1 Encodes a Novel SERCA-Type Calcium-ATPase With a Calmodulin-Binding Domain," *Journal of Biological Chemistry* 275, no. 28 (2000): 21678–21687.

8. E. G. Locke, M. Bonilla, L. Liang, Y. Takita, and K. W. Cunningham, "A Homolog of Voltage-Gated Ca(2+) Channels Stimulated by Depletion of Secretory Ca(2+) in Yeast," *Molecular and Cellular Biology* 20, no. 18 (2000): 6686–6694.

9. M. A. Valentim, A. N. Brahmbhatt, and A. R. Tupling, "Skeletal and Cardiac Muscle Calcium Transport Regulation in Health and Disease," *Bioscience Reports* 42, no. 12 (2022): 1–20.

10. D. H. MacLennan, C. J. Brandl, B. Korczak, and N. M. Green, "Amino-Acid Sequence of a Ca^{2+} + Mg^{2+}-dependent ATPase From Rabbit Muscle Sarcoplasmic Reticulum, Deduced From Its Complementary DNA Sequence," *Nature* 316, no. 6030 (1985): 696–700.

11. Z. Kaprielian, E. Bandman, and D. M. Fambrough, "Expression of Ca^{2+}-ATPase Isoforms in Denervated, Regenerating, and Dystrophic Chicken Skeletal Muscle," *Developmental Biology* 144, no. 1 (1991): 199–211.

12. N. Hämäläinen and D. Pette, "Myosin and SERCA Isoform Expression in Denervated Slow-Twitch Muscle of Euthyroid and Hyperthyroid Rabbits," *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 22, no. 5 (2001): 453–457.

13. C. Heilmann and D. Pette, "Molecular Transformations in Sarcoplasmic Reticulum of Fast-Twitch Muscle by Electro-Stimulation," *European Journal of Biochemistry* 93, no. 3 (1979): 437–446.

14. E. Leberer, K. T. Härtner, C. J. Brandl, et al., "Slow/Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase and Phospholamban mRNAs Are Expressed in Chronically Stimulated Rabbit Fast-Twitch Muscle," *European Journal of Biochemistry* 185, no. 1 (1989): 51–54.

15. I. Vandecaetsbeek, M. Trekels, M. De Maeyer, et al., "Structural Basis for the High Ca^{2+} Affinity of the Ubiquitous SERCA2b Ca^{2+} Pump," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, no. 44 (2009): 18533–18538.

16. R. G. L. Nellen, P. M. Steijlen, M. A. M. van Steensel, et al., "Mendelian Disorders of Cornification Caused by Defects in Intracellular Calcium Pumps: Mutation Update and Database for Variants in ATP2A2 and ATP2C1 Associated With Darier Disease and Hailey-Hailey Disease," *Human Mutation* 38, no. 4 (2017): 343–356.

17. E. Bachar-Wikström and J. D. Wikström, "Darier Disease – A Multi-Organ Condition?" *Acta Dermato-Venereologica* 101, no. 4 (2021): adv00430.

18. P. T. Leinonen, P. M. Hägg, S. Peltonen, et al., "Reevaluation of the Normal Epidermal Calcium Gradient, and Analysis of Calcium Levels and ATP Receptors in Hailey-Hailey and Darier Epidermis," *Journal of Investigative Dermatology* 129, no. 6 (2009 Jun): 1379–1387.

19. T. Onozuka, D. Sawamura, M. Goto, K. Yokota, and H. Shimizu, "Possible Role of Endoplasmic Reticulum Stress in the Pathogenesis of Darier's Disease," *Journal of Dermatological Science* 41, no. 3 (2006): 217–220.

20. Y. Wang, A. T. Bruce, C. Tu, et al., "Protein Aggregation of SERCA2 Mutants Associated With Darier Disease Elicits ER Stress and Apoptosis in Keratinocytes," *Journal of Cell Science* 124, no. Pt 21 (2011): 3568–3580.

21. M. Savignac, M. Simon, A. Edir, L. Guibbal, and A. Hovnanian, "SERCA2 Dysfunction in Darier Disease Causes Endoplasmic Reticulum Stress and Impaired Cell-To-Cell Adhesion Strength: Rescue by Miglustat," *Journal of Investigative Dermatology* 134, no. 7 (2014 Jul): 1961–1970.

22. T. Mauro, "Endoplasmic Reticulum Calcium, Stress, and Cell-to-Cell Adhesion," *Journal of Investigative Dermatology* 134, no. 7 (2014): 1800–1801.

23. I. A. Brody, "Muscle Contracture Induced by Exercise. A Syndrome Attributable to Decreased Relaxing Factor," *New England Journal of Medicine* 281, no. 4 (1969): 187–192.

24. G. Karpati, J. Charuk, S. Carpenter, C. Jablecki, and P. Holland, "Myopathy Caused by a Deficiency of Ca^{2+}–Adenosine Triphosphatase in Sarcoplasmic Reticulum (Brody's Disease)," *Annals of Neurology* 20, no. 1 (1986): 38–49.

25. A. Odermatt, K. Barton, V. K. Khanna, et al., "The Mutation of Pro789 to Leu Reduces the Activity of the Fast-Twitch Skeletal Muscle Sarco (Endo)plasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA1) and Is Associated With Brody Disease," *Human Genetics* 106, no. 5 (2000): 482–491.

26. A. Novelli, E. M. Valente, L. Bernardini, et al., "Autosomal Dominant Brody Disease Cosegregates With a Chromosomal (2;7)(p11.2;p12.1) Translocation in an Italian Family," *European Journal of Human Genetics* 12, no. 7 (2004): 579–583.

27. V. Guglielmi, G. Vattemi, F. Gualandi, et al., "SERCA1 Protein Expression in Muscle of Patients With Brody Disease and Brody Syndrome and in Cultured Human Muscle Fibers," *Molecular Genetics and Metabolism* 110, no. 1–2 (2013): 162–169.

28. J. P. Molenaar, J. I. Verhoeven, R. J. Rodenburg, et al., "Clinical, Morphological and Genetic Characterization of Brody Disease: An International Study of 40 Patients," *Brain* 143, no. 2 (2020): 452–466.

29. C. P. de Fuenmayor-Fernández de la Hoz, V. Lupo, L. Bermejo-Guerrero, et al., "Distal Hereditary Motor Neuronopathy as a New Phenotype Associated With Variants in BAG3," *Journal of Neurology* 271, no. 2 (2024): 986–994.

30. L. S. Pais, H. Snow, B. Weisburd, et al., "Seqr: A Web-Based Analysis and Collaboration Tool for Rare Disease Genomics," *Human Mutation* 43, no. 6 (2022): 698–707.

31. B. S. Pedersen, P. J. Bhetariya, J. Brown, et al., "Somalier: Rapid Relatedness Estimation for Cancer and Germline Studies Using Efficient Genome Sketches," *Genome Medicine* 12, no. 1 (2020): 62–70.

32. M. Inoue, N. Sakuta, S. Watanabe, et al., "Structural Basis of Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase 2b Regulation via Transmembrane Helix Interplay," *Cell Reports* 27, no. 4 (2019): 1221–1230.

33. A. Carrasco-Rozas, E. Fernández-Simón, X. Suárez-Calvet, et al., "BNIP3 Is Involved in Muscle Fiber Atrophy in Late-Onset Pompe Disease Patients," *American Journal of Pathology* 192, no. 8 (2022): 1151–1166.

34. C. E. Molina, A. Llach, A. Herraiz-Martínez, et al., "Prevention of Adenosine A2A Receptor Activation Diminishes Beat-to-Beat Alternation in Human Atrial Myocytes," *Basic Research in Cardiology* 111, no. 1 (2016): 5–19.

35. C. S. Klein, G. D. Marsh, R. J. Petrella, and C. L. Rice, "Muscle Fiber Number in the Biceps Brachii Muscle of Young and Old Men," *Muscle & Nerve* 28, no. 1 (2003): 62–68.

36. R. Dahmane, V. Valen, N. Knez, and I. Er, "Evaluation of the Ability to Make Non-Invasive Estimation of Muscle Contractile Properties on the Basis of the Muscle Belly Response," *Medical & Biological Engineering & Computing* 39, no. 1 (2001 Jan): 51–55.

37. V. Jan, K. Miš, N. Nikolic, et al., "Effect of Differentiation, de Novo Innervation, and Electrical Pulse Stimulation on mRNA and Protein Expression of Na+,K+-ATPase, FXYD1, and FXYD5 in Cultured Human Skeletal Muscle Cells," *PLoS ONE* 16, no. 2 (2021): e0247377.

38. B. E. Flucher, "Structural Analysis of Muscle Development: Transverse Tubules, Sarcoplasmic Reticulum, and the Triad," *Developmental Biology* 154, no. 2 (1992 Dec): 245–260.

39. D. Rossi, M. R. Catallo, E. Pierantozzi, and V. Sorrentino, "Mutations in Proteins Involved in E-C Coupling and SOCE and Congenital Myopathies," *Journal of General Physiology* 154, no. 9 (2022): 1–27.

40. H. Jungbluth, S. Treves, F. Zorzato, et al., "Congenital Myopathies: Disorders of Excitation-Contraction Coupling and Muscle Contraction," *Nature Reviews. Neurology* 14, no. 3 (2018): 151–167.

41. J. Tong, T. V. McCarthy, and D. H. MacLennan, "Measurement of Resting Cytosolic Ca^{2+} Concentrations and Ca^{2+} Store Size in HEK-293 Cells Transfected With Malignant Hyperthermia or Central Core Disease Mutant Ca^{2+} Release Channels," *Journal of Biological Chemistry* 274, no. 2 (1999): 693–702.

42. W. Chen, A. Koop, Y. Liu, et al., "Reduced Threshold for Store Overload-Induced Ca^{2+} Release Is a Common Defect of RyR1 Mutations Associated With Malignant Hyperthermia and Central Core Disease," *Biochemical Journal* 474, no. 16 (2017): 2749–2761.

43. I. U. S. Leong, A. Stuckey, T. Ahanian, M. Cederlöf, and J. D. Wikstrom, "Novel Mutations in Darier Disease and Association to Self-Reported Disease Severity," *PLoS ONE* 12, no. 10 (2017): e0186356.

44. S. L. Robia and H. S. Young, "Skin Cells Prefer a Slower Calcium Pump," *Journal of Biological Chemistry* 293, no. 11 (2018): 3890–3891.

45. S. A. Mikkelsen, P. Vangheluwe, and J. P. Andersen, "A Darier Disease Mutation Relieves Kinetic Constraints Imposed by the Tail of Sarco (Endo)plasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase 2b," *Journal of Biological Chemistry* 293, no. 11 (2018): 3880–3889.

46. F. Jerusalem, A. G. Engel, and M. R. Gomez, "Sarcotubular Myopathy. A Newly Recognized, Benign, Congenital, Familial Muscle Disease," *Neurology* 23, no. 9 (1973): 897–906.

47. P. Frosk, T. Weiler, E. Nylen, et al., "Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2H Associated With Mutation in TRIM32, a Putative E3-Ubiquitin-Ligase Gene," *American Journal of Human Genetics* 70, no. 3 (2002): 663–672.

48. B. G. H. Schoser, P. Frosk, A. G. Engel, U. Klutzny, H. Lochmüller, and K. Wrogemann, "Commonality of TRIM32 Mutation in Causing Sarcotubular Myopathy and LGMD2H," *Annals of Neurology* 57, no. 4 (2005): 591–595.

49. E. Servián-Morilla, M. Cabrera-Serrano, E. Rivas-Infante, et al., "Altered Myogenesis and Premature Senescence Underlie Human TRIM32-Related Myopathy," *Acta Neuropathologica Communications* 7, no. 1 (2019): 30–45.

50. S. Y. Jeong, J. H. Choi, J. Kim, J. S. Woo, and E. H. Lee, "Tripartite Motif-Containing Protein 32 (TRIM32): What Does It Do for Skeletal Muscle?" *Cells* 12, no. 16 (2023): 2104.

51. J. H. Choi, S. Y. Jeong, J. Kim, J. S. Woo, and E. H. Lee, "Tripartite Motif-Containing Protein 32 Regulates Ca^{2+} Movement in Skeletal Muscle," *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 323, no. 6 (2022): C1860–C1871.

52. M. Ntim, Q. F. Li, Y. Zhang, et al., "TRIM32 Deficiency Impairs Synaptic Plasticity by Excitatory-Inhibitory Imbalance via Notch Pathway," *Cerebral Cortex* 30, no. 8 (2020): 4617–4632.

53. G. Roti, A. Carlton, K. N. Ross, et al., "Complementary Genomic Screens Identify SERCA as a Therapeutic Target in NOTCH1 Mutated Cancer," *Cancer Cell* 23, no. 3 (2013): 390–405.

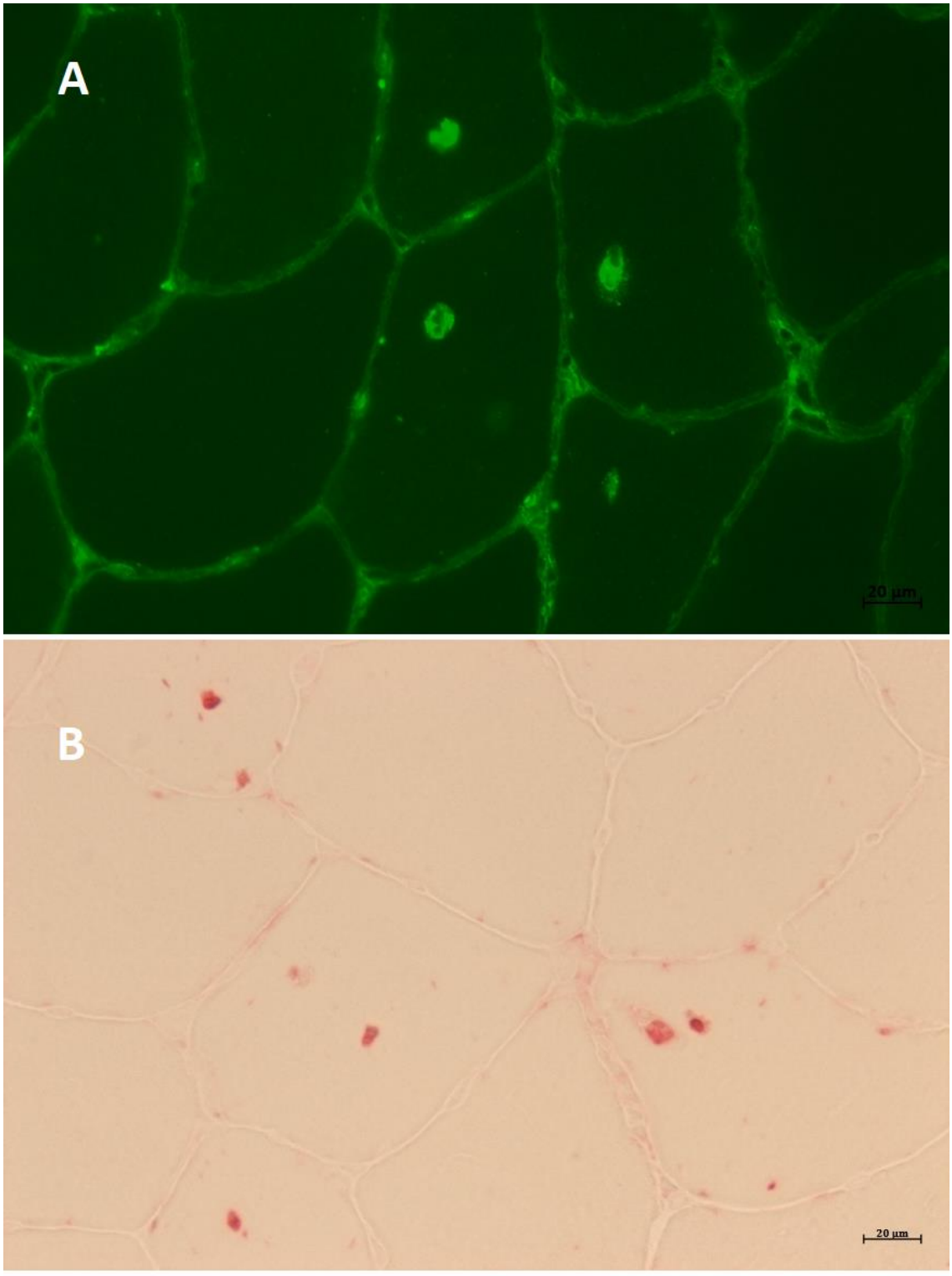
54. L. Pagliaro, M. Marchesini, and G. Roti, "Targeting Oncogenic Notch Signaling With SERCA Inhibitors," *Journal of Hematology & Oncology* 14, no. 1 (2021): 8–24.

Supporting Information

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section.

Supplementary figure S1

LC3 immunofluorescence (A) and acid phosphatase histochemistry (B) in sample from individual II:1 showing increased LC3 immunoreactivity and acid phosphatase enzyme activity in the sarcoplasm of some myofibers, corresponding to the location of the vacuoles.



Supplementary figures S2-S4

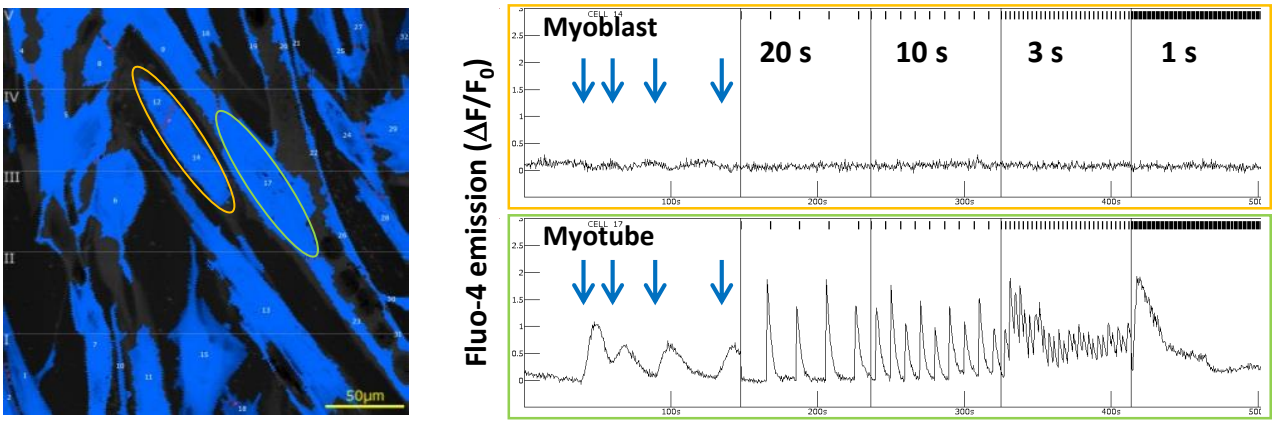


Figure S2. Representative calcium recordings from a myoblast (orange label) showing no response to caffeine (blue arrows) or electrical field stimulation; and a myotube (green label) showing a clear response to caffeine and field stimulation.

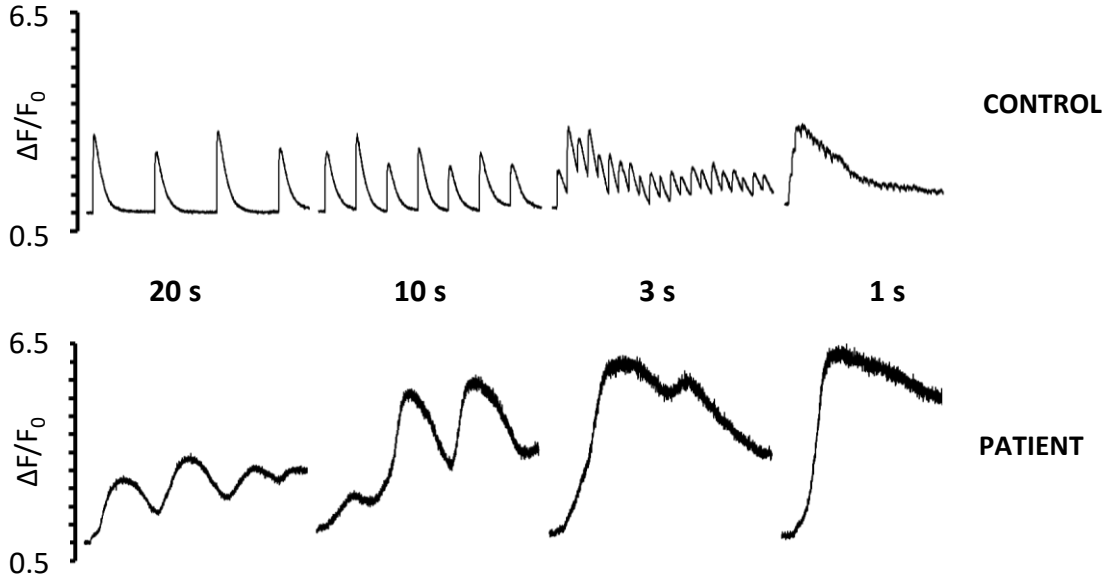


Figure S3. Calcium recordings from a control myotube (top) and a patient myotube subjected to field stimulation at 20s, 10s, 3s and 1s stimulation intervals. Myotubes were left at rest between each stimulation frequency to allow calcium levels to return to baseline before the next stimulation frequency.

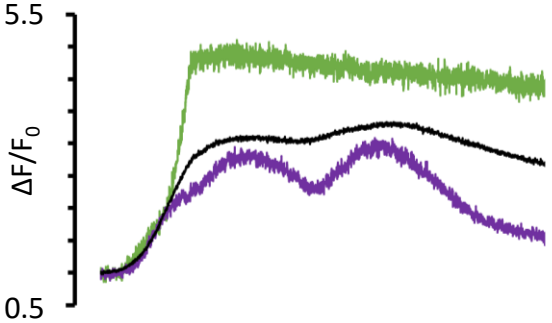


Figure S4. Representative calcium recordings from myotubes from the patient, subjected to two consecutive caffeine applications. Green and purple traces illustrates differences among myotubes and the black trace represents the average response of 13 myotubes from the patient.

Supplementary Table 1. Antibodies used in the present study.

Antigen/ Reference	Epitope	Host	Dilution (IH/IF)	Dilution (WB)	Manufacturer
SERCA2/ MA3-919	Monoclonal	Mouse	1:100	1:1000	Invitrogen
SERCA1/ MA3-912	Monoclonal	Mouse	1:100		Invitrogen
RYR1/ R129	Monoclonal	Mouse	1:1000		Sigma-Aldrich
P62/ BML-PW9860-0100	Polyclonal	Rabbit	1:200		Enzo Life Sciences
Dystrophin Carboxi/ DYS 2	Monoclonal	Mouse	1:100		Novocastra
Dystrophin Rod/ DYS 1	Monoclonal	Mouse	1:2		Novocastra
Caveolin-3/ 610421	Monoclonal	Mouse	1:20		BD Transduction
Dysferlin/ NCL-Hamlet	Monoclonal	Mouse	1:100		Novocastra
LC3B/ 2775	Polyclonal	Rabbit	1:150		Cell Signaling Technology

IH immunohistochemistry; **IF** immunofluorescence; **WB** western blot.

Supplementary Table 2. UniProt accession codes used for Multiple Sequence Alignment of SERCA2 orthologs.

Protein Sequence	Corresponding gene name	Animal species	Accession code	Uniprot review status
HUMAN	*ATP2A2*	*Homo sapiens*	P16615	Reviewed
CHIMPANZEE	*ATP2A2*	*Pan troglodytes*	K7BZQ7	Unreviewed
MOUSE	*Atp2a2*	*Mus musculus*	O55143	Reviewed
BOVINE	*ATP2A2*	*Bos taurus*	F1MPR3	Unreviewed
DOG	*ATP2A2*	*Canis lupus familiaris*	O46674	Reviewed
CHICKEN	*ATP2A2*	*Gallus gallus*	Q03669	Reviewed
FROG	atp2a2	*Xenopus tropicalis*	A0A6I8SKA5	Unreviewed
ZEBRAFISH	atp2a2b	*Danio rerio*	Q6ZM60	Unreviewed
FRUIT FLY	*SERCA*	*Drosophila melanogaster*	P22700	Reviewed

Supplementary Table T3. Muscle strength evaluation from the proband and twin sisters according to Medical Research Council (MRC) grading scale. R: right. L: left. Empty boxes were not evaluated.

	Patient II:1		**Patient II:2**		**Patient II:3**	
Upper limbs examination	R	L	R	L	R	L
Neck flexion	5	5				
Neck extension	5	5				
Shoulder abduction	4-	4	4	5	4	4
Elbow flexion	5	5	5	5	5	5
Elbow extension	5	5	5	5	5	5
External arm rotation	4	4	4	4	4	4
Internal arm rotation	5	5	5	5	5	5
Wrist extension	4	4+	5	5	5	5
Wrist flexion	5	5	5	5	5	5
Finger extensors	4	4	4	4	4	4
Finger flexors	5	5	5	5	5	5
Short thumb abductor	4	4	4	4	5	5
Interossei muscles	5	5	5	5	5	5
Lower limbs examination	R	L	R	L	R	L
Hip flexion	4	4+	4	4	4	4
Hip abduction	4	4	5	5		
Gluteus maximus	4+	4-	3	4	3-	3-
Gluteus medius	3	3	3	3	2	2
Hip adduction	5	5	5	5	5	5
Knee flexion	5	4	5	5	5	5
Knee extension	5	5	4+	4+	5	5
Foot dorsiflexion	3	3	4	3	4	4
Foot plantar flexion	4	4	5	5	5	5

4.2. Segundo trabajo

- **Título**: Repeat expansions in *PLIN4* cause autosomal dominant vacuolar myopathy with sarcolemmal features

- Publicado en la revista *Annals of Clinical and Translational Neurology* en 2025 (Q1)

- Referencia bibliográfica:

  Llansó L, Stevanovski I, Morís G, Collet-Vidiella R, Segarra-Casas A, González-Quereda L, Rodríguez-Santiago B, Gallano P, Alvarez R, Vesperinas A, Blanco R, San-Millán B, Navarro C, Illa I, Ravenscroft G, Deveson IW, Gallardo E, Olivé M. *Repeat Expansions in PLIN4 Cause Autosomal Dominant Vacuolar Myopathy With Sarcolemmal Features*. Ann Clin Transl Neurol. 2025 Oct;12(10):2136-2151. doi: 10.1002/acn3.70146. Epub 2025 Jul 22. PMID: 40693562.

Annals of Clinical and Translational Neurology

RESEARCH ARTICLE OPEN ACCESS

Repeat Expansions in *PLIN4* Cause Autosomal Dominant Vacuolar Myopathy With Sarcolemmal Features

Laura Llansó[1,2,3,4] | Igor Stevanovski[5,6,7] | Germán Morís[8] | Roger Collet-Vidiella[1,2,3,4] | Alba Segarra-Casas[3,4,9,10] | Lidia González-Quereda[3,4,9] | Benjamín Rodríguez-Santiago[3,4,9] | Pia Gallano[3,4,9] | Rodrigo Alvarez[11] | Ana Vesperinas[1,2,3,4] | Rosa Blanco[3,4] | Beatriz San-Millán[12] | Carmen Navarro[12] | Isabel Illa[1,2,†] | Gianina Ravenscroft[13] | Ira W. Deveson[5,6,7,14] | Eduard Gallardo[1,2,3,4] | Montse Olivé[1,2,3,4]

[1]Department of Neurology, Neuromuscular Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain | [2]Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain | [3]Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Barcelona, Spain | [4]Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain | [5]Genomics Pillar, Garvan Institute of Medical Research, Sydney, New South Wales, Australia | [6]Centre for Population Genomics, Garvan Institute of Medical Research, Sydney, New South Wales, Australia | [7]Murdoch Children's Research Institute, Melbourne, Victoria, Australia | [8]Department of Neurology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain | [9]Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain | [10]Genetics and Microbiology Department, Universitat Autonòma de Barcelona, Bellaterra, Spain | [11]Department of Neurology, Neuromuscular Diseases Unit, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain | [12]Department of Pathology, Complejo Hospitalario Universitario, Vigo, Spain | [13]Harry Perkins Institute of Medical Research, University of Western Australia, Perth, Western Australia, Australia | [14]St Vincent's Clinical School, Faculty of Medicine, University of New South Wales, Sydney, New South Wales, Australia

Correspondence: Eduard Gallardo (egallardo@santpau.cat) | Montse Olivé (molivep@santpau.cat)

Received: 22 April 2025 | **Revised:** 1 July 2025 | **Accepted:** 2 July 2025

Funding: Instituto de Salud Carlos III co-funded by ERDF/FEDER (Una manera de hacer Europa) under grant FIS PI21/01621 awarded to M.O.; FIS PI18/01585 (L.G.-Q., P.G.) and PI22/01859 (L.G.-Q.); SGR-Cat 2021 (AGAUR-Generalitat de Catalunya) through the project "Genomic medicine and rare diseases group" (2021-SGR-00835, 2023–2025, A.S.-C., B.R.-S., P.G., L.G.-Q.); Australian Medical Research Futures Fund (MRFF) Investigator Grant MRF1173594 (to I.W.D.), philanthropic support from The Kinghorn Foundation (to I.W.D.), and Fundación Isabel Gemio. L.L. is supported by a Grífols-funded grant (Beca de formación en enfermedades neuromusculares Isabel Illa). A.S.-C. is supported by the Ministerio de Universidades (Spain) (FPU20/06692). G.R. is supported by an Australian NHMRC Investigator Grant (APP2007769).

Keywords: AVSF | perilipin 4 | PLIN4 | sarcolemmal features | vacuolar myopathy

ABSTRACT

Objective: We aim to describe and characterize two unrelated Spanish families suffering from an autosomal dominant autophagic vacuolar myopathy caused by repeat expansions in *PLIN4*.

Methods: We evaluated the clinical phenotype and muscle imaging, and performed a genetic workup that included exome sequencing, muscle RNAseq, and long-read genome sequencing. Muscle pathology was assessed by means of histochemistry, electron microscopy, PLIN4, p62, LC3, and NBR1 immunofluorescence and/or western blotting. Detailed characterization of autophagic vacuoles was performed.

Results: Patients presented around the age of 30 with mild proximal weakness followed by prominent distal weakness in lower legs, eventually spreading to other muscle groups. Muscle biopsies showed unique pathological features characterized by numerous rimmed vacuoles that displayed sarcolemmal features and were located beneath the sarcolemma and within the cytoplasm. Ultrastructural studies showed autophagic vacuoles, replications, and loops of the basal lamina and tubulofilamentous sarcoplasmic inclusions. p62 and NBR1 co-localized with PLIN4 at the sarcolemma and vacuoles. LC3 immunoreactivity and other

Laura Llansó and Igor Stevanovski contributed equally to the work. †Deceased.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2025 The Author(s). *Annals of Clinical and Translational Neurology* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of American Neurological Association.

lysosomal markers were increased at the vacuoles. Targeted long-read sequencing of *PLIN4* in affected individuals revealed a single expanded allele of 39×99 bp repeats in family 1 and of 37×99 bp repeats in family 2.

Interpretation: We characterize two new families suffering from an autosomal dominant myopathy carrying repeat expansions in *PLIN4*. Subsarcolemmal p62 expression is a powerful although nonspecific marker of this disease. No correlation between the size of the expansion and clinical severity can be clearly established. *PLIN4* expansions should be considered in the diagnosis of autosomal dominant vacuolar myopathies, especially when sarcolemmal features are present.

1 | Introduction

Distal myopathies are a group of inherited muscle disorders clinically characterized by progressive muscular weakness and atrophy initially involving the hands, forearm, lower legs, or feet. These highly heterogeneous conditions are classified on the basis of age at onset, distribution of muscle weakness, histopathological features, and mode of inheritance. Autosomal dominant, autosomal recessive, and rare X-linked forms have been reported [1]. The first description of a distal myopathy was by Lisa Welander in 1914 in a cohort of Swedish and Finnish patients affected by adult-onset, distal upper-limb weakness and wasting slowly progressing over time, mainly affecting finger extensor muscles. The causative gene, named *TIA1*, was not identified until 2013 [2]. Since the description by Welander, more than 29 different forms of distal myopathy have been identified, and the number of genetic distal myopathies is expected to grow with the use of next-generation sequencing technologies [3].

In 2004, Di Blasi et al. described a large Italian kindred affected by an autosomal dominant distal myopathy with rimmed vacuoles displaying a characteristic expression of ubiquitin at the cell surface and lysosomal markers in the cytoplasm [4]. By linkage analysis, the disease was initially mapped to a locus in 19p13.3 with a LOD score of >3. Despite an exhaustive genetic workup, the causative gene in this family remained unsolved for decades. In 2020, by using a multiomic approach combining laser microdissection and mass spectrometry of vacuolated compared to nonvacuolated myofibers, Ruggieri and colleagues identified increased abundance of perilipin 4 at the site of the vacuoles and subsarcolemmal regions of patients' muscle biopsies. DNA analysis of the gene *PLIN4* using long-read sequencing (Oxford Nanopore Technology, ONT) revealed a heterozygous expansion in exon 3 of 40 repeats of the well-conserved 99-nucleotide or 99-mer repeat sequence (40×99 bp) encoding the amphipathic domain of perilipin 4, compared to the normal 31×99 bp sequence present in healthy subjects [5].

More recently, other groups in China described three additional families and one sporadic case with an autosomal dominant vacuolar myopathy that harbor the same or other 99-mer repeat expansions (40×, 50× and 39×99 bp, respectively) in *PLIN4*, presenting with proximal rather than distal weakness [6, 7]. In all cases, muscle pathology was distinctive, showing autophagy and ubiquitinated-protein markers (p62, FK2, NBR1) in the subsarcolemmal area and at the site of the vacuoles, which perfectly co-localized with perilipin 4, especially in type I myofibers. Additional immunohistochemical studies performed by Wang et al. described diffuse MHC-I expression and membrane attack complex (MAC) deposition in isolated myofibers of three available biopsies. Interestingly, despite perilipin 4 being known to localize to lipid droplets (LD), all the reports of muscle pathology in PLIN4 myopathy do not show intracellular lipid deposition [5–7].

Perilipins are a family of proteins that coat the surface of LD and are tissue-specifically expressed. PLIN4 is known to localize to LD in human and yeast cells, and endogenous PLIN4 has been detected mainly, but not exclusively, in adipocytes at the cell periphery and LD [8–10]. The 99-mer sequence expanded in the disease is highly conserved, and the encoded amphipathic helix or domain of perilipin 4 is exceptional in terms of its length and repetitiveness compared to other perilipins. Its main role in adipose tissue is storing triacylglycerol and controlling lipolysis by responding to hormonal signals [9, 11, 12]. In human skeletal muscle, the most highly expressed perilipin is PLIN4, which mainly localizes to the subsarcolemmal region of type 1 myofibers corresponding to subsarcolemmal LD binding [13].

Here, we aim to report and characterize in detail the clinical, pathological, and genetic features of two unrelated Spanish families suffering from an autosomal dominant myopathy carrying different 99-mer repeat expansions in *PLIN4*. In addition, we performed a literature review of all the published families to date. After a deep muscle pathology evaluation, we characterize the disease as a member of autophagic vacuolar myopathies with sarcolemmal features (AVSF).

2 | Methods

2.1 | Patients

We studied three patients from two unrelated Spanish families suffering from an autosomal dominant predominantly distal myopathy with rimmed vacuoles. We performed pedigree analysis (Figure 1), neurological examination including muscle strength evaluation according to the Medical Research Council (MRC) grading scale, serum creatine kinase (CK) levels, cardiac evaluation including EKG, 24-h Holter monitoring and cardiac ultrasound, respiratory function tests, sensory and motor nerve conduction studies and electromyography, and genetic workup in the probands of both families and additional family members. Muscle biopsy was obtained from individuals F1 III:4 and F2 IV:1. Clinical data from seven additional individuals (F1 I:2, II:3, II:4; and F2 II:1, II:4, II:5, and III:5) were retrospectively collected from medical reports or from information obtained from their relatives. The study was approved by the ethics committees of the participating institutions. Sample collection was performed after written

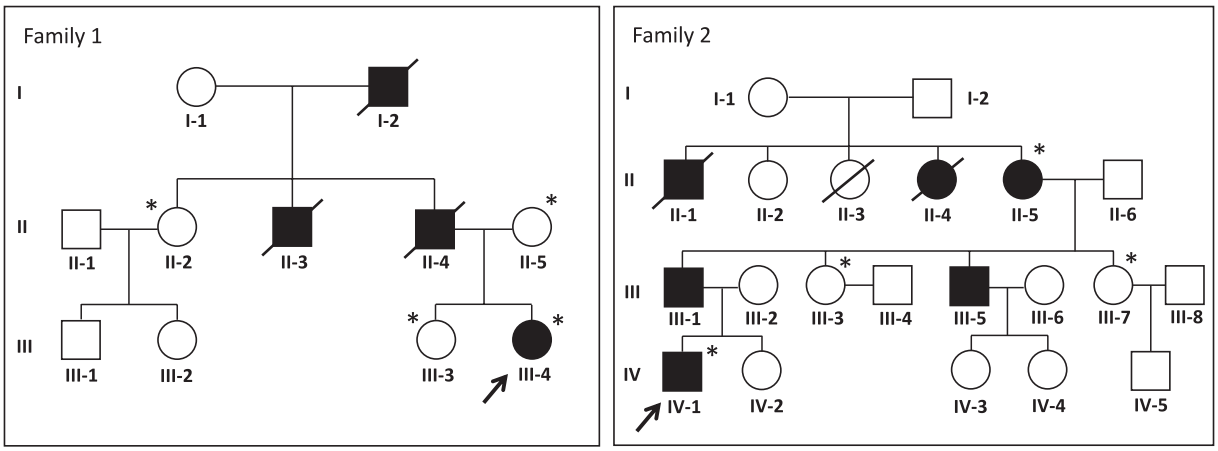


FIGURE 1 | Pedigree of Family 1 and 2. Affected individuals are shown in black. Asterisks indicate individuals that have been genetically tested.

informed consent from the patients according to the declaration of Helsinki.

2.2 | Muscle MRI Studies

Whole-body muscle MRI was performed in individuals F1 III:4 and F2 IV:1 (4 and 7 years after disease onset, respectively). In addition, pelvic and lower-limb muscle MRI was performed in individual F2 III:1. T1-weighted (T1W) and short-tau inversion recovery (STIR) sequences were recorded.

2.3 | Muscle Biopsy

Muscle biopsies were obtained after written informed consent from the biceps brachii from individual F1 III:4 and from the quadriceps muscle from individuals F2 III:1 and F2 IV:1. The samples were immediately frozen in liquid nitrogen-chilled isopentane. Cryostat sections 8-μm thick were processed for routine histological and histochemical techniques and for acid phosphatase and acetylcholinesterase (AChE) activity, as well as for Alizarin red, the latter used to detect calcium deposition. For comparative purposes, samples from two patients affected by autophagic vacuolar myopathies (one patient suffering from late onset Pompe disease, and one patient affected from colchicine myopathy) and a healthy control were processed in parallel.

2.4 | Immunohistochemistry

For immunohistochemical analysis, 6-μm thick cryostat sections were fixed with acetone for 5 min, washed with PBS, and incubated with a blocking solution (UltraCruz Blocking Reagent, Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA) for 30 min and then incubated with antibodies against dystrophin (Leica Biosystems, Nussloch, Germany), caveolin-3 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA), p62 (Enzo Biochem, Farmingdale, NY, USA), laminin α2 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), lysosomal-associated membrane protein-2 (LAMP-2) (Abcam, Cambridge, UK), MAC (C5b-9) (Dako, Glostrup, Denmark), and MHC class I (Dako, Glostrup, Denmark). After washing, the sections were processed with a DAB substrate kit, peroxidase (Vector Laboratories, Newark, CA, USA). Antibodies used in the present study are summarized in Table S1.

2.5 | Single and Double-Labelling Immunofluorescence and Confocal Microscopy

Serial cryostat 6-μm thick sections were fixed in acetone, and double-label immunofluorescence was performed as previously described [14]. Briefly, after incubation with a blocking solution, the sections were incubated overnight at 4°C with a combination of two primary antibodies as follows: (a) guinea pig anti-PLIN4 antibody (Abcam, Cambridge, UK) and rabbit anti-p62 antibody; (b) guinea pig anti-PLIN4 antibody and mouse anti-NBR1 (Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA). In addition, single LC3 (Cell Signalling, Danvers, MA, USA) immunofluorescence was performed. After washing, the sections were incubated with Alexa 488 goat anti-mouse and Alexa 594 (Invitrogen, Waltham, MA, USA) anti-guinea pig (Life Technologies, Waltham, MA, USA). The sections were mounted in a medium containing polyvinyl alcohol (Fluoprep, BioMerieux, France), sealed, and dried overnight at 4°C. Sections were examined with a Leica TCS-SL confocal microscope. Sections incubated only with the secondary antibodies were used as controls.

2.6 | Electron Microscopy

A small sample of muscle was fixed in 2% glutaraldehyde, post fixed with 1% osmium tetroxide, and embedded in araldite. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and viewed with a JEOL 1011 electron microscope.

2.7 | Western Blot (WB)

Briefly, frozen muscle samples were homogenized with 19 volumes of treatment buffer containing 0.125 mol/L Tris/HCL buffer pH 6.4, 10% glycerol, 4% SDS, 4 mol/L urea, 10% mercaptoethanol, and 0.001% bromophenol blue. 30 mL of samples were loaded in the gel (equivalent to 200 mg of noncollagen protein). WB was performed using a guinea pig monoclonal antibody to PLIN4 (Origene Technologies Inc., Rockville, MD, USA).

IRDyeH800 conjugate goat anti-guinea pig was used as a secondary antibody (Li-cor, Lincoln, NE, USA). Fluorescent bands corresponding to PLIN4 were acquired and analyzed using an Odyssey Infrared Imaging System (Li-cor). Myosin present in the gel after transfer was stained with Gel code (Thermofisher) and used as a loading control.

2.8 | Exome Sequencing

DNA was extracted from peripheral blood and whole exome sequencing (WES) was performed in the proband from family 1 (F1 III:4). Briefly, DNA library was prepared using Kapa reagents (Roche, including HyperExome probes targeting the whole exome) and sequenced in a NextSeq500 (Illumina, CA, USA). Fastq files were analyzed using standard procedures: BWA alignment to GRCh37/hg19 [15], GATK variant calling [15] and ExomeDepth for copy number variants (CNVs), and variant annotation using ANNOVAR [16]. Data filtering to obtain candidate variants included assessment of population frequencies (<0.05 MAF in gnomAD v2.1.1) and impact on the protein. Variants were classified according to the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP) guidelines [17]. *PLIN4* expansion was visually assessed with Integrative Genomics Viewer among other samples sequenced within the same batch.

2.9 | Long-Read Sequencing

Genomic DNA was extracted from patient blood samples using QIAsymphony DNA Kit (QIAgen). Deidentified samples were transferred to the Garvan Institute of Medical Research for long-read ONT sequencing and analysis. Prior to ONT library preparation, the DNA was sheared to ~20 kb fragment size using Covaris G-tubes and visualized, post-shearing, on an Agilent TapeStation. Sequencing libraries were prepared from ~1.5 to 5 μg of HMW DNA, using native library prep kits (SQK-LSK109 or SQK-LSK110), according to the manufacturer's instructions. For whole-genome sequencing runs, each library was loaded onto a FLO-PRO002 (R9.4.1) flow cell and run on an ONT PromethION device. For targeted sequencing runs, each library was loaded onto a FLO-MIN106D (R9.4.1) flow cell and run on an ONT MinION device with live target selection/rejection executed by the *ReadFish* software package [18]. Detailed descriptions of software and hardware configurations used for ReadFish/ReadUntil experiments are provided in our recent publication that demonstrates the suitability of this approach for profiling tandem repeats [19]. Samples were run for a maximum duration of 72 h, with nuclease flushes and library reloading performed at approximately 24- and 48-h timepoints for targeted sequencing runs to maximize sequencing yield.

2.10 | Bioinformatics Analysis

Raw ONT sequencing data was converted and archived in SLOW5 format using *slow5tools* (v0.3.0) [20]. Data were basecalled using *Guppy* (4.4.1) and reads with mean quality <7 were excluded from further analysis. Resulting FASTQ files were aligned to the hg38 reference genome using *minimap2* (v2.14-r883) [21]. Alignments to the *PLIN4* locus were phased into maternal and paternal haplotypes using *Longshot* (v0.4.1) [22], converted back to FASTQ format, and assembled separately *de novo* using *Flye* (v2.8.1-b1676) [23], and sequence-polished using *Racon* (v1.4.0) [24], yielding two contigs representing the two *PLIN4* haplotypes in a given individual. *Tandem Repeat Finder* (4.09) [25] was used to identify and measure the *n* x 99 bp tandem repeat sequence within *PLIN4* exon 5 [note: this is the fifth annotated exon, and the fourth coding exon in the *PLIN4* canonical transcript ENST00000301286.5 (NM_001367868.2), and is referred to as exon 3 by Ruggieri et al. [5]]. In control populations, the "normal" allele contains 29× or 31×99 bp repeat motifs mapped to the human reference genome (*hg38*) [5, 26].

2.11 | RNA Sequencing

Total RNA was extracted from 30 mg of muscle biopsy from individual F1 III:4 using the Animal Tissue RNA Purification Kit (Norgen Biotek, Canada) according to the manufacturer's recommendations. RNA integrity was assessed with the Agilent RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, CA, USA), and only samples with RIN >7 were subsequently processed. Libraries were prepared using Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus (Illumina, CA, USA) and sequenced on a NovaSeq 6000 (Illumina, CA, USA) (2×150 bp) with an intended 100 million reads per sample. FastQC [27] and Fastp [28] were used on raw fastq data, and RNAseq reads were then mapped to GRCh37/hg19 with HISAT2 [29]. Gene expression data was analyzed using OUTRIDER [30], FRASER [31] and FRASER 2.0 [32] within a cohort of 96 muscle biopsies, including healthy controls and patients with other muscular diseases.

3 | Results

3.1 | Clinical Features

3.1.1 | Family 1

The proband of Family 1 (F1 III:4, Figure 1) was a 41-year-old woman born from nonconsanguineous parents. She met her early motor developmental milestones at an appropriate age. During her childhood, she wore special footwear due to her high-arched feet; otherwise, neurological examination at 8 years of age revealed no additional abnormalities. At the age of 37, she first noticed difficulties climbing upstairs and rising up from the floor. Very soon afterwards, she noticed weakness in her hands and finger extensors. These symptoms slowly progressed during the following years.

Her father (F1 II:4) presented at the age of 28 with difficulties climbing stairs and rising his arms. His muscle weakness rapidly progressed to involve proximal and distal muscles of all limbs, and 4 years later, he was no longer able to walk and required a wheelchair. Based on the results of the EMG examination, he was misdiagnosed with distal spinal muscular atrophy and died at age 39 due to a viral infection. The paternal uncle (F1 II:3) and grandfather (F1 I:2) of the proband were also affected by a progressive muscle weakness, and they both died at early ages, 41 and 39 years old respectively. No evidence of cardiac or

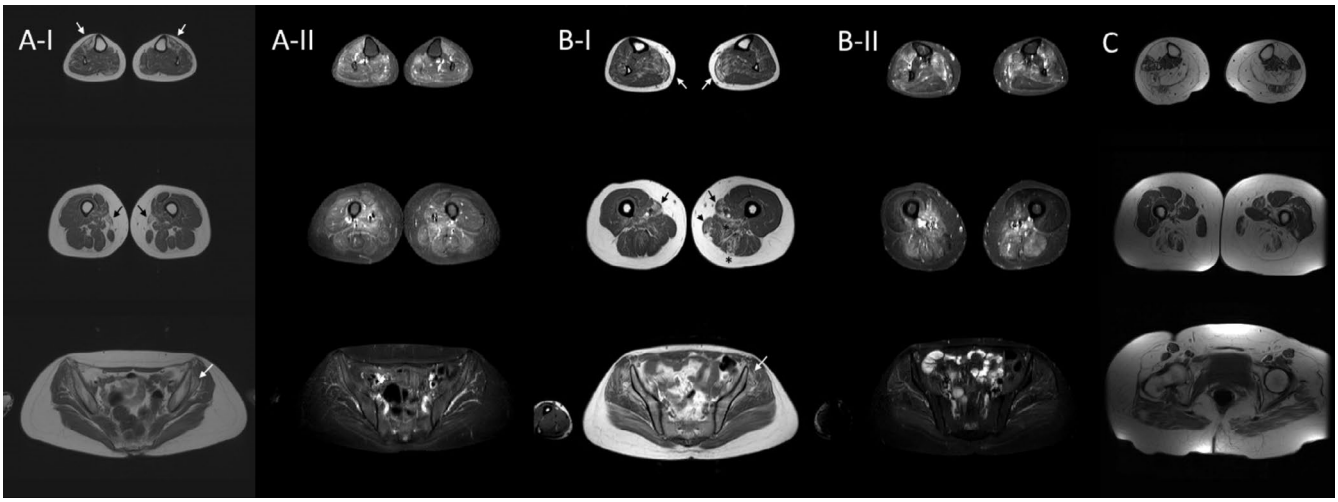


FIGURE 2 | Lower-limb and pelvic MRI from three patients (F1 III:4, F2 IV:1 and F2 III:1). A-I, B-I and C show T1-weighted images from each patient. A-II and B-II show STIR images from individuals F1 III:4 and F2 IV:1. While patient F1 III:4 (A-I) had almost exclusive fatty infiltration of tibialis anterior muscles (arrows) and mild involvement in the thighs and pelvis, the other patients from F2 had a predominant involvement of the posterior leg compartment, initially affecting gastrocnemius medialis (arrows in B-I) and soleus muscles, and mild to severe infiltration of hamstrings and adductors muscles with preserved quadriceps muscles. Arrows in thigh images show selective involvement of sartorius muscles in two of the patients. Note in B-I additional involvement of left gracilis muscle (arrowhead), adductor major and semitendinosus muscles (asterisks). In pelvic images, note early involvement of gluteus minimus muscles in the probands (white arrows in A-I and B-I). STIR sequences showed diffuse muscle edema in legs and thighs.

respiratory involvement could be found in their respective clinical records.

On the proband's first evaluation, her muscle strength according to MRC was 4/5 in elbow flexion, 2/5 in wrist and fingers extension, 4/5 in fingers abduction and adduction, 4/5 in hip flexion, 4/5 in leg extension, 3/5 in foot dorsiflexion, and 4+/5 in foot plantar flexion. The rest of the muscle groups were preserved. Deep tendon reflexes were abolished, except for the tricipital, which was preserved. Atrophy was noted on leg and forearm muscles, both in the anterior and posterior compartments. Sensation in all its modalities was intact.

Serum CK levels were normal. Sensory and motor nerve conduction studies showed normal values. Needle electromyography revealed abundant spontaneous activity at rest and a mixed neurogenic–myogenic pattern. Whole-body muscle MRI revealed very mild atrophy of paravertebral muscles, mild atrophy of glutei minimi muscles, and severe atrophy of sartorius muscles bilaterally with relative sparing of the rest of the thigh muscles. At the mid-leg level, there was selective involvement of the anterior compartment and very mild atrophy of the soleus and medial gastrocnemius. STIR sequences revealed diffuse edema in thigh and leg muscles (Figure 2A). Complete cardiac evaluation including EKG, 24-h Holter monitoring, cardiac ultrasound, and cardiac MRI revealed no abnormalities. Respiratory function tests including FVC in sitting and supine position and polysomnography were normal.

3.1.2 | Family 2

The proband (F2 IV:1, Figure 1) was a 27-year-old male at the time of first evaluation. He had a normal motor development. He reported his first symptoms at the age of 24, at which time he was a handball elite athlete. He started noticing that he got tired more easily than before, and mild weakness appeared when performing low-intensity exercise. The neurological exam at first examination showed minimal right-winged scapula with muscle strength 5−/5 in left hip flexion, 4+/5 in left hip abduction, and 4/5 in left knee flexion. Strength was 5/5 in the rest of the muscle groups, and the remaining exam did not reveal additional findings.

At last follow-up visit at 31 years of age, examination showed strength 4/5 in bilateral shoulder abduction and arm external rotation, 4/5 in finger extension, 3/5 in right and 2/5 in left hip flexion, 4/5 in hip extension, and 4/5 in left knee flexion. The rest of the muscle groups had normal strength. He had developed bilateral asymmetric scapular winging, atrophy in pectoralis and both quadriceps muscles. Deep tendon reflexes were globally diminished. He had elevated serum CK levels up to 1200 IU/L. Muscle MRI in the pelvic girdle showed moderate fatty infiltration in glutei minimi muscles, which were more affected than glutei medii. At the thigh level, there was mild to moderate atrophy of hamstrings and adductors muscles, left gracilis and both sartorii. Leg imaging showed moderate atrophy of posterior leg muscles, more prominent in medial gastrocnemii. Increased STIR signal was observed in hamstrings, hip adductors, and vastus medialis muscles, while at the leg level hyperintensity was present in tibialis anterior, medial gastrocnemii, and solei muscles bilaterally (Figure 2B).

Family history revealed muscle weakness in five additional family members spanning a total of three generations and following an autosomal dominant inheritance pattern (Figure 1).

The proband's father (F2 III:1) was 55 years old when first evaluated. He presented with a 20-year history of progressive weakness initially affecting his distal lower extremity muscles, later

also involving his upper extremities and respiratory muscles. He was on nocturnal ventilatory support 10 years after symptom onset. He had been wheelchair-bound since 42 years of age and at the time of his last evaluation was only able to perform slight movements with his fingers. He did not present ptosis or ophthalmoparesis, nor facial weakness. His muscle strength was 4/5 in neck flexors and extensors, 2/5 in finger flexors and extensors, and 0/5 in the rest of the muscle groups. Muscle tendon reflexes were globally abolished. Contractures were noted in both hands. T1-weighted muscle MRI images showed severe fatty infiltration of pelvic muscles and the posterior compartment of his thighs. Unlike in his son and patient F1 III:4, sartorius muscles were relatively spared. There was also severe symmetric involvement of leg muscles, with exclusive sparing of tibialis posterior, peronei muscles, and lateral gastrocnemii (Figure 2C). A cardiological assessment was performed with echocardiography and 24-h Holter monitoring, both without abnormal findings.

The proband's grandmother (F2 II:5) developed distal upper-limb weakness at 48 years of age and was ambulant until the 8th decade, at which time she also required ventilatory support. In the same generation, a brother and a sister were also affected (II:1, II:4) with a mild late-onset distal weakness and were still ambulant until their deaths around the ages of 78 and 85, respectively. The last affected family member was an uncle of the proband (F2 III:5), who presented at 27 years of age with fatigue and proximal upper-limb weakness. He was wheelchair-bound since the age of 35 and also required ventilatory support.

A summary of clinical data of the patients here described and the previously reported families is provided in Table 1.

3.2 | Myopathological Findings

The muscle biopsies from the three studied patients were highly similar and showed increased variability in myofibre size, increased number of internal nuclei, and the presence of numerous rimmed vacuoles in a high proportion of myofibers, particularly of type I. The vacuoles were often but not always located at the periphery of the myofibre (Figure 3A–D). There was mild endomysial tissue proliferation. Necrosis or myophagocytosis was not observed. Oxidative activity was absent at the site of the vacuoles and in central myofibre regions as observed with NADH, SDH, and COX reactions (Figure 3E,F). The vacuoles showed prominent acid phosphatase (Figure 3G) and acetylcholinesterase activity (Figure 3H). Alizarin red stained strongly positive in the subsarcolemmal region of some muscle fibers demonstrating focal calcium deposition (Figure 3I). Immunohistochemistry for sarcolemmal proteins including dystrophin (Figure 4A), laminin α2 (Figure S1), and caveolin-3 showed the vacuoles are surrounded by membrane. Interestingly, the sarcolemma of many fibers appeared irregularly thickened due to the particular subsarcolemmic localization of many vacuoles. p62 was robustly expressed at the myofibre membrane and at the site of the vacuoles (Figure 4B). Moreover, LAMP-2 (Figure 4C) and LC3 (Figure 4D) immunoreactivity was increased at the site of the vacuoles. MHC class I showed variable expression at the sarcolemma and within the cytoplasm of myofibers (Figure 4E), whereas membrane MAC deposition was seen in scattered fibers (Figure 4F). Double labeling immunofluorescence and confocal microscopy revealed increased PLIN4 co-localizing with p62 at the sarcolemma and within the cytoplasm in the majority of myofibers. Moreover, PLIN4 co-localized with the aggrephagy-related protein NBR1 (Figure 5).

Comparison of histochemical and immunohistochemical characteristics of PLIN4 myopathy with other autophagic vacuolar myopathies revealed very similar features compared to X-linked myopathy with excessive autophagy and colchicine myopathy (Table S2).

3.3 | Ultrastructural Analysis Revealed Membrane-Bounded Autophagic Vacuoles and Redundant Basal Lamina

Ultrastructural analysis showed abundant subsarcolemmal and cytoplasmic autophagic vacuoles containing myelin bodies, degraded organelles, and electron-dense granular material (Figure 6A,B). Large numbers of vacuoles were membrane-limited and often appeared abutting the extracellular space (Figure 6C,D). The basal lamina formed multiple layers and loops in the extracellular space (arrows in A and D). Collections of tubulo-filaments of 18 nm were seen within the sarcoplasm (asterisks in Figure 6D,E). Proliferation of sarcoplasmic reticulum was observed in some myofibers (Figure 6F).

3.4 | Western Blot (WB) Analysis Revealed Increased PLIN4 Protein Expression

WB analysis of PLIN4 was performed in the proband from Family 1 (F1 III:4) and individual F2 IV:1, and in two healthy controls. WB from both patients showed a normal band of 134 kDa and an extra band of higher molecular weight (Figure 7A) corresponding to protein produced from the expanded allele.

3.5 | Whole Exome Sequencing and RNA Sequencing

Alignment of the WES from patient F1 III:4 revealed an increase in coverage of exon 5 of *PLIN4* in the patient's DNA. This was not observed in any other sample sequenced in the same batch (Figure S2), suggesting the presence of an expanded allele in the patient. RNAseq data from the muscle sample revealed normal mRNA expression of *PLIN4* compared to a cohort of 96 muscle samples (data not shown), suggesting that the expanded allele is not overexpressed. Moreover, we did not observe any effect on PLIN4 mRNA splicing.

3.6 | Identification of a *PLIN4* Expanded Tandem Repeat in Affected Individuals After Long-Read Sequencing

We performed either whole genome or targeted ONT sequencing to genotype *PLIN4* in three affected and five unaffected individuals from the two families (Figure 7B,C, Figure S3). In each case, alignments to *PLIN4* were phased into maternal and paternal haplotypes, which were then separately assembled.

TABLE 1 | Summary of clinical data of the patients here described and the previously reported families. Asterisks indicate the index patients from Family 1 (F1) and 2 (F2). The size of the *PLIN4* expansion in our affected cases is reported in the genetically tested individuals.

Patient	Gender	Age of onset/ age at last examination	Age at death	Initial symptoms	Weakness progression	Scapular winging	Ambulant	Loss of ambulation at age	CK levels	Respiratory failure	EMG	Size of 99 bp expansion in *PLIN4* ($n \times 99$ bp)
F1, I:2	M	uk	39	Distal LL and UP weakness	Proximal and distal 4 limbs, and axial	No	No	uk	Normal	uk		
F1, II:3	M	uk	41	Distal LL and UP weakness	Proximal and distal 4 limbs, and axial	No	No	uk	uk	uk		
F1, II:4	M	28/uk	39	Proximal LL and UL weakness	Distal > proximal 4 limbs, and axial	No	No	32	uk	uk	Mixed myogenic–neurogenic features with spontaneous activity at rest	
F1, III:4 *	F	37/42	Alive	Proximal LL weakness	Distal > proximal 4 limbs	No	Yes	No	Normal	No	Mixed myogenic-neurogenic with spontaneous activity	39×
F2, II:1	M	6th decade/uk	78	UL weakness	Proximal and distal 4 limbs	uk	Yes (with a cane)	No	Normal	No	Myogenic features	
F2, II:4	F	uk	85	uk	Proximal and distal 4 limbs	uk	Yes (with a cane)	No	uk	No		
F2, II:5	F	48/80	Alive	Asymmetric distal UL weakness	Proximal and distal 4 limbs, and axial	No	No	74	Normal	Yes, VS at age 74. Age 73: FVC 79% sitting, 66% supine	Mixed myogenic-neurogenic features with spontaneous activity	37×
F2, III:1	M	31/59	Alive	Distal anterior LL weakness	Proximal and distal 4 limbs, and axial	No	No	42	Normal	Yes, VS at age 49. Age 49: FVC 43%, FEV1 68%, FEV1/FVC 67%, MVV 38%	Mixed features	

(Continues)

TABLE 1 | (Continued)

Patient	Gender	Age of onset/ age at last examination	Age at death	Initial symptoms	Weakness progression	Scapular winging	Ambulant	Loss of ambulation at age	CK levels	Respiratory failure	EMG	Size of 99 bp expansion in *PLIN4* ($n \times 99$ bp)
F2, III:5	M	27/58	Alive	Proximal UL weakness	Proximal and distal 4 limbs, and axial	No	No	35	740 U/L	Yes, VS at age 48. Age 53: FVC 12%, FEV1 14%, FEV1/FVC 92%	Myogenic with spontaneous activity, abundant CRD	
F2, IV:1*	M	24/32	Alive	Fatigue, proximal LL weakness in climbing stairs	Proximal and distal 4 limbs	Yes, asymmetric	Yes	No	x5 (1260 U/L)	Yes, mild. Age 30: FVC 102% (−3% supine), FEV1 111%, FEV1/ FVC 88%. MIP 34%, MEP 34%		37×
L.Maggi, 2023/A. Ruggieri, 2020/C. Di Blasi, 2004 (F1: 22 pt)	13M, 9F	Range: 30–66/39–73	65 to 94	Distal LL > UL weakness mainly in foot dorsiflexors and hand extensors (*Only 2/14 patients with proximal weakness at onset)	60% proximal weakness at progressionNeck flexors weakness (6/13)40% wheelchair-bound at 17 years from onsetAnkle contractures at end stage (7/15)	Scapular weakness without scapular swinging (at least four reported)	Some	58–85	Normal or slightly↑ (×2) (except patient IV:22 with CK 988 U/L)	Only 2 pt. III:20 invasive VS (tracheostomy) at 71 years, and IV:21 low FVC (Other patients had a "respiratory" cause of death at 65–94 years)	Myogenic with spontaneous activity at rest +CRD (also in 2 asymptomatic pt)	40×
K.Yang, 2022 (F1: 13 pt)	8M, 5F	45–65/49–82	uk	Proximal LL weakness	Slow progression of proximal LL > UL weakness Mild distal weakness (finger extensors in UL)	uk	All except II1	80 (II1)	Normal or slightly↑ (max. 668 U/L)	No	Myogenic with spontaneous activity at rest +CRD/ myotonic discharges (also in 3 asymptomatic pt)	40×

(Continues)

TABLE 1 | (Continued)

Patient	Gender	Age of onset/ age at last examination	Age at death	Initial symptoms	Weakness progression	Scapular winging	Ambulant	Loss of ambulation at age	CK levels	Respiratory failure	EMG	Size of 99 bp expansion in *PLIN4* ($n \times 99$ bp)
K.Yang, 2022 (F2: 6 pt)	3M, 3F	25–26/41 and 35	uk	Proximal LL weakness	Earlier onset, greater and faster decline than in F1. Moderate distal weakness over time (finger extensors, foot dorsiflexors)	uk	Some	39 (III4)	378–406 U/L	No	Myogenic	50×
Q.Wang, 2022 (F1: 10 pt)	10M, 0F	Range: 40s to 60s/uk	All alive	Proximal LL weakness	Proximal > Distal LL > UL	Some (at least 1 reported: II7)	Some	uk	267–822 U/L	No	Myogenic CRD (even 1 asymptomatic pt)	39×
Q.Wang, 2022 (sporadic case)	M	49/60	All alive	Weakness in climbing upstairs	Proximal > DistalLower > Upper limbsNeck flexion weakness	No	No	uk	256 U/L	Yes (VS unknown)	Myogenic CRD	39×

Abbreviations: CK, creatine kinase; CRD, complex repetitive discharges; EMG, electromyography; F, female; Fn, family; FVC, forced vital capacity; LL, lower limbs; M, male; MEP, maximal expiratory pressure; MIP, maximal inspiratory pressure; MVV, maximal voluntary ventilation; pt, patients; uk, unknown; UL, upper limbs; VS, ventilatory support.

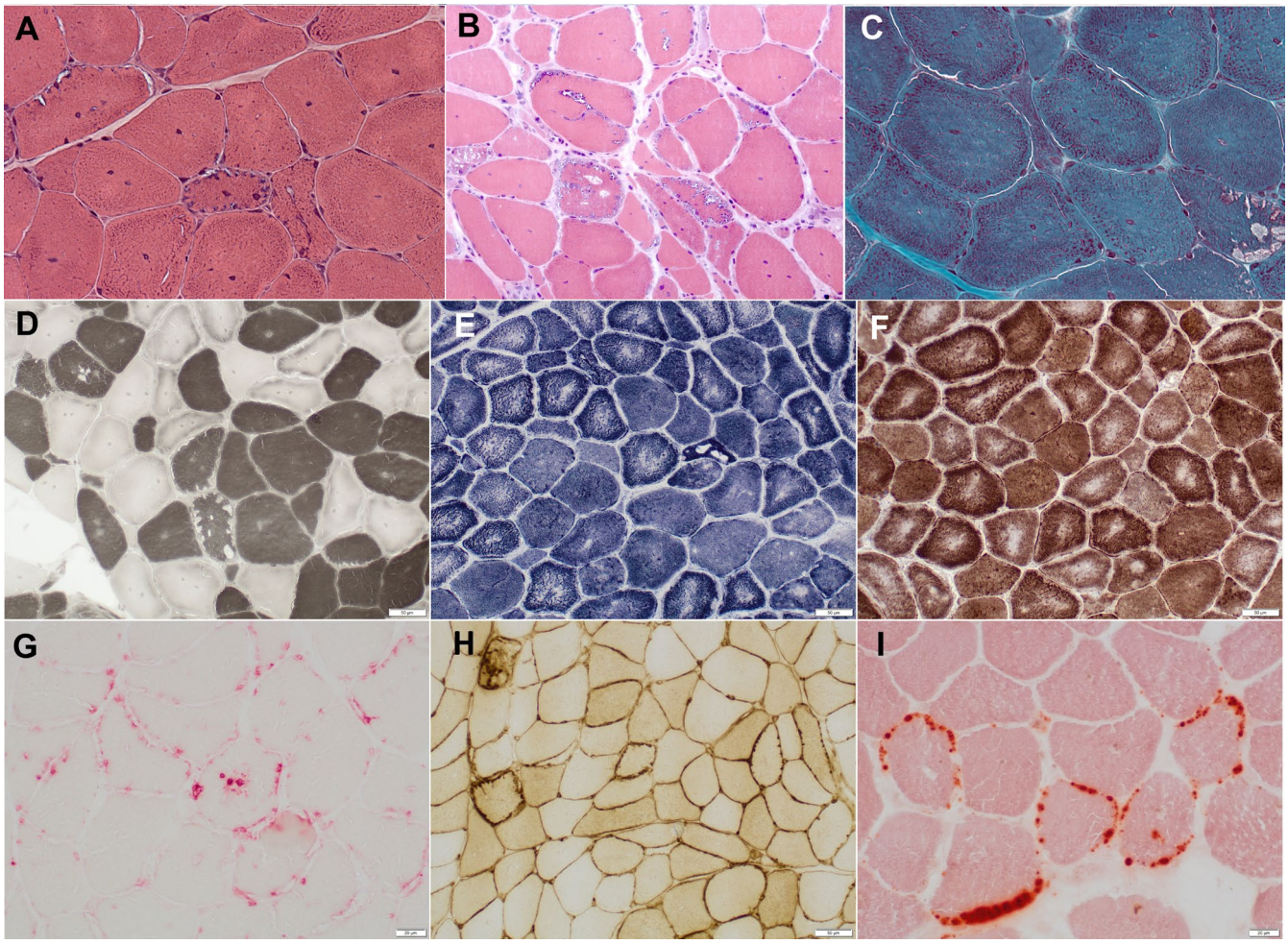


FIGURE 3 | Biopsy findings from family probands show abundant subsarcolemmal and sarcoplasmic autophagic vacuoles, and focal calcium deposition. Hematoxylin–eosin (A, B) and modified Gomori stains (C) from patients F1 III:4 and F2 IV:I show increased number of internal nuclei, variable increase of endomysial connective tissue, fiber splitting, and presence of abundant cytoplasmic rimmed vacuoles preferentially located at the cell periphery (subsarcolemmal). (D) ATPase at pH 4,3 shows absence of ATPase activity at the sites occupied by the vacuoles. Scale bar: 50 μm. (E, F) NADH and COX reactions show many central areas devoid of oxidative activity. Scale bars: 50 μm. (G) Acid phosphatase activity is increased at the site of the vacuoles. Scale bar: 20 μm. (H) Cholinesterase histochemistry showing a fiber with increased activity at the site of cytoplasmic vacuoles, and several fibers with increased activity at the periphery, some of them showing an irregular lining due to the presence of subsarcolemmal vacuoles. Scale bar: 50 μm. (I) Focal calcium deposition at the periphery of some myofibers is observed with Alizarin red stain. Scale bar: 20 μm.

Unaffected individuals in both families harbored two copies of a 29×99 bp tandem repeat within *PLIN4* exon 5 (Figure 7B,C), which encodes the wildtype protein's amphipathic domain. Affected individuals in both families were distinguished by large expansions within the *PLIN4* tandem repeat (Figure 7C). The proband in Family 1 harbored a single expanded allele of 39×99 bp repeat copies in addition to a single "normal" allele of 29×99 bp copies (Figure 7C). The two affected individuals sequenced from Family 2 (II-5 and IV-1) each harbored a single expanded allele of 37×99 bp repeat copies (Figure 7C), indicating that this expanded allele was stably inherited through three generations. The observed repeat expansions encode additional 330 and 264 amino acids, respectively, within the *PLIN4* amphipathic domain, compared to "normal" alleles. The observed repeat lengths in affected individuals were similar, but not identical, to the family reported by Ruggieri et al. [5], in which affected individuals harbored *PLIN4* tandem repeats 40×99 bp in length. After the publication by Wang et al. of a family carrying a 39×99 bp repeat expansion [7], the expanded allele of 37×99 bp copies from Family 2 is here newly reported to cause skeletal myopathy.

4 | Discussion

We report herein two families suffering from an autosomal-dominant vacuolar myopathy with predominantly distal involvement, caused by monoallelic repeat expansions in the amphipathic domain of *PLIN4*. The size of the repeat expansion was 39×99 bp in Family 1 and 37×99 bp in Family 2. The disease in these two families is characterized by adult-onset muscle weakness manifesting with very mild proximal weakness in lower limbs at the beginning, followed soon thereafter by prominent distal involvement of muscles of four limbs, mainly forearm and finger extensors and the anterior compartment of the legs. Affected individuals do not present facial, bulbar, or ocular weakness. Serum CK levels range from normal to moderately increased. So far, cardiac involvement has been ruled out

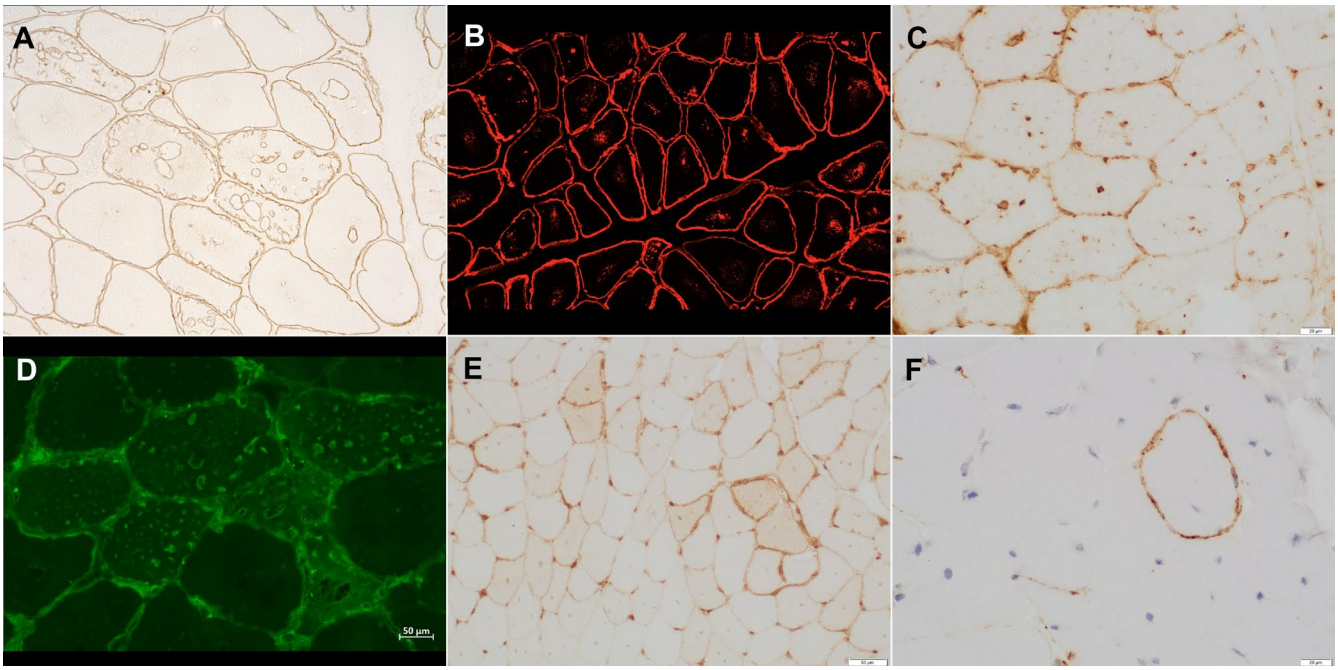


FIGURE 4 | Immunohistochemistry and immunofluorescence features in *PLIN4*-related myopathy. (A) Immunohistochemistry for carboxy-dystrophin shows abundant membrane-bounded vacuoles. (B) p62 immunofluorescence shows strong staining in the sarcolemma of all fibers and in central areas corresponding to the vacuoles. (C) Lysosomal associated protein LAMP-2 is overexpressed at the site of the vacuoles. Scale bar: 20 µm. (D) Strong LC3 immunoreaction inside the myofibers. (E) MHC class I is upregulated at the sarcolemma and cytoplasm of many myofibers, while membrane attack complex (MAC) in (F) is strongly deposited in the sarcolemma of isolated myofibers. Scale bars: 50 µm in E, 20 µm in F.

in all the reported families, including ours. By contrast, three patients in our families had severe respiratory involvement at late-stage disease. Nevertheless, only three cases were reported before to have restrictive ventilation abnormalities [7, 33]. Notably, we did not find clinical signs of myotonia nor myotonic discharges on electromyography, unlike some previous reports [33]. Interestingly, we observed mixed neurogenic–myogenic features on electromyography in most of the patients, meaning the presence of spontaneous activity at rest and a combination of small and large motor unit potentials. These findings are often misinterpreted as indicative of a neurogenic disease, particularly in patients with distal weakness. In fact, in patient F1 II:4, the EMG findings led to initially misdiagnose him as having a distal hereditary motor neuropathy, a common misdiagnosis in distal myopathies. Indeed, other myopathies, such as inclusion body myositis, myofibrillar myopathies, and many of the distal myopathies with rimmed vacuoles, commonly have mixed patterns on EMG and can be misdiagnosed as neurogenic entities in the absence of a muscle biopsy. These difficulties in EMG interpretation must be borne in mind by clinicians to guide the final diagnosis in distal or rapidly progressing myopathies.

In line with what has been reported, we found a high phenotypic variability among affected individuals even within a family, including mildly affected ones who remained ambulant at advanced ages, especially female patients, in contrast to other patients who were wheelchair-bound or deceased around 40 years of age. Our observations indicate that the age of symptom onset or disease severity is not related to the size of the 99-mer expansion in *PLIN4*, except in one reported family carrying a 50×99 bp tandem repeat whose affected individuals had an earlier onset and faster progression [6] (see Table 1 for details). In regard to gender differences, male patients in our families were generally affected earlier and more severely than females. This difference cannot be established with certainty based on the published families to date. However, it may be noted that Yang et al. reported three female carriers who remained asymptomatic above 50 years old, and in Wang's publication, all the clinically affected individuals were males [6, 7]. Further investigations and additional families will need to be identified before a conclusion can be reached regarding this association of age-of-onset and severity with gender.

Muscle imaging did not show a common pattern of involvement between families. While the proband in Family 1 had a distal leg involvement almost exclusive of tibialis anterior, the two available MRI scans in Family 2 showed a predominant involvement of the calves and posterior thigh compartments. These last findings are similar to those reported by Ruggieri et al. [33], but differ from other reported families due to prominent fatty infiltration of vasti muscles in their patients [6, 7]. Interestingly, despite the discrepancy between anterior and posterior leg involvement observed in our families, muscle imaging in both probands showed preferential infiltration of sartorius muscles, a feature also reported in Chinese patients [6, 7]. Overall, we do not identify a specific MRI pattern of involvement in PLIN4 myopathy, but the most constant feature seems to be the calf-predominant involvement of the legs.

Tandem repeat expansions such as those causing PLIN4 myopathy are difficult to identify with conventional methods such as gene panels or exome sequencing [34] and, therefore, a complex genetic approach in specialized centers is often required. In this situation, additional complementary tests, including muscle

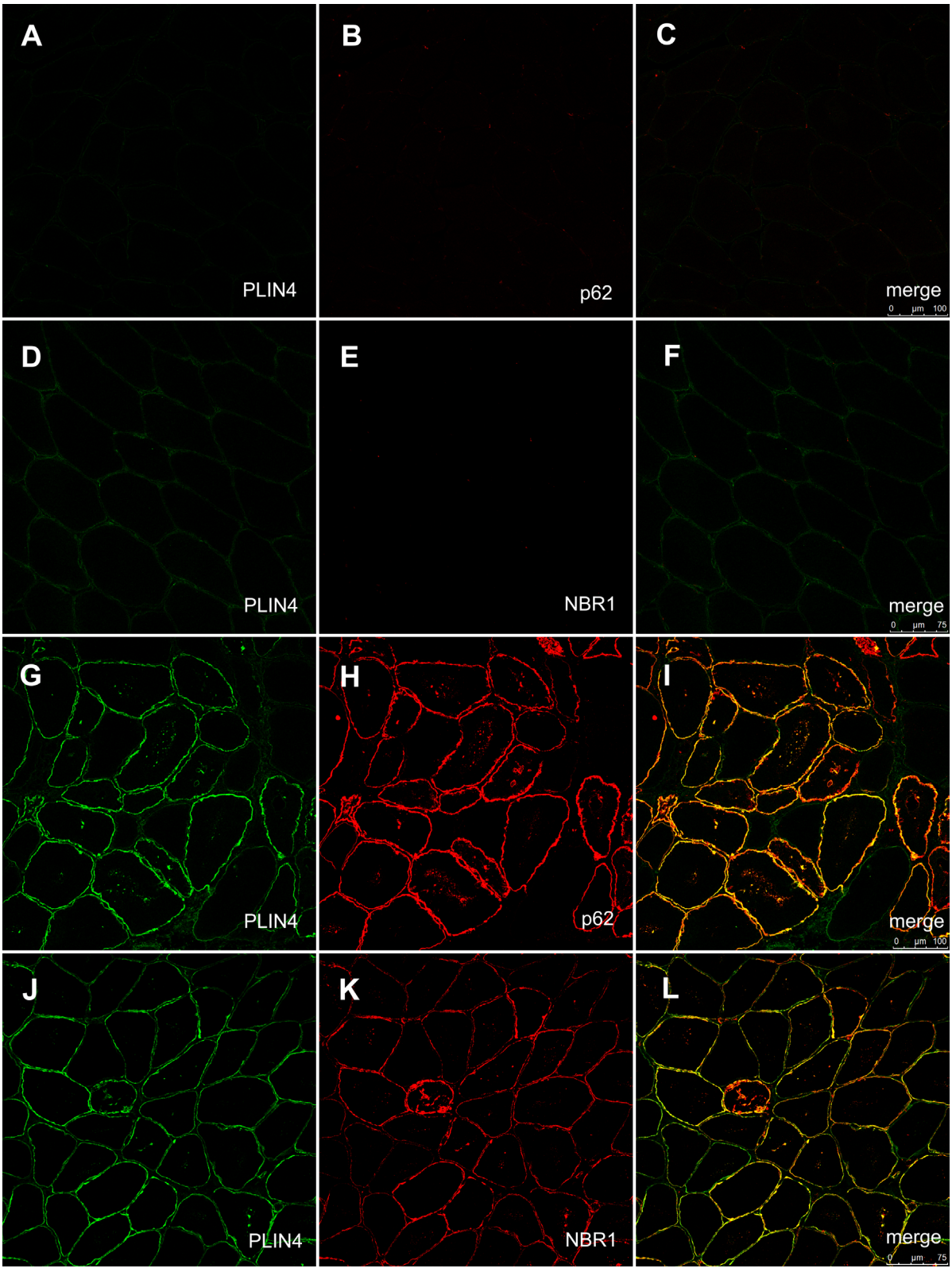


FIGURE 5 | Double labeling immunofluorescence and confocal microscopy show increased PLIN4 in patient muscle co-localizing with p62 and NBR1 at the sarcolemma and within the cytoplasm in the majority of myofibers (G to L). In contrast, control muscle (A to F) shows the absence of p62 and NBR1, and very faint subsarcolemmal PLIN4 expression corresponding to normal expression in healthy muscle. G to I: Patient F2 IV:1 muscle. J to L: Patient F1 III:4 muscle. Immunofluorescence against PLIN4 (A, D, G, J), p62 (B, H), NBR1 (E, K), and merged images (C, F, I, L) are shown.

biopsy, are crucial to guide the molecular diagnosis. In fact, the myopathological features observed in our families were so characteristic that they prompted us to test these families for *PLIN4* expansions. Prior to performing long-read sequencing, a long-range PCR assay following the protocol described in the publication by Ruggieri et al. was performed. However, we failed

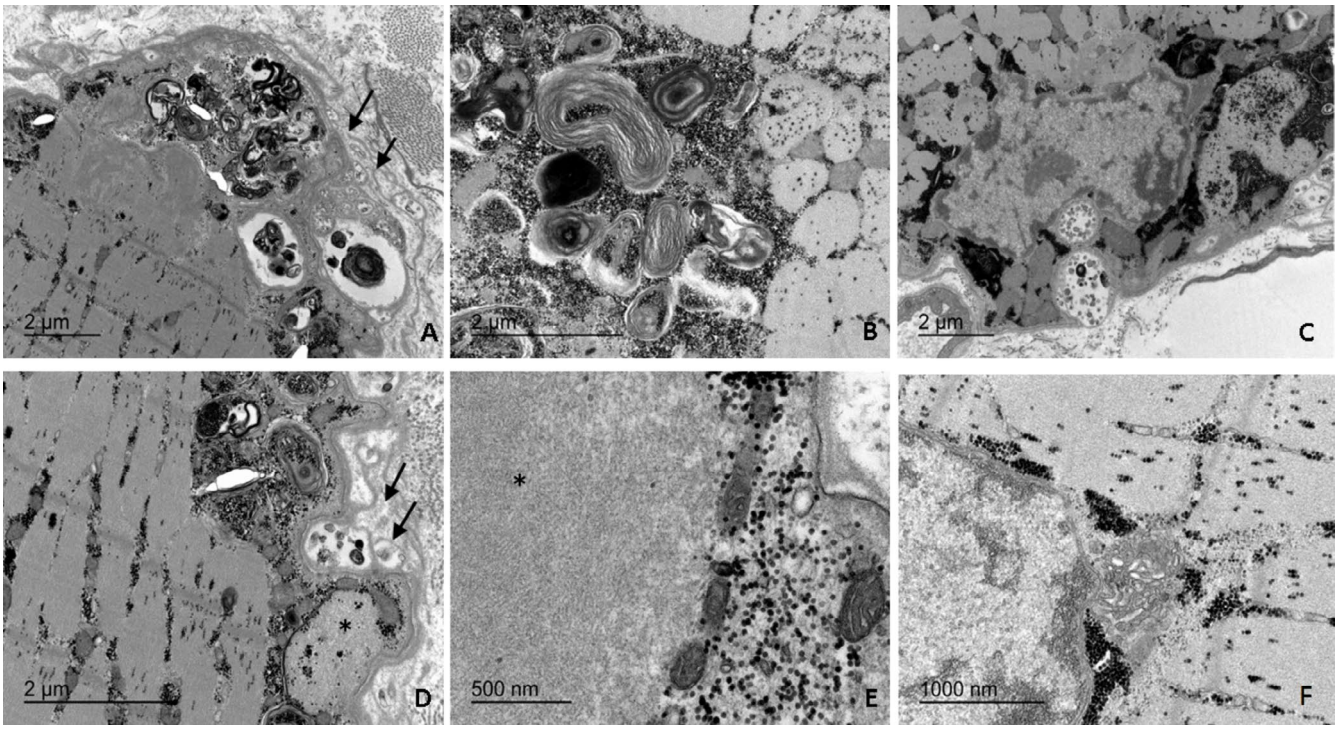


FIGURE 6 | Electron microscopy shows membrane-limited autophagic vacuoles and basal lamina redundancy. Ultrastructural analysis showed large numbers of autophagic vacuoles containing myelin bodies, degraded organelles, and electrodense and granular material (A to D). The sarcomere structure was disrupted in some regions next to the vacuoles (A). The vacuoles were membrane-limited and often appeared abutting the extracellular space (C and D). Multiple layers of the basal lamina and loops were observed (arrows in A and D). Some myofibers showed collections of tubulo-filaments of 18 nm within the sarcoplasm (asterisks in D and E). Proliferation of sarcoplasmic reticulum was observed in some myofibers (F).

to sequence the expanded fragment probably due to the well-known technical difficulties in amplifying repeat expansions.

The characteristic myopathological features in the muscle biopsies in our patients included abundant rimmed vacuoles located at the subsarcolemmal region and within the sarcoplasm. Importantly, p62 showed a unique pattern of expression in the sarcolemma of myofibers, and at the site of the vacuoles, a constant feature observed in all PLIN4 myopathy patients reported to date [5–7, 33]. Indeed, this sarcolemma labeling of p62 has been considered as highly distinctive of the disease, but it is worth noting that it has also been described in some neuropathic entities [35]. Yet, it has never been described in other vacuolar myopathies.

Results of our histochemical and immunohistochemical analyses demonstrate the vacuoles in PLIN4 myopathy are labeled with sarcolemmal markers (caveolin-3, dystrophin, laminin α2) and display acetylcholinesterase activity, which allows classifying this myopathy within the group of autophagic vacuolar myopathies with sarcolemmal features (AVSF). Remarkably, those sarcolemmal markers, especially dystrophin, laminin α2 and acetylcholinesterase, show an irregular thickened lining of the sarcolemma of several fibers due to the particular subsarcolemmic localization of many vacuoles, which together with the p62 pattern seems to be very distinctive of this disease. Similar to other autophagic vacuolar myopathies including Pompe disease, X-linked myopathy with excessive autophagy (XMEA), Danon disease, and toxic myopathies caused by colchicine or chloroquine, markers of lysosomal dysfunction including acid phosphatase, LAMP-2, and LC3 are overexpressed in vacuolated myofibers in PLIN4 myopathy. Taken together, these findings indicate that PLIN4 myopathy belongs to the group of autophagic vacuolar myopathies resulting from primary and nonprimary lysosomal dysfunction [36–44].

Additional histopathological analyses revealed calcium deposition along the cell surface of some fibers and peripheral vacuoles, a feature described in XMEA [45–47] and observed in colchicine myopathy (author observation). Finally, MHC class I overexpression and MAC deposition in isolated myofibers were observed in the three muscle samples we assessed. This finding has been previously reported in PLIN4 myopathy [7], as well as in XMEA and colchicine myopathy [43, 47, 48] and has been considered by some authors [7] the result of secondary muscle inflammation. Taken together, the histopathological features of PLIN4 myopathy—autophagic vacuoles with sarcolemmal features, MHC-I and MAC overexpression, calcium deposition, and basal lamina replication—are highly reminiscent of XMEA. Therefore, XMEA constitutes the major differential diagnosis for PLIN4 myopathy from a morphological point of view when studying a hereditary vacuolar myopathy.

Studies performed by Di Blasi et al., in 2004, long before the identification of the gene defect [4], demonstrated that ubiquitin and subunits of the proteasomal complex increase in myofibers, suggesting that a primary abnormality in the autophagy-lysosomal pathway, which led to a secondary ubiquitin-proteasome system (UPS) activation, was responsible for the disease. This fact could explain the presence of muscle inflammatory markers observed in the disease,

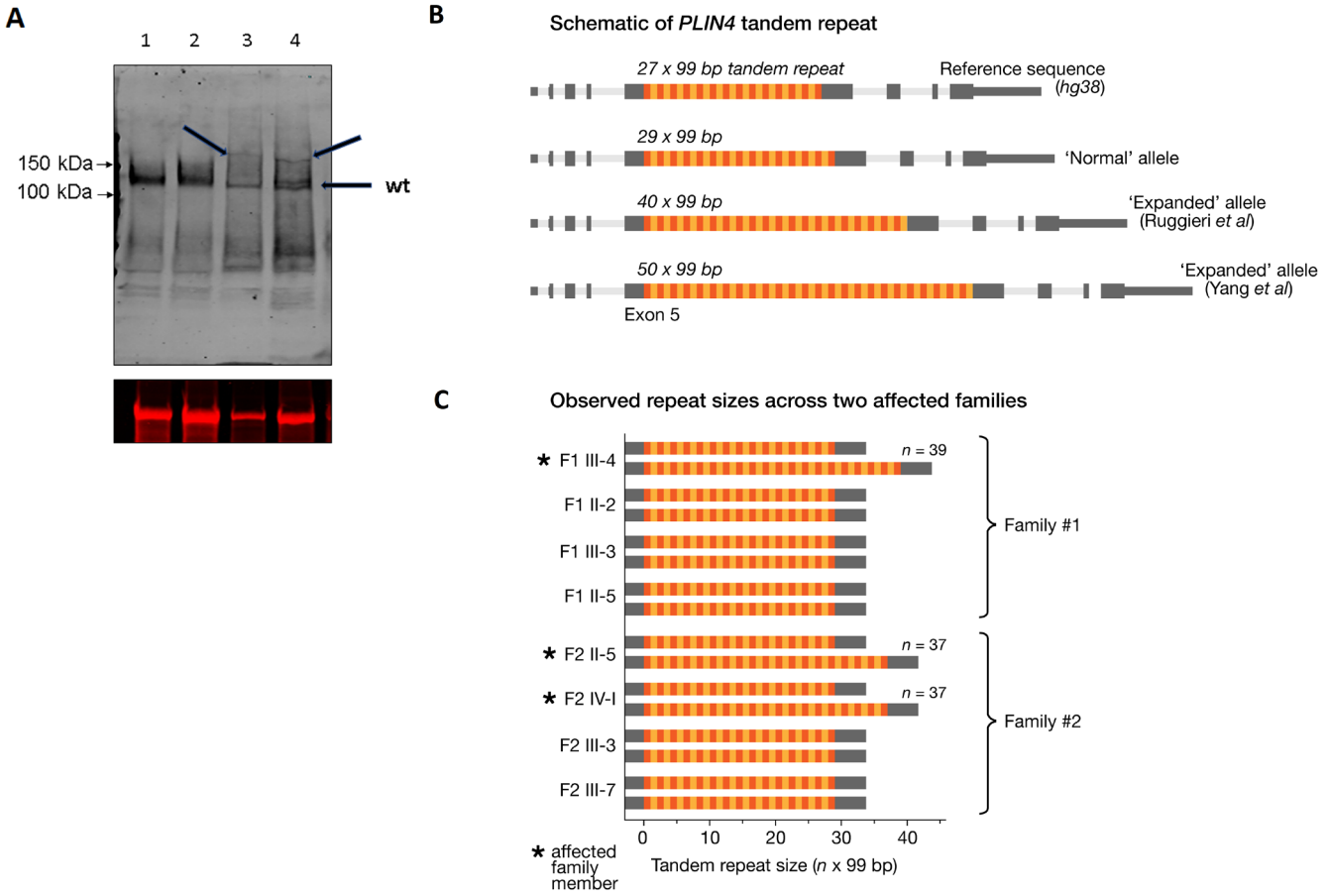


FIGURE 7 | Genomic and protein studies in *PLIN4*-related myopathy families demonstrate the presence of expanded alleles in affected individuals. (A) Western blot (WB) analysis for PLIN4 in two healthy controls (lane 1 and 2) and in the probands from Family 1 (lane 3) and Family 2 (lane 4). WB from both patients show a normal band of 134 kDa ("wt" as wildtype) and an extra band of higher molecular weight (oblique arrows). Note that the 134 kDa band is weaker in patients compared to controls, and that the extra bands are clearly visible in the patients but not in the controls. Protein loading control is shown below in red. (B, C) Genotyping of the *PLIN4* exon 5 tandem repeat in the two affected families using targeted ONT sequencing. (B) Schematic illustration of $n \times 99$ bp tandem repeat which encodes the amphipathic domain of PLIN4. 27×99 bp repeat copies are present in the human reference genome (hg38) sequence. Alleles of 29×99 bp repeat copies are common in the normal population. Expanded alleles of 39×, 40× and 50×99 bp were previously reported to cause myopathy. (C) Observed sizes of *PLIN4*-exon 5 tandem repeat alleles among eight individuals from two unrelated families. Asterisks denote clinically affected individuals.

as UPS-mediated degradation of defective proteins generates peptides presented by MHC-I to T cells upon autophagy impairment [49]. UPS activation would therefore predispose individuals to the presence of MHC-I overexpression at the sarcolemma that we observe in a nonimmune mediated myopathy such as PLIN4 or even XMEA, but it cannot explain complement activation.

In skeletal muscle, perilipin 4 is normally located beneath the sarcolemma where it is thought to bind to lipid droplets (LD), but its role in muscle tissue is not completely understood [13]. In PLIN4 myopathy, there is an increase of PLIN4 at the sarcolemma that perfectly co-localizes with markers of aggrephagy such as FK2, NBR1, and p62/SQSTM1. Interestingly, a complex experimental in vitro study focusing on the amphipathic helix of PLIN4 showed that there is a direct correlation between the targeting to LD and the length of the amphipathic domain, and that PLIN4 tends in normal conditions to interact with monolayer (not bilayer) membranes [10]. It was demonstrated that mutant PLIN4 proteins with more hydrophobicity show increased binding to LD before invading other cellular membranes, the latter not seen with the wildtype protein. These hydrophobic mutants drastically changed their binding to bilayer cellular membranes, especially in conditions of increased membrane charge or membrane packing defects. Altogether, this evidence could suggest that the tandem repeat expansion leading to PLIN4 myopathy may cause changes in the binding specificity of PLIN4 to LD and may induce the abnormal targeting to the cellular membrane that is observed in this muscle disease. This would explain the increase of PLIN4 observed at the sarcolemma, likely as a result of protein misfolding and aggregation. Its colocalization with ubiquitin, p62, FK2, and NBR1, which form an autophagy receptor complex closely related to LC3, suggests continuous activation of aggrephagy, the degradation process of protein aggregates initiated with autophagosome formation that ultimately fuse with lysosomes [49]. This process leads to the accumulation of autophagic vacuoles. Whether the lack of proper binding to LD would not predispose to lipid accumulation needs to be clarified.

5 | Conclusions

In conclusion, we report two unrelated families carrying different size expansions of the PLIN4 amphipathic domain suffering from an autosomal dominant autophagic vacuolar predominantly distal myopathy. Vacuoles show sarcolemmal features similar to those observed in lysosomal disorders and AVSF myopathies. No correlation between the size of the expansion and clinical severity could be established. Of note, female patients seem to be less severely affected. We suggest that *PLIN4* expansions lead to abnormal perilipin 4 aggregation and misfolding in the sarcolemma, which in turn causes accumulation of aggrephagic vesicles that exceed the autophagic capacity within myofibers. *PLIN4* expansions should be considered in the diagnosis of autophagic vacuolar myopathies when conventional NGS technologies fail to identify any candidate variant. Subsarcolemmal p62 expression is a good marker of the disease and helps guide the molecular diagnosis.

Author Contributions

M.O., E.G., P.G. designed the study. L.L., G.M., R.C.-V., R.A., A.V., I.I., and M.O. collected clinical data and biological samples. L.L., R.B., B.S.-M., C.N., E.G., and M.O. performed myopathological analysis. I.S., L.G.-Q., A.S.-C., B.R.-S., P.G., and I.W.D. performed the genetic testing. L.L., I.S., A.S.-C., I.W.D., E.G., and M.O. drafted the manuscript. L.L. and M.O. wrote the final manuscript. L.L., I.S., I.W.D., and M.O. prepared figures and tables. G.R. contributed to data analysis and interpretation. All authors read and approved the final manuscript. M.O. supervised the project.

Acknowledgments

M.O., L.L., R.C., A.V., and E.G. are members of the European Reference Network for Neuromuscular Diseases. We would like to thank Professor Nigel Laing for critical reading of the manuscript and all the patients for their essential collaboration in this project.

Ethics Statement

All patients gave informed consent to participate. Sample collection was obtained after written informed consent from the patients in the participating institutions. The local ethics committee, "Comitè d'Ètica d'Investigació Mèdica (CEIm) Sant Pau Campus Salut Barcelona", approved the study under project FIS PI21/01621.

Conflicts of Interest

I.W.D. manages a fee-for-service sequencing facility at the Garvan Institute of Medical Research that is a customer of Oxford Nanopore Technologies but has no further financial relationship. The authors declare no other competing financial or nonfinancial interests.

Data Availability Statement

The data supporting the findings of this study are available from the corresponding authors upon request.

References

1. M. Savarese, M. Jokela, and B. Udd, "Distal Myopathy," *Handbook of Clinical Neurology* 195 (2023): 497–519.

2. P. Hackman, J. Sarparanta, S. Lehtinen, et al., "Welander Distal Myopathy Is Caused by a Mutation in the RNA-Binding Protein TIA1," *Annals of Neurology* 73, no. 4 (2013): 500–509.

3. M. Savarese, J. Sarparanta, A. Vihola, et al., "Panorama of the Distal Myopathies," *Acta Myologica* 39, no. 4 (2020): 245–265.

4. C. Di Blasi, B. Moghadaszadeh, C. Ciano, et al., "Abnormal Lysosomal and Ubiquitin-Proteasome Pathways in 19p13.3 Distal Myopathy," *Annals of Neurology* 56, no. 1 (2004): 133–138.

5. A. Ruggieri, S. Naumenko, M. A. Smith, et al., "Multiomic Elucidation of a Coding 99-Mer Repeat-Expansion Skeletal Muscle Disease," *Acta Neuropathologica* 140, no. 2 (2020): 231–235.

6. K. Yang, Y. H. Zeng, Y. S. Qiu, et al., "Expanding the Phenotype and Genotype Spectra of PLIN4-Associated Myopathy With Rimmed Ubiquitin-Positive Autophagic Vacuolation," *Acta Neuropathologica* 143, no. 6 (2022): 733–735.

7. Q. Wang, M. Yu, W. Zhang, et al., "Subsarcolemmal and Cytoplasmic p62 Positivity and Rimmed Vacuoles Are Distinctive for PLIN4-Myopathy," *Annals of Clinical Translational Neurology* 9, no. 11 (2022): 1813–1819.

8. N. E. Wolins, J. R. Skinner, M. J. Schoenfish, A. Tzekov, K. G. Bensch, and P. E. Bickel, "Adipocyte Protein S3-12 Coats Nascent Lipid Droplets," *Journal of Biological Chemistry* 278, no. 39 (2003): 37713–37721.

9. N. E. Wolins, B. K. Quaynor, J. R. Skinner, et al., "OP9 Mouse Stromal Cells Rapidly Differentiate Into Adipocytes: Characterization of a Useful New Model of Adipogenesis," *Journal of Lipid Research* 47, no. 2 (2006): 450–460.

10. A. Čopič, S. Antoine-Bally, M. Giménez-Andrés, et al., "A Giant Amphipathic Helix From a Perilipin That Is Adapted for Coating Lipid Droplets," *Nature Communications* 9, no. 1 (2018): 1332.

11. K. T. Dalen, K. Schoonjans, S. M. Ulven, et al., "Adipose Tissue Expression of the Lipid Droplet-Associating Proteins S3-12 and Perilipin Is Controlled by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma," *Diabetes* 53, no. 5 (2004): 1243–1252.

12. K. Hsieh, Y. K. Lee, C. Londos, et al., "Perilipin Family Members Preferentially Sequester to Either Triacylglycerol-Specific or Cholesteryl-Ester-Specific Intracellular Lipid Storage Droplets," *Journal of Cell Science* 125, no. Pt 17 (2012): 4067–4076.

13. S. Pourteymour, S. Lee, T. M. Langleite, et al., "Perilipin 4 in Human Skeletal Muscle: Localization and Effect of Physical Activity," *Physiological Reports* 3, no. 8 (2015): e12481.

14. M. Olivé, A. Janué, D. Moreno, J. Gámez, B. Torrejón-Escribano, and I. Ferrer, "TAR DNA-Binding Protein 43 Accumulation in Protein Aggregate Myopathies," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 68, no. 3 (2009): 262–273.

15. H. Li and R. Durbin, "Fast and Accurate Short Read Alignment With Burrows-Wheeler Transform," *Bioinformatics* 25, no. 14 (2009): 1754–1760.

16. K. Wang, M. Li, and H. Hakonarson, "ANNOVAR: Functional Annotation of Genetic Variants From High-Throughput Sequencing Data," *Nucleic Acids Research* 38, no. 16 (2010): e164.

17. S. Richards, N. Aziz, S. Bale, et al., "Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology," *Genetics in Medicine* 17, no. 5 (2015): 405–424.

18. A. Payne, N. Holmes, T. Clarke, R. Munro, B. J. Debebe, and M. Loose, "Readfish Enables Targeted Nanopore Sequencing of Gigabase-Sized Genomes," *Nature Biotechnology* 39, no. 4 (2021): 442–450.

19. I. Stevanovski, S. R. Chintalaphani, H. Gamaarachchi, et al., "Comprehensive Genetic Diagnosis of Tandem Repeat Expansion Disorders With Programmable Targeted Nanopore Sequencing," *Science Advances* 8, no. 9 (2022): eabm5386.

20. H. Gamaarachchi, H. Samarakoon, S. P. Jenner, et al., "Fast Nanopore Sequencing Data Analysis With SLOW5," *Nature Biotechnology* 40, no. 7 (2022): 1026–1029.

21. H. Li, "Minimap2: Pairwise Alignment for Nucleotide Sequences," *Bioinformatics* 34, no. 18 (2018): 3094–3100.

22. P. Edge and V. Bansal, "Longshot Enables Accurate Variant Calling in Diploid Genomes From Single-Molecule Long Read Sequencing," *Nature Communications* 10, no. 1 (2019): 4660.

23. M. Kolmogorov, J. Yuan, Y. Lin, and P. A. Pevzner, "Assembly of Long, Error-Prone Reads Using Repeat Graphs," *Nature Biotechnology* 37, no. 5 (2019): 540–546.

24. R. Vaser, I. Sović, N. Nagarajan, and M. Šikić, "Fast and Accurate De Novo Genome Assembly From Long Uncorrected Reads," *Genome Research* 27, no. 5 (2017): 737–746.

25. G. Benson, "Tandem Repeats Finder: A Program to Analyze DNA Sequences," *Nucleic Acids Research* 27, no. 2 (1999): 573–580.

26. C. Sztalryd and D. L. Brasaemle, "The Perilipin Family of Lipid Droplet Proteins: Gatekeepers of Intracellular Lipolysis," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862, no. 10 Pt B (2017): 1221–1232.

27. S. Andrews, "FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data," (2010), Babraham Bioinformatics, http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/.

28. S. Chen, Y. Zhou, Y. Chen, and J. Gu, "Fastp: An Ultra-Fast All-In-One FASTQ Preprocessor," *Bioinformatics* 34, no. 17 (2018): i884–i890.

29. D. Kim, B. Langmead, and S. L. Salzberg, "HISAT: A Fast Spliced Aligner With Low Memory Requirements," *Nature Methods* 12, no. 4 (2015): 357–360.

30. F. Brechtmann, C. Mertes, A. Matusevičiūtė, et al., "OUTRIDER: A Statistical Method for Detecting Aberrantly Expressed Genes in RNA Sequencing Data," *American Journal of Human Genetics* 103, no. 6 (2018): 907–917.

31. C. Mertes, I. F. Scheller, V. A. Yépez, et al., "Detection of Aberrant Splicing Events in RNA-Seq Data Using FRASER," *Nature Communications* 12, no. 1 (2021): 529.

32. I. F. Scheller, K. Lutz, C. Mertes, V. A. Yépez, and J. Gagneur, "Improved Detection of Aberrant Splicing With FRASER 2.0 and the Intron Jaccard Index," *American Journal of Human Genetics* 110, no. 12 (2023): 2056–2067.

33. L. Maggi, S. Gibertini, E. Iannibelli, et al., "PLIN4-Related Myopathy: Clinical, Histological and Imaging Data in a Large Cohort of Patients," *Journal of Neurology* 270, no. 9 (2023): 4538–4543.

34. C. Depienne and J. L. Mandel, "30 Years of Repeat Expansion Disorders: What Have We Learned and What Are the Remaining Challenges?," *American Journal of Human Genetics* 108, no. 5 (2021): 764–785.

35. C. P. de Fuenmayor-Fernández de la Hoz, A. Hernández-Laín, M. Olivé, et al., "Adult-Onset Distal Spinal Muscular Atrophy: A New Phenotype Associated With KIF5A Mutations," *Brain* 142, no. 12 (2019): e66.

36. K. Sugie, S. Noguchi, Y. Kozuka, et al., "Autophagic Vacuoles With Sarcolemmal Features Delineate Danon Disease and Related Myopathies," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64, no. 6 (2005): 513–522.

37. K. Sugie, "Autophagic Vacuolar Myopathy: Danon Disease and Related Myopathies," *Neurology and Clinical Neuroscience* 10, no. 6 (2022): 273–278.

38. M. J. Danon, S. J. Oh, S. DiMauro, et al., "Lysosomal Glycogen Storage Disease With Normal Acid Maltase," *Neurology* 31, no. 1 (1981): 51–57.

39. I. Nishino, J. Fu, K. Tanji, et al., "Primary LAMP-2 Deficiency Causes X-Linked Vacuolar Cardiomyopathy and Myopathy (Danon Disease)," *Nature* 406, no. 6798 (2000): 906–910.

40. H. Kalimo, M. L. Savontaus, H. Lang, et al., "X-Linked Myopathy With Excessive Autophagy: A New Hereditary Muscle Disease," *Annals of Neurology* 23, no. 3 (1988): 258–265.

41. B. A. Minassian, R. Aiyar, S. Alic, et al., "Narrowing in on the Causative Defect of an Intriguing X-Linked Myopathy With Excessive Autophagy," *Neurology* 59, no. 4 (2002): 596–601.

42. N. Ramachandran, I. Munteanu, P. Wang, et al., "VMA21 Deficiency Prevents Vacuolar ATPase Assembly and Causes Autophagic Vacuolar Myopathy," *Acta Neuropathologica* 125, no. 3 (2013): 439–457.

43. C. Fernandez, D. Figarella-Branger, P. Alla, J. R. Harlé, and J. F. Pellissier, "Colchicine Myopathy: A Vacuolar Myopathy With Selective Type I Muscle Fiber Involvement. An Immunohistochemical and Electron Microscopic Study of Two Cases," *Acta Neuropathologica* 103, no. 2 (2002): 100–106.

44. J. L. De Bleecker, A. G. Engel, and J. C. Winkelmannt, "Localization of Dystrophin and Beta-Spectrin in Vacuolar Myopathies," *American Journal of Pathology* 143, no. 4 (1993): 1200–1208.

45. J. P. Louboutin, M. Villanova, B. Lucas-Héron, and M. Fardeau, "X-Linked Vacuolated Myopathy: Membrane Attack Complex Deposition on Muscle Fiber Membranes With Calcium Accumulation on Sarcolemma," *Annals of Neurology* 41, no. 1 (1997): 117–120.

46. K. Rouger, J. P. Louboutin, M. Villanova, Y. Cherel, and M. Fardeau, "X-Linked Vacuolated Myopathy: TNF-Alpha and IFN-Gamma Expression in Muscle Fibers With MHC Class I on Sarcolemma," *American Journal of Pathology* 158, no. 2 (2001): 355–359.

47. B. Chabrol, D. Figarella-Branger, M. Coquet, et al., "X-Linked Myopathy With Excessive Autophagy: A Clinicopathological Study of Five New Families," *Neuromuscular Disorders* 11, no. 4 (2001): 376–388.

48. J. J. Dowling, S. A. Moore, H. Kalimo, and B. A. Minassian, "X-Linked Myopathy With Excessive Autophagy: A Failure of Self-Eating," *Acta Neuropathologica* 129, no. 3 (2015): 383–390.

49. T. Wenger, S. Terawaki, V. Camosseto, et al., "Autophagy Inhibition Promotes Defective Neosynthesized Proteins Storage in ALIS, and Induces Redirection Toward Proteasome Processing and MHCI-Restricted Presentation," *Autophagy* 8, no. 3 (2012): 350–363.

Supporting Information

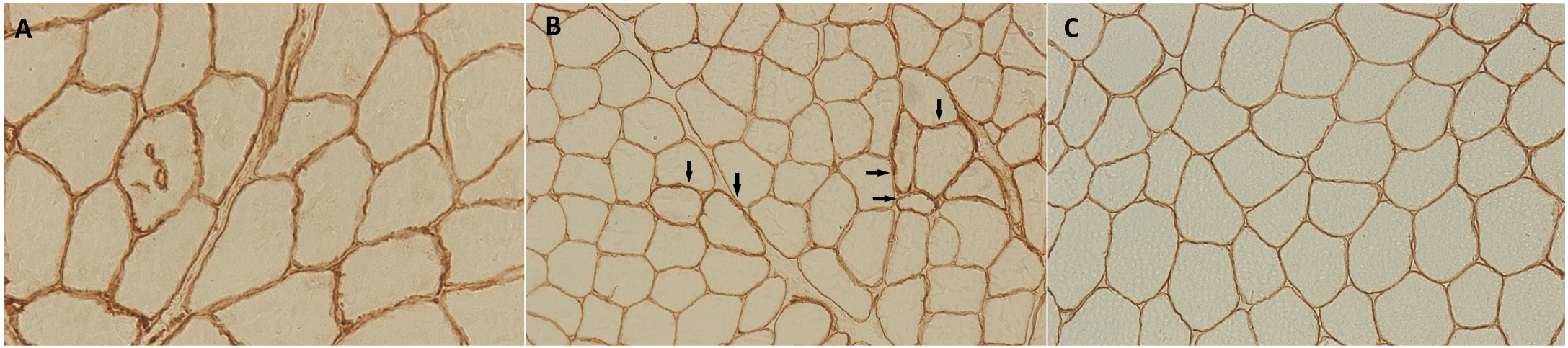
Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section.

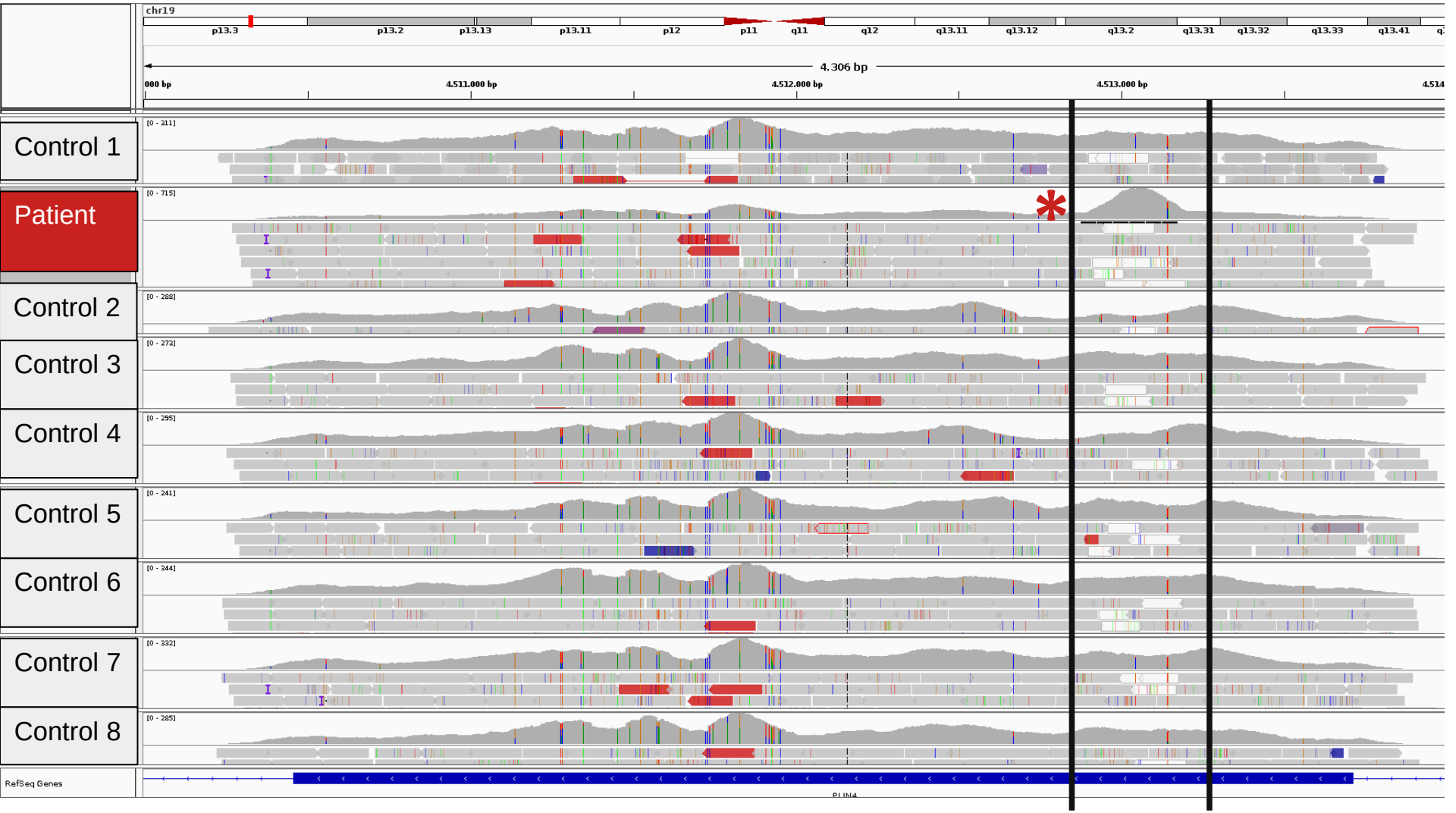
FIGURE LEGENDS – SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Figure 1. Laminin α2 immunohistochemistry in patient muscle (A, B) and healthy control muscle (C). Sarcoplasmic vacuoles contain basal lamina, as shown with laminin α2 immunoreaction in A. Image B shows several fibers with an irregularly thickened sarcolemma due to the particular subsarcolemmic localization of many vacuoles. C shows normal appearance of sarcolemma in control muscle. Images are shown at 40X magnification (A) and 20X magnification (B,C).

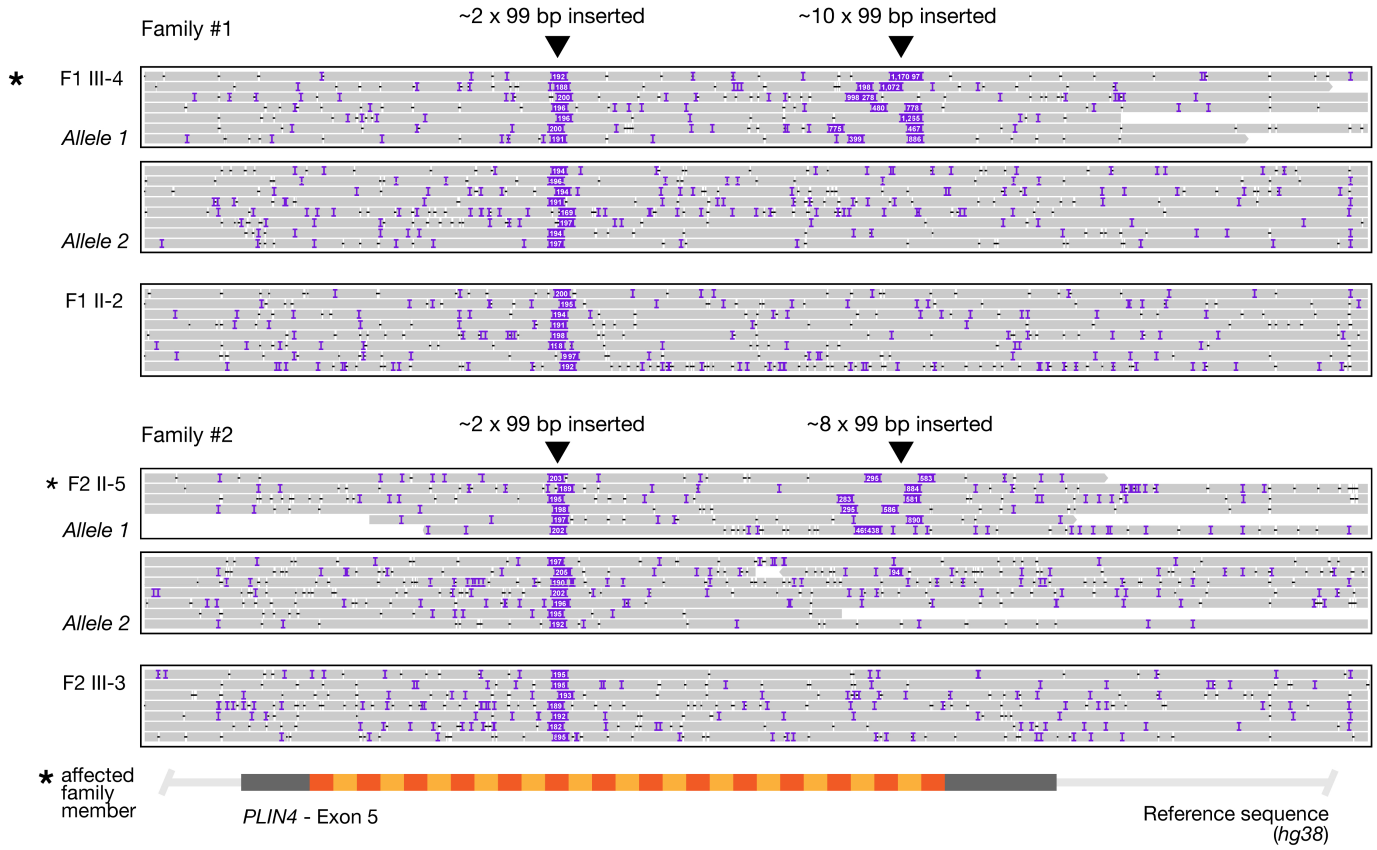
Supplementary Figure 2. Exome sequencing data showed an increase in the number of reads mapping to candidate *PLIN4* region in patient of interest. Samples sequenced in the same batch did not show increased coverage in the region.

Supplementary Figure 3. Oxford nanopore read alignments to the reference genome (hg38) within *PLIN4*-exon 5. The presence of large insertions (purple markers) within aligned reads is indicative of additional repeat copies, relative to hg38. For affected individuals, alignments are shown separately for expanded and non-expanded alleles.


A
B
C


chr19
p13.3
p13.2
p13.13
p13.11
p12
p11
q11
q12
q13.11
q13.12
q13.2
q13.31
q13.32
q13.33
q13.41
4.306 bp
000 bp
4.511.000 bp
4.512.000 bp
4.513.000 bp
4.514
Control 1
[0 - 311]
Patient
[0 - 715]
Control 2
[0 - 288]
Control 3
[0 - 273]
Control 4
[0 - 295]
Control 5
[0 - 241]
Control 6
[0 - 344]
Control 7
[0 - 332]
Control 8
[0 - 285]
RefSeq Genes
PLIN4

Nanopore read alignments to PLIN4-exon5 reference sequence



Supplementary Table 1. Antibodies used in the present study

Antigen	Manufacturer	Reference	Dilution (IF/IH or WB)	Host
PLIN4	Progen	GP-34	1/100 (IF)	Guinea Pig
PLIN4	Origen	AP33136SU-N	1/900 (WB)	Guinea pig
NBR1	Santa Cruz	sc-130380	1/50 (IH)	Mouse
LAMP-2	Abcam	ab-25631	1/10 (IH)	Mouse
P62	Enzo	PW-9860	1/200 (IF)	Rabbit
LC3 B	Cell Signaling	#2775#	1/50 (IF)	Rabbit
MAC (C5b9)	Dako	M0777	1/40 (IH)	Mouse
MHC-I/HLA-ABC	Novocastra	M0736	1/100 (IH)	Mouse
Dystrophin (Carboxy)	Novocastra	NCL-DYs2	1/8 (IH)	Mouse
Dystrophin (Rod)	Novocastra	NCL-DYs1	1/2 (IH)	Mouse
Caveolin-3	BD Bioscience	610421	1/80 (IH)	Mouse
Laminin α2	Bio-Rad	6067-0906	1/50 (IH)	Mouse

IF immunofluorescence, IH immunohistochemistry, WB western blot.

	Cholinesterase	Calcium deposits	Dystrophin	LAMP2	MHC class I	MAC	P62	Acid phosphatase
PLIN4 myopathy	+	+	+	+	+	+	+ (sarcolemma and vacuoles)	+
Colchicine myopathy	+	+	+	+	+	+	+ (only vacuoles)	+
Pompe disease	-	-	+/-	+	-	-	+ (only vacuoles)	+
XMEA	+	+	+	+	+	+	# + (only vacuoles)	+
Danon disease	+	Not reported	+/-	-	-	-	+ (only vacuoles)	+

Supplementary Table 2. Pathological features of autophagic vacuolar myopathies (AVMs) and comparison with *PLIN4*-related myopathy.

Data based on literature review and our own observations. XMEA: X-linked myopathy with excessive autophagy. (#) Based on the publication by Chen L, Fang MJ, Xu D *et al.* A novel variant in VMA21 causing adult-onset phenotype of X-linked myopathy with excessive autophagy with cardiac involvement in a Chinese patient. J Neuromuscul Dis. 2024 Dec 23. PMID: 39973400.

4.3. Tercer trabajo

- **Título**: Absence of pathogenic mutations and strong association with HLA-DRB1*11:01 in statin-naïve early-onset anti-HMGCR necrotizing myopathy

- Publicado en la revista *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation* en 2024 (Q1)

- Referencia bibliográfica:

  Llansó L, Segarra-Casas A, Domínguez-González C, Malfatti E, Kapetanovic S, Rodríguez-Santiago B, de la Calle O, Blanco R, Dobrescu A, Nascimento-Osorio A, Paipa A, Hernandez-Lain A, Jou C, Mariscal A, González-Mera L, Arteche A, Lleixà C, Caballero-Ávila M, Carbayo Á, Vesperinas A, Querol L, Gallardo E, Olivé M. Absence of Pathogenic Mutations and Strong Association With HLA-DRB1*11:01 in Statin-Naïve Early-Onset Anti-HMGCR Necrotizing Myopathy. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2024 Sep;11(5):e200285. doi: 10.1212/NXI.0000000000200285. Epub 2024 Aug 6. PMID: 39106428.

RESEARCH ARTICLE OPEN ACCESS

Absence of Pathogenic Mutations and Strong Association With HLA-DRB1*11:01 in Statin-Naïve Early-Onset Anti-HMGCR Necrotizing Myopathy

Laura Llansó, MD, Alba Segarra-Casas, MD, Cristina Domínguez-González, MD, PhD, Edoardo Malfatti, MD, PhD, Solange Kapetanovic, MD, Benjamín Rodríguez-Santiago, MD, PhD, Oscar de la Calle, MD, PhD, Rosa Blanco, MLT, Amelia Dobrescu, MD, Andrés Nascimento-Osorio, MD, Andrés Paipa, MD, PhD, Aurelio Hernandez-Lain, MD, Cristina Jou, MD, Anaís Mariscal, MD, PhD, Laura González-Mera, MD, Ana Arteche, MD, Cinta Lleixà, PhD, Marta Caballero-Ávila, MD, Álvaro Carbayo, MD, Ana Vesperinas, MD, Luis Querol, MD, PhD, Eduard Gallardo, PhD,* and Montse Olivé, MD, PhD*

Correspondence
Dr. Olivé
molivep@santpau.cat

Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 2024;11:e200285. doi:10.1212/NXI.0000000000200285

Abstract

Background and Objectives

Immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM) caused by antibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR) is an inflammatory myopathy that has been epidemiologically correlated with previous statin exposure. We characterized in detail a series of 11 young statin-naïve patients experiencing a chronic disease course mimicking a limb-girdle muscular dystrophy. With the hypothesis that HMGCR upregulation may increase immunogenicity and trigger the production of autoantibodies, our aim was to expand pathophysiologic knowledge of this distinct phenotype.

Methods

Clinical and epidemiologic data, autoantibody titers, creatine kinase (CK) levels, response to treatment, muscle imaging, and muscle biopsies were assessed. HMGCR expression in patients' muscle was assessed by incubating sections of affected patients with purified anti-HMGCR+ serum. Whole-exome sequencing (WES) with a special focus on cholesterol biosynthesis–related genes and high-resolution human leukocyte antigen (HLA) typing were performed.

Results

Patients, aged 3–25 years and mostly female (90.9%), presented with subacute proximal weakness progressing over many years and high CK levels (>1,000 U/L). Diagnostic delay ranged from 3 to 27 years. WES did not reveal any pathogenic variants. HLA-DRB1*11:01 carrier frequency was 60%, a significantly higher proportion than in the control population. No upregulation or mislocalization of the enzyme in statin-exposed or statin-naïve anti-HMGCR+ patients was observed, compared with controls.

*These authors contributed equally to this work.

From the Department of Neurology (L.L., C.L., M.C.-Á., Á.C., A.V., L.Q., E.G., M.O.), Neuromuscular Diseases Unit; Department of Genetics (A.S.-C., B.R.-S.), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Department of Neurology (C.D.-G.), Neuromuscular Diseases Unit, Hospital Universitario 12 de Octubre. Research Institute imas12, Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; Université Paris-Est Créteil (E.M.), INSERM, U955 IMRB; AP-HP, Hôpital Mondor, FHU SENEC, Service d'Histologie, Créteil, France; Department of Neurology (S.K.), Neuromuscular Diseases Unit, Osakidetza Basque Health Service, Basurto University Hospital, Universidad del País Vasco, Bilbao; Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau) (B.R.-S., R.B., C.L., L.Q., E.G., M.O.), Barcelona; Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Madrid; Genomic Instability Syndromes and DNA Repair Group and Join Research Unit on Genomic Medicine UAB (B.R.-S.), Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau; Immunology Department (O.C., A.M.), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Barcelona, Spain; Department of Genetics (A.D.), Craiova University Hospital, Romania; Neuropaediatrics Department (A.N.O.), Neuromuscular Diseases Unit, Hospital Sant Joan de Déu, Fundación Sant Joan de Déu, CIBERER - ISC III; Neurology Department (A.P., L.G.-M.), Neuromuscular Unit, IDIBELL-Hospital de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona; Pathology Department (A.H.-L.), Neuropathology Unit, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid; Pathology Department (C.J.), Institut Pediàtric de Recerca, Hospital Sant Joan de Déu, and MetabERN, Barcelona; Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid; Department of Neurology (L.G.-M.), Hospital de Viladecans, Barcelona; and Department of Genetics (A.A.), Hospital Universitario 12 de Octubre, Research Institute imas12, Madrid, Spain.

Go to Neurology.org/NN for full disclosures. Funding information is provided at the end of the article.

The Article Processing Charge was funded by the authors.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND), which permits downloading and sharing the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

Copyright © 2024 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. on behalf of the American Academy of Neurology.

Downloaded from https://www.neurology.org by 139.47.35.166 on 27 January 2025

Glossary

anti-HMGCR = anti–3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase; **anti-SRP** = anti–signal-recognition particle; **CI** = confidence interval; **CK** = creatine kinase; **CLIA** = chemiluminescent immunoassay; **HLA** = human leukocyte antigen; **IgG** = immunoglobulin G; **IMNM** = immune-mediated necrotizing myopathy; **IVIG** = IV immunoglobulin; **LGMD** = limb-girdle muscular dystrophy; **MHC-I** = major histocompatibility complex class I; **NGS** = next-generation sequencing; **OR** = odds ratio; **SAMS** = statin-associated muscle symptoms; **STIR** = short-T1 inversion recovery; **T1w** = T1-weighted; **T2w** = T2-weighted; **WES** = whole exome sequencing.

Discussion

WES of a cohort of patients with dystrophy-like anti-HMGCR IMNM did not reveal any common rare variants of any gene, including cholesterol biosynthesis–related genes. HLA analysis showed a strong association with HLA-DRB1*11:01, previously mostly described in statin-exposed adult patients; consequently, a common immunogenic predisposition should be suspected, irrespective of statin exposure. Moreover, we were unable to conclusively demonstrate muscle upregulation/mislocalization of HMGCR in IMNM, whether or not driven by statins.

Introduction

Immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM) is a type of inflammatory myopathy clinically characterized by subacute proximal weakness and high serum creatine kinase (CK) levels. Most patients with IMNM produce anti–3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (anti-HMGCR) or anti–signal-recognition particle (anti-SRP) autoantibodies. Most patients with anti-HMGCR IMNM have a history of exposure to statins; however, symptoms fail to resolve after statin discontinuation and immunosuppressive therapy becomes necessary.[1]

IMNM associated with anti-HMGCR was first described in the early 2000s by 3 groups reporting 38 statin-exposed adult patients presenting with acute or subacute proximal limb weakness.[2-4] Many series since then have described further characteristics of the disease. Bulbar, respiratory, or cardiac involvement is extremely rare, and extramuscular symptoms are usually absent. Muscle biopsy shows muscle fiber necrosis and regeneration, frequent overexpression of major histocompatibility complex class I (MHC-I), and macrophage-predominant inflammatory infiltrates with few lymphocytes. Serum CK levels are very elevated, usually ranging from 1,000 to 20,000 U/L.[1] Although response to immunosuppressive drugs is usually good, some patients require more than 1 agent. Different combination strategies are based on daily corticosteroids, steroid-sparing immunosuppressive medication, and IV immunoglobulin (IVIG) therapy. Although CK levels tend to decrease with medication, they continue high and patients can only rarely be tapered off all treatment during follow-up.[5] Although anti-HMGCR antibody titers correlate with disease severity and decrease after treatment, they rarely normalize in recovered patients.[6]

Up to 70%–75% of patients with anti-HMGCR IMNM have been exposed to statins, according to large series.[4,7,8] Nevertheless, statins are widely used and data to establish statins as causal agents of IMNM generate controversy.[9] Because previous exposure to statins correlates with age, a lower percentage of younger patients are exposed to statins compared with older patients (40% < 53 years vs 97% > 60 years). However, young age has been independently associated with greater disease severity and treatment refractoriness.[5,10] A distinct anti-HMGCR IMNM phenotype has been reported in very young statin-naïve patients, with subacute clinical presentation and chronic progression mimicking muscular dystrophy. Cases of young asymptomatic patients with anti-HMGCR antibodies and high CK levels, although extremely rare, have been reported, with either progression of weakness without treatment[11] or complete resolution of CK elevation after treatment with methotrexate and IVIG.[12] Some children and young adults with anti-HMGCR IMNM respond reasonably or very well to immunotherapy.[13,14] Nevertheless, pediatric cohort studies report that even patients treated early on in the disease course may experience clinical relapse or partial treatment response or may need adjuvant immunosuppressants other than corticosteroids to achieve disease stabilization.[15,16] In fact, a recent case-based review reported that only one-third of children achieve complete remission after a mean follow-up of 31 months.[17]

A chronic progressive course, often resembling limb-girdle muscular dystrophy (LGMD), may manifest in statin-naïve patients affected by anti-HMGCR IMNM, and this may lead to misdiagnosis or a lengthy diagnostic delay, sometimes of years, until the anti-HMGCR antibodies are tested. We previously reported a series of 5 young patients with anti-HMGCR IMNM mimicking LGMD,[18] and several subsequent reports have documented similar phenotypes.[13,16,19,20] Two recent case reports have attested to muscle imaging evidence of progression from muscle edema to fatty infiltration over the years, demonstrating irreversible muscle damage.[11,17] This fact would suggest that treatment must be prompt, given that immunomodulatory therapy initiated years after onset is usually unsuccessful in controlling the disease.

Downloaded from https://www.neurology.org by 139.47.35.166 on 27 January 2025

As yet unknown is why, in statin-naïve subjects, anti-HMGCR antibodies are produced, with subsequent development of IMNM. It has been postulated that ingesting natural sources of statins, e.g., mushrooms or red yeast rice, may trigger the disease in predisposed individuals, especially in Japan and China, where the association with pharmaceutical statin exposure is relatively low. Evidence from large series of anti-HMGCR patients has shown a well-established immunogenic association with human leukocyte antigen (HLA) class II. The DRB1*11:01 allele is strongly associated (OR = 25) with the development of anti-HMGCR autoantibodies in adults.[21] Although the association has been described even in patients with no known statin exposure, a stronger association (OR = 80) is observed when there is a dual effect of HLA-DRB1*11:01 presence and statin exposure.[8] In children, as opposed to adults, there is a strong association with the DRB1*07:01 allele.[15] In a study of 6 children and young adults with a LGMD-like phenotype, haplotype analysis indicated the presence of one or other of those alleles in most of the patients, with no apparent correlation with age.[14]

HMGCR is a ubiquitous cytoplasmic antigen expressed in normal myotubes.[22] Some authors claim that HMGCR enzyme upregulation, conformational changes, or mislocalization from the intracellular space to the cell surface can break immune tolerance and trigger autoantibody formation.[1,23] Those mechanisms, especially when a HLA risk allele is present, would result in aberrant processing by antigen-presenting cells, producing the immunogenic epitopes that lead to an autoimmune humoral response.

Two groups have recently described a new autosomal recessive LGMD caused by biallelic loss-of-function variants in the *HMGCR* gene, that led to a conformational change in the enzyme and a phenotype of chronic progressive proximal weakness.[24,25] Although 10 of the 15 patients who were tested did not have antibodies against HMGCR, this recent discovery of a new molecularly identified recessive LGMD may suggest that polymorphisms or pathogenic variants in *HMGCR* might change enzyme conformation and activate the immune system to produce autoantibodies. Another explanation for immunologic loss of tolerance against HMGCR may be mutations in other genes that encode proteins involved in cholesterol biosynthesis, leading to secondary compensatory overexpression of the enzyme in muscle cells and triggering of the immune response.

With a view to exploring the possible existence of a genetic predisposing condition, our aim was to describe in detail our series of young patients with chronic anti-HMGCR IMNM now enlarged to 11 and so expand knowledge of the unexplored pathophysiology of this distinct disease phenotype.

Methods

Gathered clinical and epidemiologic data for the study of 11 patients are summarized in Table 1. Antibodies against HMGCR were detected by ELISA in 8 patients and chemiluminescent immunoassay (CLIA) in 3 patients. The patients were also tested for anti-SRP antibodies.

Muscle Imaging

Muscle imaging studies—MRI or CT—were performed in 10 patients on diagnosis (9 MRI and 1 CT). The MRI protocol included T1-weighted (T1w), short-T1 inversion recovery (STIR), and T2-weighted (T2w) sequences.

Muscle Pathology

Muscle biopsies were performed in all 11 patients and were previously processed for routine histochemical staining and for immunohistochemistry, as previously described.[26] For the purposes of this study, MHC-I and membrane attack complex (MAC) immunostaining were assessed in 6 and 4 patients, respectively. In addition, HMGCR protein expression was assessed by immunohistochemistry in 1 statin-exposed HMGCR+ IMNM patient, as previously described,[26] and by immunofluorescence in 2 statin-naïve HMGCR+ IMNM patients and 1 healthy control using purified immunoglobulin G (IgG) from statin-exposed HMGCR+ patient serum compared with a seronegative control serum (IgG Purification Kit, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). The obtained IgG was labeled with biotin following the manufacturer's instructions (EZ Link Biotinylation Kit, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Muscle sections were immunolabeled using biotinylated IgG and Alexa 594 streptavidin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Anti-HMGCR purified biotinylated IgG immunoreactivity was double-checked by incubating patient seropositive and control seronegative sera in triple rat tissue (NOVA Lite Rat Liver-Kidney-Stomach Kit, Inova Diagnostics, San Diego, CA) to observe the specific HMGCR-associated liver immunofluorescence pattern (HALIP), as previously described.[27] HMGCR expression was also assessed in 3 patient samples using a commercial antibody compared with a healthy control (dilution 1:25 of anti-HMGCR sc-271595, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX).

Whole-Exome Sequencing

Whole-exome sequencing (WES) was performed in all 11 patients to study coding exons and flanking regions (±50 base pairs) of candidate genes. In brief, DNA libraries were prepared using Kapa reagents (Roche, including HyperExome probes targeting the whole exome) and sequenced in a NextSeq 500 instrument (Illumina, San Diego, CA). The resulting fastq sequencing files were analyzed using standard procedures, i.e., BWA alignment, GATK variant calling, and ExomeDepth for copy number variants, and variants were annotated using ANNOVAR.[28-30] Data filtering to obtain candidate variants included assessment of population frequencies, inheritance model, and impact on the protein, among others.

Variants were classified according to American College of Medical Genetics and Genomics and Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP) guidelines.[31] Evaluated were

Downloaded from https://www.neurology.org by 139.47.35.166 on 27 January 2025

Table 1 Main Clinical and Laboratory Characteristics of 11 Patients With Statin-Naïve HMGCR+ IMNM

Patient ID	Age at onset/Dx delay	Ab titers (range 0–19.9)	Initial CK levels (IU/L)	CK levels at Dx (U/L)	HLA-DRB1	Initial symptoms	IS Tx (n)	Tx response	Current clinical status	Years of follow-up
P1	Childhood/3 y	CLIA: 192 CU/mL	8,000	1,000	04:01; 04:07	Subacute onset (2 mo) with symmetrical scapular > pelvic weakness and significant flexor axial involvement. Frequent falls. Mild scoliosis and a winged scapula from onset. No respiratory or bulbar involvement	IVIG, CS, AZA, MTX, MMF, RTX (6) Currently: IVIG in periodic pulses + PDN 5 mg/d	Yes, partial	Proximal and symmetric weakness, MRC 3+/5 periscapular and 4/5 pelvic. Ambulant No distal weakness. Cervical flexion weakness 4/5 and axial flexion 3/5. Mild scoliosis, mild lumbar hyperlordosis, scapular winging R > L	10
P2	Adolescence/12 y	ELISA: 132 SGU	1,200	1,000	Np	LL proximal weakness. Subacute, slowly progressive	IVIG, CS, AZA (3)	Yes, partial	Proximal UL and LL weakness 4/5. Ambulant	14
P3	Childhood/20 y	ELISA: 325 SGU	5,000–8,000	220	11:02; 11:04	Subacute axial and limb-girdle weakness	IVIG, CS, MTX, RTX (4)	Yes, partial	Manages to walk some steps at home but needs wheelchair outdoors	23
P4	Early adulthood/ 18 y	ELISA: 111 SGU	8,000	300	11:01; 01:01	Subacute axial and limb-girdle weakness	CS, IVIG, MTX, AZA, RTX, TAC (6)	Yes, partial	Proximal, distal, and axial weakness. MRC 3/5. Ambulant	18
P5	Early childhood/ 27 y	CLIA: 59.5 CU/mL	6,000	200	07:01; 13:02	Subacute onset of proximal weakness (loss of ambulation) and skin rash on knees and knuckles, treated with CS for 5 y with a partial response. Ambulation recovered after the first year of treatment	CS, MTX, MMF (3) Currently: MMF 1g/12h	Yes, partial	Mild proximal UL weakness (biceps 4/5) and severe in LL (psoas and glutei 1/5) Ambulant	35
P6	Early adulthood/ 7 y	ELISA: 229 SGU	8,500	3,000	07:01; 15:01	Proximal limb-girdle weakness Motor clumsiness since early childhood	CS, MTX, IVIG (3)	No	Severe proximal weakness Wheelchair bound	15
P7	Childhood/25 y	ELISA: 183 SGU	10,000	225	11:01; 14:54	Subacute proximal weakness in LL.	CS, MTX, IVIG (3)	No	Proximal, distal, axial weakness Wheelchair dependent Respiratory failure: nocturnal NIV since 21 y	35
P8	Adolescence/5 y	ELISA: 177 SGU	7,000	2,000	11:01; 08:01	Progressive limb-girdle weakness, scoliosis and rigid spine, asymmetric scapular winging, axial involvement	CS, IVIG (2)	Yes, partial	Clinical improvement, in particular in shoulder girdle	10
P9	Adolescence/14 y	Immunodot strong +. Confirmed in rat triple tissue (HALIP)	UNL X5	1,082	07:01; 11:01	Proximal weakness in LL, around 4 y after also in UL. In 2012, treated with CS for 1 y without improvement	CS, MTX, AZA, IVIG (4)	Yes, partial	Mild proximal deficit: UL 4/5 and LL 4/5. Muscle pain at rest and after exercise	15
P10	Early adulthood/ 6 y	CLIA: 467,5 CU/mL	3,000	5,500	11:01; 11:04	Progressive proximal LL weakness Stopped running at 23 y. UL affected 2 y from onset.	CS, MTX, IVIG (3)	Yes, partial	Proximal deficit in UL 4/5, LL 3/5, asymmetric (worse on left side). Wheelchair bound. Mild dysphagia. Elbow retractions	10
P11	Childhood/19 y	ELISA: 948 SGU	12,500	83	11:01; 01:02	Subacute onset (mo) of LL weakness, frequent falls, ambulation lost in 1 y. At 12 y, surgery for scoliosis. At 14 y, respiratory involvement. Cervical rigidity developed	IVIG, CS, AZA (3) Currently: IVIG and CS	Yes, partial	Wheelchair bound. Only head, hand, and finger movements Severe respiratory involvement: currently tracheostomy, FVC 10%, IV 11 h/d	22

Abbreviations: Ab = antibody; AZA = azathioprine; CLIA = chemiluminescent immunoassay; CS = corticosteroid; CU/mL = chemoluminescence units/milliliter; Dx = diagnosis; FVC = forced vital capacity; HALIP = HMGCR-associated liver immunofluorescence pattern; HLA = human leukocyte antigen; HMGCR = 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase; IMNM = immune-mediated necrotizing myopathy; IS Tx = immunosuppressive treatment; IV = invasive ventilation; IVIG = IV immunoglobulin; LL = lower limb(s); MMF = mycophenolate mofetil; MRC = Medical Research Council Muscle Strength Scale; MTX = methotrexate; NIV = noninvasive ventilation; Np = not performed; PDN = prednisone; R > L = right > left; RTX = rituximab; SGU = standard units for ELISA; TAC = tacrolimus; Tx = treatment; UL = upper limb(s); U/L = units per liter; UNL = upper normal limit.

Downloaded from http://www.neurology.org/n/nn/article-pdf/12/2/e200285/3166447/nn_2025_12_2_e200285.pdf by guest on 27 January 2025

rare variants in 40 genes related with the cholesterol biosynthesis pathway: *ACAT1, ACAT2, CARM1, COQ2, CREBBP, CYP51A1, DHCR24, DHCR7, EBP, EGR2, FDFT1, FDPS, GGPS1, HMGCR, HMGCS1, HMGCS2, HSD17B7, IDI1, IDI2, INSIG1, INSIG2, LBR, LIPA, LSS, MSMO1, MVD, MVK, NSDHL, PMVK, PPARA, RXRA, SC5D, SCAP, SMARCD3, SOAT1, SQLE, SREBF1, SREBF2, TBL1X,* and *TM7SF2*. Also evaluated were variants in 139 known genes associated with muscular dystrophies and myopathies.

Human Leukocyte Antigen Typing and Statistical Analysis

We used next-generation sequencing (NGS) to fully sequence the HLA of 10 patients to determine whether they carried the DRB1*11:01 or DRB1*07:01 alleles or other unknown HLA associations. Exons 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7/8 of HLA-A, HLA-B, and HLA-C; exons 2 and 3 of HLA-DQB1 and HLA-DRB1; and exons 1, 2, 3, 4, and 5 of HLA-DPB1 were amplified by multiplex PCR (NGSgo®-MX6-1).[32] NGS was performed on a MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA) using the same kit. All samples were simultaneously sequenced in a MiSeq run, and the resulting sequences were analyzed using NGSengine (version 2.8.1.27684; GenDX, Utrecht, Netherlands) and IMGT/HLA Database (version 3.50.0). The percentage of individuals carrying each allele (carrier frequency) was calculated for comparison with carrier frequency for the general population, obtained from the Allele Frequencies database.[33-39]

To perform the statistical analysis, the weighted average populational carrier frequency was calculated considering the number of anti-HMGCR+ patients from each country represented in the study. Data were compiled in a coded database. The degree of HLA data-disease association was expressed as an odds ratio (OR) value for a 95% confidence interval (CI). Fisher exact test, OR, and CI calculations were performed using the GraphPad Prism v8.0 package.

Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

All patients consented to participate in this observational study. Clinical evaluations and complementary tests were performed as part of the routine diagnostic workup.

Data Availability

Anonymized data not published within this article will be made available by request from any qualified investigator.

Results

Clinical and Laboratory Features

Of the 11 studied patients, 10 were female (90.9%), and in terms of ethnicity, 10 were White (6 Spanish, 2 Romanian, 1 Italian, and 1 Algerian) and 1 was Latin American (Colombian). All patients were positive for anti-HMGCR and negative for anti-SRP antibodies according to ELISA or CLIA detection tests. The main clinical characteristics and anti-HMGCR antibody titers are summarized in Table 1.

Birth and early development were normal in all patients. Age at onset ranged from 3 to 25 years, and diagnostic delay ranged from 3 to 27 years. Most of the patients presented with subacute proximal weakness in the lower limbs (and less frequently in the upper limbs) that had developed over months; 1 patient presented with a concomitant skin rash in the knee and knuckle areas that disappeared after steroid therapy; 1 patient had the Raynaud phenomenon; 1 patient had mild scoliosis and a winged scapula from onset; 5 patients (45.5%) showed axial weakness, either at onset or during evolution; 2 patients had cervical rigidity; 1 patient had bulbar symptoms (P10); and finally, 7.5 and 16 years after disease onset, 2 patients experienced respiratory involvement requiring noninvasive (P7) and invasive ventilation (P11). At symptom onset, CK levels were markedly elevated (1,200–12,500 U/L).

Muscle Imaging

A muscle imaging study was performed in 10 patients (9 MRI and 1 CT). MRI results for 6 patients (P1 to P6), shown in Figure 1 and eFigure 1, suggest that progressive muscle atrophy correlates with longer disease duration. T1w images showed early-stage absent or mild fatty infiltration in the gluteal muscles that, symmetrically over time, progressed to the thigh muscles, with no clear predominance of the anterior or posterior compartment and, in the advanced disease stage, involved the distal leg muscles (typically the medial gastrocnemius muscle). The presence of edema, revealed as STIR hyperintensity, was variable and usually patchy in the thighs and legs, irrespective of disease duration.

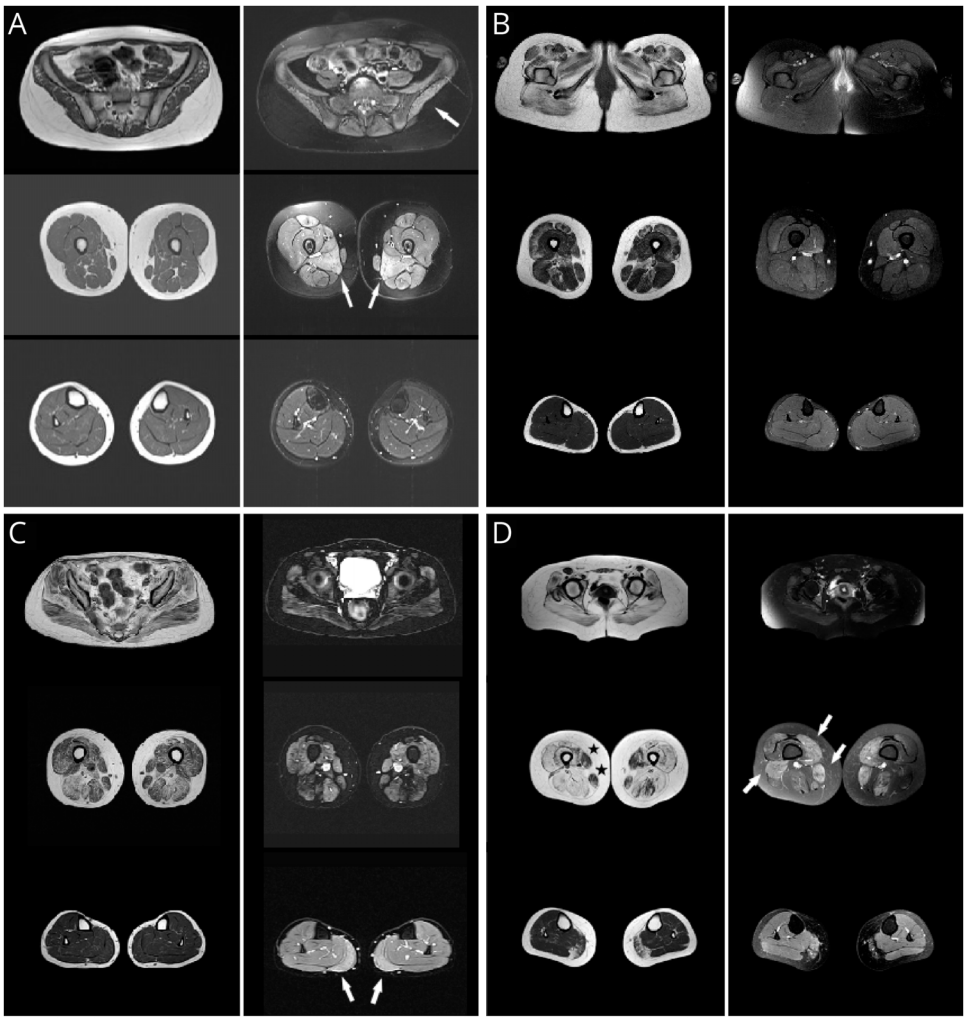
Biopsy Findings

Muscle biopsy results were available for 10 patients. Although muscle pathology features were similar in all studied patients, lesions varied from mild to severe and were characterized by increased variability in fiber size, mild to moderate endomysial fibrosis, and the consistent presence of very few to abundant necrotic and regenerative fibers. Muscle biopsies from P6 and P8 showed several whorled fibers. Inflammatory infiltrates were present in 4 patients, generally very scarce except in 2 patients, one of whom (P6) showed several perivascular inflammatory infiltrates. MHC-I was overexpressed in 5 of 6 patients. MAC/C5b-9 deposition in the membrane of nonnecrotic fibers was observed in 4 of 4 tested patients. Muscle pathology details are summarized in Table 2, and images for 3 muscle biopsies are shown in Figure 2.

No overexpression of the HMGCR protein was observed in the muscle fibers of any of the studied patients after incubation with purified IgG from the patient's HMGCR+ serum, matching with IgG from a control serum, and comparison with a healthy control muscle. Immunofluorescence images are shown in eFigure 2. No differences in HMGCR expression using a commercial antibody were observed either (data not shown).

Downloaded from https://www.neurology.org by 139.47.35.166 on 27 January 2025

Figure 1 Lower-Limb MRI Scans (T1w and STIR Images) From 4 Patients



Disease progression in years. (A) Patient 1 (P1), 3 years. (B) P2, 12 years. (C) P3, 20 years. (D) P4, 18 years. Left columns: Axial T1w images in the pelvis, thigh, and leg. Right columns: Matched STIR images. Note progressive symmetric muscle involvement in relation to disease progression. T1w images initially show fatty infiltration in the gluteal muscles that later spreads to the thigh muscles, and in more advanced disease stages, leg involvement affecting the medial gastrocnemius muscle. Note also the preservation of the gracilis and sartorius muscles (*asterisks*), even in late disease stages. STIR images show increased water content in some muscles (patchy inflammation) in 3 patients irrespective of disease evolution: bilaterally in the gluteal and adductor mayor muscles in P1 (A, *arrows*), in the thighs and medial gastrocnemius muscle in P3 (C, *arrows*), and in the thighs in P4 (D, *arrows*).

Treatment and Clinical Response

All patients received a combination of 2 or more immunosuppressive medications (range 2–6; median 3). Corticosteroids were administered to all patients and IVIG to 10 of the 11 patients. The most frequently administered immunosuppressants were methotrexate (n = 8) and azathioprine (n = 5), followed by rituximab (n = 3), mycophenolate mofetil (n = 2), and tacrolimus (n = 1). Of note, 2 patients with disease evolution of 7 and 25 years failed to respond to treatment, whereas the remaining patients partially responded, with either initial motor improvement or disease stabilization. No patient achieved full remission, including cases diagnosed early on and treated at 3, 5, and 6 years from onset. Treatment intensification was tried in all cases, but outcomes were no better. Table 1 reports treatments and current clinical status for the 11 patients.

Whole-Exome Sequencing

WES did not reveal any causative pathogenic or likely pathogenic variant in 40 genes that encode proteins involved in cholesterol biosynthesis. In this subset of candidate genes, identified in 4 patients were 6 heterozygous variants of uncertain significance (VUS) in *IDI2*, *MVD*, *HMGCS2*, *SOAT1*, and *DHCR7*. A patient (P9) with a VUS in *HMGCS2* had another VUS in *DHCR7*, both detected in a heterozygous state in genes with an autosomal recessive inheritance (see eTable 1 for more details). Likewise, no pathogenic variants that could explain the phenotype were observed in any myopathy-causative gene. Moreover, any rare variant (gnomAD v.2.1.1 allele frequency <0.05) in other genes was found to be common to all patients.

Human Leukocyte Antigen Typing

Of 10 patients, 6 were carriers of the HLA-DRB1*11:01 and 3 were carriers of the DRB1*07:01 allele (1 was a carrier of both risk alleles). The other 2 patients carried neither allele, specifically the only Latin American in the cohort (P1) and a carrier of DRB1*11:02 and DRB1*11:04 (P3). A significantly higher proportion of the DRB1*11:01 allele was observed in the anti-HMGCR+ patients compared with the general population (60% vs 13.7%; OR = 9.4, p = 0.0009, CI = 2.65–33.39). By contrast, the percentage of patients carrying

Downloaded from https://www.neurology.org by 139.47.35.166 on 27 January 2025

Table 2 Summarized Muscle Pathology Details

Patient ID	Increased fiber size variability	Muscle fiber necrosis	Inflammatory infiltrates	Endomysial fibrosis	MHC class I overexpression	MAC deposition	Additional findings
P1	Important	Abundant	Scarce	Mild	Yes	np	
P2	Moderate	Mild	Absent	Mild	np	np	
P3	Moderate	Mild	Absent	Mild	np	np	
P4	Moderate	Mild	Absent	Mild	np	np	
P5	Moderate	Mild	Absent	Mild	Yes	np	
P6	Moderate	Abundant	Moderate	Mild	Yes	Yes	Whorled fibers
P7	Moderate	Moderate	Scarce	Absent	Yes	np	
P8	Moderate	Moderate	Absent	Moderate	Yes	Yes	Whorled fibers
P9	Moderate	Moderate	Absent	Mild	np	Yes	
P10	Moderate	Abundant	Moderate	Moderate	Absent	Yes	
P11	Moderate	nk	nk	nk	nk	nk	

Abbreviations. MAC, membrane attack complex; MHC, major histocompatibility complex; np, not performed; nk, not known.

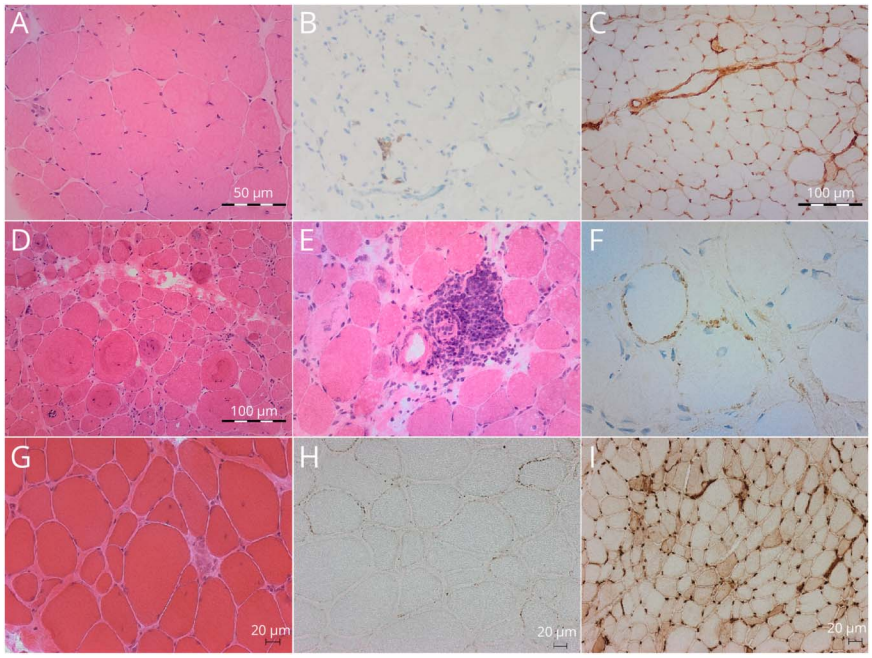
DRB1*07:01 did not differ from the weighted carrier frequency for the general population (30% vs 27.4%; OR = 0.45, p = 1.56; CI = 0.40–6.05).

Discussion

Performing WES and focusing on genes involved in cholesterol biosynthesis, we could not prove a monogenic predisposition in statin-naïve children and young adults with anti-HMGCR IMNM. Nevertheless, we did find a strong association with HLA-DRB1*11:01, which is strongly and mostly associated with statin-related IMNM in adults.

In children and young individuals compared with statin-exposed adults, anti-HMGCR IMNM differs in terms of clinical evolution, response to treatment, and prognosis. Patients tend to develop proximal muscle weakness early on in

Figure 2 Muscle Biopsy Findings From 3 Patients



(A–C) Patient 5 (P5). (D–F) P6. (G–I): P8. (A, D, E, G) Hematoxylin and eosin staining (H&E). (B) CD8 immunohistochemistry. (C, I) MHC class I immunohistochemistry; (F, H) MAC/C5b-9 immunohistochemistry. Histology shows mild to severe changes ranging from minimal to important variability in muscle fiber size, variable numbers of necrotic fibers, and absent to moderate endomysial fibrosis. Note the large number of whorled fibers in P6. Note also the few CD8 lymphocytes present in P5, in contrast with the large mononuclear perivascular inflammatory infiltrate in P6. MHC class I overexpression is absent in P5 but is diffusely overexpressed in P8. Membrane attack complex (MAC) deposition in the muscle fiber membrane can be observed in P6 and P8.

Downloaded from https://www.neurology.org by 139.47.35.166 on 27 January 2025

childhood or adolescence, and evolution is characteristically chronic and slowly progressive, resembling a muscular dystrophy, often resulting in a delayed diagnosis.[14-17] Therefore, a systematic suspicion of IMNM and testing for specific autoantibodies, especially in children and adolescents with suspected but not genetically confirmed LGMD, may help improve diagnostic time lines and lead to early treatment before muscle damage becomes irreversible.

Although most of the patients in our cohort showed an initial partial response to immunosuppressive medication, weakness progressed over long-term follow-up despite intensive treatment. Muscle biopsy showed different degrees of myofiber necrosis and macrophage infiltration, with variable overexpression of MHC-I and, in all tested samples, complement deposition on the surface of non-necrotic fibers. These findings are similar to those from larger studies assessing muscle pathology in young and adult patients exposed or not to statins, characterized by necrosis and regeneration of muscle fibers with mild or absent lymphocytic infiltrates. MAC deposition on sarcolemma has been reported in 65% of the patients by some groups, whereas other authors have reported MAC deposition exclusively in the cytoplasm of some necrotic fibers.[40,41] Other groups have described a constant expression of the autophagy marker p62 in the sarcoplasm of some fibers.[42,43] Nevertheless, p62 immunoreactivity was not systematically assessed in our series. Despite the idea of complement inhibition has been explored considering MAC deposition in necrotizing autoimmune myopathy, a recent randomized phase 2 trial with the C5 inhibitor zilucoplan failed to show significant clinical improvements or creatine kinase decrease in these patients.[44] Such findings may relate with the fact that necrotic and regenerating fibers, also in nonimmune myopathies, activate complement, and therefore, complement deposition is not a specific finding of IMNM.[45,46] According to this, complement inhibition may not be the adequate therapy target, but other potential drugs have shown promising effects in vitro.[47]

Our MRI findings suggest that this imaging tool can be useful especially in early stages, when evident patchy muscle inflammation may raise suspicion of an inflammatory myopathy. Diffuse fatty replacement, with active inflammation in some cases, was evident in advanced disease stages. Nevertheless, in our patients we did not identify a specific pattern of muscle involvement. This observation is similar to what has been reported in adult patients with anti-HMGCR IMNM.[48] Despite a characteristic pattern of muscle involvement was proposed affecting preferentially hip rotators and glutei muscles, after applying regression models, the estimated positive predictive value was only 55%. A recent retrospective study in patients with IMNM showed that muscle MRI can be useful for monitoring disease activity and that the percentage of STIR+ muscles correlated with higher risk of fat replacement at follow-up, but a specific pattern of involvement was not identified either.[49] Regarding young statin-naïve patients, only few imaging data from case reports are available with similar findings,[11,17] and there are not larger series to allow a proper comparation.

Some authors claim that upregulation of HMGCR and/or conformational changes in the enzyme can increase immunogenicity.[1] Also meriting consideration is mislocalization from the intracellular space to the cell surface, where there could be possible targeting by autoantibodies.[23] The mechanism of this latter option is unclear, and it is not even known whether it is feasible with HMGCR, but it has been described for other intracellular proteins. Macrophages, for instance, can express endoplasmic reticulum proteins in the plasma membrane when they fuse to form multinucleated giant cells,[50] just as fibroblasts can express chaperone proteins.[51]

Those mechanisms (overexpression, conformational changes, and/or mislocalization), together with specific immunogenic HLA alleles, would be the main route for statins, competitive inhibitors of HMGCR, to trigger the disease through a humoral immune response.[1] Alternatively, anti-HMGCR autoantibodies might cross-react with a different unidentified antigen. It cannot be ruled out, either, that the autoantibodies may enter the muscle fibers, as has been shown for anti-DNA antibodies,[52] but recent experiments in healthy myotubes show that the intracellular antigen is only accessible to anti-HMGCR antibodies after cell permeabilization.[22] This was the reason that led us to investigate whether the existence of a common genetic disorder could explain a predisposition to produce antibodies against HMGCR in the absence of statin exposure and why we evaluated HMGCR expression in muscle fibers in our patients.

It has been shown that none of a large cohort of patients with genetically determined muscular dystrophy had anti-HMGCR antibodies, proving their high specificity.[53] The only previous attempt to seek genetic mutations in statin-naïve patients diagnosed with anti-HMGCR IMNM was done by a group that performed WES in 8 treatment-refractory patients, none of whom had a known pathogenic variant in any of the muscular dystrophy genes.[5]

Nevertheless, despite the fact that HMGCR is the key rate-limiting enzyme in the mevalonate pathway that ultimately enables synthesis of cholesterol, cholesterol pathway–related genes have never been studied. We hypothesized that a mutation in a gene linked to cholesterol biosynthesis could cause HMGCR overexpression, either as a compensatory mechanism when cholesterol production is decreased or because of deficient degradation of the enzyme. This overexpression would cause a loss in immune tolerance and consequent production of self-reacting antibodies against HMGCR—similar, in fact, to the expected statin-mediated mechanism. Some of the studied genes linked to cholesterol biosynthesis encode the enzymes needed to produce cholesterol, including *HMGCR*, among others.[54] For instance, one of our patients was carrier of a VUS in *HMGCS2*, which encodes the mitochondrial HMG-CoA synthase needed for cholesterol

Downloaded from https://www.neurology.org by 139.47.35.166 on 27 January 2025

synthesis. This enzyme is analogous to the cytoplasmic HMG-CoA synthase encoded by *HMGCS1*. Nevertheless, the VUS was a missense variant detected in heterozygosis in a gene with autosomal recessive inheritance and was classified by most pathogenicity predictors as "benign, neutral, or tolerated." This fact and the presence in only 1 patient suggest that the VUS is extremely unlikely causative of a cholesterol deficiency and secondary HMGCR upregulation, as happens with the rest of the variants found. Furthermore, any rare variants were detected in *HMGCR* itself that could cause a change in epitope conformation and antigen presentation and finally trigger autoantibody formation.

Other analyzed genes encode sterol sensors that regulate the cellular accumulation of sterols and are essential to the endogenous degradation of HMGCR mediated by the ubiquitin-proteasome pathway. Some examples of those regulatory elements are the Insig and Scap proteins.[54,55] In fact, an animal study has shown that genetic *INSIG1/2* deletion results in an accumulation of HMGCR to a level that is approximately 20-fold higher than in wild-type mice.[56] Another gene included in our study was *COQ2*, which encodes the coenzyme Q2 necessary for coenzyme Q10 synthesis. The reason for its inclusion was the evidence that most patients with statin-associated muscle symptoms (SAMS)—included in the broader concept of statin-induced myopathy—show overt coenzyme Q10 reduction in blood and muscle samples.[57-59] That evidence has led to several clinical trials designed to clarify whether Q10 supplementation could be useful to treat SAMS, although contradictory results show that the effect remains controversial.[60-63] Whether a coenzyme Q10 deficit is directly pathogenic is not known. Yet, a possible, although unlikely, explanation could be that levels of coenzyme Q10 are reduced in non–statin-related HMGCR+ IMNM. Ruling out this possibility was the reason why we sought specific mutations in the *COQ2* gene.

Finally, in the HLA analysis of our cohort to study possible associations with statin-naïve anti-HMGCR IMNM, we found that there was a stronger association with HLA-DRB1*11:01 than in the general population (60% vs 13.7%, OR = 9.4, $p = 0.0009$), the same allele associated with anti-HMGCR IMNM in adults mostly exposed to statins.[14,15,21] By contrast, the proportion of patients who carried the DRB1*07:01 allele, previously associated with pediatric forms,[14,15,21] was not significantly higher than that in the general population. Those findings lead to different conclusions. First, DRB1*11:01 association is not restricted to the adult forms and also has an important role in pediatric patients with chronic forms of anti-HMGCR IMNM. Second, it could be hypothesized that the DRB1*11:01 carriers have been exposed to natural sources of statins, with the combination of statins and a HLA risk allele triggering the disease. This latter possibility seems very unlikely because we would expect some familial aggregation that does not occur in IMNM. Nonetheless, despite this link never having been described, it cannot be fully ruled out.

Regarding the study of HMGCR expression in muscle, we found no differences in protein expression or localization in patient biopsies using natural and commercial anti-HMGCR antibodies and so found an identical result for a sample from a statin-exposed adult patient. Nevertheless, the small sample size should be considered as a possible limitation and these results should be confirmed with higher number of skeletal muscle biopsies. Similar findings were reported by Allenbach et al. showing weak and sparse sarcolemma binding with antibodies against HMGCR in healthy fibers not undergoing necrosis,[22] in contrast with a robust binding in regenerating NCAM-positive fibers.[7] This fact calls into question the pathogenic role of anti-HMGCR antibodies and the antibody or complement-dependent induction of necrosis in necrotizing autoimmune myopathy.[9,64,65] Still, based on our experience, and contrary to what has previously been postulated, overexpression or mislocalization of the enzyme leading to increased immunogenicity and antibody formation in anti-HMGCR+ IMNM cannot be conclusively demonstrated, independently of statin exposure.

Infantile and juvenile anti-HMGCR IMNM is a rare entity, clinically different from acute adult forms of the disease, characterized by treatment refractoriness, and a slow but progressive evolution that mimics muscular dystrophy. Although a genetic predisposition has been postulated, it has never been deeply evaluated. In our study, we have described a large series of young patients with dystrophy-like anti-HMGCR IMNM. Of interest, we found a strong association with HLA-DRB1*11:01, previously linked to mainly statin-exposed adult forms of anti-HMGCR IMNM. Because WES failed to reveal any common rare variants, including in genes involved in cholesterol biosynthesis, a monogenic predisposition could not be demonstrated. Furthermore, we did not find overexpression or mislocalization of HMGCR in patient muscle fibers. The high prevalence of HLA-DRB1*11:01 suggests a common immunogenic risk factor shared by statin-naïve young patients and statin-exposed adults. Further research is needed to explore the possible presence of environmental, epigenetic, or post-translational factors that may modulate disease onset and course resulting in such different phenotypes, as well as different pathophysiologic mechanisms in antibody formation beyond HMGCR overexpression or mislocalization.

Acknowledgment

The authors acknowledge the Department of Medicine at the Universitat Autònoma de Barcelona.

Study Funding

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III cofunded by ERDF/FEDER (Una manera de hacer Europa) under grant FIS PI21/01621 awarded to MO. LL is supported by a Grífols-funded grant (Beca de formación en enfermedades neuromusculares Isabel Illa).

Disclosure

L. Llansó, C. Domínguez-González, A. Hernandez-Lain, E. Malfatti, L. González-Mera, A. Nascimento-Osorio, C. Jou, C.

Downloaded from https://www.neurology.org by 139.47.35.166 on 27 January 2025

Lleixà, M. Caballero-Ávila, A. Carbayo, A. Vesperinas, E. Gallardo, and M. Olivé are members of the European Reference Network for Neuromuscular Diseases. Go to Neurology.org/NN for full disclosures.

Publication History

Received by *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation* February 1, 2024. Accepted in final form May 30, 2024. Submitted and externally peer reviewed. The handling editor was Associate Editor Marinos C. Dalakas, MD, FAAN.

Appendix Authors

Name	Location	Contribution
Laura Llansó, MD	Department of Neurology, Neuromuscular Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; study concept or design; analysis or interpretation of data
Alba Segarra-Casas, MD	Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; analysis or interpretation of data
Cristina Domínguez-González, MD, PhD	Department of Neurology, Neuromuscular Diseases Unit, Hospital Universitario 12 de Octubre. Research Institute imas12, Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data
Edoardo Malfatti, MD, PhD	Université Paris-Est Créteil, INSERM, U955 IMRB; AP-HP, Hôpital Mondor, FHU SENEC, Service d'Histologie, Créteil, France	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data
Solange Kapetanovic, MD	Department of Neurology, Neuromuscular Diseases Unit, Osakidetza Basque Health Service, Basurto University Hospital, Universidad del País Vasco, Bilbao, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data
Benjamín Rodríguez-Santiago, MD, PhD	Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Barcelona, Spain. Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Madrid; Genomic Instability Syndromes and DNA Repair Group and Join Research Unit on Genomic Medicine UAB, Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain	Analysis or interpretation of data
Oscar de la Calle, MD, PhD	Immunology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Barcelona, Spain	Analysis or interpretation of data
Rosa Blanco	Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Barcelona, Spain. Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain	Major role in the acquisition of data; additional contributions (in addition to one or more of the above criteria)
Amelia Dobrescu, MD	Department of Genetics, Craiova University Hospital, Romania	Study concept or design
Andrés Nascimento-Osorio, MD	Neuropaediatrics Department, Neuromuscular Diseases Unit, Hospital Sant Joan de Déu, Fundación Sant Joan de Déu, CIBERER - ISC III, Barcelona, Spain	Study concept or design
Andrés Paipa, MD, PhD	Neurology Department, Neuromuscular Unit, IDIBELL-Hospital de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain	Study concept or design
Aurelio Hernandez-Lain, MD	Pathology Department, Neuropathology Unit, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain	Analysis or interpretation of data
Cristina Jou, MD	Pathology Department, Institut Pediàtric de Recerca, Hospital Sant Joan de Déu, and MetabERN, Barcelona, Spain. Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain	Study concept or design
Anaís Mariscal, MD, PhD	Immunology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Barcelona, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; study concept or design
Laura González-Mera, MD	Neurology Department, Neuromuscular Unit, IDIBELL-Hospital de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat; Department of Neurology, Hospital de Viladecans, Barcelona, Spain	Study concept or design
Ana Arteche, MD	Department of Genetics, Hospital Universitario 12 de Octubre, Research Institute imas12, Madrid, Spain	Analysis or interpretation of data
Cinta Lleixà, PhD	Department of Neurology, Neuromuscular Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Barcelona, Spain. Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain	Study concept or design; analysis or interpretation of data; additional contributions (in addition to one or more of the above criteria)

Downloaded from https://www.neurology.org by 139.47.35.166 on 27 January 2025

Appendix *(continued)*

Name	Location	Contribution
Marta Caballero-Ávila, MD	Department of Neurology, Neuromuscular Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain	Study concept or design
Álvaro Carbayo, MD	Department of Neurology, Neuromuscular Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain	Study concept or design
Ana Vesperinas, MD	Department of Neurology, Neuromuscular Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain	Study concept or design
Luis Querol, MD, PhD	Department of Neurology, Neuromuscular Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Barcelona, Spain. Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; study concept or design
Eduard Gallardo, PhD	Department of Neurology, Neuromuscular Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Barcelona, Spain. Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; study concept or design; analysis or interpretation of data
Montse Olivé, MD, PhD	Department of Neurology, Neuromuscular Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona; Institut de Recerca Sant Pau (IR Sant Pau), Barcelona, Spain. Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain	Drafting/revision of the manuscript for content, including medical writing for content; major role in the acquisition of data; study concept or design; analysis or interpretation of data

References

1. Mohassel P, Mammen AL. Anti-HMGCR myopathy. *J Neuromuscul Dis.* 2018;5(1):11-20. doi:10.3233/JND-170282
2. Fauchais AL, Iba Ba J, Maurage P, et al. Polymyositis induced or associated with lipid-lowering drugs: five cases. *La Revue de Médecine Interne.* 2004;25(4):294-298. doi:10.1016/j.revmed.2003.10.013
3. Needham M, Fabian V, Knezevic W, Panegyres P, Zilko P, Mastaglia FL. Progressive myopathy with up-regulation of MHC-I associated with statin therapy. *Neuromuscul Disord.* 2007;17(2):194-200. doi:10.1016/j.nmd.2006.10.007
4. Grable-Esposito P, Katzberg HD, Greenberg SA, Srinivasan J, Katz J, Amato AA. Immune-mediated necrotizing myopathy associated with statins. *Muscle Nerve.* 2010;41(2):185-190. doi:10.1002/mus.21486
5. Tiniakou E, Pinal-Fernandez I, Lloyd TE, et al. More severe disease and slower recovery in younger patients with anti-3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. *Rheumatology (Oxford).* 2017;56(5):787-794. doi:10.1093/rheumatology/kew470
6. Werner JL, Christopher-Stine L, Ghazarian SR, et al. Antibody levels correlate with creatine kinase levels and strength in anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum.* 2012;64(12):4087-4093. doi:10.1002/art.34673
7. Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L, et al. Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum.* 2011;63(3):713-721. doi:10.1002/art.30156
8. Limaye V, Bundell C, Hollingsworth P, et al. Clinical and genetic associations of autoantibodies to 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase in patients with immune-mediated myositis and necrotizing myopathy. *Muscle Nerve.* 2015;52(2):196-203. doi:10.1002/mus.24541
9. Dalakas MC. Myositis: are autoantibodies pathogenic in necrotizing myopathy? *Nat Rev Rheumatol.* 2018;14(5):251-252. doi:10.1038/nrrheum.2018.54
10. Kassardjian CD, Lennon VA, Alfugham NB, Mahler M, Milone M. Clinical features and treatment outcomes of necrotizing autoimmune myopathy. *JAMA Neurol.* 2015;72(9):996-1003. doi:10.1001/jamaneurol.2015.1207
11. Hiebeler M, Franke R, Ingenerf M, et al. Slowly progressive limb-girdle weakness and HyperCKemia - limb girdle muscular dystrophy or anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reductase-myopathy? *J Neuromuscul Dis.* 2022;9(5):607-614. doi:10.3233/JND-220810
12. Sasaki R, Yunoki T, Nakano Y, et al. A young female case of asymptomatic immune-mediated necrotizing myopathy: a potential diagnostic option of antibody testing for rhabdomyolysis. *Neuromuscul Disord.* 2023;33(2):183-186. doi:10.1016/j.nmd.2022.12.012
13. Mohassel P, Foley AR, Donkervoort S, et al. Anti–3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase necrotizing myopathy masquerading as a muscular dystrophy in a child. *Muscle Nerve.* 2017;56(6):1177-1181. doi:10.1002/mus.25567
14. Mohassel P, Landon-Cardinal O, Foley AR, et al. Anti-HMGCR myopathy may resemble limb-girdle muscular dystrophy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2019;6(1):e523. doi:10.1212/NXI.0000000000000523
15. Kishi T, Rider LG, Pak K, et al.; Childhood Myositis Heterogeneity Study Group. Association of anti–3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase autoantibodies with DRB1*07:01 and severe myositis in juvenile myositis patients. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2017;69(7):1088-1094. doi:10.1002/acr.23113
16. Liang WC, Uruha A, Suzuki S, et al. Pediatric necrotizing myopathy associated with anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase antibodies. *Rheumatology (Oxford).* 2017;56(2):287-293. doi:10.1093/rheumatology/kew386
17. Sener S, Batu ED, Sari S, et al. A child with refractory and relapsing anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase myopathy: case-based review. *J Neuromuscul Dis.* 2023;10(2):279-291. doi:10.3233/JND-221557
18. Paipa Merchan A, Jou C, Kapetanovic S, et al. Early onset autoimmune necrotizing myopathy associated with anti-HMGCR antibodies: an unmissable diagnosis. *Neuromuscul Disord.* 2015;25(S2):S249-S316. doi:10.1016/j.nmd.2015.06.233
19. Tard C, Tiffreau V, Jaillette E, et al. Anti-HMGCR antibody-related necrotizing autoimmune myopathy mimicking muscular dystrophy. *Neuropediatrics.* 2017;48(6):473-476. doi:10.1055/s-0037-1604402
20. Wang CH, Liang WC. Pediatric immune-mediated necrotizing myopathy. *Front Neurol.* 2023;14:1123380. doi:10.3389/fneur.2023.1123380
21. Mammen AL, Gaudet D, Brisson D, et al. Increased frequency of DRB1*11:01 in anti-hydroxymethylglutaryl- coenzyme a reductase-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012;64(8):1233-1237. doi:10.1002/acr.21671
22. Allenbach Y, Arouche-Delaperche L, Preusse C, et al. Necrosis in anti-SRP+ and anti-HMGCR+myopathies: role of autoantibodies and complement. *Neurology.* 2018;90(6):e507-e517. doi:10.1212/WNL.0000000000004923
23. Arouche-Delaperche L, Allenbach Y, Amelin D, et al. Pathogenic role of anti-signal recognition protein and anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase antibodies in necrotizing myopathies: myofiber atrophy and impairment of muscle regeneration in necrotizing autoimmune myopathies. *Ann Neurol.* 2017;81(4):538-548. doi:10.1002/ana.24902
24. Yogev Y, Shorer Z, Koifman A, et al. Limb girdle muscular disease caused by HMGCR mutation and statin myopathy treatable with mevalonolactone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023;120(7):e2217831120. doi:10.1073/pnas.2217831120
25. Morales-Rosado JA, Schwab TL, Macklin-Mantia SK, et al. Bi-allelic variants in HMGCR cause an autosomal-recessive progressive limb-girdle muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2023;110(6):989-997. doi:10.1016/j.ajhg.2023.04.006
26. De Luna N, Gallardo E, Illa I. In vivo and in vitro dysferlin expression in human muscle satellite cells. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63(10):1104-1113. doi:10.1093/jnen/63.10.1104
27. Alvarado-Cardenas M, Marin-Sánchez A, Martínez MA, et al. Statin-associated autoimmune myopathy: a distinct new IFL pattern can increase the rate of HMGCR antibody detection by clinical laboratories. *Autoimmun Rev.* 2016;15(12):1161-1166. doi:10.1016/j.autrev.2016.09.005
28. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324
29. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-1303. doi:10.1101/gr.107524.110
30. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(16):e164. doi:10.1093/nar/gkq603
31. Richards S, Aziz N, Bale S, et al.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus

Downloaded from https://www.neurology.org by 139.47.35.166 on 27 January 2025

recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424. doi:10.1038/gim.2015.30
32. Creary LE, Sacchi N, Mazzocco M, et al. High-resolution HLA allele and haplotype frequencies in several unrelated populations determined by next generation sequencing: 17th International HLA and Immunogenetics Workshop joint report. *Hum Immunol.* 2021;82(7):505-522. doi:10.1016/j.humimm.2021.04.007
33. Enrich E, Campos E, Martorell L, et al. HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 allele and haplotype frequencies: an analysis of umbilical cord blood units at the Barcelona Cord Blood Bank. *HLA.* 2019;94(4):347-359. doi:10.1111/tan.13644
34. De Re V, Caggiari L, Monti G, et al. HLA DR-DQ combination associated with the increased risk of developing human HCV positive non-Hodgkin's lymphoma is related to the type II mixed cryoglobulinemia. *Tissue Antigens.* 2010;75(2):127-135. doi:10.1111/j.1399-0039.2009.01414.x
35. Rendine S, Ferrero NM, Sacchi N, Costa C, Pollichieni S, Amoroso A. Estimation of human leukocyte antigen class I and class II high-resolution allele and haplotype frequencies in the Italian population and comparison with other European populations. *Hum Immunol.* 2012;73(4):399-404. doi:10.1016/j.humimm.2012.01.005
36. Páez-Gutiérrez IA, Hernández-Mejía DG, Vanegas D, Camacho-Rodríguez B, Perdomo-Arciniegas AM. HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies of 1463 umbilical cord blood units typed in high resolution from Bogotá, Colombia. *Hum Immunol.* 2019;80(7):425-426. doi:10.1016/j.humimm.2019.03.006
37. Arnaiz-Villena A, Benmamar D, Alvarez M, et al. HLA allele and haplotype frequencies in Algerians. Relatedness to Spaniards and Basques. *Hum Immunol.* 1995;43(4):259-268. doi:10.1016/0198-8859(95)00024-x
38. Pingel J, Solloch UV, Hofmann JA, Lange V, Ehninger G, Schmidt AH. High-resolution HLA haplotype frequencies of stem cell donors in Germany with foreign parentage: how can they be used to improve unrelated donor searches? *Hum Immunol.* 2013;74(3):330-340. doi:10.1016/j.humimm.2012.10.029
39. allelefrequencies.net
40. Watanabe Y, Uruha A, Suzuki S, et al. Clinical features and prognosis in anti-SRP and anti-HMGCR necrotising myopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(10):1038-1044. doi:10.1136/jnnp-2016-313166
41. Alshehri A, Choksi R, Bucelli R, Pestronk A. Myopathy with anti-HMGCR antibodies: perimysium and myofiber pathology. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2015;2(4):e124. doi:10.1212/NXI.0000000000000124
42. Allenbach Y, Benveniste O, Stenzel W, Boyer O. Immune-mediated necrotizing myopathy: clinical features and pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol.* 2020;16(12):689-701. doi:10.1038/s41584-020-00515-9
43. Merlonghi G, Antonini G, Garibaldi M. Immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM): a myopathological challenge. *Autoimmun Rev.* 2022;21(2):102993. doi:10.1016/j.autrev.2021.102993
44. Mammen AL, Amato AA, Dimachkie MM, et al. Zilucoplan in immune-mediated necrotising myopathy: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet Rheumatol.* 2023;5(2):e67-e76. doi:10.1016/s2665-9913(23)00003-6
45. Spuler S, Engel AG. Unexpected sarcolemmal complement membrane attack complex deposits on nonnecrotic muscle fibers in muscular dystrophies. *Neurology.* 1998;50(1):41-46. doi:10.1212/wnl.50.1.41
46. Engel AG, Biesecker G. Complement activation in muscle fiber necrosis: demonstration of the membrane attack complex of complement in necrotic fibers. *Ann Neurol.* 1982;12(3):289-296. doi:10.1002/ana.410120314
47. Julien S, van der Woning B, De Ceuninck L, et al. Efgartigimod restores muscle function in a humanized mouse model of immune-mediated necrotizing myopathy. *Rheumatology (Oxford).* 2023;62(12):4006-4011. doi:10.1093/rheumatology/kead298
48. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Carrino JA, et al. Thigh muscle MRI in immune-mediated necrotising myopathy: extensive oedema, early muscle damage and role of anti-SRP autoantibodies as a marker of severity. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(4):681-687. doi:10.1136/annrheumdis-2016-210198
49. Fionda L, Lauletta A, Leonardi L, et al. Muscle MRI in immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM): implications for clinical management and treatment strategies. *J Neurol.* 2023;270(2):960-974. doi:10.1007/s00415-022-11447-7
50. McNally AK, Anderson JM. Multinucleated giant cell formation exhibits features of phagocytosis with participation of the endoplasmic reticulum. *Exp Mol Pathol.* 2005;79(2):126-135. doi:10.1016/j.yexmp.2005.06.008
51. Okazaki Y, Ohno H, Takase K, Ochiai T, Saito T. Cell surface expression of Calnexin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2000;275(46):35751-35758. doi:10.1074/jbc.M007476200
52. Yanase K, Madaio MP. Nuclear localizing anti-DNA antibodies enter cells via caveoli and modulate expression of caveolin and p53. *J Autoimmun.* 2005;24(2):145-151. doi:10.1016/j.jaut.2004.11.008
53. Mammen AL, Casciola-Rosen L, Christopher-Stine L, Lloyd TE, Wagner KR. Myositis-specific autoantibodies are specific for myositis compared to genetic muscle disease. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2015;2(6):e172. doi:10.1212/NXI.0000000000000172
54. DeBose-Boyd RA. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res.* 2008;18(6):609-621. doi:10.1038/cr.2008.61
55. Brown MS, Radhakrishnan A, Goldstein JL. Retrospective on cholesterol homeostasis: the central role of scap. *Annu Rev Biochem.* 2018;87(1):783-807. doi:10.1146/annurev-biochem-062917-011852
56. Engelking LJ, Liang G, Hammer RE, et al. Schoenheimer effect explained—feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins. *J Clin Invest.* 2005;115(9):2489-2498. doi:10.1172/JCI25614
57. Marcoff L, Thompson PD. The role of coenzyme Q10 in statin-associated myopathy: a systematic review. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(23):2231-2237. doi:10.1016/j.jacc.2007.02.049
58. Langsjoen PH, Langsjoen AM. The clinical use of HMG CoA-reductase inhibitors and the associated depletion of coenzyme Q10. A review of animal and human publications. *Biofactors.* 2003;18(1-4):101-111. doi:10.1002/biof.5520180212
59. Banach M, Serban C, Sahebkar A, et al.; Lipid and Blood Pressure Meta-analysis Collaboration Group. Effects of coenzyme Q10 on statin-induced myopathy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Mayo Clin Proc.* 2015;90(1):24-34. doi:10.1016/j.mayocp.2014.08.021
60. Taylor BA, Lorson L, White CM, Thompson PD. A randomized trial of coenzyme Q10 in patients with confirmed statin myopathy. *Atherosclerosis.* 2015;238(2):329-335. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.016
61. Latkovskis G, Saripo V, Sokolova E, et al. Pilot study of safety and efficacy of polyprenols in combination with coenzyme Q10 in patients with statin-induced myopathy. *Medicina (Kaunas).* 2016;52(3):171-179. doi:10.1016/j.medici.2016.05.002
62. Qu H, Guo M, Chai H, Wang WT, Gao ZY, Shi DZ. Effects of coenzyme Q10 on statin-induced myopathy: an updated meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(19):e009835. doi:10.1161/JAHA.118.009835
63. Banach M, Serban C, Ursoniu S, et al.; Lipid and Blood Pressure Meta-analysis Collaboration LBPMC Group. Statin therapy and plasma coenzyme Q10 concentrations—a systematic review and meta-analysis of placebo-controlled trials. *Pharmacol Res.* 2015;99:329-336. doi:10.1016/j.phrs.2015.07.008
64. Dalakas MC. Autoimmune inflammatory myopathies. *Handb Clin Neurol.* 2023;195:425-460. doi:10.1016/B978-0-323-98818-6.00023-6
65. Dalakas MC, Mammen AL. Case 22-2019: a 65-year-old woman with myopathy. *N Engl J Med.* 2019;381(17):1693-1694. doi:10.1056/NEJMc1911058

Downloaded from https://www.neurology.org by 139.47.35.166 on 27 January 2025

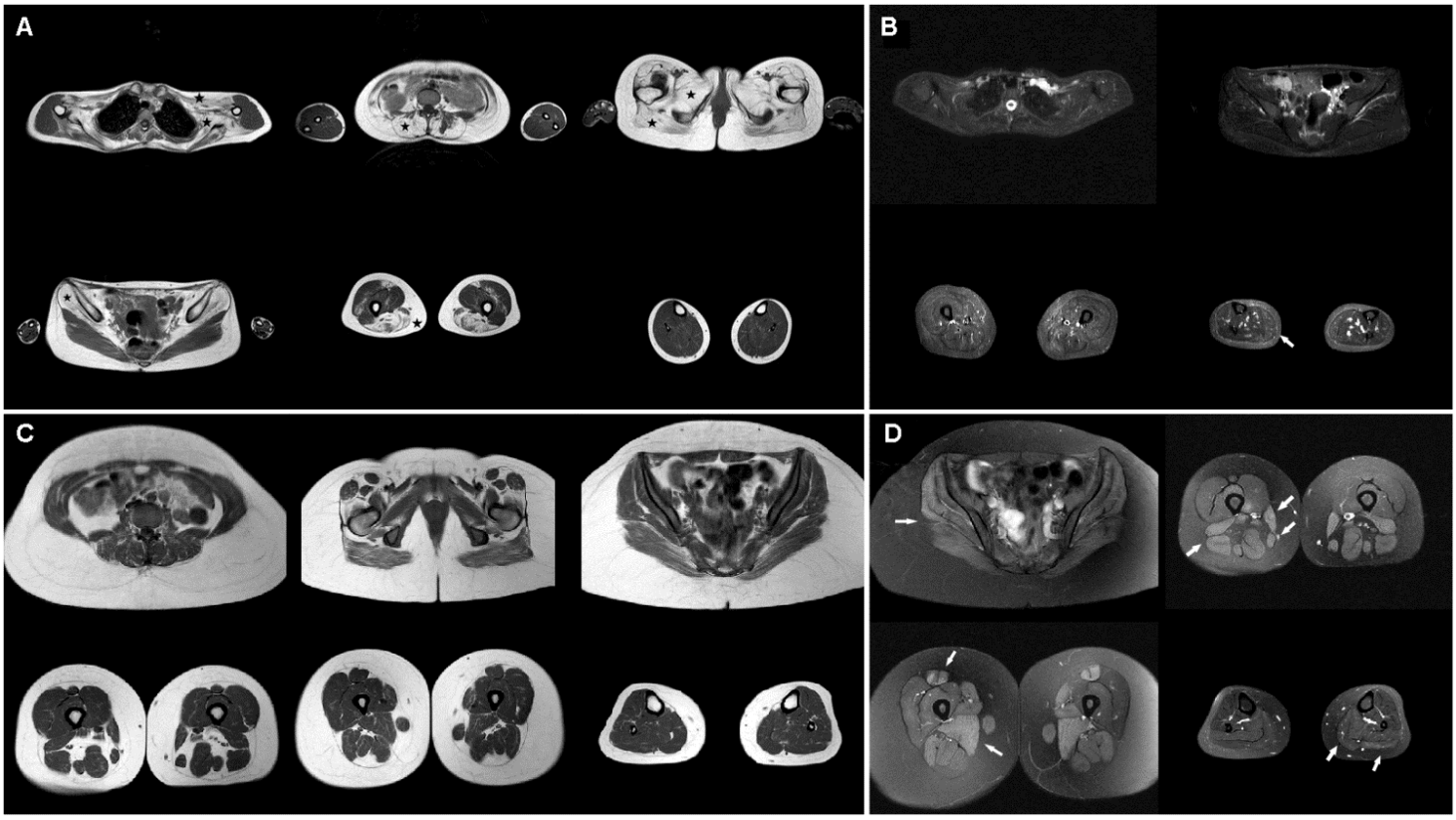
SUPPLEMENTAL CONTENT

eFigure 1. Whole-body MRI scans (T1w and STIR images) from 2 patients.

Disease progression in years. A-B: Patient 5 (P5), 27 years. C-D: P6, 7 years. A and C show T1w images, B and D show STIR images. Asterisks show fatty replacement in T1w sequences and

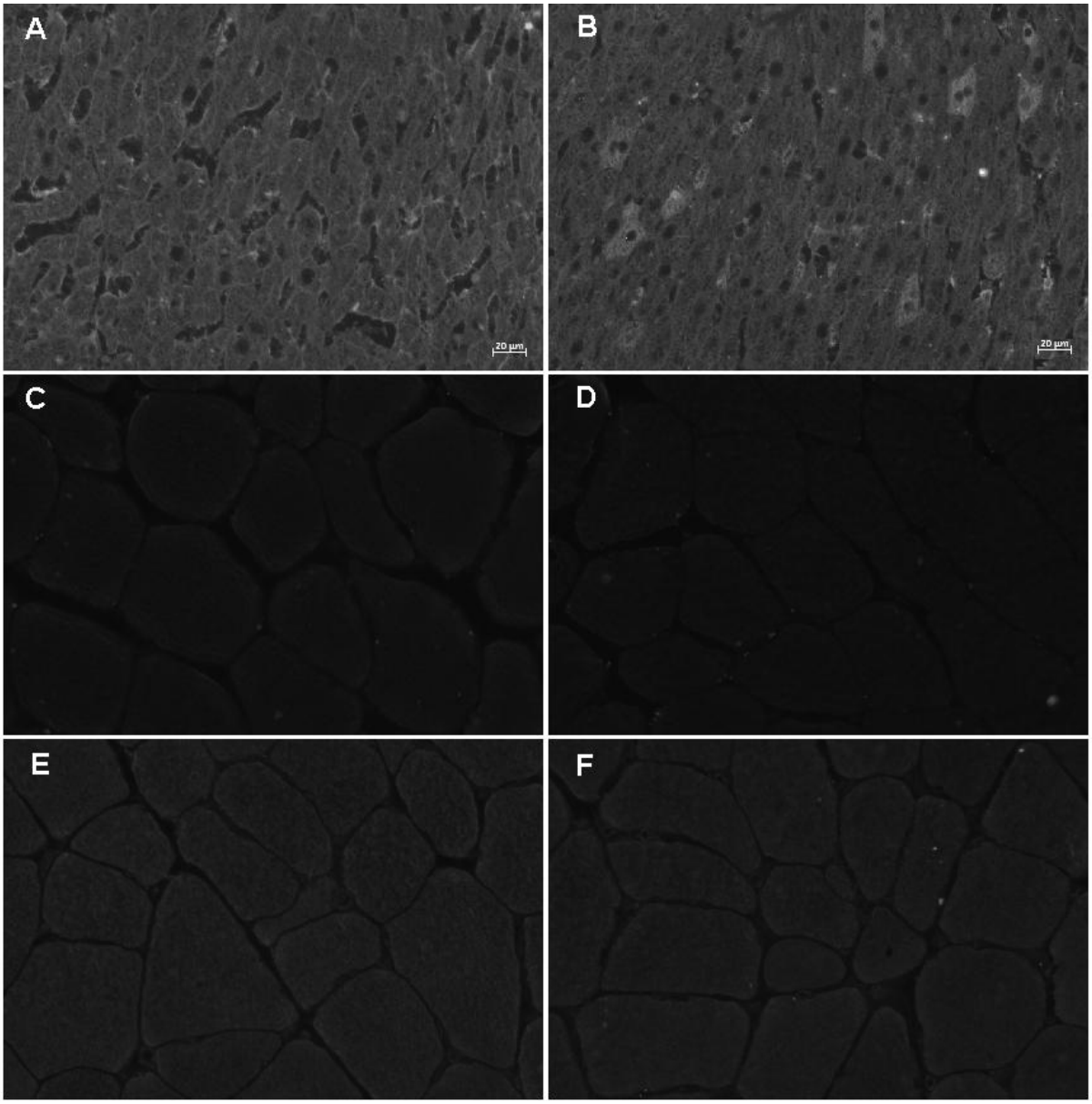
In P5, symmetric moderate fatty replacement of the shoulder girdle predominantly affects the pectoral and subscapularis muscles (*asterisks*). This patient's MRI also indicated biceps brachii involvement (not seen), and severe involvement in the thoracic and lumbar paravertebral muscles (*asterisk*). In the pelvic girdle, severe fatty infiltration is evident in the obturator muscles and in the gluteus medius and gluteus minimus muscles (*asterisks*). Note also the moderate-to-severe involvement of the posterior and medial thigh compartments (*asterisk*); in the anterior compartment, the rectus femoris and vastus lateralis muscles are the most affected. T1w sequences in distal legs do not show alterations and STIR images only reveal mild hyperintensity in both medial gastrocnemius muscles (*arrow*).

In P6, T1w images show an absence of fatty replacement, while STIR images show diffuse and patchy edema (*arrows*) affecting gluteal muscles (especially on the right side) and thighs (see symmetrical edema in the sartorius, gracilis, biceps femoris, adductor magnus, rectus femoris, and vastus medialis muscles). Distally, images show mild edema in the medial and lateral gastrocnemius muscles.



eFigure 2. HMGCR protein expression in muscle biopsies of patients with HMGCR+ IMNM and healthy controls.

Immunofluorescence using purified biotinylated IgG from anti-HMGCR+ and anti-HMGCR- sera showed no differences in protein expression. Rat triple tissue incubated with anti-HMGCR- (A) or anti-HMGCR+ serum with staining of isolated hepatocytes (HMGCR-Associated Liver Immunofluorescence Pattern (HALIP) pattern) (B). Control muscle incubated with anti-HMGCR- (C) or anti-HMGCR+ serum (D). Young statin-naïve anti-HMGCR+ IMNM patient muscle incubated with anti-HMGCR- (E) or HMGCR+ serum (F).

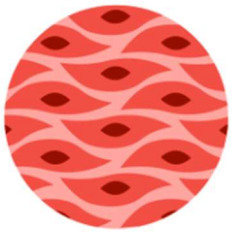


eTable 1. Variants of uncertain significance (VUS) found in genes involved in the cholesterol biosynthesis pathway, directly or indirectly related with *HMGCR*.

See details of pathogenicity predictors and population frequencies from the 6 VUS found in 4 patients. The genes included in our study were as follows: *ACAT1, ACAT2, CARM1, COQ2, CREBBP, CYP51A1, DHCR24, DHCR7, EBP, EGR2, FDFT1, FDPS, GGPS1, HMGCR, HMGCS1, HMGCS2, HSD17B7, IDI1, IDI2, INSIG1, INSIG2, LBR, LIPA, LSS, MSMO1, MVD, MVK, NSDHL, PMVK, PPARA, RXRA, SC5D, SCAP, SMARCD3, SOAT1, SQLE, SREBF1, SREBF2, TBL1X,* and *TM7SF2*. Empty boxes for *IDI2* express non-applicability of the predictors (the predictors are designed for missense variants and the variant found for this gene is the frameshift kind). GnomAD v.2.1.1 version was used. Clinvar: Last accessed: 7 December 2023.

Abbreviations. Het, heterozygous, **D,** deleterious, **H,** high, **B,** benign, **N,** neutral, **T,** tolerated, **M,** medium.

ID	Gene	Variant	Zygosity	Type	ACMG classification	Clinvar	OMIM	Inheritance	SIFT	Polyphen 2	Mutation Taster	Mutation Assessor	FATHMM	PROVEAN	MetaLR	CADD score (phred)	gnomAD allele frequency
P2	IDI2	NM_033261.3: c.286del, p.Leu96TrpfsTer9	Het	Frameshift	VUS	Not reported	-	-								22.3	0,0008544
P8	MVD	NM_002461: c.155C>T, p.T52I	Het	Missense	VUS	Not reported	Porokeratosis 7, multiple types (#614714)	AD	D	D	D	H	Uncertain	D	D	24.6	0.000007959
P8	SOAT1	NM_003101: c.132A>G, p.I44M	Het	Missense	VUS	Not reported	-	-	T	B	D	N	T	N	T	14.30	0.000007968
P9	HMGCS2	NM_001166107 : c.677G>A, p.R226Q	Het	Missense	VUS	VUS	HMG-CoA synthase-2 deficiency (#605911)	AR	T	B	D	N	T	N	T	18.20	0.00006720
P9	DHCR7	NM_001163817 : c.988G>A, p.V330M	Het	Missense	VUS	VUS	Smith-Lemli-Opitz syndrome (#270400)	AR	D	D	D	M	D	N	D	24.3	0.0003549
P10	DHCR7	NM_001163817 :c.964-1G>C	Het	Splicing	Pathogenic	Pathog.	Smith-Lemli-Opitz syndrome (#270400)	AR	D	.	D	.	D	N	D	34	0.003854



RESULTADOS

5. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

En la presente tesis doctoral se realiza un estudio sobre las bases moleculares y fisiopatológicas, características clínicas y caracterización anatomopatológica de la miopatía causada por mutaciones en *ATP2A2* (primera descripción), la miopatía causada por expansiones en *PLIN4* y la miopatía necrotizante inmunomediada asociada a anticuerpos anti-HMGCR.

En el primer estudio se describe una nueva miopatía hereditaria de inicio en la edad adulta y herencia autosómica recesiva asociada a una variante homocigota en el gen *ATP2A2*. Se recogen las características clínicas, de laboratorio, resonancia muscular y biopsia muscular de cuatro hermanas afectas de una debilidad proximal lentamente progresiva de inicio entre los 23 y 40 años de edad. La debilidad muscular predominaba en cintura pélvica. Se descartó afectación cardiológica tras estudio con ECG y ecocardiograma. Los niveles de CK eran moderadamente elevados en todos los casos (500-900 U/L). Los estudios electrofisiológicos mostraron patrones miopáticos con actividad espontánea en reposo. La RM muscular mostró un patrón común en secuencias T1 en las cuatro pacientes, con una infiltración grasa remarcable a nivel de la musculatura glútea, axial paravertebral, en vastos del cuádriceps y compartimento posteromedial de los muslos, así como en compartimento posterior de las piernas. A destacar, los aductores largos, rectos femorales y gracilis son músculos preservados a nivel radiológico.

La biopsia muscular en dos de las pacientes mostró abundantes vacuolas, algunas de ellas ribeteadas, selectivamente localizadas en las fibras musculares de tipo 1. Se realizaron estudios histoquímicos, inmunohistoquímicos y de microscopía electrónica para describir y definir las vacuolas con detalle. Algunas vacuolas estaban delimitadas por membrana, dada la presencia de actividad acetilcolinesterasa y de inmunomarcaje de proteínas de membrana como disferlina, caveolina-3 y distrofina. Además, las vacuolas mostraban marcadores de autofagia como actividad fosfatasa ácida lisosomal e inmunoreactividad para LC3, un marcador de autofagosomas, así como para p62. El estudio ultraestructural reveló numerosas vacuolas delimitadas por membrana de tamaño variable, algunas de ellas con contenido claro y otras autofágicas conteniendo cuerpos mielínicos y cuerpos residuales. Destacaba además una proliferación de los túbulos transversos y dilatación del retículo sarcoplasmático.

El estudio genético inicial mediante un panel de 137 genes de miopatías y exoma clínico (CES) fue negativo. Se amplió el estudio mediante la secuenciación del genoma completo (WGS) en los familiares afectos y no afectos, lo que permitió identificar la variante c.1117G>A (p.Glu373Lys) en *ATP2A2* en homocigosis, que segregaba con la enfermedad.

A continuación, se ampliaron los estudios anatomopatológicos para evaluar la expresión de SERCA2, el canal codificado por el gen *ATP2A2*. La inmunohistoquímica mostró diferencias de expresión de SERCA2 en músculo de paciente comparado con músculo control. Mientras que el control mostraba una inmunotinción homogénea en el citoplasma de todas las fibras de tipo 1, que expresan SERCA2 de forma selectiva, el músculo de paciente mostró menor inmunoreactividad global en el citoplasma junto a agregados de SERCA2 a nivel de las vacuolas, sugiriendo una alteración de la localización fisiológica. Por otro lado, el estudio de expresión mediante WB fue normal. Además, se evaluó la expresión de los canales SERCA1, codificado por *ATP2A1*, y de RyR1, que fue normal y sin diferencias respecto a controles.

Para analizar el posible efecto de la variante *missense* sobre el canal SERCA2, se estudió la secuencia de la cadena polipeptídica y se evidenció que el cambio de aminoácido afecta a un residuo altamente conservado entre especies localizado en el dominio extramembrana de fosforilación (dominio P). En cuanto a la estructura secundaria, el cambio de glutamina por lisina en posición 373 implica un cambio de polaridad neutra a polaridad positiva. No obstante, los estudios de modelación 3D no evidenciaron cambios previsibles de la estructura terciara proteica ni de los contactos polares con el residuo Thr376 con el que interacciona Glu373.

Con el fin de demostrar la patogenicidad de la variante c.1117G>A en *ATP2A2*, se diseñaron experimentos celulares *in vitro* para analizar con microscopio confocal de fluorescencia el transporte de Ca^{2+} intracelular en respuesta a señales despolarizantes de membrana (pulsos de corriente eléctrica) o exposición a cafeína sobre mioblastos y miotubos de pacientes. Como resultado de estos estudios se evidenció que, a pesar de que los mioblastos de paciente y controles no respondían a estos estímulos, los miotubos de controles respondían incrementando rápidamente la concentración de Ca^{2+} citoplasmático reflejando un flujo normal en respuesta a la salida masiva de iones de Ca^{2+} del RS por apertura de los canales RyR1, con posterior decremento progresivo de los niveles atribuible al cierre de canales RyR1 y la apertura de canales SERCA. Sin embargo, se observó un enlentecimiento en la recaptación de Ca^{2+} por parte del RS en miotubos de paciente respecto a controles, que resultaba en una mayor concentración

acumulada de Ca^{2+} citoplasmático que se incrementaba tras cada estímulo aplicado. En consonancia, en el 20% de miotubos de paciente se observó una respuesta tetánica a los pulsos eléctricos administrados cada 20 segundos con una respuesta normal solamente en el 60% de las células bajo la misma frecuencia de estímulo, respecto a la respuesta normal del 100% de los miotubos controles. Cuando se incrementaba la frecuencia del estímulo, este lavado más lento de Ca^{2+} citoplasmático resultaba en una respuesta tetánica mayor observada en los miotubos de pacientes, significativamente superior respecto a controles en todos los intervalos de estímulo (cada 20s, 10s, 3s y 1s; p=0.01 en test de Wilcoxon-Mann-Whitney). Además, tras el estímulo eléctrico se observó que los miotubos de pacientes tendían a una menor liberación máxima de Ca^{2+} (menor amplitud registrada respecto a controles, p=0.06) y alcanzaban el pico más lentamente de forma significativa (p=0.02), indicando una alteración añadida de la liberación de Ca^{2+} por parte del RS. En resumen, los estudios *in vitro* demostraron una recaptación lenta de Ca^{2+} por parte del RS en los miotubos portadores de la variante en homocigosis, atribuible a disfunción del canal SERCA2, y una alteración global de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular.

El segundo artículo describe dos familias españolas afectas de una miopatía hereditaria por expansiones en *PLIN4*, gen que codifica la perilipina 4. En total se trata de diez pacientes que debutaron alrededor de la treintena con una debilidad proximal leve seguida rápidamente por debilidad distal predominante en extremidades inferiores (compartimento anterior) y extremidades superiores (musculatura extensora del antebrazo). Como hecho a destacar, existía variabilidad clínica en cuanto a gravedad de la enfermedad, incluso dentro de una misma familia. Además, los varones padecían de formas generalmente más graves y de inicio más precoz. Las CK séricas oscilaban entre la normalidad y una elevación moderada. La electromiografía mostró en la mayoría de pacientes patrones mixtos con presencia de actividad espontánea. La enfermedad se asocia a insuficiencia respiratoria en fases avanzadas, requiriendo en algunos casos soporte ventilatorio tras la pérdida de ambulación. No hay datos de afectación cardiaca en nuestras familias, ni tampoco debilidad facial, bulbar ni de musculatura extraocular. Los estudios de imagen disponibles evidenciaron, a nivel de piernas, infiltración grasa de predominio en los músculos sóleo, gemelo medial y tibial anterior, con una afectación en muslos de predominio en compartimento posterior. A destacar, los casos índices presentaban una afectación radiológica precoz de los músculos glúteos menores y los sartorios, y las secuencias STIR mostraban edema difuso en muslos y piernas.

El estudio exhaustivo de las biopsias musculares practicadas a los pacientes mostró la presencia de numerosas vacuolas ribeteadas, muchas de localización subsarcolémica,

que mostraban un patrón de inmunoreactividad frente a p62/SQSTM1 que delimita las fibras musculares a lo largo del sarcolema de forma muy característica, además de marcar el interior de las propias vacuolas. Estas lesiones eran idénticas a las descritas poco antes de nuestro estudio en una familia afecta de una miopatía por expansión en *PLIN4* (121). Se demostró una perfecta co-localización de p62 con PLIN4 y el marcador de agrefagia NBR1, como se había descrito anteriormente en esta enfermedad. El estudio con microscopía electrónica mostró vacuolas autofágicas, delimitadas por membrana, duplicaciones de la lámina basal e inclusiones tubulofilamentosas en el citoplasma.

El WB para PLIN4 evidenció una banda extra de mayor peso molecular (mayor tamaño), y menor densidad (menor cantidad) de la banda correspondiente a la proteína *wild-type* no mutada en comparación con músculo control. Los hallazgos anatomopatológicos específicos descritos, y los resultados del WB, orientaron con alta sospecha a la existencia de una expansión patológica en *PLIN4*, por lo que la aproximación genética fue dirigida desde el inicio a detectar dicha expansión. El análisis de exoma en el probando de la familia 1 detectó un aumento de cobertura en el exón 5 que contiene la expansión, por lo que se dirigió el estudio de ambas familias utilizando la tecnología de secuenciación de lecturas largas (LRS) ONT del gen *PLIN4*. Esta parte del estudio se realizó en colaboración con el grupo de Ira W. Deveson del centro Genomics Pillar, Garvan Institute of Medical Research, Sidney, Australia. Como resultado se identificó una expansión de 39 x 99 pares de bases (pb) en *PLIN4* en la familia 1 y de 37 x 99 pb en la familia 2. El tamaño de la segunda expansión no se había reportado hasta la fecha en pacientes con miopatía asociada a *PLIN4*.

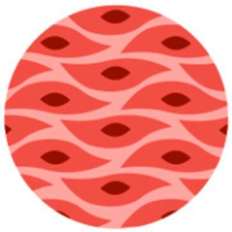
Una vez alcanzado el diagnóstico molecular, y con el fin de profundizar en la caracterización de la miopatía causada por expansiones en *PLIN4,* se realizaron estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos adicionales que demostraron marcadores de sarcolema delimitando las vacuolas (actividad acetilcolinesterasa y marcaje con anticuerpos contra distrofina, laminina α2 y caveolina-3) y marcadores de autofagia (actividad fosfatasa ácida) y lisosomales en el lugar de las vacuolas (marcaje con anticuerpos contra LC3 y LAMP-2). Estos datos, junto a los hallazgos de microscopía electrónica, nos permitieron clasificar esta miopatía en el grupo de miopatías con vacuolas autofágicas de características sacolemales (AVSF), como se comentará más adelante en la discusión. Además, se realizaron tinciones específicas que mostraron depósitos focales de calcio en la membrana de múltiples fibras (Alizarin red) y expresión leve y muy focal de marcadores de inflamación (MHC clase I y MAC).

Por último, en el tercer artículo se describe de forma exhaustiva una cohorte multicéntrica de 11 pacientes jóvenes afectos de miopatía necrotizante inmunomediada asociada a anticuerpos anti-HMGCR. La mayoría de los pacientes eran mujeres (10 de 11) de etnia caucásica (10 de 11), de edad de inicio entre los 3 y los 27 años. Clínicamente, todos los pacientes debutaban con debilidad proximal subaguda en cintura pélvica y/o cintura escapular, que posteriormente progresaba de forma crónica y lenta. El tiempo medio de seguimiento fue muy prolongado (media= 18.8 años; rango= 10-35). Ninguno de los pacientes presentaba síntomas previos como retraso de hitos motores o torpeza motora en la infancia. Al inicio de los síntomas los niveles de CK eran muy elevados (1200-12500 U/L), tal como es característico de las miopatías necrotizantes inmunomediadas. Todos los pacientes durante el seguimiento recibieron dos o más fármacos inmunosupresores (mediana= 3; rango= 2-4). Los más usados por orden fueron los corticoides (n=11), inmunoglobulinas endovenosas (n=10), metotrexato (n=8) y azatioprina (n=5). Del total, dos pacientes no tuvieron respuesta alguna al tratamiento y el resto tuvieron una respuesta parcial, bien con mejoría inicial o con estabilización de los síntomas, pero es destacable que ninguno de los casos logró una respuesta completa ni siquiera intensificando el tratamiento con múltiples fármacos. Durante la evolución, cinco pacientes desarrollaron debilidad axial franca y dos de ellos insuficiencia ventilatoria restrictiva requiriendo ventilación mecánica. A nivel de imagen muscular, se analizó el patrón de RM muscular de varios pacientes y más allá de observar una infiltración grasa progresiva proporcional al tiempo de evolución de la enfermedad, no se identificó ningún patrón específico de afectación muscular. Sí que cabe destacar la presencia de edema muscular (hiperintensidades en secuencia STIR) en varios pacientes independientemente del tiempo de evolución, aunque a menudo era parcheado y no estaba presente en todos los casos.

El análisis comparativo de las biopsias musculares reveló variabilidad del tamaño de las fibras, presencia de fibras necróticas en número variable, fibras regenerativas y aumento variable de tejido conectivo endomisial. Además, algunas muestras presentaban fibras arremolinadas. A destacar, solo un 40% de las biopsias presentaban infiltrados inflamatorios, en la mitad de los casos muy discretos. En cambio, había sobreexpresión del MHC clase I en 5 de 6 biopsias, y depósito de MAC o C5b-9 en 4 de 4 biopsias analizadas. Por último, se realizó estudio de expresión de HMGCR mediante IH o IF en tres biopsias, utilizando anticuerpo comercial y/o inmunoglobulina G purificada de suero seropositivo de un paciente con anti-HMGCR comparando con músculo control y suero control seronegativo, sin evidenciar una sobreexpresión del autoantígeno HMGCR en las fibras musculares de pacientes.

Para profundizar en el conocimiento sobre las bases moleculares de la enfermedad y poder establecer si existe una predisposición genética común en este fenotipo crónico de la enfermedad en pacientes no expuestos a estatinas, se realizó la secuenciación de exoma dirigida a 139 genes de miopatías hereditarias y 40 genes relacionados con la biosíntesis del colesterol. Los genes estudiados directamente relacionados con la síntesis del colesterol por codificar enzimas principales de la vía, o indirectamente por codificar cofactores o proteínas reguladoras, fueron los siguientes: *ACAT1, ACAT2, CARM1, COQ2, CREBBP, CYP51A1, DHCR24, DHCR7, EBP, EGR2, FDFT1, FDPS, GGPS1, HMGCR, HMGCS1, HMGCS2, HSD17B7, IDI1, IDI2, INSIG1, INSIG2, LBR, LIPA, LSS, MSMO1, MVD, MVK, NSDHL, PMVK, PPARA, RXRA, SC5D, SCAP, SMARCD3, SOAT1, SQLE, SREBF1, SREBF2, TBL1X, TM7SF2*. El resultado no evidenció ninguna variante patogénica o probablemente patogénica, ni ninguna VUS o variante rara compartida entre los pacientes.

El estudio del haplotipo reveló que 6 de 10 pacientes eran portadores del alelo HLA-DRB1*11:01. Además, 3 de 10 pacientes eran portadores del alelo DRB1*07:01. Comparado con la frecuencia alélica poblacional media correspondiente ajustada por los países de origen representados en la cohorte, el análisis estadístico demostró que la tasa de portadores del alelo DRB1*11:01 era significativamente mayor a la esperada comparado con la población general (60% vs 13.7%; OR=9.4, p=0.0009, CI=2.7-33.4). En cambio, el porcentaje de portadores del alelo DRB1*07:01 no difería respecto a la población general (30% vs 27.4%; OR=0.45, p=1.56; CI=0.4-6.1). No se encontró sobrerepresentación de ningún otro alelo de HLA.



DISCUSIÓN

6. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN

Los estudios incluidos en esta tesis doctoral evidencian el papel fundamental de un buen fenotipado clínico, así como del examen exhaustivo de las biopsias musculares y otras exploraciones complementarias, en el diagnóstico de las enfermedades musculares. El estudio histológico del tejido muscular realizado a los pacientes incluidos en las tres publicaciones ha servido no solo para ampliar el conocimiento de las alteraciones anatomopatológicas de estas entidades, sino para ayudar a interpretar las consecuencias de las mutaciones en nuevos genes asociados a miopatía y genes recientemente descritos, y como apoyo para guiar el estudio genético de forma dirigida. En los tres artículos se han aplicado técnicas avanzadas de NGS (secuenciación de exoma y genoma), y la secuenciación de lecturas largas o LRS para la identificación de la expansión en *PLIN4* en dos familias en las que se partía de una alta sospecha diagnóstica dadas las características clínico-histológicas. Además, para validar y demostrar la patogenicidad de una mutación en un gen hasta ahora no relacionado con un fenotipo muscular, se han realizado estudios funcionales *in vitro* que han demostrado que dicha variante en homocigosis provoca una disfunción de la proteína traducida sin reducir los niveles de la misma.

En el primer artículo describimos por primera vez una miopatía por mutaciones en *ATP2A2* en una familia española probablemente consanguínea, procedente de una pequeña área geográfica. El fenotipo clínico de la miopatía asociada a SERCA2 se caracteriza por una debilidad de cinturas progresiva de inicio en la edad adulta, sin episodios de hipertermia maligna, rigidez muscular o rabdomiólisis. Los pacientes presentan una elevación moderada de CK séricas y un patrón de resonancia muscular característico, con infiltración grasa glútea, paraespinal, anteroposterior de muslos y posterior de piernas, con preservación selectiva de los músculos aductores largos, rectos femorales y gracilis. Las biopsias musculares de los pacientes mostraron abundantes vacuolas localizadas exclusivamente en fibras musculares lentas o de tipo 1. El estudio ultraestructural mostró además una dilatación del sistema tubular. Posteriormente, la secuenciación de genoma identificó la variante en homocigosis c.1117G>A (p.Glu373Lys) en *ATP2A2*, gen codificante del canal SERCA2 que se expresa de forma exclusiva en las fibras de tipo 1, lo cual estaba en consonancia con la observación de vacuolas únicamente en las fibras de tipo 1.

Dado que el análisis inmunohistoquímico no evidenció una reducción de proteína SERCA2, se diseñaron los estudios funcionales para demostrar la patogenicidad de la

variante identificada. Los estudios *in vitro* en miotubos de pacientes demostraron una alteración de la homeostasis del Ca^{2+} incluyendo una lenta recaptación por parte del RS, indicando que la variante en homocigosis causa una disfunción del canal SERCA2. Además, como hecho a tener en consideración que da fortaleza a los resultados de dichos experimentos, los canales SERCA2 se expresan en una proporción mucho mayor que los SERCA1 en miotubos en condiciones de cultivo (mRNA (AU) 10^{-3} vs 10^{-6}, respectivamente) (213), por lo que se puede inferir que la recaptación alterada que evidenciamos de los canales SERCA en este tipo celular es principalmente secundaria a la disfunción de la isoforma SERCA2, codificada por el gen *ATP2A2*, y no de SERCA1. Por otro lado, estudios funcionales de actividad enzimática total del canal SERCA realizados en pacientes con enfermedad de Brody no permiten diferenciar entre SERCA1 o SERCA2, ya que analizan la actividad de las dos isoformas en fibras maduras extraídas de homogenados de músculo que incluyen una combinación de fibras rápidas y lentas (20,214–216). Por ello, para estudiar potenciales nuevas variantes en *ATP2A2* asociadas a miopatía, consideramos que los estudios en cultivos de miotubos derivados de pacientes son la mejor herramienta para evaluar de forma exclusiva la actividad del canal SERCA2.

Merece la pena comentar y analizar la falta de respuesta de mioblastos controles a los estímulos experimentales tanto eléctricos como tras exposición a cafeína. En estas células en fase de diferenciación más precoz, a pesar de expresar SERCA2 y el resto de maquinaria de transporte iónico (213), la ausencia de flujo de Ca^{2+} inducido puede ser debida a que el complejo de ECC no es estructuralmente maduro, ya que la unión del RS con los túbulos T y el sarcómero para formar la tríada muscular no sucede hasta fases terminales de maduración de la fibra muscular (217).

A nivel clínico, es interesante recalcar que nuestros pacientes no tenían miocardiopatía, a pesar de que la isoforma del canal SERCA2a se expresa también en fibras del músculo cardíaco o miocardiocitos. Además, es importante recordar que los miocardiocitos expresan varias isoformas del canal SERCA2, entre ellas la isoforma específica de corazón SERCA2c, y en menor cantidad la isoforma ubicua SERCA2b (18). No obstante, en la historia familiar destacaba un hermano de las pacientes que falleció de muerte súbita al año de edad, lo cual podría guardar relación con una arritmia cardiaca no filiada. Futuras descripciones de nuevas familias permitirán clarificar este hecho.

Hasta la fecha de la publicación del primer artículo, variantes patogénicas en *ATP2A2* solamente se habían relacionado con enfermedades dermatológicas autosómicas dominantes, la enfermedad de Darier y la acroqueratosis verruciforme, caracterizadas

por pápulas y placas, prurito, fragilidad ungueal y lesiones en mucosa oral. En la familia identificada en nuestro estudio, la ausencia de afectación cutánea permite considerar esta enfermedad muscular como un nuevo fenotipo clínico asociado a mutaciones en *ATP2A2*, y sugiere la posibilidad de que la isoforma SERCA2b expresada en la piel, traducida de un tránscrito del mismo gen, no se vea afectada por esta variante c.1117G>A que da un fenotipo muscular "puro". La estructura del gen y la localización de la variante no apoyan esta hipótesis, ya que se localiza en el exón 9 y el único exón que diferencia los tránscritos a y b es el penúltimo exón 20, que es más largo en la isoforma ubicua 2b para codificar la "cola 2b" del canal iónico (23). Sin embargo, se ha descrito que esta cola 2b modifica el canal funcionalmente implicando una tasa de transporte de Ca^{2+} más lenta, propiedad beneficiosa para los queratinocitos (218,219). En línea con esta observación, un estudio más reciente demostró que una variante en *ATP2A2* asociada a enfermedad de Darier causaba en los queratinocitos con SERCA2 mutado un transporte más rápido pero una menor afinidad por Ca^{2+} (220). En este contexto se puede suponer que la variante c.1117G>A identificada en nuestros pacientes, que hemos demostrado que enlentece la recaptación de iones de Ca^{2+} por el RS, pueda provocar patología para el músculo, pero no para la piel. En todo caso, del mismo modo que para interpretar la posible cardiopatía asociada, será necesario el estudio de más pacientes para establecer una relación clara entre genotipo y fenotipo.

Cabe destacar la publicación reciente en febrero de 2025, posterior al artículo que se está discutiendo, de un nuevo fenotipo muscular asociado al gen *ATP2A2* (46). Dicho estudio describe tres familias europeas afectas de episodios recurrentes de rabdomiólisis con patrón de herencia autosómico dominante, asociados a la variante heterocigota c.1583G>A (p.Arg528Gln). A destacar, tampoco tenían signos de afectación cutánea ni cardíaca. De forma análoga a nuestro estudio, los estudios *in vitro* de transporte de Ca^{2+} intracelular en miotubos demostraron las mismas alteraciones de función del canal SERCA2 mutado, sin comportar una reducción de cantidad de proteína. Curiosamente, las variantes en *ATP2A1* causantes de enfermedad de Brody sí que producen haploinsuficiencia, dado que los estudios de expresión proteica muestran una reducción marcada o ausencia de SERCA1 en el músculo de los pacientes (20), lo cual indica que los mecanismos genéticos subyacentes difieren en las miopatías asociadas a *ATP2A1* y *ATP2A2*.

En este sentido, la ausencia de haploinsuficiencia como mecanismo genético en la miopatía por *ATP2A2* podría ser otro motivo por el cual los pacientes no tienen afectación cutánea, dado que la mayoría de mutaciones causantes de enfermedad de Darier están asociadas a pérdida de expresión de proteína (221). Esto concuerda con

el hecho de que variantes truncantes en *ATP2A2* en la misma posición aminoacídica (p.Arg528*) que la variante *missense* de las familias reportadas con fenotipo de rabdomiólisis, previsiblemente causantes de pérdida de abundancia proteica, se han descrito como causantes de fenotipos graves de enfermedad de Darier (222).

En conjunto, consideramos que la nueva miopatía descrita por mutaciones en *ATP2A2* debería considerarse en el diagnóstico diferencial de ambas entidades clínicas –debilidad de cinturas y rabdomiólisis recurrente– con patrón de herencia autosómico recesivo o dominante, respectivamente. Asimismo, debería ser clasificada en el grupo de miopatías hereditarias debidas a una alteración del acoplamiento excitación-contracción (ECC) y la homeostasis del calcio intracelular, como es el caso de las miopatías relacionadas con los genes *RYR1* y *CACNA1S*. Dada la gran similitud fisiopatológica en cuanto al aumento de las concentraciones de Ca^{2+} citoplasmático en reposo evidenciado tanto en la miopatía hereditaria por disfunción de SERCA2, como en la debida a disfunción de los canales RyR1 por variantes que causan fuga espontánea de Ca^{2+} al citosol (*leaky channels*) (33, 223–225), sería aconsejable prevenir sobre el posible riesgo de hipertermia maligna en los pacientes con mutaciones en *ATP2A2*, a pesar de no haberse observado hasta la fecha.

Si bien desconocemos el mecanismo exacto por el cual la miopatía por mutaciones en *ATP2A2* provoca vacuolas autofágicas, cabe mencionar que en 2014 se describió la miopatía vacuolar debida a la variante heterocigota c.731A>G en *CASQ1,* otro gen implicado en el ECC, caracterizada por agregados proteicos de la misma calsecuestrina, RyR1 y SERCA (35). Los estudios de microscopio electrónico en esta miopatía vacuolar mostraron inclusiones electrodensas, algunas vacuolas limitadas por membrana, dilataciones de las cisternas terminales del RS y alteración de la morfología de las tríadas, comparable con nuestras observaciones ultraestructurales en la miopatía vacuolar por *ATP2A2*. De forma similar, nuestro estudio inmunohistoquímico de SERCA2 mostró un aumento de reactividad en el lugar de las vacuolas, sugiriendo agregados de SERCA2 a ese nivel, comparable a la miopatía vacuolar por agregados de CASQ1. Sin embargo, no evidenciamos agregados anómalos de SERCA1 ni RyR1, y no estudiamos la expresión de CASQ1. Por último, otra miopatía a tener en cuenta en el diagnóstico diferencial por las características anatomopatológicas altamente semejantes, es la miopatía sarcotubular o LGMD R8 debida a mutaciones en *TRIM32*, gen que codifica una ubiquitina ligasa que potencia la actividad de SERCA.

En el segundo artículo de esta tesis, identificamos y describimos dos nuevas familias afectas de la miopatía asociada a expansión patológica en *PLIN4*, enfermedad de la

cual solamente se habían descrito cuatro familias y un caso esporádico hasta la fecha. La caracterización completa de los pacientes y el estudio miopatológico exhaustivo nos permitió guiar el diagnóstico molecular de forma dirigida a este gen. En cuanto al fenotipo clínico, las familias descritas en nuestro estudio son parecidas a la primera familia descrita con un patrón de debilidad predominantemente distal (121,226,227), pero destaca que, a diferencia de dicha familia, nuestros pacientes presentaban frecuentemente debilidad proximal al debut de los síntomas. En cambio, en las familias descritas posteriormente, el fenotipo era proximal tanto al inicio como durante la evolución de la enfermedad (122,123). Esta observación sugiere que una clasificación dicotómica del fenotipo de la miopatía asociada a *PLIN4* en proximal o distal no es adecuada en esta enfermedad. Por otro lado, de manera uniforme, no hay evidencia de miocardiopatía en ninguno de los pacientes descritos hasta la fecha. En relación a la afectación respiratoria, se objetivó en cuatro pacientes de una de las familias incluidas en nuestro estudio, precisando ventilación mecánica en estadios avanzados. En cambio, la afectación respiratoria en las otras familias descritas era muy infrecuente (2 de 22 pacientes en la primera familia descrita (121), y únicamente en un paciente esporádico en las dos posteriores publicaciones con 30 pacientes (123)). Es esperable que descripciones de familias adicionales ayuden a poder establecer conclusiones sobre fenotipos intermedios y la prevalencia de afectación respiratoria.

En nuestro estudio por primera vez observamos la diferencia de gravedad en función del género de los pacientes, si bien cabe destacar que en la familia reportada por Yang *et al*. (122) había tres mujeres mayores de 50 años portadoras de la expansión que persistían asintomáticas, y en la publicación de Wang *et al*. (123), todos los pacientes descritos eran hombres. Serán necesarias futuras investigaciones e identificar familias adicionales para llegar a una conclusión respecto a la posible asociación de gravedad y edad de inicio con el género. Adicionalmente, el análisis comparativo de las resonancias musculares de los casos publicados hasta la fecha no nos permitió definir un patrón específico de afectación en esta miopatía, si bien la característica más frecuente es la infiltración grasa del compartimento posterior de piernas, y la infiltración preferente de los músculos sartorios en varios pacientes.

Este segundo artículo no solo amplía el conocimiento clínico e histológico sobre la miopatía asociada a *PLIN4*, sino también su espectro genético. Es importante conocer las dificultades técnicas para detectar la expansión en *PLIN4*, debido a su excepcionalidad en gran tamaño y naturaleza repetitiva, que escapa a métodos habituales de secuenciación mediante NGS. De hecho, en uno de los casos índice se secuenció el exoma mostrando un aumento en la cobertura de la región diana que,

aunque no permitía detallar el defecto molecular, permitía sospecharlo. Realizamos una PCR de alto rango pero no se logró secuenciar la expansión, por lo que tuvimos que aplicar LRS para identificar la expansión patológica en el dominio anfipático de *PLIN4*. Por tanto, en esta enfermedad, cuando la sospecha clínico-patológica es alta, es importante recurrir a técnicas avanzadas de LRS, especialmente con la plataforma Oxford Nanopore Technologies (ONT), que permite la lectura de expansiones más largas respecto a otras plataformas (73). La técnica LRS permitió confirmar expansiones patológicas de 39 x 99 pb y 37 x 99 pb en la familia 1 y la familia 2, respectivamente. El tamaño de la expansión en la segunda familia (37x) no se había descrito con anterioridad en esta miopatía, y cabe destacar que los individuos portadores, a pesar del menor tamaño de la expansión, estaban gravemente afectos en comparación con otras familias descritas, por lo que pudimos concluir que el tamaño de la expansión no se correlaciona con la gravedad de la miopatía, a diferencia de lo que se había sugerido previamente (122).

Vale la pena destacar que el tejido adiposo no parece estar afectado en los pacientes con la expansión en *PLIN4* causante de miopatía, lo cual es interesante si se tiene en cuenta que la perilipina 4 se expresa mayoritariamente en adipocitos, donde tiene una función de estabilizar el crecimiento de las gotas lipídicas (111–115). Este hecho sugiere que diferencias en el metabolismo de lípidos entre los dos tejidos puedan favorecer o desfavorecer la agregación patológica de PLIN4 y su unión normal a gotas lipídicas. No obstante, sería necesario estudiar con profundidad el perfil metabólico de estos pacientes para confirmar si efectivamente carecen de una disfunción del tejido adiposo.

En cuanto a los estudios miopatológicos de la miopatía asociada a expansiones en *PLIN4*, son hallazgos característicos la presencia de vacuolas autofágicas, ribeteadas o no, localizadas frecuentemente en las regiones subsarcolémicas, con un patrón particular de inmunoreactividad frente a p62, que delimita el sarcolema de las fibras además del lugar donde se localizan las vacuolas. Este patrón es altamente característico de la miopatía por expansiones en *PLIN4* y se ha reportado en todas las publicaciones previas, pero debemos subrayar que no es completamente específico dado que se ha descrito también en algunas entidades neurógenas como la atrofia espinal distal asociada a mutaciones en *KIF5A* (228). No obstante, no se ha reportado antes en otras miopatías vacuolares, por lo que su observación en este contexto debe hacer sospechar esta entidad y dirigir el estudio genético adecuado. Además, nuestros estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos demostrando presencia de marcadores de membrana celular delimitando las vacuolas (incluyendo presencia de laminina α2, caveolina-3 y actividad acetilcolinesterasa, entre otros), junto a un aumento de

marcadores lisosomales, nos han permitido clasificar esta miopatía en el grupo de las miopatías con vacuolas autofágicas de características sarcolemales (AVSF). Tras haber realizado una revisión de la literatura y una comparación detallada de las miopatías con AVSF con la miopatía por expansiones en *PLIN4*, se evidencia una gran similitud patológica de esta enfermedad con la XMEA (*X-linked myopathy with excessive autophagy*) (108,229,230), debido a que ambas presentan, adicionalmente, sobreexpresión de MHC-I y complemento (MAC), ausencia de fibras necróticas o cambios inflamatorios, depósitos de calcio en el sarcolema y redundancia de la lámina basal extracelular.

Un aspecto adicional es la perfecta co-localización de PLIN4 con proteínas relacionadas con la vía de la autofagia y agrefagia (ubiquitina, FK2, NBR1 y p62/SQSTM1), por lo que el mecanismo fisiopatológico que se postula es que la expansión produce una agregación anómala de perilipina 4 en el sarcolema de la fibra muscular, posiblemente debida a cambios de hidrofobicidad u otras propiedades bioquímicas que alteren su unión a gotas lipídicas provocando la unión (no esperada) a membranas bi-capa (113). Esta agregación proteica en el sarcolema daría lugar a una activación constante de la autofagia y del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), que excede la capacidad celular de degradar la proteína defectuosa. Además, la sobreactivación del UPS podría explicar la sobreexpresión de MHC-I observado en algunas fibras, dado que este proceso genera péptidos que se presentan por el MHC-I a los linfocitos T (61). En cuanto al depósito de MAC observado en algunas fibras sin inducir necrosis, en XMEA se ha sugerido que la endocitosis de membranas MAC-positivas pueda proteger a la fibra del efecto lítico del MAC (229).

Vale la pena mencionar en este punto un estudio *preprint* publicado muy recientemente que muestra *in vitro* cómo la región repetitiva de PLIN4, especialmente un fragmento *wild-type* expandido en la miopatía, es propensa a formar fibrillas de amiloide (231). Futuros estudios serán necesarios para valorar las propiedades de agregación de PLIN4 en el tejido muscular y otros tejidos.

Finalmente, en el tercer artículo describimos una serie de pacientes jóvenes no expuestos a estatinas afectos de una miopatía necrotizante por anticuerpos anti-HMGCR con fin de explorar su posible susceptibilidad genética. En este estudio multicéntrico, observacional y retrospectivo, el tiempo medio de seguimiento fue muy prolongado (18.8 años), a diferencia de otros estudios observacionales que incluyen pacientes pediátricos con tiempos de seguimiento de 1 a 3 años (142,143,154). La progresión crónica de la debilidad condicionó un largo retraso diagnóstico en muchos

casos, que osciló entre 3 y 27 años (media = 14). Todos los casos presentaron progresión pese al tratamiento inmunosupresor con al menos dos fármacos, si bien muchos se trataron en fase evolucionada. Por lo tanto, el curso crónico y progresivo de este fenotipo clínico y su relativa refractariedad al tratamiento simulan una distrofia de cinturas, que lo distingue de la forma mayoritaria en adultos previamente expuestos a estatinas.

Se desconoce la fisiopatología real de la enfermedad en estos pacientes y, además, como se ha mencionado en la introducción, no hay descrita una relación clara con un HLA de riesgo en las formas pediátricas como sí la hay en las formas que afectan a los adultos (142,143). Sin embargo, hasta la fecha nunca se han identificado variantes en ningún gen ni se ha estudiado una posible susceptibilidad genética en estos pacientes jóvenes con progresión crónica. Llamativamente, recientemente se han identificado mutaciones en el gen *HMGCR* que codifica la enzima HMGCR como causa de una nueva forma de LGMD de herencia recesiva (188,189), sin presencia de autoanticuerpos y sin inflamación en la biopsia.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, se podría plantear como mecanismo fisiopatológico de este fenotipo crónico o "distrófico" de miopatía autoinmune necrotizante con anticuerpos anti-HMGCR la presencia de mutaciones en genes relacionados con la biosíntesis del colesterol, que secundariamente provoquen una sobreexpresión de la enzima HMGCR y/o una pérdida de tolerancia inmunológica con la formación secundaria de autoanticuerpos y activación del sistema inmune. Por ejemplo, las HMG-CoA sintasas, con su forma citoplasmática y mitocondrial codificadas respectivamente por *HMGCS1* y *HMGCS2*, son necesarias para la síntesis de HMGCR. Por otro lado, las proteínas Insig y Scap codificadas por los genes *INSIG1, INSIG2* y *SCAP* son sensores endógenos de colesterol que regulan la acumulación de esteroles celulares y son esenciales para la degradación fisiológica de HMGCR mediada por el UPS en contexto de exceso de colesterol (232,233). Demostrando esta función reguladora, un estudio en ratones demostró que provocar el *knock out* de los genes *INSIG1*-2 producía una acumulación en tejido hepático de HMGCR 20 veces superior a los niveles de HMGCR en ratones *wild type* (234). Mutaciones en estos genes que impliquen ganancia o pérdida de función, respectivamente, podrían producir una acumulación de HMGCR en la célula.

En cuanto a los resultados de las investigaciones moleculares, la conclusión más importante a destacar es que no existe una causa hereditaria monogénica de esta enfermedad que provoque una sobreexpresión, dislocalización o cambios

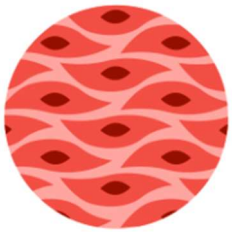
conformacionales de la enzima HMGCR que puedan explicar aumento de su inmunogenicidad y la formación de autoanticuerpos. Este hecho es importante porque se profundiza en la fisiopatología de la enfermedad no asociada a estatinas y por primera vez se analizan genes de la vía celular de la biosíntesis del colesterol con una secuenciación dirigida del exoma. El hecho de que el estudio de exoma fuera negativo va en consonancia con los resultados de nuestros estudios immunohistoquímicos sobre la expresión proteica de HMGCR en biopsias musculares de pacientes, que no mostraron una expresión diferente respecto a controles, por lo que no podemos confirmar la hipótesis sugerida por A. Mammen y P. Mohassel de que en efecto exista una sobreexpresión de HMGCR como causa de la síntesis de autoanticuerpos en esta enfermedad (148,161).

El estudio de haplotipo de los pacientes reveló la asociación significativa con el alelo HLA clase II DRB1*11:01, el mismo alelo asociado a miopatía necrotizante anti-HMGCR en adultos especialmente cuando existe exposición previa a estatinas (140,141). En cambio, no se demostró una asociación con el alelo DRB1*07:01 que se había sugerido como haplotipo de riesgo en las formas pediátricas en estudios con menor número de pacientes (142,143). Dado que la exposición a fuentes naturales de estatinas, por la dieta, por ejemplo, es altamente improbable por la ausencia de agregación familiar de esta enfermedad, la asociación con el mismo HLA de riesgo que en las formas clásicas de adultos sugiere un factor común de riesgo inmunogénico en ambos fenotipos clínicos independientemente de la toma de estatinas. Serán necesarios futuros estudios para confirmar estos resultados en otras cohortes y especialmente estudios dirigidos a explorar la presencia de otros factores ambientales, como cambios epigenéticos o postraduccionales, que puedan modular el debut de la enfermedad y su curso de una forma tan variable.

Este estudio y la literatura reportada hasta la fecha enfatizan la importancia del diagnóstico precoz en esta enfermedad, mediante la determinación serológica de anticuerpos anti-HMGCR en pacientes jóvenes con debilidad crónica de cinturas y biopsia de aspecto distrófico pero sin diagnóstico molecular definitivo. En este contexto, debido a la creciente visibilización de esta entidad clínica y la necesidad patente de un diagnóstico temprano para poder aplicar un tratamiento inmunosupresor precoz que pueda ser más efectivo, es esperable que los tiempos diagnósticos se acorten cada vez más en el futuro.

En conjunto, los estudios que componen esta tesis doctoral amplían el conocimiento de dos miopatías genéticamente determinadas y una inmunomediada, gracias al abordaje

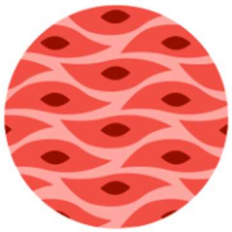
multidisciplinar e integral de las características clínicas, radiológicas, histológicas y genéticas. Por un lado, describimos una nueva enfermedad muscular hereditaria, vacuolar, causada por defectos en el gen *ATP2A2* que provocan una alteración de la homeostasis del calcio intracelular. Además, hemos identificado nuevas familias afectas de la recientemente descrita miopatía asociada a expansiones en *PLIN4*, lo que contribuye a ampliar el conocimiento de la enfermedad y definir en profundidad sus características patológicas. Finalmente, hemos ampliado el conocimiento fisiopatológico de la miopatía necrotizante asociada a anticuerpos anti-HMGCR, gracias al estudio de una serie infantojuvenil de pacientes afectos que incluye el análisis del exoma dirigido a genes de la biosíntesis del colesterol, y del haplotipo asociado a la enfermedad. Proponemos que existe una predisposición inmunogénica común a las formas de los adultos expuestos a estatinas y sugerimos la necesidad de estudiar otros factores no genéticos y no farmacológicos que predispongan a esta enfermedad.



CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

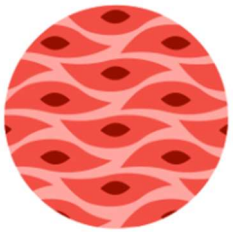
- Defectos en la función del canal *Sarcoendoplasmic Reticulum* Ca^{2+}*-ATPase* 2 (SERCA2), debidos a variantes bialélicas en *ATP2A2*, son causa de una nueva miopatía vacuolar hereditaria de inicio en la edad adulta que se caracteriza por debilidad muscular progresiva de predominio en cintura pélvica, sin afectación cutánea ni cardíaca, con elevación moderada de CK séricas y patrón de resonancia muscular y biopsia muscular característicos.
- En esta miopatía, los estudios *in vitro* de transporte de calcio intracelular en miotubos demuestran un enlentecimiento de la recaptación de Ca^{2+} por el RS debido a una pérdida de actividad del canal SERCA2, que provoca un fallo en el mecanismo de excitación-contracción.
- La miopatía por expansiones en *PLIN4* es una entidad clínicamente heterogénea, con fenotipos distales, proximales y mixtos, causada por una expansión compleja en el dominio anfipático de la perilipina 4, que escapa a métodos habituales de secuenciación del ADN mediante NGS y requiere de la secuenciación de lecturas largas (LRS) para su detección. El tamaño de la expansión en *PLIN4* no se correlaciona con la gravedad de la debilidad ni con la edad de inicio, y tampoco existe un fenómeno de anticipación.
- La histología de la miopatía asociada a expansiones en *PLIN4* se caracteriza por vacuolas autofágicas de características sarcolemales, de gran similitud histológica con XMEA, junto a sobreexpresión de p62 en el sarcolema de las fibras musculares. El inmunomarcaje para p62 no es patognomónico, pero es de gran ayuda para guiar el diagnóstico.
- La miopatía necrotizante inmunomediada asociada a anticuerpos anti-HMGCR en pacientes jóvenes sin exposición previa a estatinas se caracteriza por un curso crónico simulando una distrofia de cinturas. Los pacientes afectos comparten una susceptibilidad genética por alta prevalencia del alelo de riesgo HLA-DRB1*11:01, común a las formas de adultos expuestos a estatinas, pero no presentan una causa monogénica relacionada con genes de la biosíntesis del colesterol.
- No se detecta sobreexpresión ni localización anómala de HMGCR en músculo de pacientes afectos de la miopatía inmunomediada asociada a anticuerpos anti-HMGCR. Por ello y considerando la conclusión previa, la hipótesis en la literatura de una sobreexpresión del autoantígeno como causa de pérdida de tolerancia inmune y producción de anticuerpos, no se confirma según nuestra experiencia.



LÍNEAS DE FUTURO

8. LÍNEAS DE FUTURO

- Analizar el gen *ATP2A2* en miopatías vacuolares con sospecha de causa hereditaria sin diagnóstico molecular.
- En la misma línea, añadir el gen *ATP2A2* en el panel de miopatías hereditarias y (re)analizar el exoma con su estudio dirigido en casos de miopatía crónica progresiva sin diagnóstico molecular en nuestro centro, y en casos de rabdomiólisis con sospecha de causa hereditaria.
- Intentar establecer colaboraciones con otros grupos para agrupar pacientes con expansiones en *PLIN4* que permitan definir con más precisión el fenotipo clínico asociado a la enfermedad.
- Estudiar el posible efecto de expansiones en *PLIN4* sobre el metabolismo lipídico en pacientes afectos, mediante estudio metabólico completo y perfil lipídico en sangre (LDL, HDL, lipoproteína A, colesterol total, triglicéridos, HbA1C). Como proyecto de investigación más complejo, realizar un estudio proteómico en suero de pacientes afectos para evaluar diferencias en la expresión de proteínas implicadas en diversas vías celulares, incluyendo el metabolismo de lípidos.
- Realizar cultivos de mioblastos y/o adipocitos derivados de pacientes con expansiones en *PLIN4* para intentar estudiar la agregabilidad de la perilipina 4 mutada en los tejidos donde se expresa, en comparación con células de controles.
- Estudiar la especificidad del patrón de inmunoreactividad de p62 en el sarcolema en la miopatía asociada a *PLIN4* y comprobar si otras entidades (además de la atrofia espinal distal por mutaciones en *KIF5A*) pueden tener este patrón. Para ello, realizar inmunohistoquímica para p62 en una serie de biopsias musculares de pacientes afectos de distintas enfermedades neuromusculares.



BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Henderson CA, Gomez CG, Novak SM, Mi-Mi L, Gregorio CC. Overview of the Muscle Cytoskeleton. Compr Physiol. 2017 Jun 18;891–944.

2. Wilson DGS, Tinker A, Iskratsch T. The role of the dystrophin glycoprotein complex in muscle cell mechanotransduction. Commun Biol. 2022 Sep 27;5(1):1022.

3. Belhasan DC, Akaaboune M. The role of the dystrophin glycoprotein complex on the neuromuscular system. Neurosci Lett. 2020 Mar;722:134833.

4. Dowling JJ, Weihl CC, Spencer MJ. Molecular and cellular basis of genetically inherited skeletal muscle disorders. Nat Rev Mol Cell Biol. 2021 Nov 13;22(11):713–32.

5. Squire JM. Muscle contraction: Sliding filament history, sarcomere dynamics and the two Huxleys. Glob Cardiol Sci Pract. 2016 Oct 5;2016(2).

6. Szent-Györgyi AG. Calcium regulation of muscle contraction. Biophys J. 1975 Jul;15(7):707–23.

7. Bers DM. Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. Annu Rev Physiol. 2008 Mar 1;70(1):23–49.

8. Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. Muscle Nerve. 2007 Apr;35(4):430–42.

9. Zhang H, Chang M, Chen D, Yang J, Zhang Y, Sun J, et al. Congenital myopathies: pathophysiological mechanisms and promising therapies. J Transl Med. 2024 Sep 2;22(1):815.

10. Sanchez EJ, Lewis KM, Danna BR, Kang C. High-capacity Ca2+ Binding of Human Skeletal Calsequestrin. J Biol Chem. 2012 Mar;287(14):11592–601.

11. Kumar A, Chakravarty H, Bal NC, Balaraju T, Jena N, Misra G, et al. Identification of calcium binding sites on calsequestrin 1 and their implications for polymerization. Mol Biosyst. 2013;9(7):1949.

12. Nelson BR, Wu F, Liu Y, Anderson DM, McAnally J, Lin W, et al. Skeletal muscle-specific T-tubule protein STAC3 mediates voltage-induced Ca2+ release and contractility. Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Jul 16;110(29):11881–6.

13. Brandl CJ, Green NM, Korczak B, MacLennan DH. Two Ca2+ ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. Cell. 1986 Feb 28;44(4):597–607.

14. Brandl CJ, deLeon S, Martin DR, MacLennan DH. Adult forms of the Ca2+ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. J Biol Chem. 1987 Mar 15;262(8):3768–74.

15. Hovnanian A. SERCA pumps and human diseases. Subcell Biochem. 2007;45:337–63.

16. Valentim MA, Brahmbhatt AN, Tupling AR. Skeletal and cardiac muscle calcium transport regulation in health and disease. Biosci Rep. 2022 Dec 1;42(12):1–20.

17. Gélébart P, Martin V, Enouf J, Papp B. Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Apr;303(2):676–84.

18. Dally S, Bredoux R, Corvazier E, Andersen JP, Clausen JD, Dode L, et al. Ca2+-ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase 2 isoform (SERCA2c). Biochem J. 2006 Apr 15;395(2):249–58.

19. Periasamy M, Maurya SK, Sahoo SK, Singh S, Reis FCG, Bal NC. Role of SERCA Pump in Muscle Thermogenesis and Metabolism. Compr Physiol. 2017 Jun 18;7(3):879–90.

20. Molenaar JP, Verhoeven JI, Rodenburg RJ, Kamsteeg EJ, Erasmus CE, Vicart S, et al. Clinical, morphological and genetic characterization of Brody disease: An international study of 40 patients. Brain. 2020 Feb 1;143(2):452–66.

21. Nellen RGL, Steijlen PM, van Steensel MAM, Vreeburg M, European Professional Contributors, Frank J, et al. Mendelian disorders of cornification caused by defects in intracellular calcium pumps: mutation update and database for variants in ATP2A2 and ATP2C1 associated with Darier disease and Hailey-Hailey disease. Hum Mutat. 2017 Apr;38(4):343–56.

22. Dhitavat J, Dode L, Leslie N, Sakuntabhai A, Macfarlane S, MacSween R, et al. Acrokeratosis Verruciformis of Hopf is Caused by Mutation in ATP2A2: Evidence That it is Allelic to Darier's Disease. J Invest Dermatol. 2003 Feb;120(2):229–32.

23. Leong IUS, Stuckey A, Ahanian T, Cederlöf M, Wikstrom JD. Novel mutations in Darier disease and association to self-reported disease severity. PLoS One. 2017 Oct 13;12(10):e0186356.

24. Bachar-Wikström E, Wikström JD. Darier disease – a multi-organ condition? Acta Derm Venereol. 2021 Apr 1;101(4):adv00430.

25. Schartner V, Romero NB, Donkervoort S, Treves S, Munot P, Pierson TM, et al. Dihydropyridine receptor (DHPR, CACNA1S) congenital myopathy. Acta Neuropathol. 2017 Apr 23;133(4):517–33.

26. Snoeck M, van Engelen BGM, Küsters B, Lammens M, Meijer R, Molenaar JPF, et al. RYR1-related myopathies: a wide spectrum of phenotypes throughout life. Eur J Neurol . 2015 Jul 11;22(7):1094–112.

27. Fusto A, Cassandrini D, Fiorillo C, Codemo V, Astrea G, D'Amico A, et al. Expanding the clinical-pathological and genetic spectrum of RYR1-related

congenital myopathies with cores and minicores: an Italian population study. Acta Neuropathol Commun . 2022 Apr 15;10(1):54.

28. Garibaldi M, Rendu J, Brocard J, Lacene E, Fauré J, Brochier G, et al. 'Dusty core disease' (DuCD): expanding morphological spectrum of RYR1 recessive myopathies. Acta Neuropathol Commun. 2019 Dec 5;7(1):3.

29. Lawal TA, Todd JJ, Witherspoon JW, Bönnemann CG, Dowling JJ, Hamilton SL, et al. Ryanodine receptor 1-related disorders: an historical perspective and proposal for a unified nomenclature. Skelet Muscle. 2020 Dec 16;10(1):32.

30. Voermans NC, Snoeck M, Jungbluth H. RYR1-related rhabdomyolysis: A common but probably underdiagnosed manifestation of skeletal muscle ryanodine receptor dysfunction. Rev Neurol (Paris). 2016 Oct;172(10):546–58.

31. Kruijt N, den Bersselaar L Van, Snoeck M, Kramers K, Riazi S, Bongers C, et al. RYR1-Related Rhabdomyolysis: A Spectrum of Hypermetabolic States Due to Ryanodine Receptor Dysfunction. Curr Pharm Des. 2022;28(1):2–14.

32. Jungbluth H, Treves S, Zorzato F, Sarkozy A, Ochala J, Sewry C, et al. Congenital myopathies: disorders of excitation–contraction coupling and muscle contraction. Nat Rev Neurol. 2018 Mar 2;14(3):151–67.

33. Rossi D, Catallo MR, Pierantozzi E, Sorrentino V. Mutations in proteins involved in E-C coupling and SOCE and congenital myopathies. J Gen Physiol. 2022;154(9):1–27.

34. Larach MG. Standardization of the caffeine halothane muscle contracture test. North American Malignant Hyperthermia Group. Anesth Analg. 1989 Oct;69(4):511–5.

35. Rossi D, Vezzani B, Galli L, Paolini C, Toniolo L, Pierantozzi E, et al. A Mutation in the CASQ1 Gene Causes a Vacuolar Myopathy with Accumulation of Sarcoplasmic Reticulum Protein Aggregates. Hum Mutat. 2014 Oct;35(10):1163–70.

36. Protasi F, Paolini C, Dainese M. Calsequestrin-1: a new candidate gene for malignant hyperthermia and exertional/environmental heat stroke. J Physiol. 2009 Jul 30;587(13):3095–100.

37. Kraeva N, Zvaritch E, Frodis W, Sizova O, Kraev A, MacLennan DH, et al. CASQ1 gene is an unlikely candidate for malignant hyperthermia susceptibility in the North American population. Anesthesiology. 2013 Feb;118(2):344–9.

38. Barone V, Del Re V, Gamberucci A, Polverino V, Galli L, Rossi D, et al. Identification and characterization of three novel mutations in the CASQ1 gene in four patients with tubular aggregate myopathy. Hum Mutat. 2017 Dec;38(12):1761–73.

39. Böhm J, Lornage X, Chevessier F, Birck C, Zanotti S, Cudia P, et al. CASQ1 mutations impair calsequestrin polymerization and cause tubular aggregate myopathy. Acta Neuropathol. 2018 Jan 16;135(1):149–51.

40. Lewis KM, Ronish LA, Ríos E, Kang C. Characterization of Two Human Skeletal Calsequestrin Mutants Implicated in Malignant Hyperthermia and Vacuolar Aggregate Myopathy. J Biol Chem. 2015 Nov;290(48):28665–74.

41. Horstick EJ, Linsley JW, Dowling JJ, Hauser MA, McDonald KK, Ashley-Koch A, et al. Stac3 is a component of the excitation–contraction coupling machinery and mutated in Native American myopathy. Nat Commun. 2013 Jun 4;4(1):1952.

42. Rahimi MJ, Urban N, Wegler M, Sticht H, Schaefer M, Popp B, et al. De novo variants in ATP2B1 lead to neurodevelopmental delay. Am J Hum Genet. 2022 May;109(5):944–52.

43. Smits JJ, Oostrik J, Beynon AJ, Kant SG, de Koning Gans PAM, Rotteveel LJC, et al. De novo and inherited loss-of-function variants of ATP2B2 are associated with rapidly progressive hearing impairment. Hum Genet. 2019 Jan 8;138(1):61–72.

44. Zanni G, Calì T, Kalscheuer VM, Ottolini D, Barresi S, Lebrun N, et al. Mutation of plasma membrane Ca2+ ATPase isoform 3 in a family with X-linked congenital cerebellar ataxia impairs Ca2+ homeostasis. Proc Natl Acad Sci USA . 2012 Sep 4;109(36):14514–9.

45. Molina CE, Llach A, Herraiz-Martínez A, Tarifa C, Barriga M, Wiegerinck RF, et al. Prevention of adenosine A2A receptor activation diminishes beat-to-beat alternation in human atrial myocytes. Basic Res Cardiol. 2016 Jan 26;111(1):5–19.

46. Malaichamy S, Idoux R, Polavarapu K, Šikić K, Holla E, Thompson R, et al. Dominant rhabdomyolysis linked to a recurrent *ATP2A2* variant reducing SERCA2 function in muscle. Brain. 2025 Feb 19;148(8):2869–82.

47. Salviati G, Volpe P. Ca2+ release from sarcoplasmic reticulum of skinned fast- and slow-twitch muscle fibers. Am J Physiol. 1988 Mar 1;254(3):C459–65.

48. Schuster F, Müller R, Hartung E, Roewer N, Anetseder M. Inhibition of sarcoplasmic Ca2+-ATPase increases caffeine- and halothane-induced contractures in muscle bundles of malignant hyperthermia susceptible and healthy individuals. BMC Anesthesiol. 2005 Jun 9;5(1):8.

49. Sambuughin N, Zvaritch E, Kraeva N, Sizova O, Sivak E, Dickson K, et al. Exome analysis identifies Brody myopathy in a family diagnosed with malignant hyperthermia susceptibility. Mol Genet Genomic Med. 2014 Nov 6;2(6):472–83.

50. Rosenberg H, Pollock N, Schiemann A, Bulger T, Stowell K. Malignant hyperthermia: a review. Orphanet J Rare Dis. 2015 Dec 4;10(1):93.

51. Wang X, Pattison JS, Su H. Posttranslational Modification and Quality Control. Circ Res. 2013 Jan 18;112(2):367–81.

52. King BC, Kulak K, Colineau L, Blom AM. Outside in: Roles of complement in autophagy. Br J Pharmacol. 2020;178(14):2786–801.

53. Soto C, Pritzkow S. Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. Nat Neurosci. 2018 Oct 24;21(10):1332–40.

54. Ramachandran N, Munteanu I, Wang P, Ruggieri A, Rilstone JJ, Israelian N, et al. VMA21 deficiency prevents vacuolar ATPase assembly and causes autophagic vacuolar myopathy. Acta Neuropathol. 2013 Mar 12;125(3):439–57.

55. Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. Science (1979). 1989 Oct 20;246(4928):382–5.

56. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. Trends Cell Biol. 2012 Aug;22(8):407–17.

57. Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018 Jun 6;19(6):365–81.

58. Fred Dice J. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. Trends Biochem Sci. 1990 Aug;15(8):305–9.

59. Kiffin R, Christian C, Knecht E, Cuervo AM. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. Mol Biol Cell. 2004 Nov;15(11):4829–40.

60. Kaushik S, Massey AC, Mizushima N, Cuervo AM. Constitutive activation of chaperone-mediated autophagy in cells with impaired macroautophagy. Mol Biol Cell. 2008 May;19(5):2179–92.

61. Wenger T, Terawaki S, Camosseto V, Abdelrassoul R, Mies A, Catalan N, et al. Autophagy inhibition promotes defective neosynthesized proteins storage in ALIS, and induces redirection toward proteasome processing and MHCI-restricted presentation. Autophagy. 2012 Mar;8(3):350–63.

62. Olivé M. Extralysosomal Protein Degradation in Myofibrillar Myopathies. Brain Pathol. 2009 Jul 10;19(3):507–15.

63. Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, et al. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. Science (1979). 2004 Nov 5;306(5698):1037–40.

64. He C, Bassik MC, Moresi V, Sun K, Wei Y, Zou Z, et al. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. Nature. 2012 Jan 26;481(7382):511–5.

65. Zhu H, Tannous P, Johnstone JL, Kong Y, Shelton JM, Richardson JA, et al. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. J Clin Invest. 2007 Jul 2;117(7):1782–93.

66. Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. Nat Med. 2007 May 22;13(5):619–24.

67. Takagi H, Matsui Y, Hirotani S, Sakoda H, Asano T, Sadoshima J. AMPK mediates autophagy during myocardial ischemia in vivo. Autophagy. 2007 Jul 16;3(4):405–7.

68. Tannous P, Zhu H, Johnstone JL, Shelton JM, Rajasekaran NS, Benjamin IJ, et al. Autophagy is an adaptive response in desmin-related cardiomyopathy. Proc Natl Acad Sci U S A . 2008 Jul 15;105(28):9745–50.

69. Pattison JS, Osinska H, Robbins J. Atg7 induces basal autophagy and rescues autophagic deficiency in CryABR120G cardiomyocytes. Circ Res. 2011 Jul 8;109(2):151–60.

70. Huang K, Bi FF, Yang H. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Prevalence of Congenital Myopathy. Front Neurol. 2021 Nov 2;12.

71. Meyer A, Meyer N, Schaeffer M, Gottenberg JE, Geny B, Sibilia J. Incidence and prevalence of inflammatory myopathies: a systematic review. Rheumatology (Oxford). 2015 Jan;54(1):50–63.

72. Theadom A, Rodrigues M, Roxburgh R, Balalla S, Higgins C, Bhattacharjee R, et al. Prevalence of Muscular Dystrophies: A Systematic Literature Review. Neuroepidemiology. 2014;43(3–4):259–68.

73. Yeow D, Rudaks LI, Davis R, Ng K, Ghaoui R, Cheong PL, et al. Long-read sequencing for diagnosis of genetic myopathies. BMJ Neurol Open. 2025 Jan 11;7(1):e000990.

74. Theadom A, Rodrigues M, Poke G, O'Grady G, Love D, Hammond-Tooke G, et al. A nationwide, population-based prevalence study of genetic muscle disorders. Neuroepidemiology. 2019;52(3–4):128–35.

75. Crudele JM, Chamberlain JS. AAV-based gene therapies for the muscular dystrophies. Hum Mol Genet. 2019 Oct 1;28(R1):R102–7.

76. Patterson G, Conner H, Groneman M, Blavo C, Parmar MS. Duchenne muscular dystrophy: Current treatment and emerging exon skipping and gene therapy approach. Eur J Pharmacol. 2023 May;947:175675.

77. Mendell JR, Pozsgai ER, Lewis S, Griffin DA, Lowes LP, Alfano LN, et al. Gene therapy with bidridistrogene xeboparvovec for limb-girdle muscular dystrophy type 2E/R4: phase 1/2 trial results. Nat Med. 2024 Jan 4;30(1):199–206.

78. Torri F, Ciurli B, Rende M, Votta A, Mocciaro E, Karakashi F, et al. Deciphering Facioscapulohumeral Dystrophy in the clinical trials era: where are we now? Acta Myol. 2025 Mar;44(1):2–10.

79. Pascual-Gilabert M, Artero R, López-Castel A. The myotonic dystrophy type 1 drug development pipeline: 2022 edition. Drug Discov Today. 2023 Mar;28(3):103489.

80. Poudel BH, Fletcher S, Wilton SD, Aung-Htut M. Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2B (LGMD2B): Diagnosis and Therapeutic Possibilities. Int J Mol Sci . 2024 May 21;25(11):5572.

81. Shieh PB, Kuntz NL, Dowling JJ, Müller-Felber W, Bönnemann CG, Seferian AM, et al. Safety and efficacy of gene replacement therapy for X-linked myotubular myopathy (ASPIRO): a multinational, open-label, dose-escalation trial. Lancet Neurol. 2023 Dec;22(12):1125–39.

82. McNally EM, Pytel P. Muscle Diseases: The Muscular Dystrophies. Annu Rev Pathol. 2007 Feb 1;2(1):87–109.

83. McElhanon KE, Bhattacharya S. Altered membrane integrity in the progression of muscle diseases. Life Sci. 2018 Jan;192:166–72.

84. Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. Nature. 1986 Oct;323(6089):646–50.

85. Monaco AP, Bertelson CJ, Colletti-Feener C, Kunkel LM. Localization and cloning of Xp21 deletion breakpoints involved in muscular dystrophy. Hum Genet. 1987 Mar;75(3):221–7.

86. Zambon AA, Muntoni F. Congenital muscular dystrophies: What is new? Neuromuscul Disord. 2021 Oct;31(10):931–42.

87. Walton JN, Nattrass FJ. On the classification, natural history and treatment of the myopathies . Brain. 1954;77(2):169–231.

88. Bushby KMD, Beckmann JS. 30th and 31st ENMC international workshops, Naarden, The Netherlands, Held 6–8 January 1995. Neuromuscul Disord. 1995 Jul;5(4):337–43.

89. Straub V, Murphy A, Udd B, Corrado A, Aymé S, Bönneman C, et al. 229th ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies – Nomenclature and reformed classification Naarden, The Netherlands, 17–19 March 2017. Neuromuscul Disord. 2018 Aug;28(8):702–10.

90. Sarparanta J, Jonson PH, Golzio C, Sandell S, Luque H, Screen M, et al. Mutations affecting the cytoplasmic functions of the co-chaperone DNAJB6 cause limb-girdle muscular dystrophy. Nat Genet. 2012 Apr 26;44(4):450–5.

91. Melià MJ, Kubota A, Ortolano S, Vílchez JJ, Gámez J, Tanji K, et al. Limb-girdle muscular dystrophy 1F is caused by a microdeletion in the transportin 3 gene. Brain. 2013 May;136(5):1508–17.

92. Georganopoulou DG, Moisiadis VG, Malik FA, Mohajer A, Dashevsky TM, Wuu ST, et al. A Journey with LGMD: From Protein Abnormalities to Patient Impact. Protein J. 2021 Aug 10;40(4):466–88.

93. Savarese M, Jokela M, Udd B. Distal myopathy. Handb Clin Neurol. 2023;497–519.

94. Claeys K, Fardeau M. Myofibrillar myopathies. Handb Clin Neurol. 2013;113:1337–42.

95. Palmio J, Udd B. Myofibrillar and distal myopathies. Rev Neurol (Paris). 2016 Oct;172(10):587–93.

96. Inoue M, Weihl CC. Myofibrillar myopathy: towards a mechanism-based definition as a Z-disk-opathy. Curr Opin Neurol. 2025 Oct;38(5):513–23.

97. Paradas C, Carbonell P, Llansó L, Olivé M. Distal Myopathies. In: England, JD (Ed), Encyclopedia of the Neurological Sciences. 3rd ed. Elsevier, Academic Press; 2025. p. 272–92.

98. Goebel HH, Bönnemann CG, Rare Structural Myopathy Consortium. 169th ENMC International Workshop: Rare Structural Congenital Myopathies. 6-8 November 2009, Naarden, The Netherlands. Neuromuscul Disord. 2011 May;21(5):363–74.

99. Beecroft SJ, van de Locht M, de Winter JM, Ottenheijm CA, Sewry CA, Mohammed S, et al. Recessive MYH7-related myopathy in two families. Neuromuscul Disord. 2019 Jun;29(6):456–67.

100. Sewry CA, Wallgren-Pettersson C. Myopathology in congenital myopathies. Neuropathol Appl Neurobiol. 2017 Feb 15;43(1):5–23.

101. Vivekanandam Vinojini, Jayaseelan Dipa, Hanna Michael G. Muscle channelopathies. Handb Clin Neurol. 2023;195:521–32.

102. Bhai SF, Vissing J. Diagnosis and management of metabolic myopathies. Muscle Nerve. 2023 Sep 25;68(3):250–6.

103. Sugie K, Noguchi S, Kozuka Y, Arikawa-Hirasawa E, Tanaka M, Yan C, et al. Autophagic vacuoles with sarcolemmal features delineate Danon disease and related myopathies. J Neuropathol Exp Neurol. 2005 Jun;64(6):513–22.

104. Sugie K. Autophagic vacuolar myopathy: Danon disease and related myopathies. Neurol Clin Neurosci. 2022 Nov 6;10(6):273–8.

105. Danon MJ, Oh SJ, DiMauro S, Manaligod JR, Eastwood A, Naidu S, et al. Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. Neurology. 1981 Jan;31(1):51–7.

106. Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamada T, Shimojo S, Koori T, et al. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). Nature. 2000 Aug 24;406(6798):906–10.

107. Kalimo H, Savontaus ML, Lang H, Paljärvi L, Sonninen V, Dean PB, et al. X-linked myopathy with excessive autophagy: a new hereditary muscle disease. Ann Neurol. 1988 Mar;23(3):258–65.

108. Minassian BA, Aiyar R, Alic S, Banwell B, Villanova M, Fardeau M, et al. Narrowing in on the causative defect of an intriguing X-linked myopathy with excessive autophagy. Neurology. 2002 Aug 27;59(4):596–601.

109. De Bleecker JL, Engel AG, Winkelmannt JC. Localization of Dystrophin and beta-Spectrin in Vacuolar Myopathies. Am J Pathol. 1993;143(4):1200–8.

110. Fernandez C, Figarella-Branger D, Alla P, Harlé JR, Pellissier JF. Colchicine myopathy: a vacuolar myopathy with selective type I muscle fiber involvement. An immunohistochemical and electron microscopic study of two cases. Acta Neuropathol. 2002 Feb;103(2):100–6.

111. Wolins NE, Skinner JR, Schoenfish MJ, Tzekov A, Bensch KG, Bickel PE. Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. J Biol Chem. 2003 Sep 26;278(39):37713–21.

112. Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, Tzekov A, Park C, Choi K, et al. OP9 mouse stromal cells rapidly differentiate into adipocytes: characterization of a useful new model of adipogenesis. J Lipid Res. 2006 Feb;47(2):450–60.

113. Čopič A, Antoine-Bally S, Giménez-Andrés M, La Torre Garay C, Antonny B, Manni MM, et al. A giant amphipathic helix from a perilipin that is adapted for coating lipid droplets. Nat Commun. 2018 Dec 1;9(1).

114. Dalen KT, Schoonjans K, Ulven SM, Weedon-Fekjaer MS, Bentzen TG, Koutnikova H, et al. Adipose tissue expression of the lipid droplet-associating proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. Diabetes. 2004 May;53(5):1243–52.

115. Hsieh K, Lee YK, Londos C, Raaka BM, Dalen KT, Kimmel AR. Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets. J Cell Sci. 2012 Sep 1;125(Pt 17):4067–76.

116. Pourteymour S, Lee S, Langleite TM, Eckardt K, Hjorth M, Bindesbøll C, et al. Perilipin 4 in human skeletal muscle: localization and effect of physical activity. Physiol Rep. 2015 Aug;3(8).

117. Dias Araújo AR, Bello AA, Bigay J, Franckhauser C, Gautier R, Cazareth J, et al. Surface tension–driven sorting of human perilipins on lipid droplets. J Cell Biol. 2024 Dec 2;223(12).

118. Koprulu M, Zhao Y, Wheeler E, Dong L, Rocha N, Li C, et al. Identification of Rare Loss-of-Function Genetic Variation Regulating Body Fat Distribution. J Clin Endocrinol Metab. 2022 Mar 24;107(4):1065–77.

119. Griseti E, Bello AA, Bieth E, Sabbagh B, Iacovoni JS, Bigay J, et al. Molecular mechanisms of perilipin protein function in lipid droplet metabolism. FEBS Lett. 2024 May;598(10):1170–98.

120. Sztalryd C, Brasaemle DL. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2017 Oct;1862(10 Pt B):1221–32.

121. Ruggieri A, Naumenko S, Smith MA, Iannibelli E, Blasevich F, Bragato C, et al. Multiomic elucidation of a coding 99-mer repeat-expansion skeletal muscle disease. Acta Neuropathol. 2020 Aug 1;140(2):231–5.

122. Yang K, Zeng YH, Qiu Y Sen, Lin F, Chen HZ, Jin M, et al. Expanding the phenotype and genotype spectra of PLIN4-associated myopathy with rimmed ubiquitin-positive autophagic vacuolation. Acta Neuropathol. 2022 Jun 1;143(6):733–5.

123. Wang Q, Yu M, Zhang W, Gang Q, Xie Z, Xu J, et al. Subsarcolemmal and cytoplasmic p62 positivity and rimmed vacuoles are distinctive for PLIN4-myopathy. Ann Clin Transl Neurol. 2022 Nov 1;9(11):1813–9.

124. Mariampillai K, Granger B, Amelin D, Guiguet M, Hachulla E, Maurier F, et al. Development of a New Classification System for Idiopathic Inflammatory Myopathies Based on Clinical Manifestations and Myositis-Specific Autoantibodies. JAMA Neurol. 2018 Dec 1;75(12):1528.

125. Tanboon J, Nishino I. Classification of idiopathic inflammatory myopathies: pathology perspectives. Curr Opin Neurol. 2019 Oct;32(5):704–14.

126. Damoiseaux J, Mammen AL, Piette Y, Benveniste O, Allenbach Y, Allenbach Y, et al. 256th ENMC international workshop: Myositis specific and associated autoantibodies (MSA-ab): Amsterdam, The Netherlands, 8-10 October 2021. Neuromuscul Disord. 2022 Jul;32(7):594–608.

127. Mariampillai K, Granger B, Amelin D, Guiguet M, Hachulla E, Maurier F, et al. Development of a New Classification System for Idiopathic Inflammatory Myopathies Based on Clinical Manifestations and Myositis-Specific Autoantibodies. JAMA Neurol. 2018 Dec 1;75(12):1528.

128. Betteridge Z, Tansley S, Shaddick G, Chinoy H, Cooper RG, New RP, et al. Frequency, mutual exclusivity and clinical associations of myositis autoantibodies in a combined European cohort of idiopathic inflammatory myopathy patients. J Autoimmun. 2019 Jul;101:48–55.

129. Allenbach Y, Mammen AL, Benveniste O, Stenzel W, Allenbach Y, Amato A, et al. 224th ENMC International Workshop: Clinico-sero-pathological classification of immune-mediated necrotizing myopathies. Zandvoort, The Netherlands, 14-16 October 2016. Neuromuscul Disord. 2018 Jan;28(1):87–99.

130. Lim J, Rietveld A, De Bleecker JL, Badrising UA, Saris CGJ, van der Kooi AJ, et al. Seronegative patients form a distinctive subgroup of immune-mediated necrotizing myopathy. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2019 Jan;6(1).

131. Cotton C V, Spencer LG, New RP, Cooper RG. The utility of comprehensive autoantibody testing to differentiate connective tissue disease associated and idiopathic interstitial lung disease subgroup cases. Rheumatology (Oxford). 2017 Aug 1;56(8):1264–71.

132. Pluk H, van Hoeve BJA, van Dooren SHJ, Stammen-Vogelzangs J, van der Heijden A, Schelhaas HJ, et al. Autoantibodies to cytosolic 5′-nucleotidase 1A in inclusion body myositis. Ann Neurol. 2013 Mar 4;73(3):397–407.

133. Benjamin Larman H, Salajegheh M, Nazareno R, Lam T, Sauld J, Steen H, et al. Cytosolic 5′-nucleotidase 1A autoimmunity in sporadic inclusion body myositis. Ann Neurol. 2013 Mar 17;73(3):408–18.

134. Salam S, Dimachkie MM, Hanna MG, Machado PM. Diagnostic and prognostic value of anti-cN1A antibodies in inclusion body myositis. Clin Exp Rheumatol. 2022 Feb 25;40(2):384–93.

135. Trallero-Araguás E, Rodrigo-Pendás JÁ, Selva-O'Callaghan A, Martínez-Gómez X, Bosch X, Labrador-Horrillo M, et al. Usefulness of anti-p155 autoantibody for diagnosing cancer-associated dermatomyositis: A systematic review and meta-analysis. Arthritis Rheum. 2012 Feb 27;64(2):523–32.

136. Fiorentino DF, Chung LS, Christopher-Stine L, Zaba L, Li S, Mammen AL, et al. Most patients with cancer-associated dermatomyositis have antibodies to nuclear matrix protein NXP-2 or transcription intermediary factor 1γ. Arthritis Rheum. 2013 Nov 28;65(11):2954–62.

137. Ichimura Y, Matsushita T, Hamaguchi Y, Kaji K, Hasegawa M, Tanino Y, et al. Anti-NXP2 autoantibodies in adult patients with idiopathic inflammatory myopathies: possible association with malignancy. Ann Rheum Dis. 2012 May;71(5):710–3.

138. Zhen C, Hou Y, Zhao B, Ma X, Dai T, Yan C. Efficacy and safety of rituximab treatment in patients with idiopathic inflammatory myopathies: A systematic review and meta-analysis. Front Immunol. 2022 Dec 12;13.

139. O'Hanlon TP, Carrick DM, Targoff IN, Arnett FC, Reveille JD, Carrington M, et al. Immunogenetic Risk and Protective Factors for the Idiopathic Inflammatory Myopathies. Medicine (Baltimore). 2006 Mar;85(2):111–27.

140. Mammen AL, Gaudet D, Brisson D, Christopher-Stine L, Lloyd TE, Leffell MS, et al. Increased frequency of DRB1*11:01 in anti-hydroxymethylglutaryl- coenzyme a reductase-associated autoimmune myopathy. Arthritis Care Res (Hoboken). 2012 Aug;64(8):1233–7.

141. Limaye V, Bundell C, Hollingsworth P, Rojana-Udomsart A, Mastaglia F, Blumbergs P, et al. Clinical and genetic associations of autoantibodies to 3-

hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase in patients with immune-mediated myositis and necrotizing myopathy. Muscle Nerve. 2015 Aug 1;52(2):196–203.

142. Kishi T, Rider LG, Pak K, Barillas-Arias L, Henrickson M, McCarthy PL, et al. Association of Anti–3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase Autoantibodies With DRB1*07:01 and Severe Myositis in Juvenile Myositis Patients. Arthritis Care Res (Hoboken). 2017 Jul 1;69(7):1088–94.

143. Mohassel P, Landon-Cardinal O, Foley AR, Donkervoort S, Pak KS, Wahl C, et al. Anti-HMGCR myopathy may resemble limb-girdle muscular dystrophy. Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation. 2019 Jan 12;6(1):e523.

144. Ohnuki Y, Suzuki S, Uruha A, Oyama M, Suzuki S, Kulski JK, et al. Association of immune-mediated necrotizing myopathy with HLA polymorphisms. HLA. 2023 May 15;101(5):449–57.

145. Watanabe Y, Uruha A, Suzuki S, Nakahara J, Hamanaka K, Takayama K, et al. Clinical features and prognosis in anti-SRP and anti-HMGCR necrotising myopathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2016 Oct;87(10):1038–44.

146. Ge Y, Lu X, Peng Q, Shu X, Wang G. Clinical Characteristics of Anti-3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Antibodies in Chinese Patients with Idiopathic Inflammatory Myopathies. PLoS One. 2015 Oct 28;10(10):e0141616.

147. Shelly S, Mielke MM, Mandrekar J, Milone M, Ernste FC, Naddaf E, et al. Epidemiology and Natural History of Inclusion Body Myositis. Neurology. 2021 May 25;96(21).

148. Mammen AL. Statin-Associated Autoimmune Myopathy. New England Journal of Medicine. 2016 Feb 18;374(7):664–9.

149. Ma X, Bu BT. Anti-SRP immune-mediated necrotizing myopathy: A critical review of current concepts. Front Immunol. 2022 Oct 13;13.

150. Zhao Y, Zhang W, Liu Y, Wang Z, Yuan Y. Factors associated with refractory autoimmune necrotizing myopathy with anti-signal recognition particle antibodies. Orphanet J Rare Dis. 2020 Dec 8;15(1):181.

151. Benveniste O, Romero NB. Myositis or dystrophy? Traps and pitfalls. Presse Med. 2011 Apr;40(4):e249–55.

152. Benveniste O, Drouot L, Jouen F, Charuel JL, Bloch-Queyrat C, Behin A, et al. Correlation of anti-signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy. Arthritis Rheum. 2011 Jul;63(7):1961–71.

153. Pinal-Fernandez I, Mammen AL. Spectrum of immune-mediated necrotizing myopathies and their treatments. Curr Opin Rheumatol . 2016 Nov;28(6):619–24.

154. Tiniakou E, Pinal-Fernandez I, Lloyd TE, Albayda J, Paik J, Werner JL, et al. More severe disease and slower recovery in younger patients with anti-3-hydroxy-3-

methylglutarylcoenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. Rheumatology (United Kingdom). 2017 May 1;56(5):787–94.

155. Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L, Rosen P, Rosen A, Doering KR, et al. Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. Arthritis Rheum. 2011 Mar;63(3):713–21.

156. Klein M, Mann H, Pleštilová L, Zámečník J, Betteridge Z, McHugh N, et al. Increasing incidence of immune-mediated necrotizing myopathy: single-centre experience. Rheumatology (Oxford). 2015 Nov;54(11):2010–4.

157. Grable-Esposito P, Katzberg HD, Greenberg SA, Srinivasan J, Katz J, Amato AA. Immune-mediated necrotizing myopathy associated with statins. Muscle Nerve. 2010 Feb;41(2):185–90.

158. Kassardjian CD, Lennon VA, Alfugham NB, Mahler M, Milone M. Clinical features and treatment outcomes of necrotizing autoimmune myopathy. JAMA Neurol. 2015 Sep 1;72(9):996–1003.

159. Allenbach Y, Drouot L, Rigolet A, Charuel JL, Jouen F, Romero NB, et al. Anti-HMGCR Autoantibodies in European Patients With Autoimmune Necrotizing Myopathies. Medicine (Baltimore). 2014 May;93(3):150–7.

160. Werner JL, Christopher-Stine L, Ghazarian SR, Pak KS, Kus JE, Daya NR, et al. Antibody levels correlate with creatine kinase levels and strength in anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-associated autoimmune myopathy. Arthritis Rheum. 2012 Dec;64(12):4087–93.

161. Mohassel P, Mammen AL. Anti-HMGCR Myopathy. J Neuromuscul Dis. 2018;5(1):11–20.

162. Arouche-Delaperche L, Allenbach Y, Amelin D, Preusse C, Mouly V, Mauhin W, et al. Pathogenic role of anti-signal recognition protein and anti-3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase antibodies in necrotizing myopathies: Myofiber atrophy and impairment of muscle regeneration in necrotizing autoimmune myopathies. Ann Neurol. 2017 Apr;81(4):538–48.

163. Allenbach Y, Arouche-Delaperche L, Preusse C, Radbruch H, Butler-Browne G, Champtiaux N, et al. Necrosis in anti-SRP+ and anti-HMGCR+myopathies: Role of autoantibodies and complement. Neurology. 2018 Feb 6;90(6):e507–17.

164. Dalakas MC. Myositis: Are autoantibodies pathogenic in necrotizing myopathy? Nat Rev Rheumatol. 2018 May;14(5):251–2.

165. Dalakas MC. Autoimmune inflammatory myopathies. Handb Clin Neurol. 2023;195:425–60.

166. Paipa Merchan A, Jou C, Kapetanovic S, Velez V, Fernández Cuesta M, García-Bragado F, et al. Early onset autoimmune necrotizing myopathy associated with anti-HMGCR antibodies: An unmissable diagnosis. Vol. 25, WMS International Congress, Brighton. 2015.

167. Tard C, Tiffreau V, Jaillette E, Jouen F, Nelson I, Bonne G, et al. Anti-HMGCR Antibody-Related Necrotizing Autoimmune Myopathy Mimicking Muscular Dystrophy. Neuropediatrics. 2017 Dec 1;48(6):473–6.

168. Wang CH, Liang WC. Pediatric immune-mediated necrotizing myopathy. Front Neurol. 2023;14:1123380.

169. Poulsen NS, Madsen KL, Hornsyld TM, Eisum ASV, Fornander F, Buch AE, et al. Growth and differentiation factor 15 as a biomarker for mitochondrial myopathy. Mitochondrion. 2020 Jan;50:35–41.

170. Martín-Jimenez P, Bermejo-Guerrero L, Navarro-Riquelme M, Serrano-Lorenzo P, Garrido-Moraga R, Hernández-Laín A, et al. Comprehensive analysis of GDF15 as a biomarker in primary mitochondrial myopathies. Mol Genet Metab. 2025 Mar;144(3):109023.

171. Cotta A, Carvalho E, da-Cunha-Júnior AL, Valicek J, Navarro MM, Junior SB, et al. Muscle biopsy essential diagnostic advice for pathologists. Surg Exp Pathol. 2021 Dec 14;4(1):3.

172. Díaz-Manera J, Llauger J, Gallardo E, Illa I. Muscle MRI in muscular dystrophies. Acta Myol. 2015 Dec;34(2–3):95–108.

173. Albayda J, Demonceau G, Carlier PG. Muscle imaging in myositis: MRI, US, and PET. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2022 Jun;36(2):101765.

174. Deroide N, Bousson V, Mambre L, Vicaut E, Laredo JD, Kubis N. Muscle MRI STIR signal intensity and atrophy are correlated to focal lower limb neuropathy severity. Eur Radiol. 2015 Mar 26;25(3):644–51.

175. Poliachik SL, Friedman SD, Carter GT, Parnell SE, Shaw DW. Skeletal Muscle Edema in Muscular Dystrophy: Clinical and Diagnostic Implications. Phys Med Rehabil Clin N Am. 2012 Feb;23(1):107–22.

176. Ferguson MR, Poliachik SL, Budech CB, Gove NE, Carter GT, Wang LH, et al. MRI change metrics of facioscapulohumeral muscular dystrophy: Stir and T1. Muscle Nerve. 2018 Jun 3;57(6):905–12.

177. Fabry V, Mamalet F, Laforet A, Capelle M, Acket B, Sengenes C, et al. A deep learning tool without muscle-by-muscle grading to differentiate myositis from facio-scapulo-humeral dystrophy using MRI. Diagn Interv Imaging. 2022 Jul;103(7–8):353–9.

178. Díaz-Manera J, Walter G, Straub V. Skeletal muscle magnetic resonance imaging in Pompe disease. Muscle Nerve. 2021 May 6;63(5):640–50.

179. Holm-Yildiz S, Witting N, de Stricker Borch J, Kass K, Khawajazada T, Krag T, et al. Muscle biopsy and MRI findings in ANO5-related myopathy. Muscle Nerve. 2021 Dec 7;64(6):743–8.

180. Wijntjes J, van Alfen N. Muscle ultrasound: Present state and future opportunities. Muscle Nerve. 2021 Apr 13;63(4):455–66.

181. Vicino A, Veltsista D, van Alfen N. Muscle ultrasound in myopathies. Curr Opin Neurol. 2024 Oct;37(5):549–57.

182. Llansó L, Moore U, Bolano-Diaz C, James M, Blamire AM, Carlier PG, et al. Expanding the muscle imaging spectrum in dysferlinopathy: description of an outlier population from the classical MRI pattern. Neuromuscul Disord. 2023 Apr;33(4):349–57.

183. Bevilacqua JA, Guecaimburu Ehuletche M del R, Perna A, Dubrovsky A, Franca MC, Vargas S, et al. The Latin American experience with a next generation sequencing genetic panel for recessive limb-girdle muscular weakness and Pompe disease. Orphanet J Rare Dis. 2020 Dec 13;15(1):11.

184. Yu M, Zheng Y, Jin S, Gang Q, Wang Q, Yu P, et al. Mutational spectrum of Chinese LGMD patients by targeted next-generation sequencing. PLoS One. 2017 Apr 12;12(4):e0175343.

185. Lorenzoni PJ, Kay CSK, Ducci RDP, Fustes OJH, Rodrigues PR do VP, Hrysay NMC, et al. Single-centre experience with autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy: case series and literature review. Arq Neuropsiquiatr. 2023 Oct 18;81(10):922–33.

186. Davignon L, Chauveau C, Julien C, Dill C, Duband-Goulet I, Cabet E, et al. The transcription coactivator ASC-1 is a regulator of skeletal myogenesis, and its deficiency causes a novel form of congenital muscle disease. Hum Mol Genet. 2016 Apr 15;25(8):1559–73.

187. Böhm J, Malfatti E, Oates E, Jones K, Brochier G, Boland A, et al. Novel ASCC1 mutations causing prenatal-onset muscle weakness with arthrogryposis and congenital bone fractures. J Med Genet. 2019 Sep;56(9):617–21.

188. Yogev Y, Shorer Z, Koifman A, Wormser O, Drabkin M, Halperin D, et al. Limb girdle muscular disease caused by HMGCR mutation and statin myopathy treatable with mevalonolactone. Proc Natl Acad Sci USA. 2023 Feb 14;120(7).

189. Morales-Rosado JA, Schwab TL, Macklin-Mantia SK, Foley AR, Pinto e Vairo F, Pehlivan D, et al. Bi-allelic variants in HMGCR cause an autosomal-recessive progressive limb-girdle muscular dystrophy. Am J Hum Genet. 2023 Jun 1;110(6):989–97.

190. Ghaoui R, Cooper ST, Lek M, Jones K, Corbett A, Reddel SW, et al. Use of Whole-Exome Sequencing for Diagnosis of Limb-Girdle Muscular Dystrophy. JAMA Neurol. 2015 Dec 1;72(12):1424.

191. Beecroft SJ, Yau KS, Allcock RJN, Mina K, Gooding R, Faiz F, et al. Targeted gene panel use in 2249 neuromuscular patients: the Australasian referral center experience. Ann Clin Transl Neurol. 2020 Mar 9;7(3):353–62.

192. Töpf A, Johnson K, Bates A, Phillips L, Chao KR, England EM, et al. Sequential targeted exome sequencing of 1001 patients affected by unexplained limb-girdle weakness. Genet Med. 2020 Sep;22(9):1478–88.

193. Gonzalez-Quereda L, Rodriguez MJ, Diaz-Manera J, Alonso-Perez J, Gallardo E, Nascimento A, et al. Targeted Next-Generation Sequencing in a Large Cohort of Genetically Undiagnosed Patients with Neuromuscular Disorders in Spain. Genes (Basel). 2020 May 11;11(5):539.

194. Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. J Appl Genet. 2011 Nov 23;52(4):413–35.

195. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. Trends Genet. 2014 Sep;30(9):418–26.

196. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. Curr Protoc Mol Biol. 2018 Apr 16;122(1).

197. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 2015 May;17(5):405–24.

198. Nicolau S, Milone M, Liewluck T. Guidelines for genetic testing of muscle and neuromuscular junction disorders. Muscle Nerve. 2021 Sep 16;64(3):255–69.

199. Stence AA, Thomason JG, Pruessner JA, Sompallae RR, Snow AN, Ma D, et al. Validation of Optical Genome Mapping for the Molecular Diagnosis of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. J Mol Diagn. 2021 Nov;23(11):1506–14.

200. Välipakka S, Savarese M, Johari M, Sagath L, Arumilli M, Kiiski K, et al. Copy number variation analysis increases the diagnostic yield in muscle diseases. Neurol Genet. 2017 Dec;3(6).

201. Nallamilli BRR, Pan Y, Sniderman King L, Jagannathan L, Ramachander V, Lucas A, et al. Combined sequence and copy number analysis improves diagnosis of limb girdle and other myopathies. Ann Clin Transl Neurol. 2023 Nov 8;10(11):2092–104.

202. Giardina E, Camaño P, Burton-Jones S, Ravenscroft G, Henning F, Magdinier F, et al. Best practice guidelines on genetic diagnostics of facioscapulohumeral muscular dystrophy: Update of the 2012 guidelines. Clin Genet. 2024 Jul 29;106(1):13–26.

203. Owusu R, Savarese M. Long-read sequencing improves diagnostic rate in neuromuscular disorders. Acta Myol. 2023;42(4):123–8.

204. Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, Suzuki Y, Qu W, Doi K, et al. Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. Nat Genet. 2019 Aug 22;51(8):1222–32.

205. Deng J, Yu J, Li P, Luan X, Cao L, Zhao J, et al. Expansion of GGC Repeat in GIPC1 Is Associated with Oculopharyngodistal Myopathy. Am J Hum Genet. 2020 Jun;106(6):793–804.

206. Yu J, Shan J, Yu M, Di L, Xie Z, Zhang W, et al. The CGG repeat expansion in RILPL1 is associated with oculopharyngodistal myopathy type 4. Am J Hum Genet. 2022 Mar;109(3):533–41.

207. Cortese A, Beecroft SJ, Facchini S, Curro R, Cabrera-Serrano M, Stevanovski I, et al. A CCG expansion in ABCD3 causes oculopharyngodistal myopathy in individuals of European ancestry. Nat Commun. 2024 Jul 27;15(1):6327.

208. Cumming SA, Hamilton MJ, Robb Y, Gregory H, McWilliam C, Cooper A, et al. De novo repeat interruptions are associated with reduced somatic instability and mild or absent clinical features in myotonic dystrophy type 1. Eur J Hum Genet. 2018 Nov 2;26(11):1635–47.

209. Espinosa E, Bautista R, Larrosa R, Plata O. Advancements in long-read genome sequencing technologies and algorithms. Genomics. 2024 May;116(3):110842.

210. Cummings BB, Marshall JL, Tukiainen T, Lek M, Donkervoort S, Foley AR, et al. Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing. Sci Transl Med. 2017 Apr 19;9(386).

211. Segarra-Casas A, Domínguez-González C, Natera-de Benito D, Kapetanovic S, Hernández-Laín A, Estévez-Arias B, et al. Translating Muscle RNAseq Into the Clinic for the Diagnosis of Muscle Diseases. Ann Clin Transl Neurol. 2025 May 25;12(7):1465–147.

212. Marchant RG, Bryen SJ, Bahlo M, Cairns A, Chao KR, Corbett A, et al. Genome and RNA sequencing boost neuromuscular diagnoses to 62% from 34% with exome sequencing alone. Ann Clin Transl Neurol. 2024 May 27;11(5):1250–66.

213. Jan V, Miš K, Nikolic N, Dolinar K, Petrič M, Bone A, et al. Effect of differentiation, de novo innervation, and electrical pulse stimulation on mRNA and protein expression of Na+, K+-ATPase, FXYD1, and FXYD5 in cultured human skeletal muscle cells. PLoS One. 2021;16(2):e0247377.

214. Karpati G, Charuk J, Carpenter S, Jablecki C, Holland P. Myopathy caused by a deficiency of Ca2+-adenosine triphosphatase in sarcoplasmic reticulum (Brody's disease). Ann Neurol. 1986 Jul 8;20(1):38–49.

215. Benders AA, Veerkamp JH, Oosterhof A, Jongen PJ, Bindels RJ, Smit LM, et al. Ca2+ homeostasis in Brody's disease. A study in skeletal muscle and cultured muscle cells and the effects of dantrolene and verapamil. J Clin Invest. 1994 Aug 1;94(2):741–8.

216. Vattemi G, Gualandi F, Oosterhof A, Marini M, Tonin P, Rimessi P, et al. Brody Disease: Insights Into Biochemical Features of SERCA1 and Identification of a Novel Mutation. J Neuropathol Exp Neurol. 2010 Mar;69(3):246–52.

217. Flucher BE. Structural analysis of muscle development: Transverse tubules, sarcoplasmic reticulum, and the triad. Dev Biol. 1992 Dec;154(2):245–60.

218. Vandecaetsbeek I, Trekels M, De Maeyer M, Ceulemans H, Lescrinier E, Raeymaekers L, et al. Structural basis for the high Ca2+ affinity of the ubiquitous SERCA2b Ca2+ pump. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Nov 3;106(44):18533–8.

219. Robia SL, Young HS. Skin cells prefer a slower calcium pump. J Biol Chem. 2018 Mar 16;293(11):3890–1.

220. Mikkelsen SA, Vangheluwe P, Andersen JP. A Darier disease mutation relieves kinetic constraints imposed by the tail of sarco(endo)plasmic reticulum Ca2+-ATPase 2b. J Biol Chem. 2018 Mar 16;293(11):3880–9.

221. Ahn W, Lee MG, Kim KH, Muallem S. Multiple Effects of SERCA2b Mutations Associated with Darier's Disease. J Biol Chem. 2003 Jun;278(23):20795–801.

222. Ringpfeil F, Raus A, DiGiovanna JJ, Korge B, Harth W, Mazzanti C, et al. Darier disease – novel mutations in ATP2A2 and genotype–phenotype correlation. Exp Dermatol. 2001 Feb 7;10(1):19–27.

223. Tong J, McCarthy T V, MacLennan DH. Measurement of resting cytosolic Ca2+ concentrations and Ca2+ store size in HEK-293 cells transfected with malignant hyperthermia or central core disease mutant Ca2+ release channels. J Biol Chem. 1999 Jan 8;274(2):693–702.

224. Chen W, Koop A, Liu Y, Guo W, Wei J, Wang R, et al. Reduced threshold for store overload-induced Ca2+ release is a common defect of RyR1 mutations associated with malignant hyperthermia and central core disease. Biochem J. 2017 Aug 7;474(16):2749–61.

225. Kushnir A, Todd JJ, Witherspoon JW, Yuan Q, Reiken S, Lin H, et al. Intracellular calcium leak as a therapeutic target for RYR1-related myopathies. Acta Neuropathol. 2020 Jun 31;139(6):1089–104.

226. Di Blasi C, Moghadaszadeh B, Ciano C, Negri T, Giavazzi A, Cornelio F, et al. Abnormal lysosomal and ubiquitin-proteasome pathways in 19p13.3 distal myopathy. Ann Neurol. 2004 Jul;56(1):133–8.

227. Maggi L, Gibertini S, Iannibelli E, Gallone A, Bonanno S, Cazzato D, et al. PLIN4-related myopathy: clinical, histological and imaging data in a large cohort of patients. Vol. 270, J Neurol. 2023. p. 4538–43.

228. de Fuenmayor-Fernández de la Hoz CP, Hernández-Laín A, Olivé M, Sánchez-Calvín MT, Gonzalo-Martínez JF, Domínguez-González C. Adult-onset distal spinal muscular atrophy: a new phenotype associated with KIF5A mutations. Brain. 2019 Dec 1;142(12):e66.

229. Chabrol B, Figarella-Branger D, Coquet M, Mancini J, Fontan D, Pedespan JM, et al. X-linked myopathy with excessive autophagy: a clinicopathological study of five new families. Neuromuscul Disord. 2001;11(4):376–88.

230. Dowling JJ, Moore SA, Kalimo H, Minassian BA. X-linked myopathy with excessive autophagy: a failure of self-eating. Acta Neuropathol. 2015 Feb 18;129(3):383–90.

231. Choufani C, Fuggetta N, Sabbagh B, Moulin C, Franckhauser C, Lyonnais S, et al. Perilipin 4 repetitive region forms amyloid fibrils promoted by a genetic expansion found in myopathy patients. BioRxiv. 2025 Jun 4;

232. DeBose-Boyd RA. Feedback regulation of cholesterol synthesis: Sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. Cell Res. 2008 Jun;18(6):609–21.

233. Brown MS, Radhakrishnan A, Goldstein JL. Retrospective on Cholesterol Homeostasis: The Central Role of Scap. Annu Rev Biochem. 2018 Jun 20;87(1):783–807.

234. Engelking LJ, Liang G, Hammer RE, Takaishi K, Kuriyama H, Evers BM, et al. Schoenheimer effect explained: feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins. J Clin Invest. 2005 Sep;115(9):2489–98.