

UNIVERSIDAD DE GRANADA



PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN BIOMEDICINA

Tesis Doctoral

TITINA Y UTROFINA: ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE  
DISTORSIÓN ARQUITECTURAL SARCOMÉRICA Y SOBRE-  
EXPRESIÓN PROTEICA EN BIOPSIAS MUSCULARES, Y  
CORRELACIÓN DIAGNÓSTICA

Doctorando:

**Rogelio Rainiero Ávila Polo**

Directoras:

Dra. Carmen Paradas López

Dra. Norma Beatriz Romero

Granada, 2022

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Rogelio Rainiero Ávila Polo  
ISBN: 978-84-1117-372-8  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/75427>



## AGRADECIMIENTOS

“T.G.I.F.”, como escribía en la pizarra mi profesor Don Pedro Garciarías hace años: “*thank God it's Friday*”. Eso mismo pienso yo, gracias a Dios. Después de muchos años y muchas vicisitudes, hoy es viernes.

Quiero expresar mi gratitud a toda la gente que me ha acompañado y me ha apoyado de forma tan diversa:

A mis Directoras de Tesis, las Dras. Carmen Paradas y Norma B. Romero, por su apoyo a lo largo de este tiempo y permitirme colaborar con ellas. Carmen, muchas gracias por escucharme, por tus ideas, por tus revisiones estando de viaje...gracias por tus ánimos en los momentos difíciles y por creer en mí. Norma, gracias por todo lo que me has enseñado, por tu paciencia, por tus consejos y por el tiempo que me has dedicado (incluidas esas tardes inolvidables al teléfono revisando el *paper* frase por frase). Muchas gracias por vuestra implicación.

Muchas gracias también a todos los miembros de los equipos con los que he coincidido: del IBiS (Macarena, Fabi, Emi, Bea...), de Neurología (Íñigo, Eva, Yolanda, Pilar, Marcos...), del Pabellón Risler (Edoardo, Guy y Clémence, los artistas de la microscopía electrónica, Emmanuelle, Mai, Anais, Angéline, mi querida Favienne, y por supuesto al Prof. Fardeau), así como al Prof. Eymard y a Nathalie del Institut de Myologie. Gracias por vuestra ayuda.

Quiero asimismo agradecer a todo el equipo de Anatomía Patológica del Hospital U. Virgen del Rocío, por acogerme desde que llegué de residente y haberme apoyado tanto en este tiempo y hacerle sentir como en casa a un *granaíno* como yo. Gracias a mi primer jefe, el Dr. Palacios, y gracias también al Dr. De Álava, al Dr. Borrero y a la Dra. Vieites por su apoyo y confianza, y permitirme llevar a cabo el proyecto. Muchas gracias también en estas últimas semanas por facilitarme poder acabarlo. Gracias al Dr. Rivas, mi maestro en el mundo de la Neuropatología. Eloy, gracias por darme una oportunidad, por todo lo que me enseñas a diario y apoyarme en este último empujón. Gracias al resto de compañeros patólogos, de los que he aprendido y aprendo Anatomía Patológica cada día. Gracias a los Residentes con los que he coincidido (María, Esteban, Fernando, Nicoleta, Manolo, David...a todos), por todo lo que hemos compartido, y gracias a los que han



venido después, por su entusiasmo. Gracias a Carolina por sus innumerables consejos, y a Andrés por su dedicación. Gracias al equipo de Molecular: a Michele por su docencia y su paciencia, a Mercedes y Elena, por su disponibilidad siempre. Gracias a todo el personal técnico de AP, en especial a Marcos por buscar tantos casos en el archivo y a mi equipo del Laboratorio de Neuro: a Loren y Pilar, por vuestras enseñanzas, y ahora a Inma y Mari Ángeles, gracias por vuestra ayuda en este proyecto y vuestro apoyo y vuestra sonrisa.

Y por supuesto, GRACIAS a mi familia: a mis padres Rosario y Rogelio, a mi hermano Alexis, a mi tía Rosario y a mi tío Luis, a mis abuelos Francisca y Juan, a mi tía Magdalena y mi tío Joaquín, y a todos los demás. Habéis sido, y sois, mi apoyo incondicional. Os quiero muchísimo, y no sabré nunca cómo devolveros todo lo que me dais. A los que ya no estáis, no sabéis cuánto os echo de menos, pero sé que veláis por mí.

GRACIAS a Carmen María, mi media mitad y mi equilibrio, gracias por estar conmigo cada día y por tu apoyo, por darme ánimos, fuerza, inspiración, y por tus abrazos. Gracias por tu amor y por tenerme con los pies en la tierra, y que no me olvide de las cosas importantes. Perdóname por el tiempo que te he robado. Gracias a Ana y a José, los mejores suegros que podría tener.

Por último, gracias a Dora y Pruden por acompañarme de manera incondicional, incluso de madrugada. Ellas también han hecho la Tesis conmigo, y ojo, que saben lo que no está escrito.

A todos vosotros y a todos los demás que me olvide, MUCHAS GRACIAS.

**TITINA Y UTROFINA: ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE  
DISTORSIÓN ARQUITECTURAL SARCOMÉRICA Y SOBRE-  
EXPRESIÓN PROTEICA EN BIOPSIAS MUSCULARES, Y  
CORRELACIÓN DIAGNÓSTICA**

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS .....	5
ÍNDICE DE TABLAS .....	7
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	8
RESUMEN.....	13
SUMMARY.....	17
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>1. ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES.....</b>	<b>25</b>
1.1. GENERALIDADES.....	25
1.2. DIAGNÓSTICO.....	26
1.2.a. HISTORIA CLÍNICA.....	26
1.2.b. EXPLORACIÓN FÍSICA.....	28
1.2.c. TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS.....	29
<b>2. BIOPSIA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO.....</b>	<b>32</b>
2.1. INDICACIONES Y ELECCIÓN DEL MÚSCULO A BIOPSIAR.....	32
2.2. REALIZACIÓN Y PROCESAMIENTO.....	33
2.3. HISTOLOGÍA NORMAL.....	34
2.4. ESTUDIO HISTOQUÍMICO E HISTOENZIMÁTICO.....	36
2.5. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	38
2.5.a. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.....	38
2.5.b. APLICACIÓN EN BIOPSIAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	39
2.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	42
2.6.a. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.....	42
2.6.b. ULTRAESTRUCTURA DE LA FIBRA MUSCULAR.....	42
2.6.c. PATOLOGÍA ULTRAESTRUCTURAL EN BIOPSIAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	45
2.6.d. APLICACIÓN EN BIOPSIAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	46
2.7. OTROS ESTUDIOS ADICIONALES.....	47
<b>3. TITINA.....</b>	<b>48</b>
3.1. ESTRUCTURA.....	48
3.2. FUNCIÓN.....	49
3.3. DISTINTOS FENOTIPOS DE TITINOPATÍAS .....	50
3.4. HISTOPATOLOGÍA ASOCIADA.....	53
<b>4. DISTROFINA Y UTROFINA.....</b>	<b>54</b>
4.1. DISTROFINA.....	54
4.1.a. ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y PROTEÍNAS ASOCIADAS.....	54
4.2. UTROFINA.....	55
4.2.a. ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y PROTEÍNAS ASOCIADAS.....	55
4.2.b. EXPRESIÓN.....	56
4.2.c. RELACIÓN CON ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES.....	57
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
<b>III. CAPÍTULO 1:</b>	
<b>“LOSS OF SARCOMERIC SCAFFOLDING AS A COMMON     BASELINE HISTOPATHOLOGIC LESION IN TITIN-RELATED     MYOPATHIES”.....</b>	<b>63</b>
<b>1. MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>65</b>
1.1. PATIENTS.....	65

1.2. MOLECULAR DATA .....	66
1.3. MORPHOLOGICAL STUDIES.....	67
1.4. ELECTRON MICROSCOPY.....	67
2. RESULTS.....	71
3. DISCUSSION.....	81
<b>IV. CAPÍTULO 2:</b>	
<b>“DIAGNOSTIC UTILITY OF THE DIFFUSE UTROPHIN</b>	
<b>EXPRESSION (DUE) PATTERN IN MUSCLE BIOPSY” .....</b>	<b>87</b>
1. MATERIALS AND METHODS.....	89
1.1. CASES.....	89
1.2. SAMPLE MUSCLE PROCESSING.....	89
1.3. MORPHOLOGICAL ANALYSIS.....	90
1.4. STATISTICAL ANALYSIS.....	91
2. RESULTS.....	95
2.1. DESCRIPTION OF THE SERIES, CLASSIFICATION	
AND CLINICAL DATA .....	95
2.1.a. MYOPATHIES.....	97
2.1.b. NEUROMUSCULAR JUNCTION DISEASES.....	99
2.1.c. NEUROGENIC DISORDERS.....	99
2.2. HISTOLOGICAL FINDINGS.....	100
2.2.a. REGENERATIVE FIBRES.....	100
2.2.b. NECROTIC FIBRES.....	102
2.2.c. ENDOMYSIAL FIBROSIS.....	103
2.2.d. NEO-MYHC+ FIBRES.....	104
2.3. DIFFUSE UTROPHIN EXPRESSION (DUE) PATTERN.....	107
2.3.a. RELATION WITH SEX.....	107
2.3.b. RELATION WITH AGE RANGES AT BIOPSY.....	107
2.3.c. RELATIONS WITH DIAGNOSTICS.....	110
2.3.d. RELATION WITH HISTOLOGICAL FINDINGS.....	122
3. DISCUSSION.....	127
<b>V. DISCUSIÓN FINAL.....</b>	<b>133</b>
<b>VI. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS.....</b>	<b>141</b>
<b>VII. APÉNDICES/ APPENDICES.....</b>	<b>147</b>
<b>APPENDIX I.</b> Publicación/Publication.....	149
<b>APPENDIX II.</b> Chapter 2: Distribution of the patients in the total series	
according to diagnostics and histological findings in muscle biopsies.....	151
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>159</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Imagen histológica del músculo esquelético.....	35
<b>Figura 2.</b> Representación de algunas de las técnicas histoquímicas e histoenzimáticas comúnmente utilizadas en el estudio de la biopsia muscular.....	38
<b>Figura 3.</b> Representación de técnicas inmunohistoquímicas habitualmente empleadas en el estudio de la biopsia muscular.....	41
<b>Figura 4.</b> Imagen ultraestructural del sarcómero de una fibra de músculo esquelético.....	44
<b>Figura 5.</b> Ejemplos de imágenes de alteraciones ultraestructurales de la fibra muscular.....	46
<b>Figura 6.</b> Esquema de la localización de la titina en el sarcómero.....	49
<b>Figura 7.</b> Representación de la localización de las proteínas distrofina y utrofina a nivel subsarcolémico en la fibra muscular y su relación con el complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DPC).....	55
<b>Figura 8.</b> Histochemistry from group 1 patients (AR-CM).....	71
<b>Figura 9.</b> Electron microscopy studies from Group 1 patients (AR-CM).....	73
<b>Figura 10.</b> Histochemistry from Group 2 (AR-ED) and Group 3 patients (AR-DM).....	74
<b>Figura 11.</b> Electron microscopy from Group 2 (AR-ED).....	75
<b>Figura 12.</b> Electron microscopy studies from Group 3 (AR-DM) and Group 4 (HMERF).....	76
<b>Figura 13.</b> Histochemistry from P21, Group 4 (HMERF).....	77
<b>Figura 14.</b> High-magnification electron microscopy studies from P3 (AR-CM) (A, B), and P15 (AR-DM) (B, C).....	78
<b>Figura 15.</b> Examples of biopsies with different amount of RFs, NFs and EF.....	92
<b>Figura 16.</b> Examples of biopsies with different amount of neo-MyHC+ fibres.....	93
<b>Figura 17.</b> Examples of biopsies with different patterns of IHC utrophin staining.....	94
<b>Figura 18.</b> Number of cases in the different age-ranges and diagnostics.....	96
<b>Figura 19.</b> Distribution of cases in the myopathies category according to diagnostic groups.....	97
<b>Figura 20.</b> Representation of odds ratios of the different categories, groups and subgroups with significant association to presence of RFs in muscle biopsies among the total series.....	101
<b>Figura 21.</b> Representation of odds ratios of the different categories, groups and subgroups with significant association) to presence of NFs in muscle biopsies among the total series.....	103
<b>Figura 22.</b> Representation of odds ratios of the different groups or subgroups with significant association to presence of EF in muscle biopsies among the total series.....	104
<b>Figura 23.</b> Representation of odd ratio of the MeM group to presence of neo-MyHC+ fibres in muscle biopsies.....	105
<b>Figura 24.</b> Representation of odd ratios of the groups and subgroups with significant association to presence of abundant neo-MyHC+ fibres in muscle biopsies among the total series.....	106
<b>Figura 25.</b> Representation of percentages of biopsies with SUE and DUE-pattern in the total series in the different age ranges.....	109

<b>Figure 26.</b> Distribution of biopsies with SUE, and DUE-pattern among the different groups of myopathies.....	111
<b>Figure 27.</b> MD group: examples of biopsies with DUE pattern.....	113
<b>Figure 28.</b> MeM group: examples of biopsies with IHC for utrophin.....	114
<b>Figure 29.</b> CM group: examples of biopsy with IHC for utrophin.....	115
<b>Figure 30.</b> Representation of odds ratios of the different groups or subgroups with significant association to DUE pattern in muscle biopsies regarding the rest of myopathies.....	117
<b>Figure 31.</b> IM group: examples of biopsy with IHC for utrophin.....	118
<b>Figure 32.</b> TM group: example of biopsy with IHC for utrophin.....	119
<b>Figure 33.</b> Distribution of biopsies with SUE, and those with DUE-pattern among the different groups of ND.....	120
<b>Figure 34.</b> Representation of odds ratios of the different groups with significant association to SUE in muscle biopsies regarding to the rest of ND.....	121
<b>Figure 35.</b> ND category: example of biopsy with IHC for utrophin.....	121
<b>Figure 36.</b> Distribution of the different number of biopsies with/without RFs, NFs, EF or neo-MyHC+ fibres and presence/absence of DUE-pattern.....	125
<b>Figure 37.</b> Distribution of the different number of biopsies with abundant/ few neo-MyHC+ fibres and presence/absence of DUE-pattern.....	126

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Table 1.</b> Clinical phenotypes of patients with <i>TTN</i> -related myopathies.....	69
<b>Table 2.</b> Genetic data of patients with <i>TTN</i> -related myopathies.....	70
<b>Table 3.</b> Data relative to biopsy and summarized description of the histological findings in LM in patients with <i>TTN</i> -related myopathies.....	79
<b>Table 4.</b> Summarized description of histological findings in EM in patients with <i>TTN</i> -related myopathies.....	80
<b>Table 5.</b> Categories (bold type), groups (underlined) and subgroups of the total series.....	95
<b>Table 6.</b> Distribution of biopsies with SUE and DUE-pattern in the total series according to different age ranges and percentage of biopsies with DUE-pattern among biopsies with SUE.....	108

# ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Ab	Antibody (Anticuerpo)
AD	Autosomal dominant (Autosómica dominante)
ALS	Amyotrophic Lateral Sclerosis (Esclerosis lateral amiotrófica)
AR	Autosomal recessive (Autosómica recesiva)
AR-CM	Autosomal recessive congenital myopathy (Miopatía congénita autosómica recesiva)
AR-DM	Young adult onset recessive distal titinopathy (Titinopatía distal recesiva de inicio en adulto joven)
AR-ED	Early onset recessive Emery-Dreifuss-like without cardiomyopathy (Tipo Emery-Dreifuss recesivo de inicio precoz sin cardiomiopatía)
ATPases	Adenosine triphosphatases (Adenosina trifosfatasa)
BMD	Becker muscular dystrophy (Distrofia muscular de Becker)
CB	Cytoplasmic body (Cuerpo citoplasmático)
CC	Coiled coil
CCD	Central core disease (Enfermedad del <i>core</i> central)
CD3	Cluster of differentiation 3 (Grupo de diferenciación 3)
CD4	Cluster of differentiation 4 (Grupo de diferenciación 4)
CD8	Cluster of differentiation 8 (Grupo de diferenciación 8)
CD20	Cluster of differentiation 20 (Grupo de diferenciación 20)
CFTD	Congenital fibre type disproportion (Desproporción congénita del tipo de fibras)
CI	Confidence interval (Intervalo de confianza)
CIM	Critical-illness myopathy (Miopatía del enfermo crítico)
CK	Creatin kinase (Creatina quinasa)
CM	Congenital myopathy (Miopatía congénita)
CMD	Congenital muscular dystrophy (Distrofia muscular congénita)
CMH	Cochran-Mantel-Haenszel
CMyast	Congenital myasthenia (Miastenia congénita)
CNM	Centronuclear myopathy (Miopatía congénita centronuclear)



COX	Cytochrome oxidase (Citocromo oxidasa)
CPT-II	Carnitine palmitoyltransferase II (Carnitina palmitoiltransferasa II)
CSIM	Corticosteroids-induced myopathy (Miopatía inducida por corticoesteroides)
CSUR	Centros, Servicios y Unidades de Referencia
CT	Computed Tomography (Tomografía Computerizada)
<i>DAG1</i>	<i>Dystroglycan 1 (Distroglicano 1)</i>
DM	Dermatomyositis (Dermatomiositis)
DMD	Duchenne muscular dystrophy (Distrofia muscular de Duchenne)
DMD-C	Duchenne muscular dystrophy-carrier (Portadora de Distrofia muscular de Duchenne)
DMDL	Duchenne muscular dystrophy-like (Tipo-Distrofia muscular de Duchenne)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DPC	Dystrophin-associated protein complex (Complejo de proteínas asociado a la distrofina)
DRP	Dystrophin related protein (Proteína relacionada con la distrofina)
DRP1	Dystrophin related protein 1 (Proteína relacionada con la distrofina 1)
DRP2	Dystrophin related protein 2 (Proteína relacionada con la distrofina 2)
DUE	Diffuse utrophin expression (Expresión difusa de utrofina)
EDMD	Emery-Dreifuss muscular dystrophy (Distrofia muscular de Emery-Dreifuss)
EF	Endomysial fibrosis (Fibrosis endomisial)
e.g.	exempli gratia
EOMFC	Early onset myopathy with fatal cardiomyopathy (Miopatía de inicio precoz con cardiomiopatía fatal)
EM	Electron microscopy (Microscopía electrónica)
EURO-NMD	European Reference Network for rare or low prevalence complex diseases focussed in Neuromuscular Diseases
FINmaj	Finnish founder mutation (Mutación fundadora finlandesa)
FN3	Fibronectin type III (Fibronectina tipo III)
FT1U	Fibre type 1 uniformity (Uniformidad de fibras tipo 1)
GSD	Glycogen storage disease (Glucogenosis)

HMERF	Hereditary myopathy with early respiratory failure (Miopatía hereditaria con fallo respiratorio precoz)
HUVR	Hospital Universitario Virgen del Rocío
H&E	Hematoxylin and Eosin (Hematoxiliana y Eosina)
IHC	Immunohistochemistry (Inmunohistoquímica)
IM	Inflammatory myopathies (Miopatías Inflamatorias)
IMNM	Immunemediated necrotizing myopathy (Miopatía necrotizante inmunomediada)
IQR	Interquartile range (Rango intercuartílico)
LGMD	Limb-girdle muscular dystrophy (Distrofia muscular de cinturas)
LM	Light microscopy (Microscopio óptico)
MAC	Membrane attack complex (Complejo de ataque a membrana)
MAD	Myoadelinate deaminase (Mioadenilato deaminasa)
MCh	Muscular channelopathy (Canalopatía muscular)
MD	Muscular dystrophy (Distrofia muscular)
Mdn	Median (Mediana)
MeM	Metabolic myopathy (Miopatía metabólica)
Mex	M-band exon (Exón de línea M)
MFM	Myofibrillar myopathy (Miopatía miofibrilar)
MG	Myasthenia gravis
mGT	modified Gomori Trichrome (Tricrómico de Gomori modificado)
MHC-I	Major histocompatibility complex type I (Complejo mayor de histocompatibilidad tipo I)
MIM	Mendelian Inheritance in Man
MiM	Mitochondrial myopathy (Miopatía mitocondrial)
MLPA	Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (Amplificación de la sonda dependiente de la ligadura múltiple)
MmD	Multi-minicore disease (Enfermedad multi-minicore)
MmD-HD	Multi-minicore disease with heart disease (Enfermedad multi-minicore con enfermedad cardíaca)
MND	Motor neuron disease (Enfermedad de motoneurona)
MRI	Magnetic Resonance Imaging (Imagen por Resonancia Magnética)

MyHC-1	Myosin heavy chain-1 (Miosina tipo 1)
MyHC-2	Myosin heavy chain-2 (Miosina tipo 2)
NADH-TR	Nicotinamide adenine dinucleotide-tetrazolium reductase (Nicotinamida adenina dinucleótido tetrazolio reductasa)
NBT	Nitroblue tetrazolium (Azul de nitro-tetrazolio)
ND	Neurogenic disorders (Trastornos neurógenos)
neo-MyHC	Neonatal myosin heavy chain (Miosina neonatal)
NF	Necrotic fibres (Fibras necróticas)
NGS	Next-Generation Sequencing
NM	Nemaline myopathy (Miopatía por nemalinas)
NMD	Neuromuscular disease (Enfermedad neuromuscular)
NMJD	Neuromuscular junction disease (Enfermedad de la unión neuromuscular)
OPMD	Oculopharyngeal muscular dystrophy (Distrofia óculo-faríngea)
OR	Odds Ratio (Razón de ventajas)
P	(followed by number): Patient (Paciente)
	P-value (Valor P)
PAS	Periodic Acid Schiff (Ácido periódico de Schiff)
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PEVK	Proline-Glutamic acid-Valine-Lysine (Prolina-Ácido glutámico-Valina-Lisina)
PFK	Phosphofructokinase (Fosfofructoquinasa)
pH	Potential of Hydrogen (Potencial Hidrógeno)
PM	Polymyositis (Polimiositis)
<i>PMP22</i>	<i>Peripheral myelin protein 22</i>
PN	Peripheral neuropathy (Neuropatía periférica)
POEMS	Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy, Monoclonal protein, Skin changes (Polineuropatía, Organomegalia, Endocrinopatía, proteína Monoclonal, cambios cutáneos)
PYGM	Myophosphorilase (Miofosforilasa)
RF	Regenerative fibres (Fibras regenerativas)
<i>RYR1</i>	<i>Ryanodine Receptor 1 (Receptor de Rianodina 1)</i>
RV	Rimmed vacuol (Vacuola ribeteada)

Sd.	Syndrome (Síndrome)
SDH	Succinate dehydrogenase (Succinato deshidrogenasa)
<i>SEPN1</i>	<i>Selenoprotein N (Selenoproteína N)</i>
sIBM	Sporadic inclusion bodies myositis (Miositis por cuerpos de inclusión esporádica)
SLONM	Sporadic late-onset nemaline myopathy (Miopatía nemalínica tardía esporádica)
SMA	Spinal muscular atrophy (Atrofia muscular espinal)
<i>SMN1</i>	<i>Survival of motor neuron 1</i>
<i>SMN2</i>	<i>Survival of motor neuron 2</i>
SUE	Sarcolemmal utrophin expression (Expresión sarcolémica de utrofina)
TM	Toxic myopathy (Miopatía tóxica)
TMD	Tibial muscular dystrophy (Distrofia muscular tibial)
<i>TTN</i>	<i>Titin (Titina)</i>
<i>UTRN</i>	<i>Utrophin (Utrofina)</i>

# RESUMEN



## **INTRODUCCIÓN**

Las enfermedades neuromusculares (NMD) son en general patologías crónicas a menudo incapacitantes y sin tratamiento curativo por su predominante origen genético. Su diagnóstico precisa combinar datos clínicos, electrofisiológicos, histológicos, de imagen y genéticos. El examen de la biopsia de músculo esquelético se realiza mediante cortes histológicos teñidos con tinciones histoquímicas en un microscopio óptico junto con técnicas inmunohistoquímicas (IHC) y microscopía electrónica (EM) para un estudio ultraestructural. El análisis de los hallazgos de la biopsia muscular en conjunto con los datos clínicos, es una herramienta diagnóstica fundamental en el campo de las NMD.

La titina es una proteína estructural de la fibra muscular que se extiende entre el disco Z y la línea M y se codifica por el gen *TTN* (2q31). Las técnicas de secuenciación masiva han demostrado mutaciones en *TTN* asociadas a numerosos fenotipos clínicos conocidos, pero también nuevas variantes que precisan de una adecuada correlación clínica e histológica para su interpretación. La biopsia muscular es clave entonces para confirmar el diagnóstico y establecer nuevos fenotipos clínicos asociados a *TTN*.

La utrofina es una proteína estructural codificada por el gen *UTRN* (6q24) que se expresa a nivel sarcolémico en la época fetal. La expresión sarcolémica mediante IHC fuera de ese período se ha demostrado en las distrofinopatías, mostrando un patrón difuso en fibras maduras con déficit de distrofina. El aumento de expresión de utrofina en las distrofinopatías se ha justificado como una forma de compensación dada la analogía estructural y funcional con la distrofina. Asimismo, se ha comunicado expresión anómala en fibras regenerativas (RF) en otras NMD, pero con escasa referencia a ese patrón de expresión difusa.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Realizar el análisis histopatológico en biopsias musculares de pacientes con NMD y establecer su utilidad diagnóstica en relación con las proteínas estructurales de la fibra muscular titina y utrofina.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

A. Valorar la utilidad diagnóstica del examen histológico en el estudio de las titinopatías:

A.1. Describir las alteraciones histológicas, con especial atención los hallazgos ultraestructurales, en pacientes con mutaciones en el gen *TTN*.

A.2. Evaluar si las alteraciones encontradas:

- se correlacionan con los fenotipos clínicos.
- tienen alguna particularidad para apoyar la patogenicidad de las nuevas variantes encontradas en el gen *TTN*.

B. Valorar la utilidad diagnóstica de la expresión sarcolémica de utrofina con patrón difuso (DUE) en las NMD:

B.1 Analizar la asociación de DUE con NMD.

B.2. Analizar la asociación de DUE con alteraciones histológicas en relación a la degeneración y regeneración muscular.

## **RESULTADOS**

El análisis de biopsias musculares de pacientes con NMD relacionadas con *TTN* incluyó 23 pacientes de cuatro fenotipos y mutaciones patogénicas dominantes (AD) o recesivas (AR) localizadas en diferentes dominios del gen: miopatía congénita AR (AR-

CM), miopatía de inicio precoz tipo Emery-Dreifuss AR (AR-ED), miopatía distal AR de inicio en adulto joven (AR-DM) y miopatía hereditaria con fallo respiratorio precoz (HMERF).

El estudio histológico identificó defectos oxidativos con internalización nuclear prominente en AR-CM, a los que se añadieron RF, fibras necróticas (NF), fibrosis endomisial (EF) y vacuolas ribeteadas (RV) en las formas AR-ED y AR-DM, y cuerpos citoplasmáticos (CB) de forma predominante en pacientes con HMERF. En EM, las anomalías más significativas, principalmente en las formas AR-CM, fueron pequeñas lesiones tipo minicore, variantes de *streaming* de la línea Z y pequeñas desorganizaciones peculiares que afectaban a uno o pocos sarcómeros a modo de áreas claras con disrupción de la línea M y pérdida de filamentos gruesos. Se observaron CB en algunas AR-CM y con RV en HMERF y algunos casos de AR-ED. En conjunto, resultaron patrones histopatológicos reconocibles en los diferentes fenotipos clínicos y alteraciones estructurales que podrían apuntar a considerar la patogenicidad de las mutaciones en *TTN*.

El estudio centrado en la utrofina incluyó 274 pacientes con diferentes NMD clasificadas en tres categorías diagnósticas: miopatías, enfermedades de la unión neuromuscular y trastornos neurógenos (ND), y a su vez en grupos y subgrupos diagnósticos.

El patrón DUE se observó en un 33.6% de biopsias, incluyendo casos de las tres categorías, demostrando que no es exclusivo de DMD y tampoco de las miopatías, dado que se evidenció hasta en un 30% de ND. Además, demostramos que el patrón DUE puede ser una herramienta diferenciadora para el diagnóstico dado que su presencia se asoció a ciertos grupos de miopatías como las distrofias musculares y las miopatías inflamatorias, y su ausencia a otros como las miopatías metabólicas y las tóxicas. Confirmamos también la vinculación de la utrofina con fenómenos de regeneración: el patrón DUE se asoció a presencia de RF y de abundantes fibras con expresión de miosina neonatal. También a la presencia de NF y EF (que reflejan procesos de daño muscular agudo y crónico respectivamente). Por último, el patrón DUE sugiere un papel añadido de la utrofina más allá de la regeneración muscular o mecanismos compensatorios asociados a la ausencia de distrofina, dada su evidencia en fibras sin expresión de miosina neonatal y fibras maduras con distrofina conservada. Estos hallazgos plantean considerar nuevas propiedades para la utrofina.

## **CONCLUSIÓN**

En conclusión, evidenciamos la importante contribución que aportan la EM en el conjunto del estudio de las titinopatías y el estudio de la expresión de utrofina mediante IHC en el estudio de las NMD. La EM pone de manifiesto patrones de lesión y alteraciones sarcoméricas particulares que permitirían ayudar a considerar una probable patogenicidad de las mutaciones en *TTN*, tras la orientación inicial de la biopsia con técnicas convencionales y la integración con los datos clínicos. La identificación de un patrón DUE permite orientar el diagnóstico, así como valorar la capacidad regenerativa persistente en el tejido. Además, nuestros resultados abren la puerta a nuevos planteamientos: 1) mejorar el entendimiento del mecanismo subyacente a la distorsión sarcomérica en miopatías relacionadas con *TTN*, 2) identificar nuevos roles de la utrofina, estudiar su mecanismo de expresión y valorar su potencial aplicación en terapia como elemento protector para retrasar el daño de la fibra muscular en ciertas NMD.



# SUMMARY



## **INTRODUCTION**

Neuromuscular disorders (NMDs) are usually chronic pathologies, often disabling and without curative treatment due to their predominant genetic origin. Its diagnosis requires combining clinical, electrophysiological, histological, imaging and genetic data. The examination of skeletal muscle biopsy is performed with histological sections and histochemical stains for evaluation under a light microscopy, along with immunohistochemical (IHC) techniques and electron microscopy (EM) for ultrastructural study. Analysis of muscle biopsy findings in conjunction with clinical data is a fundamental diagnostic tool in the field of NMDs.

Titin is a structural muscle fibre protein encoded by the *TTN* gene (2q31) that spans between the Z-disc and the M- line. Massive sequencing techniques have shown mutations in *TTN* associated with numerous known clinical phenotypes, but also new variants that require adequate clinical and histological correlation for their interpretation. Muscle biopsy is therefore a key to confirm the diagnosis and establish new clinical phenotypes associated with *TTN*.

Utrophin is a structural protein encoded by *UTRN* gene (6q24). It is expressed in the sarcolemma in the foetal period. The sarcolemmal IHC expression beyond this period has been reported in dystrophinopathies with a diffuse pattern in mature fibres with dystrophin deficiency. It has been justified as a compensation mechanism, given the structural and functional analogy between both proteins. Moreover, it has been referred in regenerative fibres (RFs) in other NMDs but scant references to that diffuse pattern.

## **OBJECTIVES**

### GENERAL OBJECTIVE:

To carry out the histopathological analysis in muscle biopsies of patients with NMDs and assess its diagnostic usefulness in relation to the structural proteins of muscle fibre titin and utrophin.

### SPECIFIC OBJECTIVES:

- A. To assess the diagnostic utility of the histological exam in the study of titinopathies:
  - A.1. to describe the histological alterations, with special mention to ultrastructural findings, in patients with mutations in the *TTN* gene.
  - A.2. to assess whether the structural alterations:
    - correlate with clinical phenotypes.
    - have some particularities to support the pathogenicity of the new variants found in the *TTN* gene.
- B. To assess the utility of the study of the sarcolemmal expression of utrophin with a diffuse pattern (DUE) in NMDs.
  - B.1 to analyse the association between DUE and NMDs.
  - B.2. to analyse the association between DUE and histological alterations relative to muscle degeneration and regeneration.

## **RESULTS**

The analysis of muscle biopsies from patients with NMD related to *TTN* included 23 patients with four phenotypes and dominant or recessive (AR) pathogenic mutations located in different domains of the gene: congenital AR myopathy (AR-CM), AR early-onset Emery-Dreifuss-like myopathy (AR-ED), young/ early-adult-onset AR distal myopathy (AR-DM), and hereditary myopathy with early respiratory failure (HMERF).

The histological study identified oxidative defects with prominent nuclear internalization in AR-CM. Besides that, in AR-ED and AR-DM forms there were also RFs, necrotic fibres (NF), endomysial fibrosis (EF) and rimmed vacuoles (RVs), whereas cytoplasmic bodies (CBs) predominantly in patients with HMERF. In EM, the most significant abnormalities, mainly in the AR-CM forms, were small minicore-like lesions, variable Z-line streaming, and particular small disorganizations that affected one or a few sarcomeres as clear areas with disruption of the M-line and loss of thick filaments. CBs were observed in some AR-CM and with RVs in HMERF and some cases of AR-ED. As a whole, we described recognizable histopathological patterns and structural alterations that could point to considering the pathogenicity of *TTN* mutations.

The study focused on utrophin included 274 patients with different NMDs classified into three diagnostic categories: myopathies, neuromuscular junction diseases and neurogenic disorders (NDs), and in turn into diagnostic groups and subgroups.

DUE pattern was observed in 33.6% of biopsies, including cases of the three categories, demonstrating not only that it is not exclusive to DMD nor myopathies, as it was evidenced in up to 30% of NDs. Furthermore, we demonstrated that DUE pattern could be a differentiating tool for diagnosis since its presence was associated with certain groups of myopathies such as muscular dystrophies and inflammatory myopathies, and its absence with others such as metabolic and toxic myopathies. We also confirmed the relation of utrophin with regeneration phenomena: DUE pattern was associated with the presence of RFs and abundant fibres with neonatal myosin expression. It was also associated to the presence of NFs and EF (which reflect processes of acute and chronic muscle damage respectively). Finally, DUE pattern suggests an additional role for utrophin beyond muscle regeneration or compensatory mechanisms associated to absence of dystrophin, given its evidence in fibres without neonatal myosin expression and mature fibres with preserved dystrophin. These findings suggest considering new properties for utrophin.

## **CONCLUSION**

In conclusion, we show the important contribution of EM in the study of titinopathies and the examination of utrophin expression by IHC in the study of NMDs. EM reveals patterns of injury and particular sarcomeric alterations that may help to consider a probable pathogenicity of mutations in *TTN*, once the biopsy is oriented with conventional techniques and clinical data are integrated. The expression of utrophin and the identification of a DUE pattern allow to guide the diagnosis, as well as to assess the persistent regenerative capacity in the tissue. In addition, our results open the door to new approaches: 1) to improve the understanding of the mechanism underlying sarcomeric distortion in *TTN*-related myopathies, 2) to identify new roles for utrophin, study the mechanism of expression and assess its potential application in therapy as a protective element to delay the muscle fibre damage in certain NMDs.

## **BIBLIOGRAFÍA (selección) / REFERENCES (selection)**

- Savarese M, Sarparanta J, Vihola A et al. Increasing role of titin mutations in neuromuscular disorders. *J Neuromuscul Dis* 2016; 3:293–308.
- Chauveau C, Rowell J, Ferreiro A. A rising titan: TTN review and mutation update. *Human mutation* 2014; 35 (9): 1046-1059.
- Evilä A, Vihola A, Sarparanta J et al. Atypical phenotypes in titinopathies explained by second titin mutations. *Ann Neurol* 2014; 75:230-240.
- Teijeira S, Teijeiro A, Fernández R et al. Subsarcolemmal expression of utrophin in neuromuscular disorders: an immunohistochemical study of 80 cases. *Acta Neuropathol* 1998;96:481-6.
- Sewry CA, Matsumura K, Campbell KP, et al. Expression of dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1994;4(5/6):401-9.
- Wilson LA, Cooper BJ, Dux L et al. Expression of utrophin (dystrophin-related protein) during regeneration and maturation of skeletal muscle in canine X-linked muscular dystrophy. *Neuropathol and Appl Neurobiol* 1994; 20:359-67.



# I. INTRODUCCIÓN





# 1. ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES

## 1.1. GENERALIDADES

Las enfermedades neuromusculares (NMD) son el conjunto de patologías que se caracterizan por un daño en cualquier estructura del sistema nervioso periférico, incluyendo por tanto las patologías que afectan a la motoneurona inferior del asta anterior de la médula espinal, al nervio periférico, a la unión neuromuscular y a las fibras musculares esqueléticas.

Aunque en conjunto afectan a un porcentaje significativo de la población (según la Federación Española de Enfermedades Neuromusculares se estiman en unos 60.000 pacientes en nuestro país), la mayoría de ellas, consideradas individualmente, son enfermedades con muy baja prevalencia (Deenen et al., 2015). De hecho, la mayor parte de las NMD se reconocen como enfermedades raras (menos de 5 casos/10.000 habitantes) (Posada et al., 2008).

Las NMD pueden afectar a individuos de ambos sexos, con debut en todas las edades, existiendo asimismo casos congénitos. Tienen una gran variabilidad en cuanto a su severidad y progresión, pero en general son enfermedades crónicas incapacitantes, para las que a menudo muchos pacientes necesitan cuidados prolongados en el tiempo, y que en su mayor parte no disponen de tratamientos efectivos ni curación.

En cuanto a la etiología, las NMD pueden ser adquiridas (tóxico-metabólicas, degenerativas o disinmunes) o hereditarias, con herencia mendeliana autosómica dominante, recesiva o ligada al cromosoma X, y herencia materna o mitocondrial.

### 1.2. DIAGNÓSTICO

Las NMD son un grupo sumamente heterogéneo de patologías de diagnóstico complejo, que a menudo precisan la integración de datos clínicos, analíticos, neurofisiológicos, morfológicos (con técnicas de imagen o histología) y/o genéticos, y por tanto tienen un abordaje diagnóstico y terapéutico multidisciplinar.

#### 1.2.a. HISTORIA CLÍNICA

La historia clínica, junto con la exploración física, son claves en la caracterización de una determinada patología y si son certeras permitirán una correcta selección y secuencia de técnicas complementarias que permitan el diagnóstico definitivo del proceso (Wicklund, 2011).

##### **Datos clínicos**

La clínica de las NMD es muy variable. Aunque algunas de ellas tienen algunas características particulares, a menudo comparten rasgos comunes para diferentes patologías, y suele ser una combinación de signos y síntomas la que orienta hacia la sospecha del proceso responsable.

La debilidad es uno de los síntomas más frecuentes. La afectación de los grupos musculares puede ser característica de algunas patologías y es un dato fundamental en el proceso de orientación diagnóstica, distinguiéndose diferentes patrones:

a) proximal (afectación de las cinturas escapular y pelviana): gran parte de las distrofias (e.g. las distrofias musculares de cinturas o [LGMD] o la distrofia muscular de Duchenne [DMD]) y miopatías inflamatorias (IM) (e.g. dermatomiositis [DM] o polimiositis [PM]).

b) distal (de la flexión dorsal o plantar del pie, muñecas, dedos): distrofias musculares distales, neuropatías hereditarias y neuropatías adquiridas (salvo algún tipo específico como la polineuropatía inflamatoria desmielinizante crónica).

## I. INTRODUCCIÓN

c) proximal de miembros superiores y distal de miembros inferiores (escápulo-peroneal): distrofia facio-escápulo-humeral, distrofia de Emery-Dreifuss (EDMD).

d) distal de miembros superiores y proximal de miembros inferiores: miositis por cuerpos de inclusión (sIBM).

e) axial: músculos flexores del cuello, músculos paraespinales (camptocormia).

f) facial: orbicular de los ojos y de la boca (e.g. distrofia facio-escápulo-humeral, síndrome [sd]. de Guillain-Barré, miastenias), ptosis (simétrica y no fluctuante en miopatía mitocondrial [MiM], distrofia miotónica, distrofia muscular óculo-faríngea [OPMD]; fluctuante y fatigable en la miastenia gravis [MG], síndromes miasténicos congénitos)

g) respiratoria: sd. Guillain-Barré, déficit de maltasa ácida, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), etc.

h) faríngea: miastenia gravis, ALS, OPMD, etc.

La intolerancia al ejercicio es la aparición de debilidad y otros síntomas como dolor, náuseas o vómitos al realizar un ejercicio de nivel o duración, que en condiciones normales, sería acorde a su edad, sexo y masa muscular (Vissing, 2016). Es frecuente en miopatías metabólicas.

### **Antecedentes familiares**

Las NMD hereditarias se asocian a patrones de herencia diferentes, de tipo autosómico dominante (AD), autosómico recesivo (AR) o ligado al cromosoma X, por lo que es fundamental describir la presencia de datos clínicos sugestivos de NMD en la familia.

### **Debut y progresión**

Es importante determinar el momento de inicio de la sintomatología, que es muy variable según la enfermedad. El inicio puede ser desde el nacimiento (e.g. miopatías

## I. INTRODUCCIÓN

congénitas [CM], distrofias musculares congénitas [CMD]), infancia/ adolescencia (e.g. distrofias musculares [MD] y MiM), o en edad adulta (e.g. OPMD, ALS). Asimismo, la forma de presentación puede ser aguda o subaguda (e.g. IM, sd. de Guillain-Barré), o crónica (e.g. MD, neuropatías hereditarias).

### **Factores desencadenantes**

En algunas NMD existen agentes externos o situaciones que desencadenan una sintomatología. Es el caso de la miopatía tóxica (TM) (e.g. por estatinas o esteroides), o algunas miopatías metabólicas (MeM) en las que pueden desencadenarse crisis en situaciones de ejercicio o con la fiebre o infecciones.

### **Afectación sistémica**

Es conocido que algunas NMD se asocian a cardiopatías (e.g. DMD, distrofia miotónica, miopatías miofibrilares [MFM]), alteraciones gastrointestinales (e.g. distrofia miotónica y algunas MiM), alteraciones dérmicas (e.g. DM) e incluso neoplasias (e.g. DM, miopatías necrotizantes inmunomediadas [IMNM] o la polineuropatía asociada a POEMS).

### 1.2.b. EXPLORACIÓN FÍSICA

Recogidos los datos de la historia clínica, el examen físico es determinante para una buena categorización de la patología. Es importante la realización de un examen neurológico pormenorizado y sistemático, valorando asimismo si existe una afectación exclusiva a nivel periférico o también la hay central. Asimismo, como se ha indicado previamente, además del estudio neurológico es importante completar la exploración a nivel sistémico para descartar patología acompañante, frecuente en algunas NMD. El examen neurológico es amplio y debe ser completo, incluyendo la evaluación del estado mental y lenguaje, pares craneales, examen motor (masa muscular, movimientos

## I. INTRODUCCIÓN

espontáneos, tono, fuerza), examen sensitivo, reflejos de estiramiento muscular, coordinación y marcha) (Fuller, 2020; Venance y Tawil, 2011).

### 1.2.c. TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS

A partir de la orientación diagnóstica proporcionada por los datos clínicos y la exploración física, existen diferentes técnicas complementarias de diferente complejidad y disposición, que el médico responsable puede emplear para completar el proceso diagnóstico:

#### **Perfil de enzimas séricas**

La creatina quinasa (CK) es la enzima más frecuentemente testada ante la sospecha de una NMD, dado que se eleva como consecuencia de un daño muscular. Aunque hay que tener en cuenta que determinadas situaciones como un ejercicio intenso pueden provocar un aumento de las cifras de CK séricas, esta determinación es muy útil para hacer distinción entre NMD con cifras de CK conservadas o mínimamente aumentadas (e.g. neuropatías hereditarias o atrofia muscular espinal [SMA]) y otras con cifras altas (IM o MD). Respecto a éstas últimas, el rango de incremento de CK varía también según diferentes tipos de MD y en algunas este incremento es especialmente llamativo (e.g. distrofinopatías, disferlinopatías o  $\alpha$ -dystroglicanopatías) (Renard, 2015).

#### **Estudios neurofisiológicos**

Son útiles para reconocer la localización de la lesión en caso de NMD. A veces pueden dar un diagnóstico, y es que tanto trastornos neurógenos (ND) como enfermedades de la unión neuromuscular (NMJD) pueden asemejarse clínicamente en ocasiones a miopatías (Wicklund, 2011). Incluyen estudios de conducción nerviosa sensitiva y motora, de estimulación repetitiva, de fibra aislada y el electromiograma.

## I. INTRODUCCIÓN

### **Técnicas de imagen**

Tanto la imagen por resonancia magnética (MRI) como la tomografía computerizada (CT) y la ecografía, son técnicas no invasivas que pueden resultar muy útiles en el estudio de las NMD. Además de ayudar a elegir el músculo a biopsiar, pueden ofrecer en distinta medida datos sobre el grado de alteración, el patrón de distribución de la afectación e incluso orientar hacia la posible etiología (Wicklund, 2011). La MRI es la técnica de imagen muscular más frecuentemente utilizada. La mayor ventaja de la MRI es que no supone una exposición a radiación ionizante. Según la secuencia utilizada, se puede valorar el grado de edema e infiltración grasa, en función de diversas escalas que valoran los cambios en la señal de los músculos (Fischer et al., 2008; Kamath et al., 2008; Kornblum et al., 2006; Mercuri, et al., 2002). Estos estudios permiten determinar el patrón de afectación por grupos musculares, lo que es muy útil en el diagnóstico diferencial (Wattjes et al., 2010).

### **Biopsia muscular**

Ver página 32.

### **Biopsia de nervio periférico**

Tiene una utilidad limitada, y generalmente se practica cuando la causa de una neuropatía periférica (PN) no puede identificarse por métodos no invasivos, como en caso de sospecha de patología inflamatoria o autoinmune (e.g. vasculitis), infecciosa (e.g. lepra) o de depósito (e.g. amiloidosis) (Rivas Infante, 2015).

### **Estudios genéticos**

El espectro de alteraciones moleculares en NMD es muy amplio y abarca mutaciones tanto del DNA nuclear como del DNA mitocondrial (Laing, 2012). Para su detección se puede emplear una amplia variedad de técnicas cuya elección dependerá de diversos factores. Entre las técnicas moleculares se incluyen:

## I. INTRODUCCIÓN

- PCR: útil para detectar repeticiones de trinucleótidos en la distrofia miotónica de Steinert o en la OPMD, o su variante MLPA para detectar deleciones o duplicaciones en exones del gen *DMD*, el número de copias de los genes *SMN1* y *SMN2* en la SMA o de duplicaciones de *PMP22* en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (Bidinost, 2018), como NMD más frecuentemente asociadas a cambios en la dosis génica.

- Secuenciación de DNA: para identificar el orden de las bases nitrogenadas de la cadena de DNA. El método de Sanger es muy fiable, pero puede secuenciar sólo pequeñas porciones de DNA (Sanger y Coulson, 1975). Las nuevas técnicas de NGS o secuenciación masiva paralela, pueden secuenciar millones de fragmentos de DNA de manera simultánea, en menos tiempo y con menos costo (Vasli et al., 2013). Se aplica para: 1) secuenciar paneles de genes determinados relacionados con una enfermedad concreta o un grupo de enfermedades relacionadas, 2) secuenciar el total de regiones codificantes (exones) e intrónicas flanqueantes (exoma), al que se recurre en caso de una clínica peor definida, y 3) secuenciación del genoma completo, incluyendo regiones codificante y no codificantes en su totalidad, que suele realizarse en aquellos casos en los que no se ha llegado al diagnóstico con los estudios moleculares previos) (Rubio et al., 2020).

# 2. BIOPSIA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

## 2.1. INDICACIONES Y ELECCIÓN DEL MÚSCULO A BIOPSIAR

La biopsia muscular permite la obtención de tejido muscular esquelético a partir del cual pueden realizarse numerosos estudios de tipo histo-morfológico, bioquímico o molecular. Aunque a menudo los hallazgos no sean específicos, pueden ayudar a concretar el estudio genético (Curtis y Sewry, 2013), y en gran medida, éste es el objetivo del examen histológico y estructural. Además, se suma que, en la actualidad, el avance de las nuevas técnicas de secuenciación masiva, cada vez más al alcance de los laboratorios, identifican frecuentemente nuevas mutaciones y variantes de significado desconocido. Esto hace que la descripción de hallazgos histológicos y por supuesto estructurales, sea junto con la adecuada correlación clínica, un elemento crucial para su adecuada interpretación.

La biopsia muscular es una técnica cruenta, por lo que no se incluye entre las utilizadas en primera instancia. Debe realizarse siguiendo unas indicaciones precisas, de manera que tenga una adecuada rentabilidad. Aunque existen pacientes con datos clínicos muy sugestivos de determinadas NMD, en cuyo caso se consideraría directamente el estudio genético (Walters y Baborie, 2020), en numerosas ocasiones es preciso la realización de una biopsia muscular para definir el proceso. Una de las principales indicaciones de la biopsia muscular es determinar si la causa es adquirida o genética para acelerar un posible tratamiento, permitir un consejo genético o tener datos pronósticos (García Bragado, 2015; Walters y Baborie, 2020).

Se aconseja elegir un músculo con afectación moderada para evitar los cambios morfológicos terminales inespecíficos comunes en músculos más gravemente afectados (Joyce et al., 2012; Dubowitz et al., 2013). Para ello, la MRI muscular puede resultar de gran utilidad (Dubowitz et al., 2013). En general, los músculos más comúnmente



## I. INTRODUCCIÓN

biopsiados, y también mejor caracterizados histológicamente, son en caso de afectación proximal: deltoides, bíceps braquial o cuádriceps (vasto lateral), y en caso de afectación distal: gastrocnemio o tibial anterior, reservándose el peroneo corto en caso de biopsia asociada del nervio peroneo superficial (e.g. sospecha de vasculitis) (Collins et al., 2000).

### 2.2. REALIZACIÓN Y PROCESAMIENTO

La técnica de biopsia de músculo esquelético es relativamente sencilla. Se puede hacer mediante aguja percutánea, pero se prefiere generalmente de forma abierta, en quirófano y bajo anestesia local, porque hay más capacidad de obtener más material y éste es más fácilmente orientable. En general es suficiente un fragmento de 1-1.5 cm de longitud x 1 cm de grosor (Villegas-Romero et al., 2021; Dubowitz et al., 2013).

Una vez extraída la muestra es fundamental que se congele lo antes posible para preservarla. Aunque en algunos centros el personal de laboratorio puede comenzar el procesamiento en el mismo quirófano, lo más habitual es que el material se remita con premura al Servicio de Anatomía Patológica de referencia. Si está en otro Centro, el tejido se puede enviar también en fresco envuelto en una gasa húmeda bien escurrida y manteniendo una temperatura fría, pero se recomienda en todo caso un retraso en la congelación inferior a las 2 horas, para evitar artefactos estructurales o bioquímicos (Dubowitz et al., 2013).

Ya en el laboratorio, se procederá a optimizar la muestra en función de los diferentes estudios a realizar. No obstante, si el material fuese escaso, se priorizará el examen histomorfológico mediante al menos microscopía óptica (LM) para hacer las técnicas de tinción histoquímicas e histoenzimáticas básicas (página 36).

El procesamiento general implicaría en primer lugar preservar material para estudio de microscopía electrónica (EM) con la sección longitudinal de uno o varios

## I. INTRODUCCIÓN

fragmentos de aproximadamente 1-2 mm de grosor y su inclusión en glutaraldehído al 4% para su fijación (Joyce et al., 2012, Nix y Moore, 2020). A continuación, el resto del tejido se separa en diferentes fragmentos de aproximadamente 0,5 cm con cortes transversales, y se congelan en isopentano (metilbutano) enfriado en nitrógeno líquido. Dicho procedimiento proporciona una congelación rápida y evita artefactos morfológicos (Joyce et al., 2012, Dubowitz et al., 2013, Nix y Moore, 2020). Un método alternativo, en caso de no disponer de isopentano, sería cubrir el tejido con talco a modo de crioprotección previa a la inclusión en nitrógeno líquido (García Bragado, 2003, Ridaura-Sanz, 2008). Las muestras se conservan congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Nix y Moore, 2020) y a partir de ellas se pueden hacer estudios histomorfológicos, bioquímicos o moleculares.

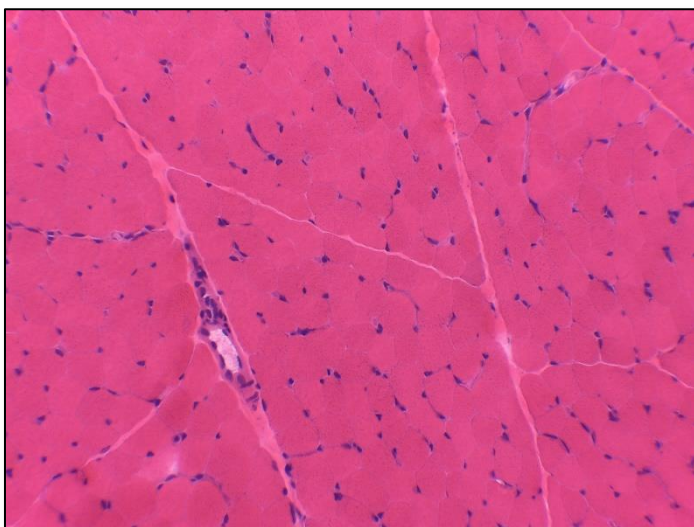
### 2.3. HISTOLOGÍA NORMAL

La unidad celular del músculo esquelético es la fibra muscular. Es una célula alargada, multinucleada, con núcleos de disposición periférica. Las fibras musculares se agrupan formando fascículos que componen los diferentes tipos musculares (Figura 1). Los músculos esqueléticos se rodean de una capa de tejido conjuntivo que los reviste en totalidad y que se denomina epimisio. Está en contacto con la fascia muscular, y a través de él, penetran los vasos y nervios musculares (Ross et al., 1997). El epimisio se extiende internamente rodeando los fascículos musculares, denominándose entonces perimisio, en el que también podemos identificar de manera focal estructuras vasculares y nerviosas. Las diferentes fibras musculares están separadas entre sí por una delgada vaina de fibras reticulares que se corresponde con el endomisio, que junto con glucosaminoglicanos

## I. INTRODUCCIÓN

forma la lámina externa que rodea las fibras musculares (Geneser, 2000). En el endomisio se encuentran sólo pequeños capilares y ramas nerviosas (Ross et al., 1997).

Existen dos tipos de fibras musculares, que en el ser humano se distribuyen en mosaico con una imagen tipo “tablero de ajedrez” (Heffner Jr y Balos, 2007). En las descripciones originales se distinguían por su coloración como rojas y blancas (Ross et al., 1997). Las fibras rojas o fibras tipo 1 tienen mayor cantidad de mioglobina y mitocondrias, abundantes lípidos y una gran actividad oxidativa. Las fibras blancas o tipo 2, tienen menos mioglobina y mitocondrias, y una mayor actividad glucolítica, si bien hay un subtipo de fibras tipo 2 con actividad oxidativa moderada (2B). Las fibras tipo 1



**Figura 1. Imagen histológica del músculo esquelético.** Las fibras musculares se agrupan formando fascículos musculares separados por tejido conjuntivo (perimisio) que contiene estructuras vasculares y nerviosas. H&E 10X.

son fibras de contracción lenta y las fibras tipo 2 son de contracción rápida (Ross et al., 1997; Heffner Jr y Balos, 2007; Dubowitz et al. 2013). La determinación del tipo de fibra se establece en base a su inervación por la motoneurona del asta anterior de la médula. Neurona, axón y fibra muscular conforman una unidad motora, de manera que todas fibras inervadas por una misma motoneurona son del mismo tipo (Dubowitz et al. 2013). Las fibras de una misma unidad motora están dispersas en el músculo, lo que permite un

## I. INTRODUCCIÓN

reclutamiento espacial homogéneo. El número de unidades motoras activadas determinan la fuerza producida por un músculo.

De manera aislada, en ocasiones se identifican los husos neuromusculares (órganos sensoriales complejos con función propioceptiva) que se localizan en el perimisio, entre los fascículos musculares (Dubowitz et al., 2013). Están constituidas por grupos de fibras musculares especializadas, fibras nerviosas aferentes y eferentes, y vasos sanguíneos (Poirier, 1985).

### **2.4. ESTUDIO HISTOQUÍMICO E HISTOENZIMÁTICO**

El estudio se realiza sobre criocortes de entre 7 y 10 micras (Ridaura-Sanz, 2008), aplicando un panel básico de tinciones a las que se sumarían técnicas adicionales en función de la sospecha diagnóstica (Figura 2). Se consideran técnicas comúnmente utilizadas en el diagnóstico de NMD las siguientes técnicas histoquímicas o histoenzimáticas (Dubowitz et al., 2013; Nix y Moore, 2020; Ridaura-Sanz, 2008; Walters y Baborie, 2020):

- Hematoxilina-Eosina (H&E): la tinción por excelencia en Anatomía Patológica. En las biopsias de músculo esquelético permite valorar la variabilidad en el tamaño y forma de las fibras, localización de los núcleos, presencia de determinadas inclusiones, vacuolas, fibras necróticas (NF), regenerativas (RF), fibrosis endomisial (EF) y sustitución adiposa, inflamación, etc.

- Tricrómico de Gomori modificado (mGT): además de valorar cúmulos mitocondriales (fibras rojo-rasgadas), permite identificar inclusiones de diverso tipo como nemalinas, cuerpos citoplasmáticos (CB), cuerpos reductores, etc.

## I. INTRODUCCIÓN

- Ácido peryódico de Schiff (PAS): permite diferenciar los tipos de fibra (fibras tipo 1 menos intensas y fibras tipo 2 más intensas) y valorar alteraciones por cúmulos o ausencia de glucógeno.

- Rojo oleoso (*oil-Red O*): permite diferenciar los tipos de fibra (fibras tipo 1 con más contenido lipídico y fibras tipo 2 con menos), y valorar alteraciones por exceso en el número o tamaño de las gotas lipídicas.

- Enzimas oxidativas (nicotinamida adenina dinucleótido tetrazolio reductasa (NADH-TR), succinato deshidrogenasa (SDH), combinación citocromo C oxidasa (COX)/ SDH: permiten diferenciar los tipos de fibra (fibras tipo 1 más intensas y fibras tipo 2 menos intensas), y valorar la conservación de la organización de la estructura interna miofibrilar y el contenido mitocondrial, evidenciando lesiones como áreas bien delimitadas con ausencia de mitocondrias (tipo *cores*), o lesiones tipo diana, así como fibras lobuladas, fibras azul-rasgadas, defectos en la actividad mitocondrial (COX), etc.

- Adenosina trifosfatasas (ATPases) con pH 4.3, 4.6, 9.4: se utilizan para distinguir los tipos de fibra en función del pH: con pH 9.4 se evidencian más intensamente las fibras tipo 2, y más levemente las tipo 1; con pH 4.3, más oscuras las fibras tipo 1 y negativas las tipo 2; con pH 4.6, más intensas las tipo 1, de forma más moderada las 2B y negativas las 2A (Dubowitz et al., 2013).

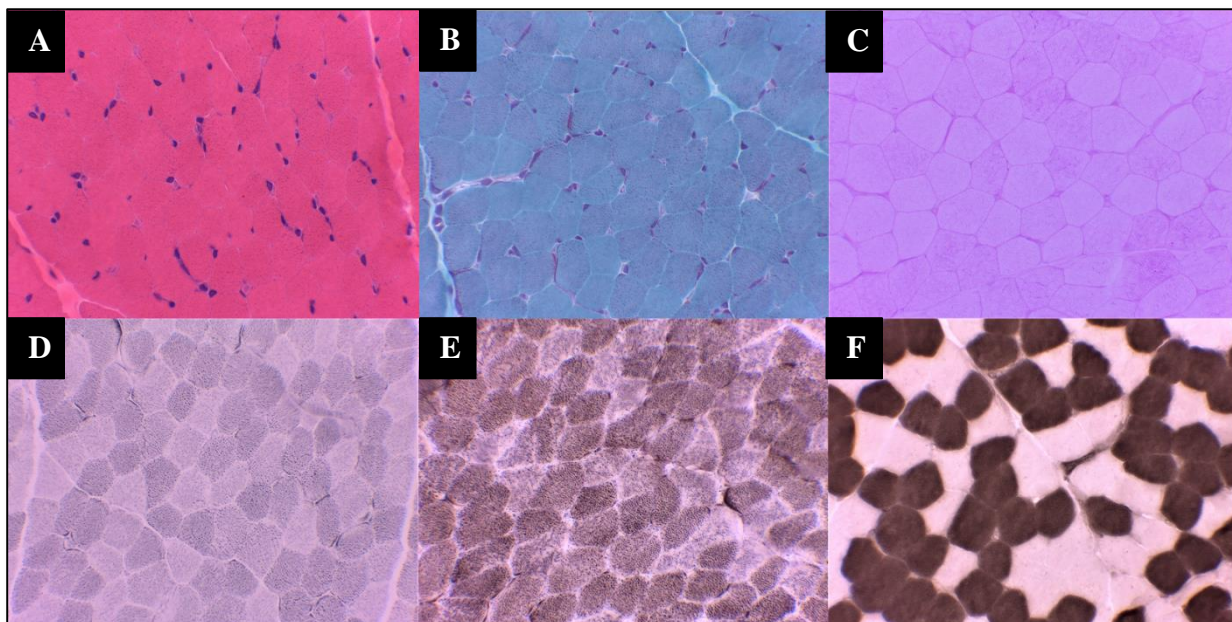
- Fosfatasa ácida: intensa en enfermedades por depósito lisosomal y miopatías vacuolares, por ejemplo, en el caso del déficit de maltasa ácida en la glucogenosis (GSD) tipo II.

- Miofosforilasa (PYGM): ausente en la GSD tipo V.

- Fosfofructoquinasa (PFK): ausente en la GSD tipo VII.

- Mioadenilato deaminasa (MAD): ausente en formas de mialgia de esfuerzo.

- Menadiona NBT: positiva en los cuerpos reductores.



**Figura 2. Representación de algunas de las técnicas histoquímicas e histoenzimáticas comúnmente utilizadas en el estudio de la biopsia muscular. A. Hematoxilina-Eosina; B. Tricrómico de Gomori modificado; C. PAS; D. NADH; E. COX; F. ATPasas pH4.5. 10X**

### 2.5. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

#### 2.5.a. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

La inmunohistoquímica (IHC) tiene como objetivo detectar y permitir la visualización de una determinada proteína celular en secciones tisulares utilizando técnicas inmunológicas (García del Moral, 1993). Para ello, la proteína en cuestión debe ser reconocida de manera específica por otra molécula o anticuerpo (Ab) primario (Kalyuzhny, 2016). La visualización del antígeno se hace habitualmente, dada su mayor sensibilidad de manera indirecta, mediante Ab secundarios marcados, que reconocerán a los Ab primarios (García del Moral, 1993). El marcaje puede ser mediante sondas fluorescentes con un fluoróforo o mediante enzimas y sus sustratos cromogénicos (Kalyuzhny, 2016). La enzima más utilizada en IHC es la peroxidasa, y como sustrato, generalmente se emplea la diaminobencidina (Mohan, 2012), que da lugar a un color marrón. Los métodos enzimáticos utilizan generalmente dos tipos de complejos proteicos

## I. INTRODUCCIÓN

para la detección: estreptavidina-biotina o avidina-biotina. En el primer caso, se usan Ab secundarios unidos a biotina, que se acoplarán a los Ab primarios y a su vez a la estreptavidina unida a la enzima. Al añadirse el sustrato, se produce la reacción química y la coloración permite la detección de la proteína. En el caso del complejo avidina-biotina, se combinan grandes complejos preformados de avidina, biotina y peroxidasa con los Ab secundarios biotinizados, incrementando la sensibilidad de detección del antígeno (Buchwalow y Böcker, 2010).

### 2.5.b. APLICACIÓN EN BIOPSIAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

El uso de técnicas IHC en el estudio de la biopsia muscular tiene en general como finalidad la identificación de elementos propios del músculo esquelético para valorar su pérdida o disminución, cúmulo, o localización normal o anómala.

La valoración de la pérdida o disminución en la expresión de proteínas se realiza fundamentalmente en el contexto de sospecha de MD para orientar el diagnóstico como paso previo al estudio genético, o bien con posterioridad, cuando el resultado del mismo no ha sido concluyente (Vogel y Zamecnik, 2005).

La mayor parte de las proteínas deficitarias en MD se localizan en el sarcolema o la región subsarcolémica, dos áreas de la fibra muscular con una marcada complejidad estructural y con muchos elementos interconectados entre sí, y con la maquinaria contráctil de la fibra. Muchas de esas proteínas forman parte del complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DPC), que agrupa a los distroglicanos, sarcoglicanos, sintrofinas, distrobrevinas y sarcospan. Además, caben destacar otras proteínas de la membrana como la caveolina o la disferlina. El déficit de cada una de estas proteínas se asocia a una entidad concreta de MD (e.g. distrofina a DMD, disferlina a LGMD R2 según la nueva nomenclatura o LGMD2B con la clásica,  $\gamma$ -sarcoglicano a LGMD R5 o 2C,  $\alpha$ -

## I. INTRODUCCIÓN

sarcoglicano a LGMD R3 o 2D, etc.) (Straub et al., 2018) (Figura 3A). A nivel nuclear cabe destacar la proteína emerina, localizada en la membrana nuclear interna, y cuyo déficit se relaciona con la EDMD. Dada su localización, en este caso, el déficit de la proteína se reflejará como una ausencia de inmunotinción nuclear.

En cuanto a la valoración de proteínas sarcoplásmicas mediante IHC, destaca el uso habitual de Ab para la miosina con el objetivo de diferenciar las fibras lentas (con MyHC-1) de las rápidas (con MyHC-2), y las fibras en desarrollo con la isoforma neonatal de la miosina de cadena pesada (neo-MyHC) (Figura 3B-D). La diferenciación entre tipos de fibras puede ser especialmente importante en las CM, donde suelen haber predominio de fibras tipo 1 (lentas), y también en las ND, en las que fenómenos de denervación y reinervación dan lugar a una pérdida del patrón en mosaico habitual y ocurre un agrupamiento por tipo de fibras.

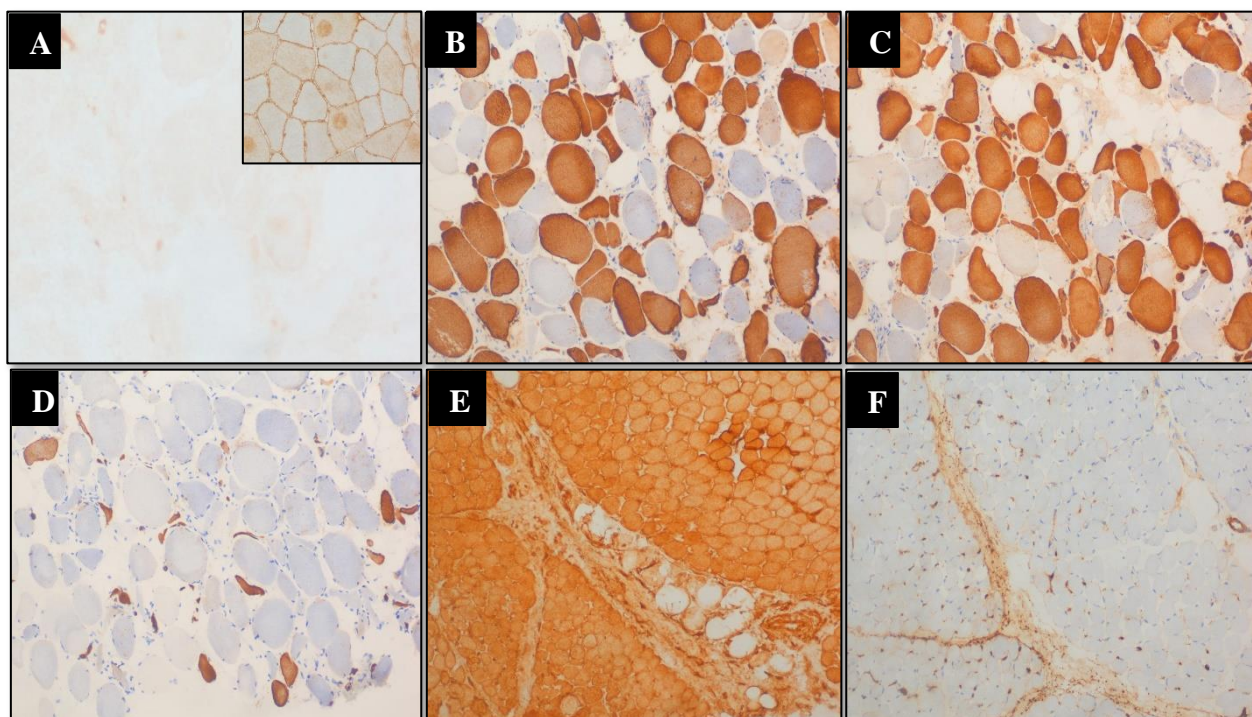
Los cúmulos proteicos son en general menos informativos que los déficits proteicos para determinar el gen responsable de la patología que los provocan, dado que a menudo se acumulan varias proteínas (e.g. en las MFM se acumulan en el sarcoplasma desmina, miotilina, ubiquitina, etc.).

El ejemplo más característico de aumento de inmunoexpresión con localización anómala de proteínas son las IM. En general evidencian una sobre-expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I), que pasa de expresarse en condiciones normales en capilares endomisiales a hacerlo también en el sarcolema de manera difusa en la PM y sIBM, y sólo o con mayor refuerzo a nivel perifascicular (coincidente con la localización de las fibras más dañadas) en la DM (Figura 3E). En ésta última, es también característica una inmunorreactividad anómala de MAC en los capilares endomisiales a nivel perifascicular (Figura 3F). Asimismo, en las IM, la IHC resulta de utilidad para



## I. INTRODUCCIÓN

caracterizar el infiltrado inflamatorio (más rico en linfocitos T CD3 +, y entre ellos CD8 +, en el infiltrado de la PM, y predominante en linfocitos B CD20 + y linfocitos T CD4 + en la DM).



**Figura 3. Representación de técnicas inmunohistoquímicas habitualmente empleadas en el estudio de la biopsia muscular.**

**A.** IHC para disferlina 10X: ausencia de inmunotinción sarcoplémica (control positivo en esquina superior derecha 20X con inmunotinción sarcoplémica normal). Se corresponde con una disferlinopatía; **B.** IHC para MyHC-1 (miosina lenta) 10X: inmunotinción sarcoplásmica en las fibras lentas (tipo 1); **C.** IHC para MyHC-2 (miosina rápida) 10X: inmunotinción sarcoplásmica en las fibras rápidas (tipo 2); **D.** IHC para neo-MyHC (miosina neonatal) 10X: inmunotinción sarcoplásmica en las fibras en desarrollo; **E.** IHC para MHC-I 4X: inmunotinción sarcoplémica y sarcoplásmica anómala con patrón difuso y refuerzo perifascicular en una dermatomiositis; **F.** IHC para MAC 4X: inmunotinción anómala en capilares endomisiales con patrón perifascicular en una dermatomiositis.

### **2.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

#### 2.6.a. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

La EM emplea un tipo de microscopio que utiliza como fuente de iluminación un haz de electrones en lugar de fotones como un microscopio óptico (Dykstra y Reuss, 2003). En la EM de transmisión, los electrones se vehiculizan a través de una columna de vacío, y a través de lentes condensadoras se concentran en la muestra. Los electrones quedan retenidos en las zonas más densas y atraviesan las menos densas, dando lugar a una imagen que se amplifica y proyecta en una pantalla fluorescente para visualizarse directamente, a través de oculares o en una pantalla digital (Dykstra y Reuss, 2003; Torres Seco, 2002). El uso de un haz de electrones hace que la capacidad de penetración en los tejidos sea mayor y por tanto que su resolución, contraste y definición sean más propicios para estudiar estructuras celulares con mayor detalle (Maloney, 1993; Torres Seco, 2002).

#### 2.6.b. ULTRAESTRUCTURA DE LA FIBRA MUSCULAR

La fibra muscular se rodea por el sarcolema, que comprende el plasmalema (membrana limitante del miocito) y la lámina basal (o externa) superpuesta (Ross et al., 1997). Además de los lípidos y glicoproteínas comunes a las membranas celulares, contiene un conjunto de proteínas específicas involucradas en el funcionamiento de la fibra muscular. Las fibras musculares son células multinucleadas, con cientos de núcleos dispuestos en la periferia, por debajo del sarcolema (Geneser, 2000), con una imagen ovalada o aplanada en cortes longitudinales para LM.

Las fibras musculares maduras normales, contienen en su citoplasma (sarcoplasma) fibras paralelas denominadas miofibrillas que se disponen como largos haces de miofilamentos orientados de forma longitudinal (Fardeau y Tomé, 1981) con una imagen característica de estriaciones transversales en cortes longitudinales de fibras

## I. INTRODUCCIÓN

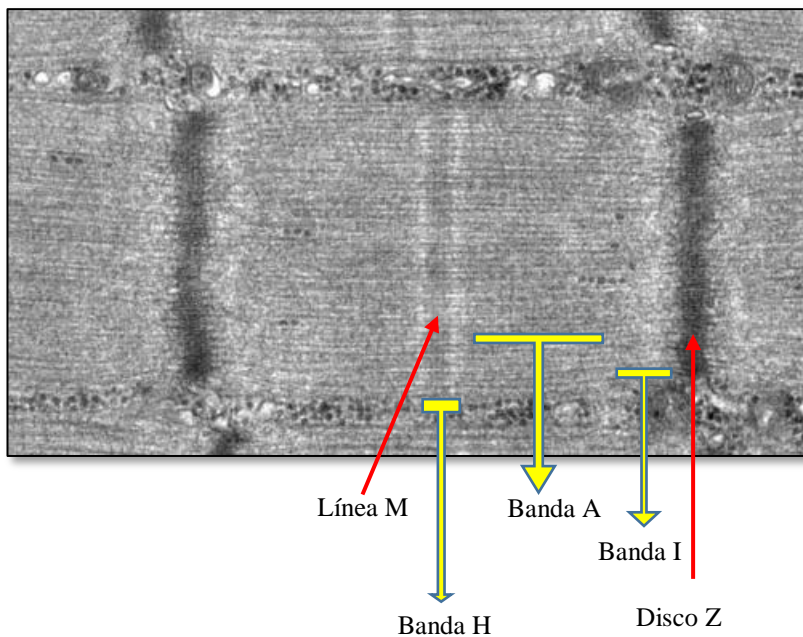
musculares teñidos con hematoxilina-eosina, y de bandas oscuras y claras (Ross et al., 1997), en función del mayor o menor índice de refracción respectivamente, en estudio por EM, de contraste de fases o polarización.

Las bandas oscuras o densas se denominan bandas A (por anisotrópicas: birrefringentes a la luz polarizada), y las bandas claras son las I (por isotrópicas: difracción simple con luz polarizada). La parte central de la banda A tiene a su vez una porción más clara que se denomina zona H (del alemán *Helle*, claro), con una línea central más densa, la línea M (Fardeau y Tomé, 1981). Por último, la banda I está a su vez cortada por una línea densa, la línea o disco Z (del alemán *Zwischenscheibe*, disco intermedio). El espacio entre dos líneas Z se denomina sarcómero, y es la unidad estructural y funcional de la miofibrilla (Geneser, 2000) (Figura 4).

Las miofibrillas se constituyen fundamentalmente por miofilamentos gruesos de miosina y finos de actina, tropomiosina y troponina, que por su disposición son los responsables de esa imagen de estriaciones transversales referida previamente. Los filamentos finos de actina parten de ambos lados de los discos Z, constituyendo en exclusividad la banda I, no obstante, sus extremos se superponen con parte de los filamentos gruesos que forman la banda A, respetando la más central (banda H). De esta manera, la banda A se compone en las porciones laterales por filamentos de miosina y actina superpuestos, y en la parte más central, sólo por filamentos de miosina, correspondiéndose a ésta última a la zona más clara de la banda H. La línea M, que une transversalmente la porción central de los filamentos de miosina alineándolos, está compuesta por miomesina (Geneser, 2000, Ross et al., 1997). Existen además unos filamentos adicionales constituidos por titina, la proteína de mayor longitud conocida, que se extiende a lo largo de una mitad del sarcómero, desde la línea M, con una porción fija que se une a la miosina a lo largo de la banda A, y una porción elástica dispuesta entre

## I. INTRODUCCIÓN

los filamentos de actina a lo largo de la banda I, hasta que se ancla al disco Z por medio de la alfa-actinina (ver en Introducción, Sección 3).



**Figura 4. Imagen ultraestructural del sarcómero de una fibra de músculo esquelético.**  
Representación de las diferentes partes del sarcómero.

Finalmente, las miofibrillas consiguen estabilidad arquitectural fijándose al sarcolema a través de estructuras subsarcolémicas denominadas costámeros, y mediante una red densa de filamentos intermedios a modo de citoesqueleto, que unen las diferentes miofibrillas y fijan los discos Z, entre las que destaca la proteína desmina.

Además de las miofibrillas, en el sarcoplasma destacan inclusiones (cúmulos de glucógeno y gotas lipídicas) y organelas como los aparatos de Golgi (localizados cerca del polo nuclear), mitocondrias (dispuestas en hileras entre las miofibrillas y en la periferia celular) o el retículo sarcoplásmico (equivalente al retículo endoplasmático liso de otras células), que rodea las miofibrillas a modo de una red que se anastomosa a nivel de las intersecciones entre banda A y banda I, formando los denominados retículos de contacto. Tienen una íntima relación a ese nivel con los túbulos T (invaginaciones sarcolémicas entre dos retículos de contacto). Dos retículos de contacto laterales y un

## I. INTRODUCCIÓN

túbulo T central forman una triada, estructura clave en el acoplamiento excitación-contracción (Geneser, 2000, Poirier, 1985).

### 2.6.c. PATOLOGÍA ULTRAESTRUCTURAL EN BIOPSIAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

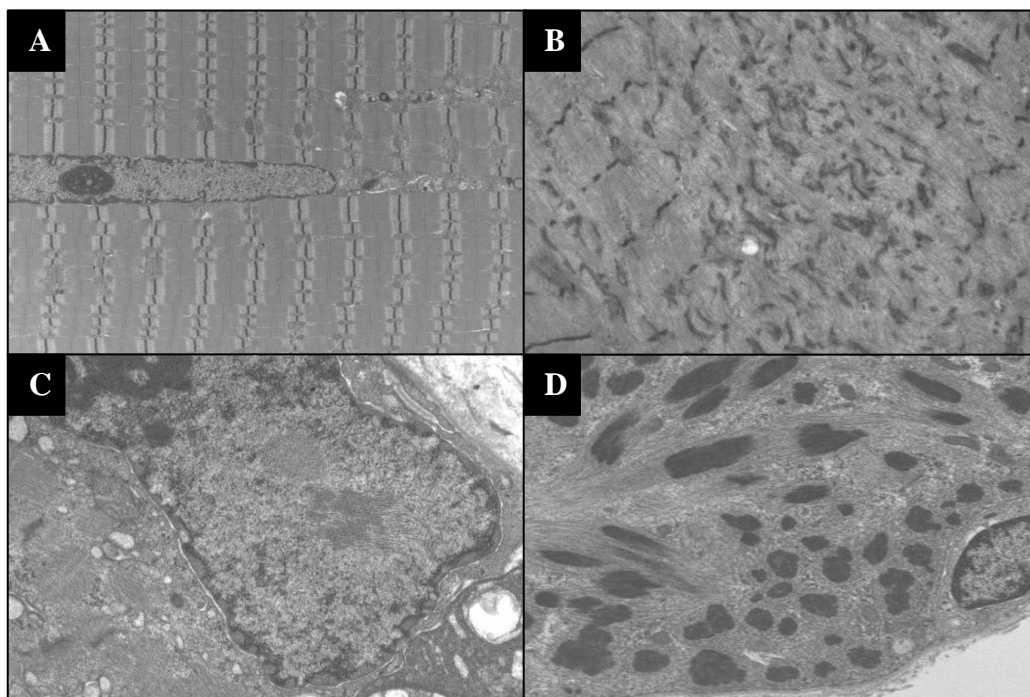
En el contexto de la biopsia muscular, la EM permite estudiar los diferentes componentes de la fibra, esclarecer el tipo de estructuras observadas en LM e identificar otras sólo evidentes a nivel ultraestructural (Dubowitz et al., 2013) (Figura 5).

Las lesiones más comúnmente evidenciadas en patología neuromuscular son las que ocurren en el sarcoplasma y afectan a los miofilamentos en forma de pérdida o disrupciones. Son muy heterogéneas en cuanto a su posibilidad de extensión y distribución. El ejemplo más extremo supone una pérdida miofilamentosa completa como ocurre en las NF, pero las desorganizaciones miofibrilares también pueden ser leves con sólo cambio en la orientación de miofibrillas a nivel periférico (e.g. fibras en anillo), o a nivel central como en los *cores* estructurados, en los que se mantiene el patrón de estriación sarcomérica aunque con cierto grado de desorientación e irregularidad de las líneas Z. Asimismo, pueden existir disrupción de la organización miofibrilar de extensión variable a lo largo de los sarcómeros y ausencia de mitocondrias, como en los *cores* desestructurados y en los *minicores* (Dubowitz et al., 2013).

Otras lesiones relevantes son las que se originan en la línea Z, bien a modo de *streaming*, bastones nemalínicos o *rods* extendiéndose hacia la banda I o formando grupos o CB con una zona central densa y una periférica con filamentos finos radiantes.

## I. INTRODUCCIÓN

Aparte de las lesiones relacionadas con los miofilamentos, cabe destacar la posibilidad de evidenciar vacuolas autofágicas, inclusiones de filamentos gruesos sarcoplásmicos o nucleares, o cúmulos de partículas de glucógeno, entre otras lesiones.



**Figura 5. Ejemplos de imágenes de alteraciones ultraestructurales de la fibra muscular.**

A. Internalización nuclear; B. Desestructuración miofibrilar con ausencia de mitocondrias, tipo core; C. Inclusiones intranucleares; D. Cuerpos nemalínicos. EM.

### 2.6.d. APLICACIÓN EN BIOPSIAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

La técnica de procesamiento del tejido y su posterior valoración son métodos laboriosos y para una optimización de tiempo y recursos, hay que tener en cuenta que hay grupos de patologías en las que puede resultar muy útil y otras en las que puede ser una técnica prescindible. No obstante, esta sospecha diagnóstica no está siempre bien definida antes de procesar la biopsia, y de no hacerse, en ocasiones, en caso de querer estudiar alguna lesión en concreto, podría incluso hacer plantear una nueva toma de muestra. Es

## I. INTRODUCCIÓN

por ello que siempre que el material de biopsia sea suficiente y se asegure el estudio en LM, se aconseja reservar uno o varios fragmentos para estudio en EM.

El estudio con EM se debe considerar esencial en el estudio de las CM por sus frecuentes alteraciones estructurales, que a menudo además dan nombre a muchas entidades (e.g. los *cores* centrales de la miopatía central core [CCD], los *minicores* de la miopatía *multiminicore* [MmD], los bastones nemalínicos de la miopatía nemalínica [NM], etc). Del mismo modo es clave la EM en cualquier otra miopatía con agregados proteicos e inclusiones evidenciadas en el estudio histológico (e.g. en MFM).

Asimismo, la EM puede ser útil en el estudio de MeM (e.g. depósitos de glucógeno subsarcolémicos en la GSD tipo V, o lisosomales en la GSD tipo II), o en síndromes miasténicos congénitos (e.g. alteraciones en las hendiduras post-sinápticas). Por el contrario, en MD o en IM puede resultar en general innecesario, salvo en algunas excepciones como en la OPMD, o la sIBM, caracterizadas a nivel morfológico por presencias de inclusiones filamentosas o vacuolas ribeteadas (RV), si bien la EM no suele ser necesaria para llegar a estos diagnósticos.

### 2.7. OTROS ESTUDIOS ADICIONALES

A partir del material de biopsia se pueden realizar diversos estudios complementarios para: cuantificar la cantidad de determinadas proteínas (western blot) (Paciello y Papparella, 2009); determinar la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (espectrofotometría); determinar alteraciones en el DNA mitocondrial como deleciones únicas, deleciones múltiples, depleción (southern blot, hibridación o PCR), incluso aislar células madre (llamadas células satélite) y realizar cultivos primarios en laboratorio con fines de investigación.

### 3. TITINA

#### 3.1. ESTRUCTURA

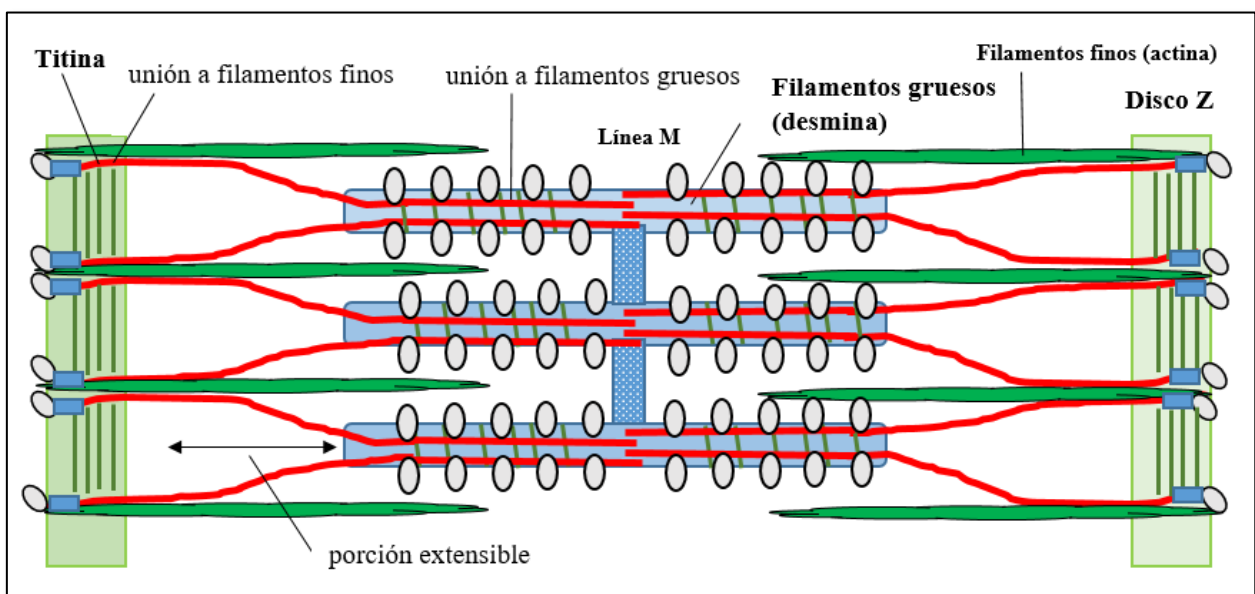
La titina es la proteína humana de mayor tamaño con 33.000 aminoácidos (Maruyama et al., 1984; Kurzban y Wang, 1988). Está codificada por el gen *TTN* (OMIM \* 188840), localizado en el cromosoma 2q31 (Bang et al., 2001; Labeit et al., 1990; Rossi et al., 1994). Se expresa tanto en los músculos esqueléticos como en el músculo cardíaco (Gregorio et al., 1999; Maruyama, 1997; Wang, 1996) y está localizada en el sarcómero. Supone el tercer grupo de miofilamentos más abundantes en las miofibrillas después de la actina y la miosina (Wang, 1996; Maruyama, 1997; Gregorio et al., 1999).

La titina se sitúa a lo largo de la mitad de un sarcómero, extendiéndose desde el disco Z hasta la línea M (Fürst et al., 1988) (Figura 6). Tiene una arquitectura modular que se correlaciona con las diferentes porciones sarcoméricas. Su dominio amino-terminal se ancla al disco Z, interactuando con muchas proteínas a ese nivel, como la  $\alpha$ -actinina (Young et al., 1998), nebulina (Witt et al., 2006) o la filamina C (Labeit et al., 2006). La región de la banda I está formada principalmente por dos grandes segmentos repetitivos tipo inmunoglobulina (Ig) y unas secuencias únicas intercaladas de menor tamaño: los dominios N2 y PEVK. Los dominios N2 pueden tener dos tipos de secuencias (N2A y N2B) que distinguen las dos isoformas de titina: N2A presente en músculo cardíaco y esquelético y N2B, únicamente en cardíaco (Castro-Ferreira et al, 2010). Es una porción muy extensible dado que puede alargarse y enrollarse (Granzier y Labeit., 2002). Esta porción es la responsable de la propiedad elástica de la proteína (Linke et al., 2002; Witt et al., 1998). La región de la banda A representa la mayor parte de la proteína. Se forma por repeticiones simples de dominios similares a la fibronectina-3 (FN3) y tipo Ig con diferentes patrones. Es una porción rígida estrechamente asociada a la miosina, y



## I. INTRODUCCIÓN

proporciona estabilización al sarcómero (Bang et al., 2001). Por último, el dominio carboxi-terminal está localizado en la línea M y contiene un dominio quinasa. A este nivel, los filamentos de titina de las dos mitades de los sarcómeros adyacentes, se superponen y se conectan con otros elementos proteicos como la miomesina (Obermann et al., 1997) y la calpaína 3 (Kinbara, 1997). La calpaína 3 es una endopeptidasa dependiente de calcio específica del músculo, cuyo déficit secundario en western blot se ha evidenciado en pacientes con diferentes fenotipos clínicos de mutaciones en *TTN* (Evila et al., 2014; Ceyhan-Birsoy et al., 2013; Pfeffer et al., 2012; Carmignac et al., 2007; Haravuori et al., 2001).



**Figura 6.** Esquema de la localización de la titina en el sarcómero. Modificada de Granzier y Labeit, 2004.

Nótese la notable extensión de la proteína titina.

### 3.2. FUNCIÓN

La titina tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura del sarcómero durante la contracción debido a la transmisión de la fuerza a todos los elementos a los que se conecta (Horowitz et al., 1986). También es la principal

## I. INTRODUCCIÓN

determinante de la tensión pasiva generada en el curso del estiramiento del músculo (Linke et al., 1999): al estirarse el sarcómero, se alarga la secuencia Ig, y a continuación la PEVK. Asimismo, es también responsable de la fuerza restauradora o elástica al funcionar como un resorte elástico bidireccional durante el acortamiento del sarcómero, para recuperar la longitud del sarcómero en reposo y mantener los filamentos gruesos lejos del disco Z (Helmes 1996). Además, se han planteado nuevos roles más recientemente como el de mediador de señalización intracelular, funcionando como sensor biomecánico (Linke 2014), regulador en la transcripción génica (Lange 2005) y en el reemplazo (*turnover*) proteico (Puchner 2008, Stahl 2011 , Castro-Ferreira 2011; Vikhlyantsev 2012; Kötter 2014).

### 3.3. DISTINTOS FENOTIPOS DE TITINOPATÍAS

Las mutaciones en *TTN* se han asociado hasta la fecha con un amplio espectro de condiciones clínicas que van desde casos de miocardiopatía hipertrófica o dilatada de presentación aisladas (MIM # 604145; MIM # 613765) (Arimura et al., 2009; Gerull et al., 2002; Herman et al., 2012; Lopes et al., 2013) a numerosas patologías con afectación de la musculatura esquelética únicamente o en combinación con patología cardíaca (Savarese et al., 2016).

Según el 219º Taller Internacional del Centro Neuromuscular Europeo (*219th ENMC International Workshop*) celebrado en 2016 y recogido en 2017 en la revista *Neuromuscular Disorders* (Hackman et al., 2017), hasta el momento se han reportado 9 fenotipos clínicos de miopatías con o sin cardiopatía asociada:

- Distrofia muscular tibial autosómica dominante de inicio tardío (TMD) (MIM # 600334).
- Distrofia muscular de cinturas (LGMD R10 o 2J) (MIM # 608807).

## I. INTRODUCCIÓN

- Miopatía hereditaria con fallo respiratorio precoz (HMERF) (MIM # 603689).
- Miopatía de inicio precoz con cardiomiopatía fatal (EOMFC) (MIM # 611705).
- Miopatía congénita centronuclear (CNM) (Ceyhan-Birsoy, 2013).
- Enfermedad multi-minicore con enfermedad cardíaca (MmD-HD) (Chauveau et al., 2014).
- Titinopatía distal recesiva de inicio en adulto joven (AR-DM) (Evila et al., 2016).
- Tipo Emery-Dreifuss recesivo de inicio precoz sin cardiomiopatía (AR-ED) (De Cid et al., 2015).
- Distrofia muscular proximal de miembros inferiores recesiva de inicio en el adulto (Evilä et al., 2014).

Además de estos fenotipos clínicos, se valoran otros emergentes por clasificar.

El fenotipo tipo TMD (Udd et al., 1993), tiene una herencia AD. Es una miopatía de inicio en edad adulta, lentamente progresiva y caracterizada por una debilidad distal de predominio en el compartimento anterior de la pierna. La forma en homocigosis de la primera mutación descrita en TMD (FINmaj), da lugar a un fenotipo totalmente distinto tipo LGMD, con inicio en la infancia y con debilidad de tipo proximal (Udd, 1992). Posteriormente se han descrito mutaciones en otros exones, tanto en homocigosis como en heterocigosis compuesta, que han dado lugar a fenotipos algo diferentes (e.g. más severos y de inicio precoz como la forma AR-DM [Evilä et al., 2016]).

El fenotipo HMERF, con herencia autosómica dominante, se asocia a mutaciones en el exón 344 de *TTN*. Tiene un inicio generalmente en adultos jóvenes y se caracteriza por debilidad proximal y distal e insuficiencia respiratoria precoz (Ohlsson et al., 2012; Pfeffer et al., 2012; Palmio et al., 2014).

## I. INTRODUCCIÓN

En cuanto a las formas congénitas cabe decir que son las que tienen una mayor heterogeneidad clínica en su presentación (Oates et al., 2018). Suelen tener una herencia AR con mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta. La primera descrita, inicialmente denominada como miopatía de Salih (Salih et al., 1998) (a modo de CMD con cardiomiopatía dilatada), se corresponde con el fenotipo definido como EOMFC (MIM # 611705) (Carmignac et al., 2007). No obstante, el espectro clínico se ha ampliado, incluyendo formas con artrogriposis múltiple congénita o tipo Emery-Dreifuss con otras formas de cardiopatía asociadas. En este sentido, recientemente se ha sugerido la designación conjunta bajo la denominación de MmD-HD, por la similitud de hallazgos en la biopsia muscular (defectos oxidativos a modo de *minicores*) y la patología cardíaca en común. Un fenotipo controvertido es el descrito de inicio como CNM, si bien en los pacientes descritos no se refería hasta ese momento ninguna cardiopatía, el estudio histológico evidenciaba no sólo internalizaciones nucleares, si no también defectos oxidativos, lo que lo hace parecido a la forma MmD-HD.

Por último, un fenotipo clínico recientemente descrito se corresponde con una forma AR-ED (De Cid et al., 2015), caracterizada por debilidad de cinturas y contracturas de inicio precoz y pérdida temprana de la capacidad de deambulación.

Los estudios realizados mediante metodología de NGS han llevado a un aumento exponencial en el número de mutaciones identificadas, ya sean mutaciones patogénicas o variantes de significado incierto en el gen *TTN*. Sin embargo, no todas las variantes de *TTN* están asociadas con una enfermedad. En este sentido, en un estudio reciente, Savarese et al. destacaron el desafío que supone la asociación de nuevos cambios mutacionales encontrados a un fenotipo clínico plausible de titinopatía (Savarese et al., 2018), así como que, con toda probabilidad, puedan surgir nuevos fenotipos en el futuro. Por esta razón, las correlaciones histopatológicas de fenotipo y genotipo son de suma

## I. INTRODUCCIÓN

importancia, especialmente porque los estudios funcionales son posibles sólo para algunas mutaciones ubicadas en dominios *TTN* específicos (Chaveau et al., 2014a).

### 3.4. HISTOPATOLOGÍA ASOCIADA

Los cambios histopatológicos en las miopatías relacionadas con *TTN* son marcadamente variables. En los pacientes con fenotipo clínico tipo TMD y LGMD2J se han descrito casos con RV (Partanen et al., 1994; Udd et al., 1992), mientras que en la forma tipo HMERF, se han referido estructuras tipo CB (Carmignac et al., 2007; Chinnery et al., 2001; Edström et al., 1990; Ohlsson et al., 2012; Pfeffer et al., 2012). Además, en las formas de inicio precoz se habla de la presencia de internalizaciones nucleares y ciertos defectos en las tinciones oxidativas descritas como minicores o lesiones tipo minicore (Ceyhan-Birsoy et al., 2013; Chaveau et al., 2014; Palmio et al., 2014). No obstante hasta el momento, no se ha realizado un análisis histopatológico y ultraestructural sistemático y exhaustivo del músculo esquelético en grandes cohortes de enfermedades relacionadas con *TTN*.

## 4. DISTROFINA Y UTROFINA

### 4.1. DISTROFINA

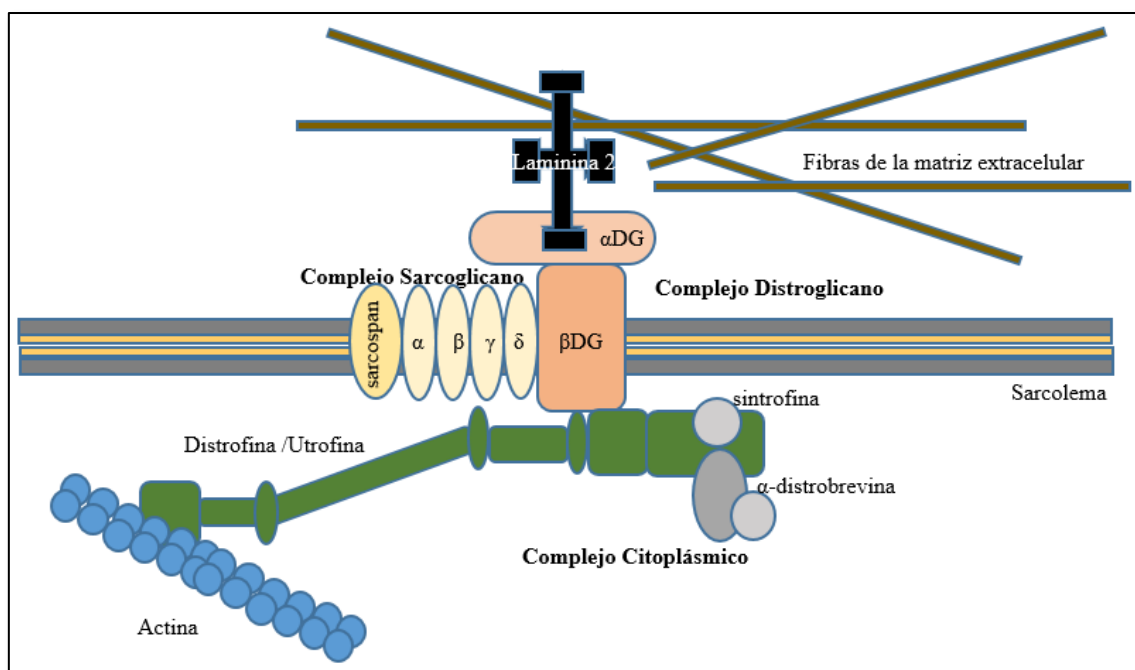
#### 4.1.a. ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y PROTEÍNAS ASOCIADAS

La distrofina forma parte de la familia de proteínas  $\beta$ -espectrina/ $\alpha$ -actinina (Koenig et al., 1988), caracterizadas por un extremo amino-terminal que se une a la actina, seguidas por un número variable de unidades de repetición tipo espectrina. En el caso de la distrofina, esta porción se compone por 24 unidades interrumpidas por cuatro regiones ricas en prolina, y constituye el dominio central de la proteína (*rod domain*), que es la parte más extensa de la proteína y la que le otorga flexibilidad. Le siguen dos pequeños dominios: el dominio WW (Bork y Sudol, 1994), con afinidad para sustratos ricos en prolina, que facilita la unión de la distrofina con la porción citoplásmica rica en prolina del  $\beta$ -dístroglicano (proteína transmembrana del sarcolema) (Campbell y Kahl, 1989; Macias et al., 1996; Navarro, 1999) y el dominio rico en cisteína, que incluye una región ZZ que se une a la calmodulina (Anderson et al., 1996). Por último, el extremo carboxi-terminal (o dominio CC por *coiled coil*) sirve de unión a otras proteínas como la sintrofina o distrobrevina (Figura 7).

El  $\beta$ -dístroglicano, proteína a la que se une la distrofina, forma parte del DPC (Ervasti y Campbell, 1991 y 1993; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993). Este complejo tiene tres complejos proteicos: el dístroglicano, el sarcoglicano y el citoplásmico, que contiene a la propia distrofina, sintrofina y distrobrevina (Crosbie et al., 1997). El gen *DAG1* produce una proteína precursora que dará lugar por una proteasa al  $\alpha$  y  $\beta$ -dístroglicano (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993). Éste último es una proteína transmembrana que se une en su porción citoplásmica a la distrofina, en la transmembrana a los sarcoglicanos y caveolina-3, y en su porción extracelular al  $\alpha$  dístroglicano, que se

## I. INTRODUCCIÓN

localiza en la matriz extracelular (Blake et al., 2002), y se une a su vez con otras proteínas de la matriz extracelular como la laminina-2, agrina o perlecan (Blake et al., 2002). El complejo sarcoglicano incluye cinco proteínas transmembrana ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -sarcoglicanos y sarcospan) (Crosbie et al., 1997). Además de ayudar a estabilizar al complejo distroglicano al sarcolema por su unión con  $\beta$ -distroglicano, parece tener también un papel de señalización intracelular al interactuar con algunas proteínas como la filamina.



**Figura 7. Representación de la localización de las proteínas distrofina y utrofina a nivel subsarcolémico en la fibra muscular y su relación con el complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DPC).** Modificada de Blake et al, 2002.

### 4.2. UTROFINA

#### 4.2.a. ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y PROTEÍNAS ASOCIADAS

La utrofina es una proteína de 395 kDa. (Tinsley et al., 1992) originalmente identificada por Love et al. y descrita como DMDL (Love et al., 1989, Love et al., 1991) o DRP (Khurana et al., 1990). La denominación actual es de utrofina (por su parecido a la distrofina y su ubicua distribución tisular "distrofina ubicua") (Khurana et al., 1990; Love et al., 1991; Blake et al., 1992; Man et al., 1992; Blake y Kroger, 2000;) o DRP1,

## I. INTRODUCCIÓN

debido a la descripción posterior de una segunda DRP (DRP2) (Roberts et al., 1996). Está codificada por el gen *UTRN* (OMIM 128240), de 74 exones (Li et al., 2007), ubicado en el cromosoma 6 (6q24) (Buckle et al., 1990; Love et al., 1989) y considerado un gen homólogo del gen *DMD* (Roberts et al., 1993, Tennyson et al., 1995). La utrofina y la distrofina tienen un patrón estructural análogo (Tinsley et al., 1992; Blake et al., 1996), con más del 70% de identidad en su dominio de unión a la actina (amino-terminal), así como en su extremo carboxi-terminal (Pearce et al., 1993). Además, la utrofina, como la distrofina, interactúa con el DPC y se une a la actina con alta afinidad (Rybakova et al., 2002), permitiendo su anclaje al sarcolema (Ervasti y Campbell, 1991; Matsumura et al., 1992; Suzuki et al., 1992; Tinsley et al., 1992) (Figura 7). Como hace la distrofina, esto contribuye a estabilizarlo mecánicamente de la tensión creada durante la contracción muscular y proporcionan una mayor resistencia a la rotura del filamento de actina debido al estiramiento o torsión (Prochniewicz et al., 2009).

La homología de secuencia tanto en DNA como a nivel proteico entre utrofina y distrofina, sugiere un origen común a partir de la duplicación de un mismo gen durante la evolución de los organismos vertebrados (Duan, 2019), si bien recientemente se han descrito funciones adicionales de la distrofina que la utrofina no comparte, como interacción con el sistema de microtúbulos.

### 4.2.b. EXPRESIÓN

Tanto la utrofina como la distrofina se coexpresan en el sarcolema de las fibras musculares esqueléticas en el período fetal (Clerk et al., 1993, Chevron et al., 1994). La utrofina se expresa desde antes de la semana 9 de gestación y luego se reduce hasta la semana 26 (Clerk et al., 1993). Desde entonces, su nivel es similar al de un músculo esquelético adulto normal, y está restringido a las uniones neuromusculares (con un papel



## I. INTRODUCCIÓN

en la diferenciación y mantenimiento de la membrana postsináptica), (Deconinck et al., 1997), uniones miotendinosas, y al endomysio capilar. La utrofina también se encuentra en muchos otros órganos (Khurana et al., 1990, Khurana et al, 1991, Love et al., 1989, Man et al, 1991, Matsumura et al., 1993), incluidos los vasos y túbulos glomerulares de la corteza renal, el plexo coroideo, la piamadre craneal, los vasos miocárdicos y cerebrales y los nervios periféricos (Weir et al 2002).

### 4.2.c. RELACIÓN CON ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES

La deficiencia primaria de utrofina no se ha descrito como responsable de ninguna NMD (Hilton-Jones y Squier, 1993). Sin embargo, es conocida la expresión anómala de utrofina en el sarcolema de las fibras musculares esqueléticas en pacientes con DMD y distrofia muscular de Becker (BMD), si bien el mecanismo subyacente no está bien conocido. Cabe señalar que se ha descrito una inmunotinción distintiva intensa y uniformemente distribuida en la membrana de todas las fibras musculares de la utrofina en la biopsia en pacientes con DMD (Helliwell et al., 1992; Teijeira et al., 1998) y portadoras de DMD (DMD-C) (Sewry et al., 1994a). Por su parte, en la BMD, la expresión de utrofina se ha referido como más variable (con casos con expresión difusa, parcheada o sin inmunoexpresión), y menos intensa (Helliwell et al., 1992, Teijeira et al., 1998).

Aunque de manera natural la utrofina no es capaz por sí sola de compensar la debilidad debida al déficit de distrofina, existen estudios que confirman que un incremento en niveles de utrofina reduce el daño histológico y mejora la función muscular (Tinsley et al., 1996, 1998; Goudemant et al., 1998). Estos resultados apoyarían el uso de terapias basadas en la expresión de utrofina para tratar la deficiencia de distrofina (Song et al., 2019; Duan, 2019).

## I. INTRODUCCIÓN

Aunque en la mayoría de las descripciones la expresión anormal sarcolémica de utrofina se atribuye comúnmente a distrofinopatías, se ha referido esporádicamente en otras NMD con conservación de expresión de distrofina, especialmente en IM (Helliwell et al., 1992; Lukáš, 1999; Teijeira et al. 1998). Además, se ha vinculado a la utrofina con la regeneración de la fibra muscular (Galvagni et al., 2002, Gramolini et al., 1999a, 1999b; Lin et al., 1998; Wilson et al., 1994; Helliwell et al., 1992). También se ha descrito su expresión en LGMD (Helliwell et al., 1992, Sewry et al. 1994b), distrofia miotónica (Helliwell et al., 1992; Lukáš, 1999), CMD (Helliwell et al., 1992), CM (Lukáš, 1999), MeM como GSD tipo V (Teijeira et al. 1998), o incluso en ND (Lukáš, 1999). Sin embargo, la mayoría de esos trabajos incluyeron un número limitado de biopsias musculares de pacientes con NMD diferentes a las distrofinopatías y en muchos casos sólo se refirieron a la presencia de expresión anormal de utrofina, pero no describieron específicamente el patrón de extensión de la expresión de utrofina en la biopsia.

## **II. OBJETIVOS**



## II. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Realizar el análisis histopatológico en biopsias musculares de pacientes con NMD y establecer su utilidad diagnóstica en relación con las proteínas estructurales de la fibra muscular titina y utrofina.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A. Valorar la utilidad diagnóstica del examen histológico en el estudio de las titinopatías:

A.1. Describir las alteraciones histológicas, con especial atención los hallazgos ultraestructurales, en pacientes con mutaciones en el gen *TTN*.

A.2. Evaluar si las alteraciones encontradas:

- Se correlacionan con los fenotipos clínicos.
- Tienen alguna particularidad para apoyar la patogenicidad de las nuevas variantes encontradas en el gen *TTN*.

B. Valorar la utilidad diagnóstica del estudio de la expresión sarcolémica de utrofina con patrón difuso (DUE) en las NMD:

B.1. Analizar la asociación de DUE con NMD.

B.2. Analizar la asociación de DUE con alteraciones histológicas en relación a la degeneración y regeneración muscular.



# **III. CAPÍTULO 1**

**“LOSS OF SARCOMERIC SCAFFOLDING AS  
A COMMON BASELINE HISTOPATHOLOGIC  
LESION IN TITIN-RELATED MYOPATHIES”**





## 1. MATERIALS AND METHODS

### 1.1. PATIENTS

Twenty-three patients (14 males and 9 females) of various ethnic backgrounds with different clinical phenotypes of *TTN*-related myopathy were included in the present study. Clinical data of these patients were systematically retrieved and retrospectively analysed. Patients P1 to P10, P14 and P17 to P20 (n=15) are firstly reported in the publication that presents part of the results of this Doctoral Thesis (see Appendix I). Part of the clinical, pathologic or genetic data from patients P11 to P13, P15, P16 and P21 to P23 (n=8) have been previously reported (Evilä et al., 2016; Evilä et al., 2014; De Cid et al., 2015; Hackman et al., 2008; Palmio et al., 2014).

Patients were classified into 4 groups according to their clinical features: group 1: Autosomal recessive congenital myopathy (AR-CM) (n= 10), group 2: AR-ED (n=4), group 3: AR-DM (n= 4) and group 4: HMERF (n= 5) (Table 1). As a summary:

Group 1: AR-CM patients, P1 to P10, showed congenital hypotonia or early onset diffuse muscle weakness, with congenital arthrogyrosis or early development of contractures (P8, P9 and P10); associated cardiomyopathy was found in P7 and P8.

Group 2: AR-ED patients P11 to P14 showed a similar phenotype with severe proximal weakness mainly in the lower limbs and limitation in the abduction of the arms due to mild shoulder contracture. De Cid et al., 2015, recently described P11 to P13.

Group 3: AR-DM patients, P15 to P18, showed distal or proximal and distal early severe muscle weakness of the four limbs with early onset and severe intensity. Evilä et al., 2016 and Hackman et al., 2008 described P15 and P16 before.

Group 4: HMERF group included patients P19 to P23. Most of them had adult onset weakness with diaphragmatic respiratory failure. Earlier onset at 10 years was observed in P19. Palmio et al.,2014, previously reported patients P21 to P23.

#### 1.2. MOLECULAR DATA

All patients had known or novel mutations in *TTN* (Table 2) confirmed by Sanger sequencing, and familial segregation validated when parental DNA was available. Parents of P1 to P5, P7 to P14, P17 and P18 were screened to confirm the segregation of the mutations and to verify that *TTN* mutations were on opposite alleles. Most of the patients harbored compound heterozygous mutations (21 patients). At least one of them was a truncating mutation (frameshift, nonsense mutation or mutation affecting an essential splice site) leading to a predicted protein truncation or degradation (Table 2). The second mutations were either truncating mutations or rare missense mutations. Two cases carried homozygous mutations: P11 (AR-ED) and P22 (HMERF).

The mutations affected different protein domains (Table 2):

Patients from group 1 (AR-CM) had the most heterogeneous results. Although genetic variants were in exons coding different protein portions, they mostly affected the A-band (9 of 10 cases). I-band was involved in 3 of 10 cases, and both M-line and Z-line in 2 of 10 cases, respectively.

As recently reported, patients P11 to P13 from group 2 (AR-ED) had *TTN* mutations located in exons coding for the M-line domain (Mex1 to Mex3) (De Cid et al., 2015). P14 showed a similar phenotype, but mutations were located in exons 363/ Mex5 and 94 (I-band).

### III. CAPÍTULO 1 Titinopathies: Ultrastructural Particularities

In group 3 (AR-DM), a combination of Mex5/Mex6 mutations and a second mutation involving A-band domain was present in all patients (Evilä et al., 2014; Evilä et al., 2016; Hackman et al., 2008).

Finally, HMERF patients carried several reported mutations in exon 344 (Palmio et al., 2014).

#### **1.3. MORPHOLOGICAL STUDIES**

All patients underwent open biopsy for morphological and histochemical analyses of fresh-frozen skeletal muscle tissue after informed consent. The biopsied muscle is reported in Table 3. Samples were analysed either in the research laboratory at the Myology Institute in Paris, France, or at the Neuropathology laboratory of Fleni Institute and J.P. Garrahan Hospital in Buenos Aires, Argentina, or at the Department of Pathology of Sahlgrenska University Hospital in Gothenburg, Sweden. For conventional histochemical techniques 10 µm thick cryostat sections were stained with H&E, mGT, PAS, Oil red O, NADH-TR, SDH, COX, menadione-NBT and ATPase preincubated at pH 9.4, 4.63, 4.35. Digital photographs of each biopsy were obtained with a *Zeiss AxioCam HRc* linked to a *Zeiss Axioplan* Bright Field Microscope and processed with the *Axio Vision 4.4 software* (Zeiss, Germany).

#### **1.4. ELECTRON MICROSCOPY**

Detailed EM analysis was performed in 19 patients (Table 4). For ultrastructural studies small muscle samples were fixed in 2.5 % glutaraldehyde, pH 7.4, post-fixed in 2 % osmium tetroxide for 2 hours, dehydrated and embedded in epoxy resin. At least 3 blocks from each patient were studied, including longitudinal and transverse-oriented samples. Semi-thin sections were stained by toluidine blue and examined in LM to select pathological areas. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate.

### III. CAPÍTULO 1 Titinopathies: Ultrastructural Particularities

The grids were observed using a *Philips CM120* electron microscope (80 kV; *Philips Electronics NV*, Netherlands).

### III. CAPÍTULO 1 Titinopathies: Ultrastructural Particularities

Patient	Sex, Onset	Clinical Phenotype	Family Affected	Reference
<b>Group 1</b>				
P1	M (Childhood)	Congenital myopathy	None	PS
P2	M, 3 y	Congenital myopathy	Yes <sup>1</sup>	PS
P3	F, Birth	Congenital myopathy	None	PS
P4	M, < 1 y	Congenital myopathy	None	PS
P5	M, Birth	Congenital myopathy	None	PS
P6	F, Birth	Congenital myopathy, mainly distal	None	PS
P7	M, 2 y	Congenital myopathy with severe dilated cardiomyopathy (11 y)	None	PS
P8	F, Birth	Congenital myopathy with early diffuse contractures and cardiopathy (23 y)	None	PS
P9	M, Birth	Severe congenital myopathy with arthrogrypotic features	None	PS
P10	M, Birth	Congenital myopathy with early diffuse contractures	None	PS
<b>Group 2</b>				
P11	M, 10 y	Early-onset recessive Emery-Dreifuss-like without cardiomyopathy	None	(De Cid et al. 2015) (P1)
P12	F, Childhood	Early-onset recessive Emery-Dreifuss-like without cardiomyopathy	None	(De Cid et al. 2015) (P2)
P13	F, 19 m	Early-onset recessive Emery-Dreifuss-like without cardiomyopathy	None	(De Cid et al. 2015) (P3)
P14	M, 20 y	Young adult recessive proximal	None	PS
<b>Group 3</b>				
P15	M, 20 y	Young adult onset recessive distal titinopathy	Yes <sup>2</sup>	(Hackman et al., 2008) (C1) (Evilä et al., 2014) (5B) (Evilä et al., 2016) (B)
P16	F, 30 y	Young adult onset recessive distal titinopathy	Yes <sup>3</sup>	(Hackman et al., 2008) (C2) (Evilä et al., 2014) (5A) (Evilä et al., 2016) (C)
P17	M, 20 y	Young adult recessive proximal & distal myopathy	Yes <sup>4</sup>	PS
P18	F, 30 y	Young adult recessive proximal & distal myopathy	Yes <sup>5</sup>	PS
<b>Group 4</b>				
P19	F, 10 y	HMERF	Yes <sup>6</sup>	PS
P20	M, 50 y	HMERF	None	PS
P21	F, 54 y	HMERF	Yes <sup>7</sup>	(Palmio et al., 2014) (L:II-1)
P22	M, 25 y	HMERF	None	(Palmio et al., 2014) (K:II-1)
P23	M, 38 y	HMERF	Yes <sup>8</sup>	(Palmio et al., 2014) (G:II-2)

**Table 1. Clinical phenotypes of patients with *TTN*-related myopathies.**

M: Male, F: Female, y: years, m: months; PS: Present Study; HMERF: Hereditary Myopathy with Early Respiratory Failure; <sup>1</sup>: two sisters; <sup>2</sup>: his mother (P16); <sup>3</sup>: her son (P15); <sup>4</sup>: his sister (P18); <sup>5</sup>: her brother (P17); <sup>6</sup>: her father; <sup>7</sup>: her brother; <sup>8</sup>: his mother.

### III. CAPÍTULO 1 Titinopathies: Ultrastructural Particularities

Patient	TTN Mutation (Ref Seq NM_001267550.2): Nucleotide Change / Isoform modification	Exon	Inheritance	Titin domain	Reference
<b>Group 1</b>					
P1***†	c.2137C>T/ p.(Arg713*) c.95562G>C/ p.(Trp31854Cys)	14 345	AR	Z-line A-band	PS
P2***†	c.56200_56215dup/ p.(Asn18739Ilefs*2) c.23444G>A/ p.(Arg7815Gln)	290 82	AR	A-band I-band	PS
P3**†	c.79070_79071del/ p.(Tyr26357Cysfs*55) c.76502T>C/ p.(Val25501Ala) c.10045A>G/ p.(Thr3349Ala) c.4078G>A/ p.(Gly1360Arg)	327 327 43 24	AR	A-band A-band I-band Z-line	PS
P4**†	c.64688C>G/ p.(Pro21563Arg) c.97218_97221dupTATT/ p.(Lys32408Tyrfs*2)	311 350	AR	A-band A-band	PS
P5*†	c.35713+1G>A/ Intron 162 (not in N2A isoform) c.53918del/ p.(Gly17973Glu fs*18)	- 281	AR	- A-band	PS
P6***	c.95867G>A/ p.(Trp31956*) c.99415A>G/ p.(Lys33139Glu)	346 356	AR	A-band A-band	PS
P7**†	c.99833dup/ p.(Val33278Serfs*2) c.71993G>C/ p.(Arg23998Pro)	356 327	AR	A-band A-band	PS
P8*†	c.107425del/ p.(Asp35809Thrfs*35) c.97417del/ p.(Arg32473Valfs*19)	363 (Mex5) 350	AR	M-line A-band	PS
P9***†	c.17009G>A/ p.(Trp5670*) c.19715-1G>C/ splice	59 68	AR	A-band A-band	PS
P10**†	c.29621_29624del/ p.(Glu9874Glyfs*28) c.102214T>C/ p.(Trp34072Arg)	105 359 (Mex1)	AR	I-band M-line	PS
<b>Group 2</b>					
P11*†	c.106959T>A/ p.(Tyr35653*) (homozygous)	361 (360 <sup>#</sup> ) (Mex2)	AR	M-line	(De Cid et al. 2015) (P1)
P12*†	c.106050del / p.(Glu35351Asnfs*54) c.106978C>T / p.(Gln35660*)	359 (358 <sup>#</sup> ) (Mex1) 361 (360 <sup>#</sup> ) (Mex3)	AR	M-line M-line	(De Cid et al. 2015) (P2)
P13*†	c.105910_105914del / p.(Thr35304Cysfs*3) c.106422del / p.(Phe35475Serfs*3)	359 (358 <sup>#</sup> ) (Mex1) 360 (359 <sup>#</sup> ) (Mex2)	AR	M-line M-line	(De Cid et al. 2015) (P3)
P14**†	c.26877G>A/ p.(Trp8959*) c.107387A>C/ p.(Glu35796Ala)	94 363 (Mex5)	AR	I-band M-line	PS
<b>Group 3</b>					
P15*	c.100558_100561dup / p.(Gly33521Aspfs*25) c.107647del / p.(Ser35883Glnfs*10)	358 (357 <sup>#</sup> ) 363 (362 <sup>#</sup> ) (Mex5)	AR	A-band M-line	(Hackman et al., 2008) (C1) (Evilä et al., 2014) (5B) (Evilä et al., 2016) (B)
P16*	c.98105del / p.(Pro32702Leufs*15) c.107647del / p.(Ser35883Glnfs*10)	353 (352 <sup>#</sup> ) 363 (362 <sup>#</sup> ) (Mex5)	AR	A-band M-line	(Hackman et al., 2008) (C2) (Evilä et al., 2014) (5A) (Evilä et al., 2016) (C)
P17*†	c.107867del/ p.(Leu35956Argfs*16) c.52021C>T/ p.(Arg17341*)	364 (Mex6) 274	AR	M-line A-band	PS
P18*†	c.107867del/ p.(Leu35956Argfs*16) c.52021C>T/p.(Arg17341*)	364 (Mex6) 274	AR	M-line A-band	PS
<b>Group 4</b>					
P19*	c.95185T>C/ p.(Trp31729Arg)	344	AD	A-band	PS
P20*	c.95187G>C/ p.(Trp31729Cys)	344	AD	A-band	PS
P21*	c.95195C>T/ p.(Pro31732Leu)	344 (343 <sup>#</sup> )	‡	A-band	(Palmio et al., 2014) (L:II-1)
P22*	c.95195C>T/ p.(Pro31732Leu) (homozygous)	344 (343 <sup>#</sup> )	‡	A-band	(Palmio et al., 2014) (K:II-1)
P23*	c.95134T>C/ p.(Cys31712Arg)	344 (343 <sup>#</sup> )	AD	A-band	(Palmio et al., 2014) (G:II-2)

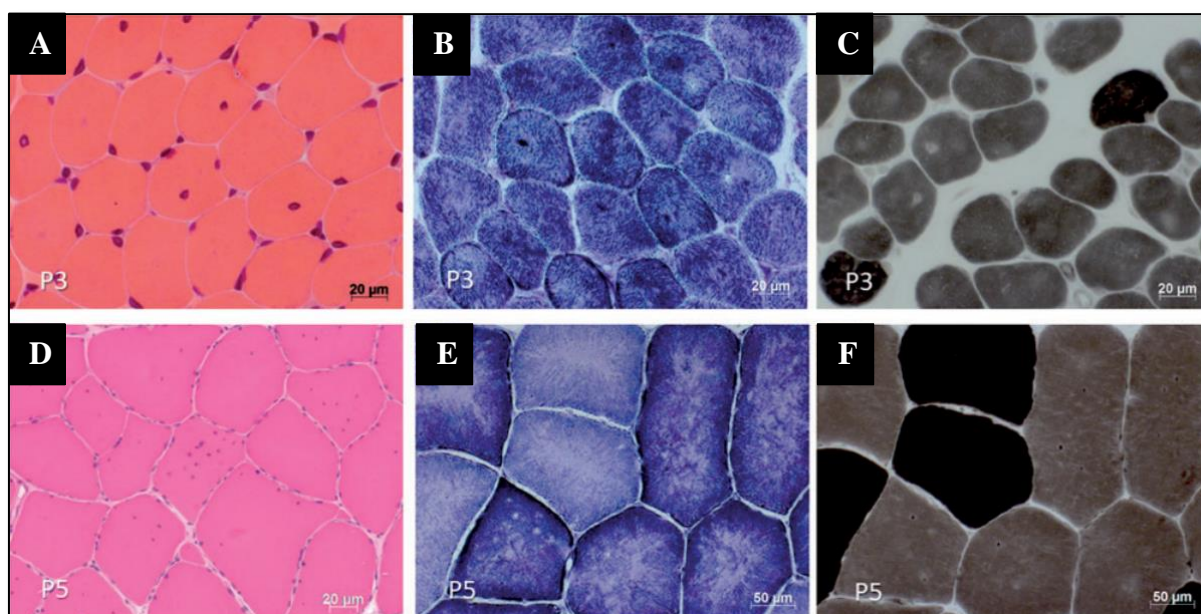
**Table 2. Genetic data of patients with *TTN*-related myopathies.**

All listed variations are heterozygous and predicted to affect N2A mature skeletal muscle isoform except otherwise stated. \*Patients are carriers of two truncating mutations or of two mutations previously reported; \*\*Patients are carriers of one truncating mutation and one missense mutation found in an exon already reported as mutated in the disease; \*\*\*Patients are carriers of one truncating mutation and one missense mutation found in an exon never reported as mutated in the disease; † Segregation in the family was confirmed; # Numbered as firstly published, according to the old numbering (before October 2013); AR: Autosomal recessive; AD: Autosomal dominant; ‡ Described in the original paper as semirecessive or semidominant (34); Ref Seq: Reference Sequence; PS: Present Study.

## 2. RESULTS

Detailed histopathologic analysis is reported in Table 3 (LM) and Table 4 (EM).

Group 1: AR-CM (P1-P10) (Figures 8, 9). Muscle biopsies from all cases showed multiple small irregular and randomly distributed areas of reduced/absent oxidative activity or better-defined core areas (P1, P2, P3, P7) associated with mild fiber size variability, type 1 fiber predominance and increased nuclear internalizations (Figure 8). Increased frequency of nuclear centralizations was evident in four cases (P2, P3, P7, P8). In addition, P9 and P10 displayed numerous CBs in atrophic fibers.



**Figure 8. Histochemistry from group 1 patients (AR-CM).**

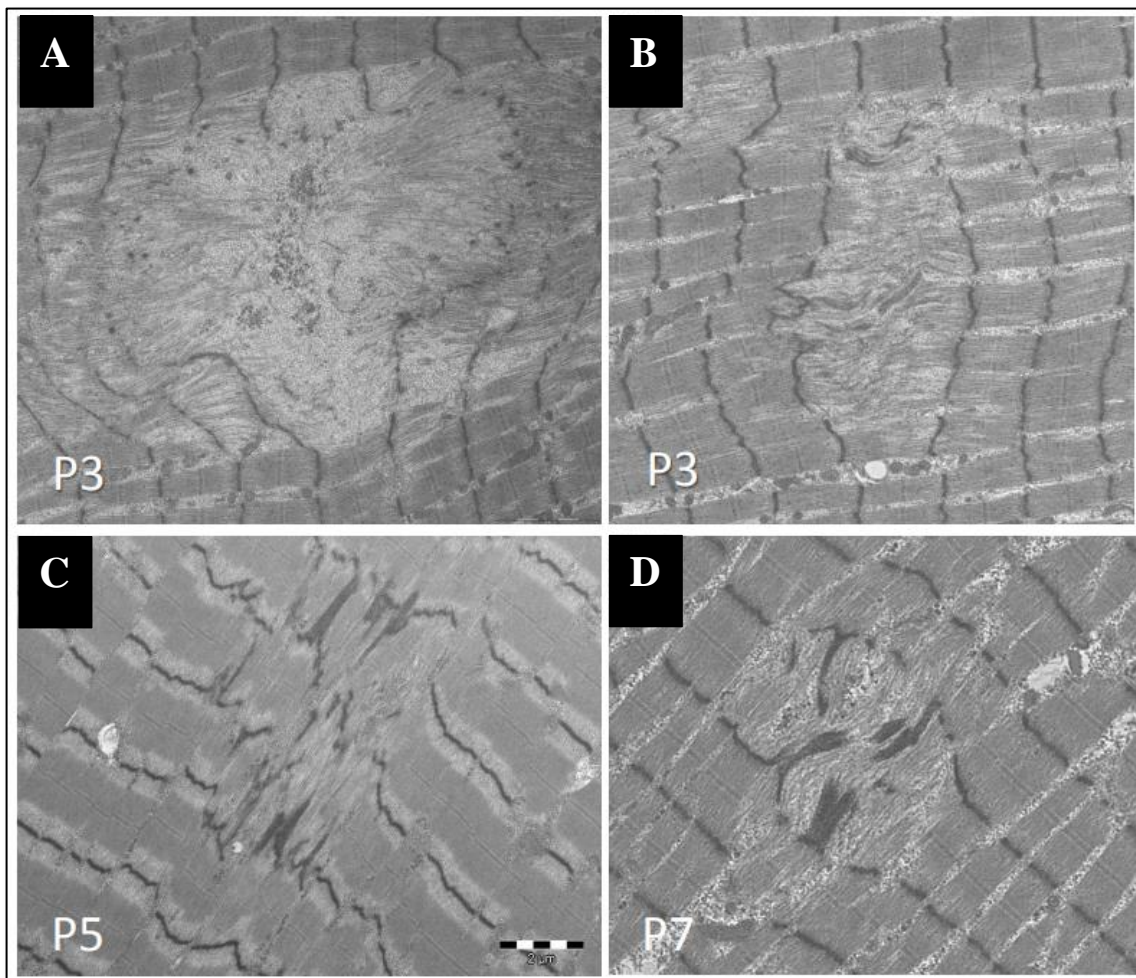
P3 (A–C): (A) H&E. Presence of numerous fibers harbouring centralized nuclei. (B) NADH. The majority of muscle fibers show multiple and irregular areas of defective oxidative reaction. (C) ATPase 9.4. Type 1 fiber predominance. P5 (D–F): (D) H&E. Great fibre size diameter variation and presence of multiple nuclear internalization in numerous fibers. (E) NADH. Multiple and irregular centrally placed areas of defective oxidative reaction. (F) ATPase 9.4. Type 1 fiber predominance.

By EM we identified variable length sarcomere disorganizations characterized by:

a) clear small areas of M-line dissolution by subsequent disintegration of thick filaments, running along one or a few sarcomeres with preservation of the Z-line structure (P1, P3, P7, P9) (Figure 9A, B); some areas of myofibrillar disorganization extended through the

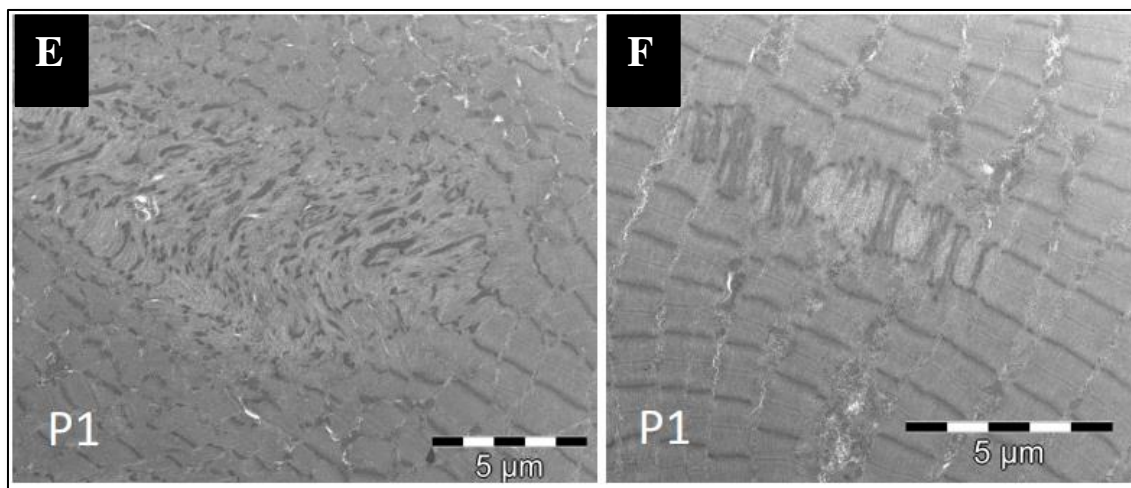
### III. CAPÍTULO 1 Titinopathies: Ultrastructural Particularities

adjacent myofibrils; b) focal areas of diffusion of Z-line material resembling small “pennants” starting from the Z-line (P4, P5, P6, P7, P8) (Figure 9C, D); sometimes, the electron dense material appeared to span the full width of a sarcomere (Figure 9F); c) many focal areas of sarcomeric disruption affecting a few sarcomeres with Z-line streaming and sharp limits from the adjoining normal sarcomeres with paucity of mitochondria, evoking classical minicores (P1, P2, P3, P4, P6, P7, P9) (Figure 9E). Moreover, P9 and P10 showed additional changes as CBs (P9, P10), nuclear inclusions corresponding to tubulofilamentous aggregates (P10), duplication of triads (P10) or atrophic fibers showing disorganized internal structure with thin filaments and small segments of dense Z material (P9, P10). Internalized/centralized nuclei were common in most of the cases.



(continues in next page)

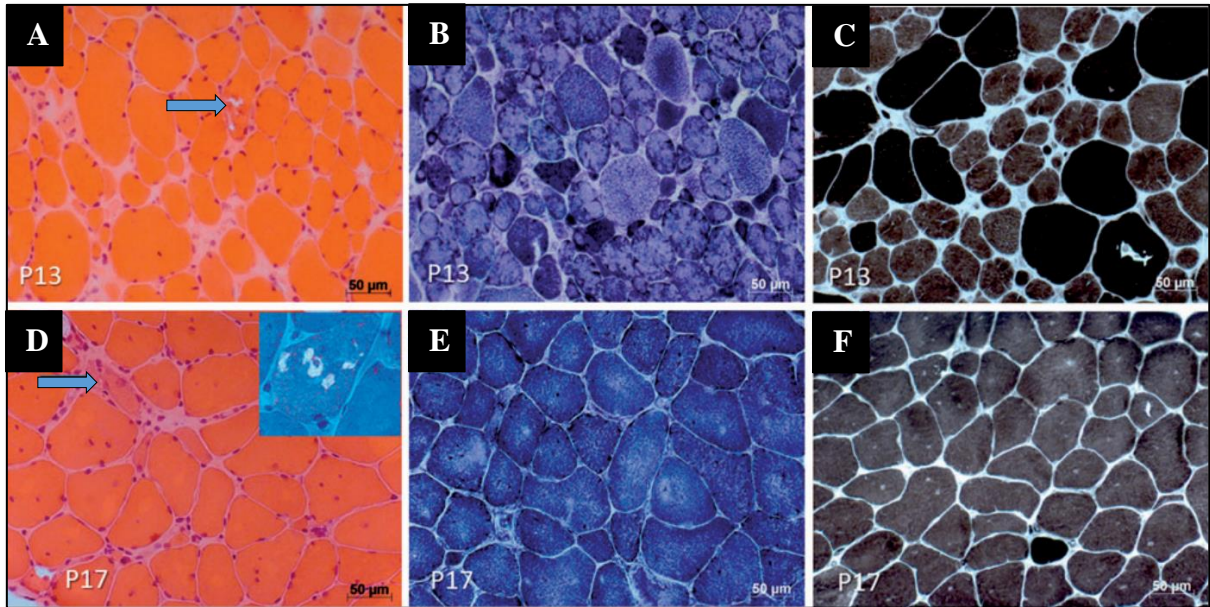




**Figure 9. Electron microscopy studies from Group 1 patients (AR-CM).**

(A, B) P3. Characteristic lesions showing evident loss of thick myofilaments with M-line and A-line dissolution and slight fragmentation of Z-line involving a few or several sarcomeres and myofibrils. (C, D) P5 and P7. Small areas of myofibrillar disarray involving one or few sarcomeres with dispersion of Z-line material resembling small “pennants”. (E) P1. Focal and large area of myofibrillar disorganization with Z-line streaming and paucity of mitochondria. (F) P1. Small area of sarcomeric disarray with accumulation of Z-line material spanning one sarcomere. Areas of myofibrillar disorganization extended through the adjacent myofibrils.

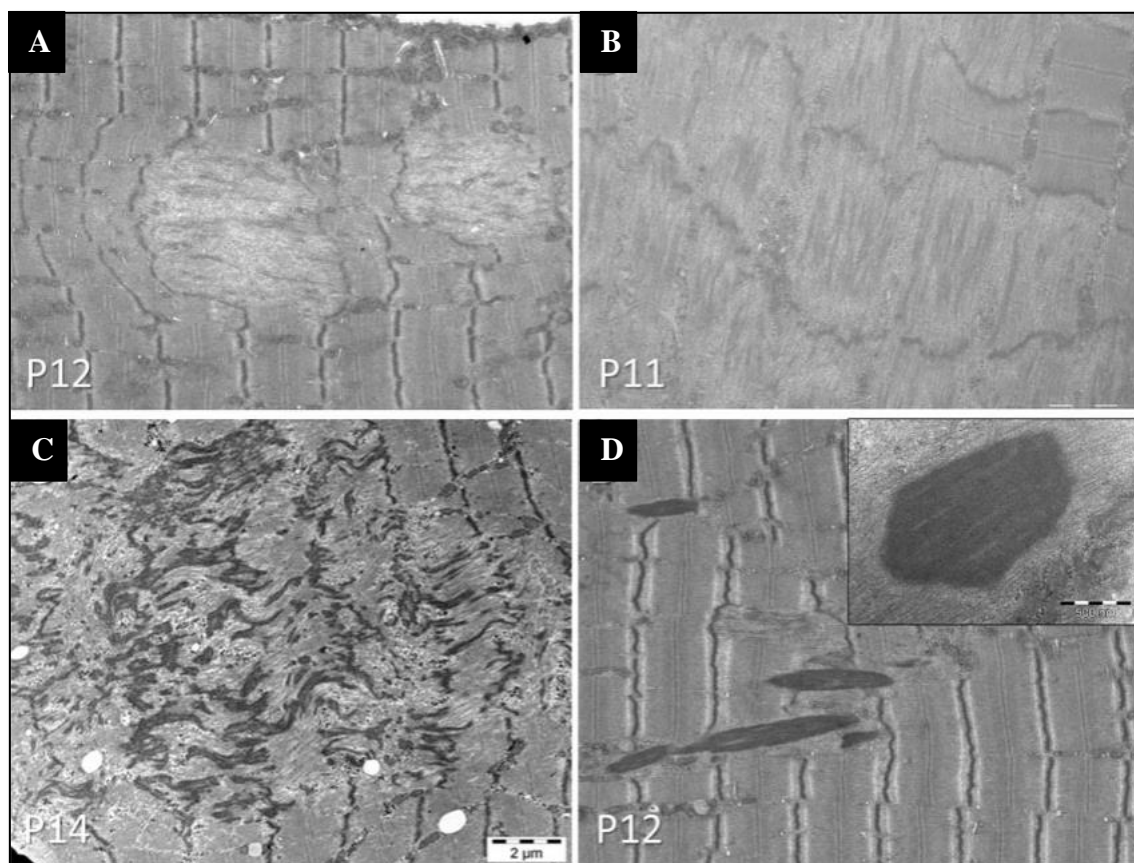
Group 2: AR-ED (P11 to P14) (Figure 10A-C, Figure 11). Muscle biopsies showed a dystrophic pattern with marked fiber size variability, NFs and RFs, EF, numerous RVs and sometimes rods or CBs. In addition, irregularities in oxidative staining were also evident in most of the cases (Figure 10A-C). Ultrastructural study showed also the presence of clear small and focal areas of sarcomere M-line dissolution spanning one or a few sarcomeres with almost complete preservation of the Z-line (P11, P12) (Figure 11 A, B), and dense Z-line material disrupted (Figure 11C), or resembling small “pennants” (P13, P14). CBs were observed in P12 and P13; some of them showed small segments of dense material among the thin filaments in the peripheral halo. Moreover, nemaline bodies (P12, P13, P14) with the characteristic square lattice structure (Figure 11D), RVs containing degradation products (P13, P14), tubulofilamentous sarcoplasmic (P13) and nuclear inclusions (P12, P13) were also observed.



**Figure 10. Histochemistry from Group 2 (AR-ED) and Group 3 patients (AR-DM).**

(A–C) P13 (AR-ED): (A) H&E. Presence of great round fibres size variation with numerous atrophic fibers, some NFs, RVs (arrow), internalized nuclei and EF. (B) NADH. Numerous fibers showing diffuse alterations of oxidative staining conferring a lobulated aspect to smaller fibers. (C) Type 1 fiber predominance. (D–F) P17 (AR-DM). (D) H&E. Fibers type variation, prominent nuclear internalizations and mild EF, NFs, RFs (arrow). Presence of some RVs (mGT in top right corner). (E) NADH. Irregular areas of uneven oxidative staining. (F) ATPase 9.4. Marked type 1 fibre predominance.

Group 3: AR-DM (P15 to P18) (Figure 10D-F and Figure 12A-C). Muscle biopsies showed mild irregular disorganizations at oxidative staining associated with mild to moderate myopathic changes (Figure 10D-F). Few NFs and RFs, as well as RVs in sparse fibers were evident in P17. By EM, we showed the presence of small and focal areas involving one sarcomere as clear areas with loss of myofilaments including M-line dissolution with almost intact Z-line (P15) (Figure 12A), Z-line diffusion spanning all along the sarcomere (Figure 12B) or resembling small “pennants” (P15, P16), or large areas of accumulated dark protein material and myofibrillar striation loss (P15, P16) (Figure 12C).

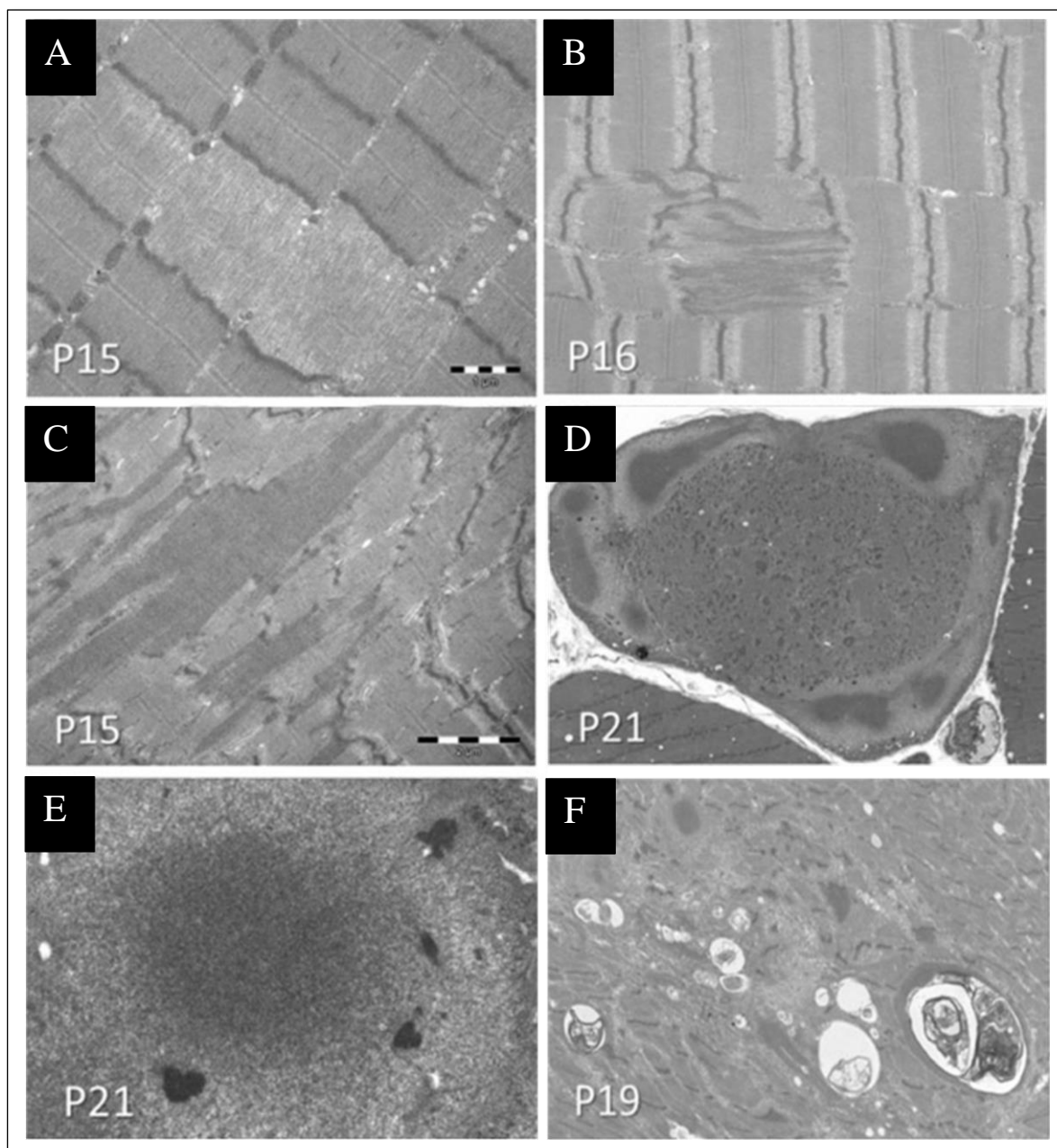


**Figure 11. Electron microscopy from Group 2 (AR-ED).**

(A) P12. Distinctive lesion showing loss of myofilaments with M-line dissolution, disintegration of thick filament and almost preserved Z-line, involving a few sarcomeres and myofibrils; (B) Clear areas of myofibrillar disintegration extending to the adjacent sarcomeres corresponding to dissolution of M-band structure, with almost intact Z-line (C) P14. Small areas of disorganization of the structure with Z-line material accumulation occasionally reminding a classical minicore. (D) P12. Cytoplasmic elongated nemaline bodies (rods), with the characteristic square lattice structure (in top right corner).

Group 4: HMERF (P19 to P23) (Figure 12D-F and Figure 13). All biopsies showed internalized nuclei (Fig. 13A), and numerous fuchsinophilic inclusions corresponding to CBs, presenting a remarkable circular disposition in some fibers in P19 and P21 (Figure 13B-D). By EM some CBs showed small electron dense amorphous inclusions among the thin filaments in the peripheral halo (P19 and P21) (Figure 12D, E). Widespread abnormal areas corresponding to accumulated filamentous material and damage of myofibrils with loss of striations were frequently observed (P19, P21, P23). Furthermore, we rarely found focal sarcomere disruptions with small “pennants” starting from the Z-line (P19, P23). Eventually, we encountered some atrophic fibers with

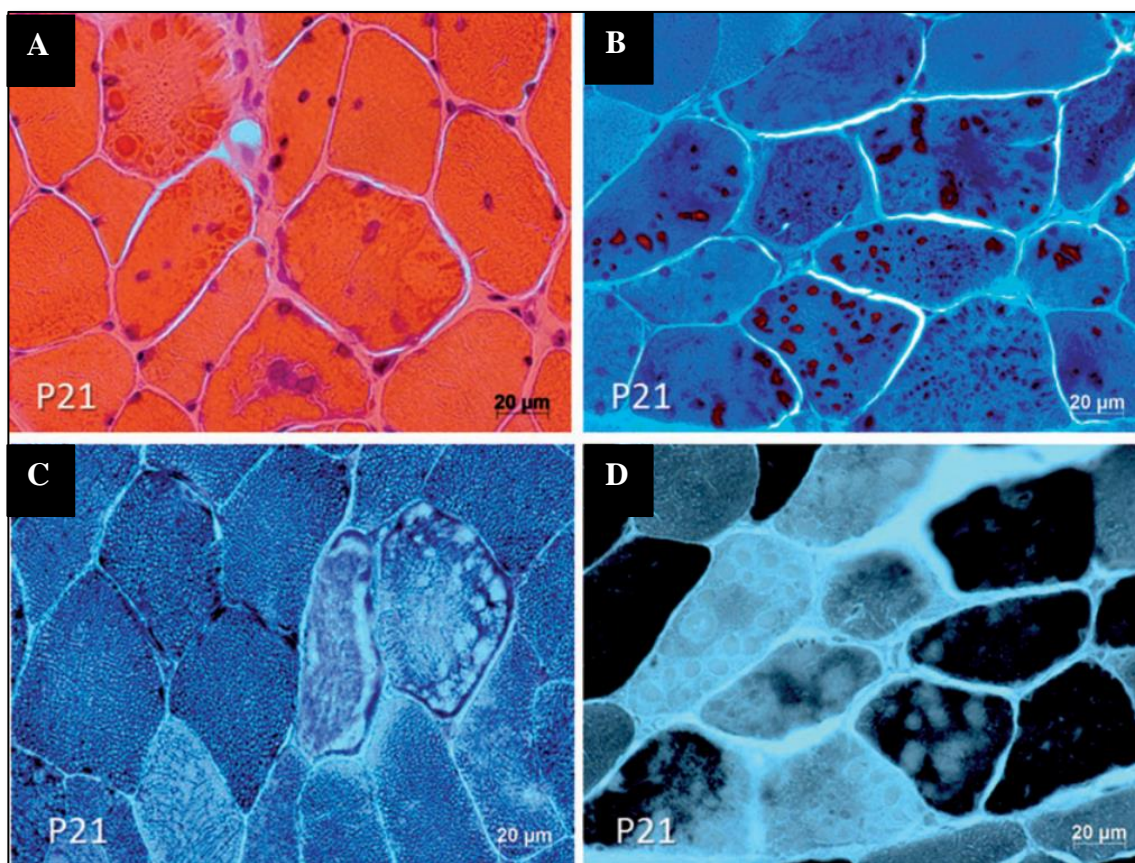
completely disorganized internal structure and rods (P19), and RVs/autophagic vacuoles (P19, P21, P23) (Figure 12 F).



**Figure 12. Electron microscopy studies from Group 3 (AR-DM) and Group 4 (HMERF).**

EM studies from Group 3 (AR-DM): (A) P15. Loss of myofilaments with M-line dissolution (in the central area of the image) and preserved Z-line involving one sarcomere; in a small part are noted reminiscent of M-band. (B) P16. Streaming of dark material starting from the Z-line and spanning all along the sarcomere. (C) P15. Large areas of accumulated filamentous/granular material and myofibrillar striation loss. EM studies from Group 4 (HMERF): (D) P21. Muscle fiber with subsarcolemmal cytoplasmic bodies disposed in a circle. (E) P21. Compact central area of a cytoplasmic body harboring small electron-dense structures in the peripheral region. (F) P19. Autophagic material and cellular debris.





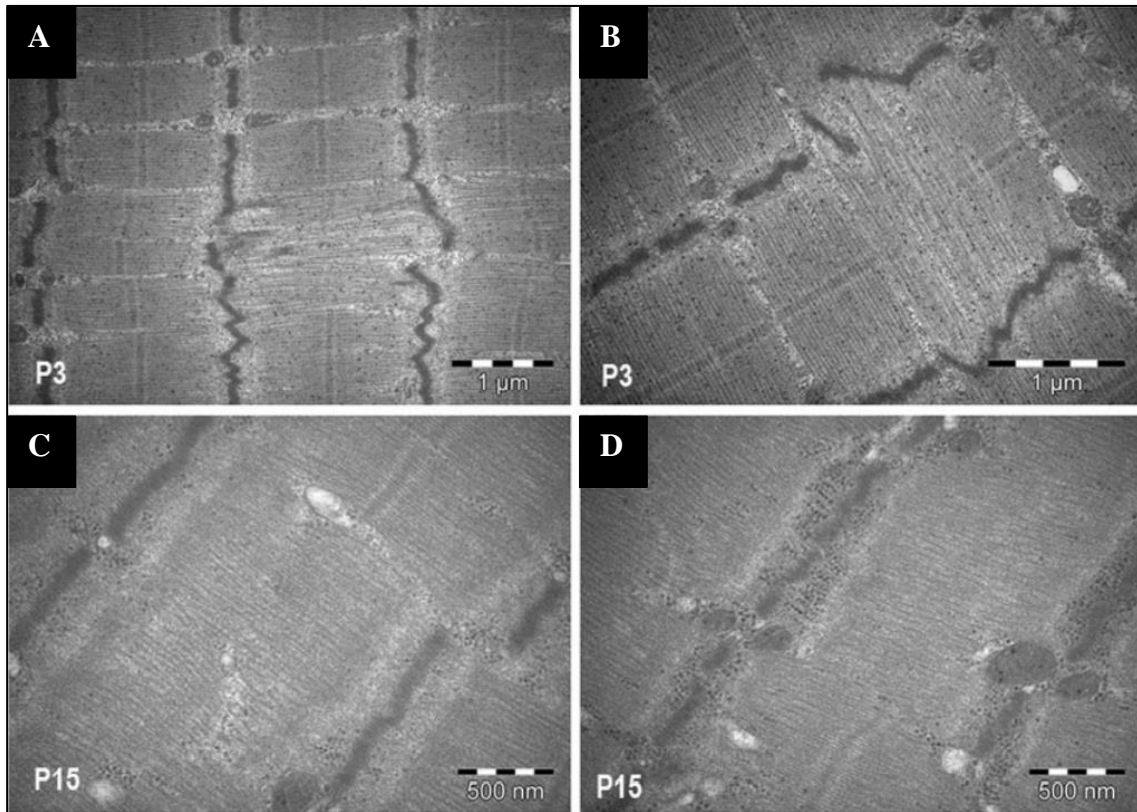
**Figure 13. Histochemistry from P21, Group 4 (HMERF).**

(A) H&E. Fibers size variability and internalized nuclei. Presence of fibers with CBs. (B) mGT. Fibers show numerous and multiple fuchsinophilic rounded inclusions corresponding to CBs. (C) NADH. Areas of defective oxidative staining corresponding to the zone occupied by the CBs with particular circular and peripheral distribution. (D) ATPase 9.4 Some fibers harbor areas devoid of reactions corresponding to the CBs.

As a summary:

Overall, group 1 (AR-CM) was characterized by multiple and small particular areas of sarcomere disorganization distributed through the muscle fibers. In AR-ED and AR-DM, sarcomere disruptions were associated with mild myopathic changes or moderate dystrophic pattern  $\pm$  RVs. In HMERF patients, CBs were the main feature, with a typical but not constant circular peripheral distribution.

As a whole, in all muscle biopsies we identified variable sarcomere disruptions suggesting a loss of sarcomeric scaffolding as common histopathologic lesions associated with *TTN* pathogenic mutations.



**Figure 14. High-magnification electron microscopy studies from P3 (AR-CM) (A, B), and P15 (AR-DM) (B, C).**

These images show slight abnormalities, only identified by especially M-band disruption, without A-band alterations, which could be considered as initial or early changes.

### III. CAPÍTULO 1 Titinopathies: Ultrastructural Particularities

Patient	Age at biopsy	Muscle biopsied	LIGHT MICROSCOPY	Reference
<b>Group 1</b>				
P1	8 y; 13 y	NR	Well-defined areas of defective oxidative staining, some nuclear internalizations, type 1 fiber predominance	PS
P2	7 y	Vastus lateralis	Multiple and well-delimited areas of uneven oxidative staining , centralized nuclei, type 1 fiber predominance	PS
P3	3 y	Deltoid	Multiple and well-delimited areas of uneven oxidative staining, prominent nuclear centralizations, type 1 fiber uniformity	PS
P4	7 y	Vastus lateralis	Type 1 fiber predominance, internalized nuclei, uneven oxidative staining	PS
P5	31 y	Deltoid	Uneven oxidative staining, nuclear internalizations, type 1 fiber predominance	PS
P6	49 y	Deltoid	Type 1 fiber predominance, numerous internalized nuclei, uneven oxidative staining, increased interstitial fat and connective tissue, occasional COX negative fibers.	PS
P7	12 y	Deltoid	Multiple and well-delimited areas of uneven oxidative staining, prominent nuclear centralizations, type 1 fiber uniformity	PS
P8	23 y	Deltoid	Prominent nuclear centralizations, type 1 fiber uniformity, presence of rare areas of uneven oxidative staining	PS
P9	1 m	Vastus lateralis	Fiber caliber variation, many small fibers, internalized nuclei, uneven oxidative staining, fuchsinophilic protein inclusions	PS
P10	4 m; 4 y	Vastus lateralis	Fuchsinophilic protein inclusions, uneven oxidative staining, nuclear internalizations	PS
<b>Group 2</b>				
P11	7 y	Deltoid	Necrotic/regenerating fibers, some nuclear internalizations, and type 1 fiber predominance	(De Cid et al. 2015) (P1)
P12	43 y;52 y	Deltoid	Rare necrotic/regenerating fibers, nemaline bodies, RVs, uneven oxidative staining, and some nuclear internalizations	( De Cid et al. 2015) (P2)
P13	9 y	Vastus lateralis	Type 1 fiber predominance, rods, RVs, uneven oxidative staining , internalized nuclei, necrotic and regenerative fibers	(De Cid et al. 2015) (P3)
P14	47 y	Deltoid	Uneven oxidative staining, internalized nuclei, increased interstitial connective tissue, occasional COX negative fibers.	PS
<b>Group 3</b>				
P15	42 y	Deltoid	Uneven oxidative staining , internalized nuclei	(Hackman et al., 2008) (C1) (Evilä et al., 2014)(5B)
P16	69 y	Deltoid	Uneven oxidative staining , internalized nuclei	(Evilä et al., 2016) (B) (Hackman et al., 2008) (C2) (Evilä et al., 2014)(5A) (Evilä et al., 2016)(C)
P17	54 y	Deltoid	Necrotic fibers, few RVs, internalized nuclei, mild uneven oxidative staining , Type 1 fiber predominance, mild endomysial fibrosis	PS
P18	NS	NR	Few internalized nuclei (only H-E staining available)	PS
<b>Group 4</b>				
P19	10 y	Deltoid	CBs, uneven oxidative staining, internalized nuclei	PS
P20	71 y	Peroneus longus	Rods, CBs fuchsinophilic protein inclusions, slight increase in endomysial fibrosis, type 1 fiber predominance, internalized nuclei	PS
P21	55 y	Deltoid	Type 1 fiber predominance , CBs, RVs, uneven oxidative staining , internalized nuclei	(Palmio et al., 2014) (L:II-1)
P22	27 y	Deltoid	CBs, RVs, uneven oxidative staining , internalized nuclei	(Palmio et al., 2014) (K:II-1)
P23	48 y	Deltoid	CBs, RVs, regenerative fibers, internalized nuclei	(Palmio et al., 2014) (G:II-2)

**Table 3. Data relative to biopsy and summarized description of the histological findings in LM in patients with *TTN*-related myopathies.**

y: years; m: months; NR: Not Referred; LM: Light Microscopy; PS: Present Study; CBs: cytoplasmic bodies, RVs: Rimmed vacuoles; NA: Not available; H-E: Hematoxylin-Eosin.

### III. CAPÍTULO 1 Titinopathies: Ultrastructural Particularities

Patient	ELECTRON MICROSCOPY	Reference
<b>Group 1</b>		
P1	Focal and short areas of myofibrillar disorganization, nuclear internalizations; some clear areas with myofilaments loss, M-line disruption and almost intact Z-line	PS
P2	Focal and multiple areas of myofibrillar disarray resembling minicores, nuclear internalizations	PS
P3	Foci of myofibrillar disorganization with Z-band streaming running over few sarcomeres, some large clear areas with myofilaments loss, M-line disruption and almost intact Z-line	PS
P4	Focal and multiple areas of myofibrillar disarray resembling minicores, nuclear internalizations, Z-line streaming spanning all along the sarcomere resembling «pennants»	PS
P5	Z-line streaming spanning all along the sarcomere or as small «pennants», rare focal areas of myofibrillar disorganization	PS
P6	Z-line streaming spanning all along the sarcomere or as small «pennants», internalized nuclei in rows, small RVs, focal areas of myofibrillar disorganization	PS
P7	Focal and multiple areas of myofibrillar disarray resembling minicores, granular streaming spanning all along the sarcomere or as small «pennants», internalized nuclei	PS
P8	Z-line streaming spanning along the sarcomere or as small «pennants», internalized nuclei	PS
P9	Focal and multiple areas of myofibrillar disarray resembling minicores, clear areas with loss of myofilaments with almost intact Z-line, CBs, numerous fibers with marked sarcomere disorganization	PS
P10	CBs, nuclear filamentous inclusions, atrophic fibers with degenerated myofibrils, duplication of triads	PS
<b>Group 2</b>		
P11	Clear areas with loss of myofilaments with almost intact Z-line, internalized nuclei	( De Cid et al. 2015) (P1)
P12	CBs, sometimes with dense material in the peripheral halo, nemaline bodies, nuclear tubulo-filamentous inclusions, RVs/ AV, clear areas with loss of myofilaments with almost intact Z-line, internalized nuclei	( De Cid et al. 2015) (P2)
P13	CBs, sometimes with dense material in the peripheral halo, nemaline bodies, tubulo-filamentous material, RVs, and filamentous nuclear inclusions, focal Z-line streaming spanning all along the sarcomere or as small «pennants».	( De Cid et al. 2015) (P3)
P14	Z-line streaming spanning all along the sarcomere or as small «pennants», mini-cores internalized nuclei, nemaline rods in some fibers, mitochondrial abnormalities	PS
<b>Group 3</b>		
P15	Clear areas with loss of myofilaments with almost intact Z-line , Z-line streaming spanning all along the sarcomere or as small «pennants», large areas of protein material and myofibrillar loss, internalized nuclei	(Hackman et al., 2008) (C1) (Evilä et al., 2014)(5B) (Evilä et al., 2016) (B)
P16	Z-line streaming spanning all along the sarcomere or as small “pennants”, large areas of accumulated protein material with myofibrillar loss.	(Hackman et al., 2008) (C2) Evilä et al., 2014)(5A) ( Evilä et al., 2016)(C)
P17	NA	PS
P18	NA	PS
<b>Group 4</b>		
P19	CBs sometimes with dense protein aggregates in the peripheral halo, RVs, Z-line streaming as small «pennants», large areas of protein material and myofibrillar loss, atrophic fibers with disorganized internal structure with thin-filaments and small segments of dense material	PS
P20	NA	PS
P21	CBs sometimes with dense material in peripheral halo, protein inclusions, RVs, large areas of protein material and myofibrillar loss, internalized nuclei	(Palmio et al., 2014) (L:II-1)
P22	NA	(Palmio et al., 2014) (K:II-1)
P23	CBs, large areas of protein material and myofibrillar loss, atrophic fibers with disorganized internal structure with thin-filaments and small segments of dense material	(Palmio et al., 2014) (G:II-2)

**Table 4. Summarized description of histological findings in EM in patients with *TTN*-related myopathies.**

EM: Electron Microscopy, PA: Present Article; CBs: cytoplasmic bodies, RVs: Rimmed vacuoles; NA: Not available. PS: Present Study.



### 3. DISCUSSION

*TTN*-related myopathies comprise a large group of different clinical entities (Oates et al., 2018; Hackman et al., 2017; Savarese et al., 2016). The relatively recent employment of NGS techniques has lead and probably will continue leading to increase the number of genetic variants described in *TTN*, as well as new associated clinical phenotypes (Fernández-Marmiesse et al., 2017; De Cid et al., 2015; Chauveau et al., 2014a, 2014b;). Our study focuses on the description of recessive *TTN* cases and HMERF cases. Interestingly, while HMERF is usually a dominant disorder, P22 presented with homozygous p.Pro31732Leu mutation. Palmio et al, reported this mutation (initially described as p.Pro30091Leu) in 2014, as a semi-recessive mutation since some heterozygous carriers do not develop a disease and some do (Palmio et al., 2014). An outstanding diagnostic challenge is the assignment of a pathogenic value to the already huge and still increasing number of *TTN* sequence variants identified with NGS (Savarese et al., 2018). Moreover, reliable functional tests for the interpretation of single variants are lacking. However, considering the high number of variants of uncertain significance in the *TTN* gene, confrontation of molecular, clinical and morphological data is crucial for the establishment of the molecular diagnosis.

With the morphological studies of 23 *TTN* mutated patients, we intended to correlate specific histopathological lesions with each different clinical group of patients.

AR-CM patients (P1 to P10) from group 1 presented a typical congenital myopathy phenotype (Table 1). Cardiomyopathy was present in two cases (P7 and P8), and reported in a clinically affected sister of P2. All patients harbored recessive compound heterozygous mutations in different exons of *TTN*, involving different domains but predominantly located in the A-band. Muscle biopsies showed

### III. CAPÍTULO 1 Titinopathies: Ultrastructural Particularities

disorganizations of the mesh of the intermyofibrillar network at oxidative staining as predominant findings, associated with type 1 fibers predominance, internalized or centralized nuclei, corresponding to some extent to previously described pathological spectrum of the disorder (Chauveau et al., 2014a; Palmio et al., 2014; Ceyhan-Birsoy et al., 2013;). Nevertheless, ultrastructural studies (Table 4) consistently revealed common and relevant features: a) small clear areas of focal myofibrillar disintegration with loss of thick filament corresponding to dissolution of M-band structure, with almost intact Z-line (Figure 9A, B); b) areas with Z-line diffusion spanning all along the sarcomere, or resembling small “pennants” (Figure 9C, D, F); and c) focal myofibrillar disorganizations with Z-line streaming and paucity of mitochondria, involving a few sarcomeres (Figure 9E).

Patients from group 2 with AR-ED (P11 to P14) harbored compound heterozygous (P12, P13, P14) or homozygous (P11) mutations involving M-line protein domains. Muscle biopsies had a variably severe dystrophic pattern with RVs, rods and CBs. Our detailed ultrastructural analysis allowed disclosing the presence of distinctive small and focal areas of sarcomere disorganizations with M-line dissolution in all patients (Figure 11A, B). Some of CBs had an atypical aspect with small dense material in the peripheral halo (Table 4).

Group 3 patients P15 and P16 were originally considered as severe early-onset TMD with proximal involvement (Hackman et al., 2008). They shared a mutation in exon 363/Mex5 but harbored different second truncating mutations that explained their more severe phenotype (Evilä et al., 2016; Evilä et al., 2014; Hackman et al., 2008) allowing to redefine them as AR-DM. P17 and P18 harbored the same two mutations in exons 364/Mex6 and 274. Muscle biopsies revealed multiple nuclear internalization and uneven oxidative staining. Mild variability in the size of the fibers, slight increase in endomysial

### III. CAPÍTULO 1 Titinopathies: Ultrastructural Particularities

connective tissue and some RVs were evident in P17. EM mainly showed both focal and large areas of disorganizations with myofibrillar/filaments loss (Figure 12A-C) (P15 and P16).

Group 4 included HMERF patients (P19 to P23) characterized by severe early respiratory insufficiency with variable degree of muscular involvement. P19 showed uncommon early-onset at 10 years old. All the patients harbored missense *TTN* mutations in the same *TTN* exon 344 (Palmio et al., 2014). Presence of CBs was the common and most prominent histological feature (Figure 13). CBs were preferentially subsarcolemmal, sometimes with a circular peripheral distribution of CBs as described (Uruha et al., 2015). EM disclosed that some of them harboured the presence of short segments of dense material in the peripheral halo (Figure 12D, E). Variable length of sarcomere disorganizations has also been reported in biopsies from HMERF patients (Uruha et al., 2015; Pfeffer et al., 2014; Toro et al., 2013; Ohlsson et al., 2012). Our cases showed mainly large areas of protein material deposit (P19, P21, P23) and Z-line streaming resembling small “pennants” (P19, P23). Atrophic fibers showed complete sarcomere disorganization, rods and RVs/autophagic vacuoles (P19, P21).

As a whole, we identified here that *TTN* pathogenic mutations cause a large spectrum of histopathologic lesions always associated with particular sarcomere disruptions. Although one could imagine that the presence of sarcomeric pathology is as an expected finding related to the loss of titin intrinsic properties, the above mentioned particular sarcomeric disruption presented common elements such as focal myofibrillar disintegration with loss of thick filament corresponding to dissolution of M-band structure, with almost intact Z-line, that we have never observed in the EM analyses of muscle biopsies from other congenital diseases. The sarcomere disruption observed initially on the band M as shown in Figure 14, then in Figures 9B and 12A, can be

extended later on the whole of the sarcomere structure, as shown in Figures 9A and 11A. The dissolution of M line with almost intact Z line could be considered as an early lesion (Figure 14) and, clearly, there may be different degrees of disruption of the sarcomere. Thus, these lesions might be considered as a common and priming myofibril damage that successively lead to the development of multiple and variable histopathological alterations.

Of note, these restricted and focal sarcomere abnormalities identified in *TTN*-related myopathies appear different from classical cores or minicores lesions as observed in myopathies related to *RYR1* (OMIM \*180901) and *SEPN1* (OMIM \*606210) genes. Indeed, ultrastructurally, typical cores found in *RYR1* mutated patients, correspond to wide areas of compacted and disorganized myofibrils, with Z-line streaming and absence of mitochondria, extending over numerous sarcomeres or almost along the full length of the fibers; they are sharply demarcated from the normally structured zones of the muscle fibers (Romero y Clarke, 2013). However, mostly in *RYR1* recessives the core areas frequently occupied the whole myofiber cross sectional and extended to a moderate number of sarcomeres in length (Bevilacqua et al., 2011). In contrast, the classical minicores as found in *SEPN1*-related myopathies have poorly-defined borders and are characterized by the presence of multiple foci of myofilamentary disorganization, with Z-line streaming, running over a few sarcomeres, even if occasionally they are longer; mitochondria are absent from the altered areas (Romero y Clarke, 2013). Additionally, and this is a key point in our work, these “minicore” lesions never appear as focal clear areas of myofibrillar disruption, involving one or few sarcomeres, with M-line disintegration and some loss of filaments in the central part of the abnormal areas, associating with almost intact Z-line, as we observed in *TTN*-related myopathies (Figures 9A, B; 11A, B and 12A).

### III. CAPÍTULO 1 Titinopathies: Ultrastructural Particularities

Based on our findings we aimed at establish a deep correlation between histopathologic phenotype and genotype leading at explaining the mechanism underlying the loss of sarcomere scaffolding. Unfortunately, this was hindered by the lack of tools for functional studies of the mutations. Further studies will also be required to better characterize the *TTN* isoforms and their role for muscle function.

In conclusion, our morphological analysis of the muscle biopsies from 23 patients carrying *TTN* pathogenic mutations suggest a recognizable pattern of myofibrillar alteration that could help in the diagnosis of titinopathies in a such complicated scenario where functional studies are still lacking. Further deep histopathological analyses are needed to assess the exact specificity of these lesions.



## **IV. CAPÍTULO 2**

### **“DIAGNOSTIC UTILITY OF THE DIFFUSE UTROPHIN EXPRESSION (DUE) PATTERN IN MUSCLE BIOPSY”**





## **1. MATERIALS AND METHODS**

### **1.1. CASES**

We have collected skeletal muscle biopsies with definitive clinicopathological or molecular diagnosis performed or referred to the Laboratory of Neuropathology of the Hospital Universitario Virgen del Rocío (HUVR) in Seville (Spain), which is part of the reference NMD Unit at National and European level (CSUR and EURO-NMD) from 2015. The study was carried out under appropriate consent of the local Ethic Committee for the use of the samples. Samples were obtained for diagnostic purpose by open muscle biopsy.

We used as healthy controls 10 samples of muscle biopsies obtained from trauma surgery in adult patients without any previous medical history of NMD.

We classified the cases into three diagnostic categories: myopathies, NMJD and ND, which were then subdivided into different groups and subgroups according to diagnostics (Table 5). According to the age at biopsy, we considered minor and adult patients and defined four groups: group 1 (infants: < 2 years) and group 2 (children/adolescents: 2 to 17 years) for minors, and group 3 (young-middle aged adults: 18 to 59 years) and group 4 (older adults:  $\geq$  60 years) for adults.

### **1.2. SAMPLE MUSCLE PROCESSING**

All the skeletal muscle biopsies were processed in the Laboratory of Neuropathology at HUVR, including conventional histochemical and immunohistochemical techniques for diagnosis in NMDs, as well as specific genetic studies when required. Our analysis included immunohistochemical staining for utrophin (clone

DRP3/20C5, Novocastra) and neo-MyHC (clone WB-MHCn, Novocastra) as additional techniques.

### 1.3. MORPHOLOGICAL ANALYSIS

To minimize variability in the examination, the same pathologist analysed every single muscle sample employing a light microscope (*Nikon model Eclipse Ci-L*) with a 10X eyepiece lens.

We systematically evaluated semi-quantitatively the presence of three histological findings with basic stainings: RFs (i.e. smaller fibres with characteristic basophilic cytoplasm and large nuclei), NFs and EF. RFs, and NFs items were classified as absent (0), few (1) (i.e. scarce scattered fibres corresponding to <5% of muscle fibres in histological sections) or abundant (2) (numerous fibres corresponding to >5% of muscle fibres) (Figure 15A-D). EF was categorized as absent (0), mild (1) (i.e. slight separation of the muscle fibres, overall involving < 20% of histological sections of muscle biopsies) or high (2) (i.e. clear separation of muscle fibres with rounded contours +/- fat substitution, involving >20% of histological sections) (Figure 15E, F). In addition, we assessed the presence of muscle fibres expressing neo-MyHC (neo-MyHC+ fibres) and quantified as absent (0), few (1) (i.e. scarce scattered fibres corresponding to <5% of muscle fibres in histological sections) or abundant (2) (numerous fibres corresponding to >5% of muscle fibres) (Figure 16).

The evaluation of abnormal utrophin immunohistochemical staining was based on the presence or absence of sarcolemmal utrophin expression (SUE), considering only complete sarcolemmal immunostaining evidenced using the 4X or 10X objectives, that is 40X or 100X total magnification. DUE-pattern was defined as SUE with widespread immunostaining pattern (i.e.  $\geq 90\%$  of muscle fibres in the histological section). (Figure

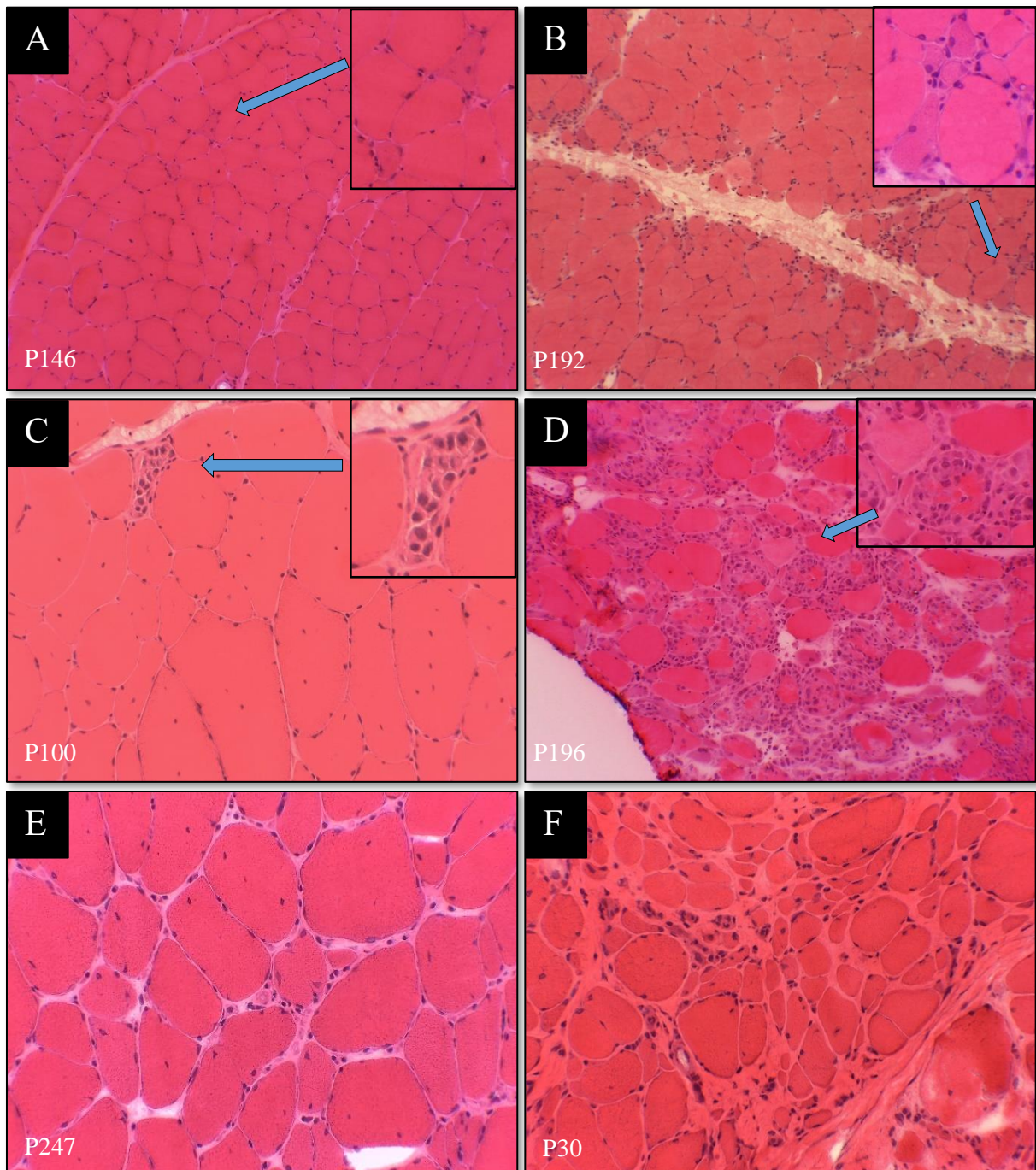
17A, B). Different patterns with lower percentage or isolated immunostained fibres as well as an exclusively perifascicular distribution pattern of the immunostained fibres were considered as biopsies with SUE, but without DUE pattern. Any faint immunostaining for utrophin only evident at higher magnifications were considered as negative (Figure 17C-F).

#### **1.4. STATISTICAL ANALYSIS**

Firstly, we described the presence of RFs, NFs, EF and neo-MyHC+ fibres in the muscle biopsies and search for significant associations with the different diagnostics.

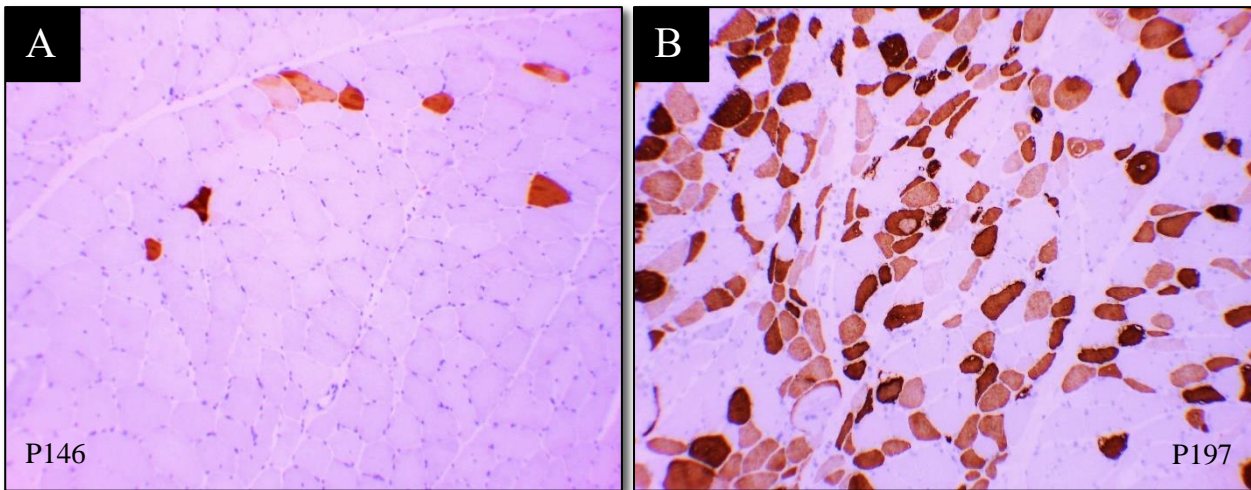
Then, we evaluated the presence of SUE and specifically DUE pattern in the biopsies to assess the association of the latter to the different diagnostics (categories, groups or subgroups), as well as to the histological findings previously referred, and clinical data as sex and age group at biopsy.

We performed statistical analysis with *IBM SPSS Statistics 24* software. We employed Chi-square and Fisher's exact tests to check the association between two binary variables, and the Cochran-Mantel-Haenszel (CMH) test to check the association between two binary variables, while controlling for a third confounding variable. We set the level of significance at  $P < 0.05$  and a 95% confidence interval (95% CI). Graphics were performed with *GraphPad Prism 8* and *Microsoft Word 2016* softwares.



**Figure 15. Examples of biopsies with different amount of RFs, NFs and EF.**

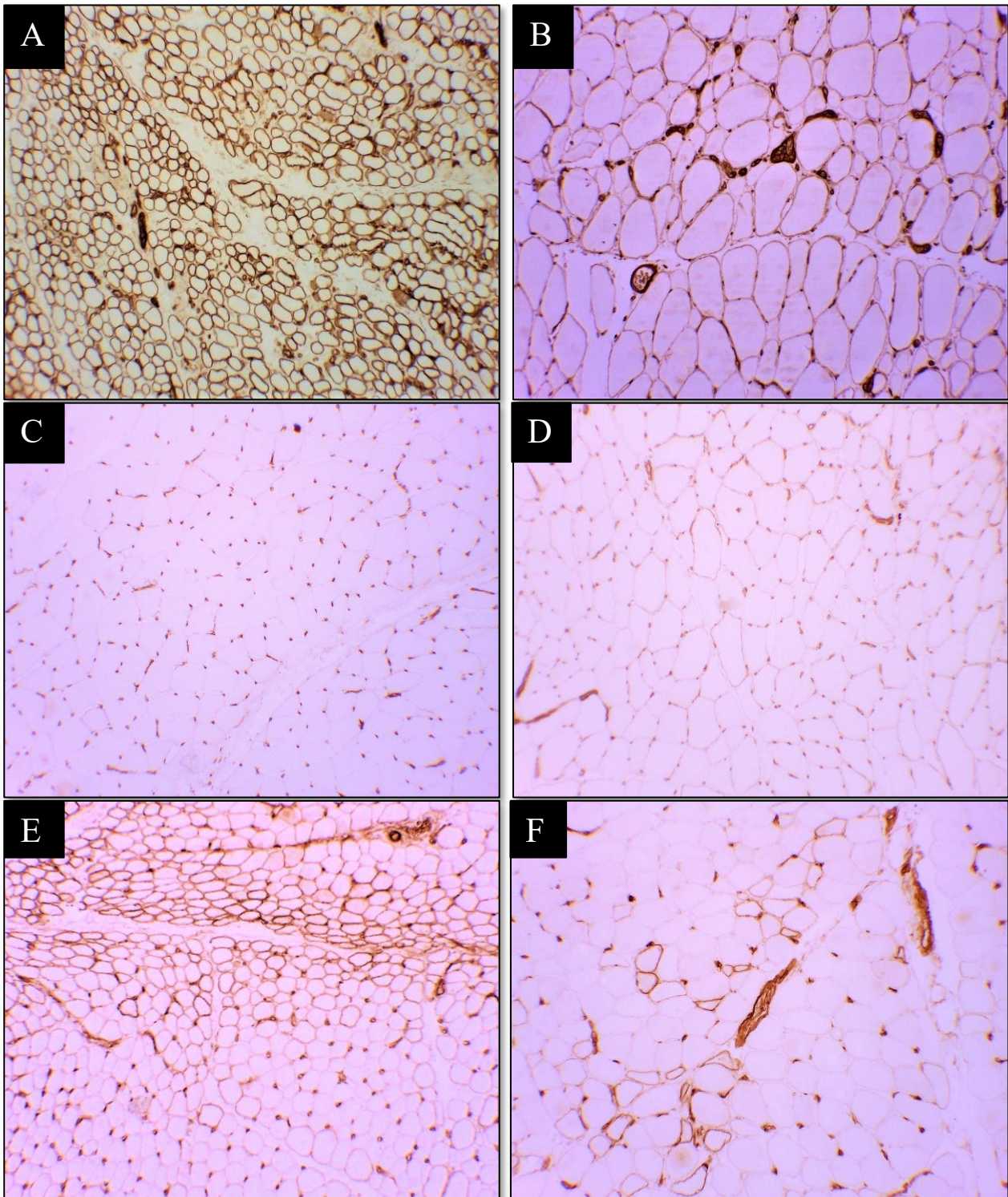
**(A-B):** few **(A)** and abundant **(B)** regenerative fibres (RFs), H&E 10X; **(C-D):** few **(C)** and abundant **(D)** necrotic fibres (NFs)with myophagia, H&E,20X, 10X; **(E-F):** mild **(E)** and abundant **(F)** endomysial fibrosis (EF),H&E,20X.



**Figure 16. Examples of biopsies with different amount of neo-MyHC+ fibres.**

**(A-B):** Few **(A)** and abundant **(B)** neo-MyHC+ fibres, 10X. Note that Figures 15A and 16A are from the same patient (P146): RFs identified in H&E are evident also in IHC for neo-MyHC, but other fibres with mature aspect are also stained.





**Figure 17. Examples of biopsies with different patterns of IHC utrophin staining.**

(A-B):SUE with DUE pattern: strong staining (A) and weak staining (B)10X; (C-E):Absence of DUE: utrophin staining only in endomysial capillaries (C) 10X; Isolated fibres with weak or uncertain SUE (D) 10X; Focal fibres with SUE with perifascicular pattern with uncertain or negative fibres in the central part of the fascicle (E)10X; Isolated fibres with SUE (F) 10X.

## 2. RESULTS

### 2.1. DESCRIPTION OF THE SERIES, CLASIFICATION AND CLINICAL DATA

We studied 800 skeletal muscle biopsies in a period of two and a half years (from May 2016 to January 2019). In order to achieve the most reliable results possible in this study, we performed an exhaustive screening, considering only those cases with a firm diagnosis, based on defining histomorphological, histoenzymatic or genetic findings and adequate clinical correlation.

Finally, we selected 274 cases, which constituted our total series. It included 157 males and 117 females, aged from 4 days to 82 years (median [Mdn] 45 years; interquartile range [IQR] 12.75-61).

According to the diagnosis, we classified the cases into three categories: myopathies (n=230), neuromuscular junction diseases (NMJDs) (n=3) and neurogenic disorders (NDs) (n=41). Then, we sub-classified the cases according to diagnosis in different groups and subgroups (Table 5). Distribution of diagnostics (categories and groups) by age ranges is exposed in Figure 18.

**Myopathies:**

Muscular Dystrophies: Congenital muscular dystrophy, Dystrophynopathy, Limb-girdle muscular dystrophy, Emery-Dreifuss muscular dystrophy, Oculopharyngeal muscular dystrophy.

Metabolic myopathies: Glycogen storage disease, CPT-II deficiency, Mitochondrial myopathy, MAD deficiency

Congenital Myopathies: Nemaline myopathy, Centronuclear myopathy, Congenitafiber type disproportion, Fibre type 1 uniformity

Inflammatory myopathies: Dermatomyositis, Polymyositis, Sporadic Inclusion bodies myositis, Immune-mediated necrotizing myopathy, Granulomatous myopathy, Macrophagic myopathy, Eosinophilic fasciitis

Toxic myopathies: statins, chloroquine, colchicine, steroids

Critical illness myopathy

Sporadic late onset nemaline myopathy

**Neuromuscular junction diseases:**

Congenital myasthenia

Myasthenia gravis

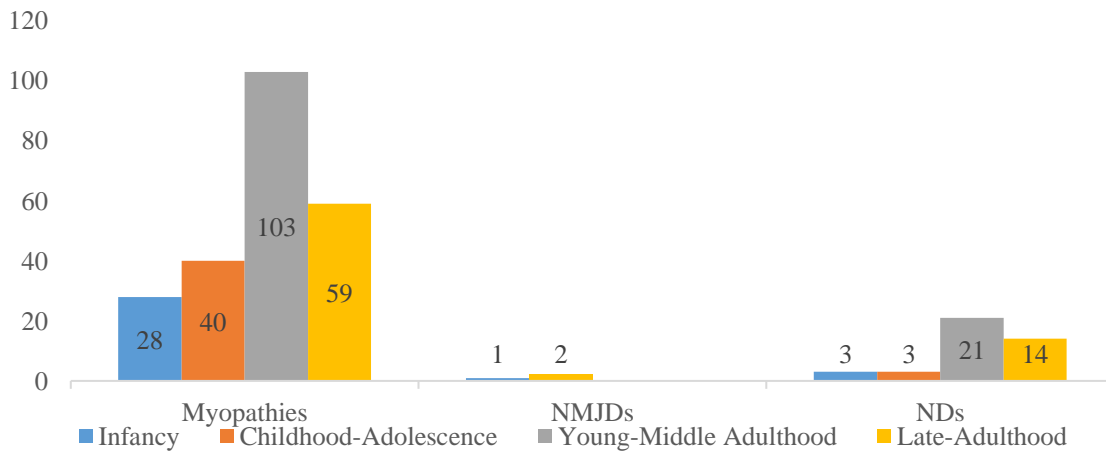
**Neurogenic disorders**

Motor neuron diseases: Amyothophic lateral sclerosis Spinal muscular atrophy

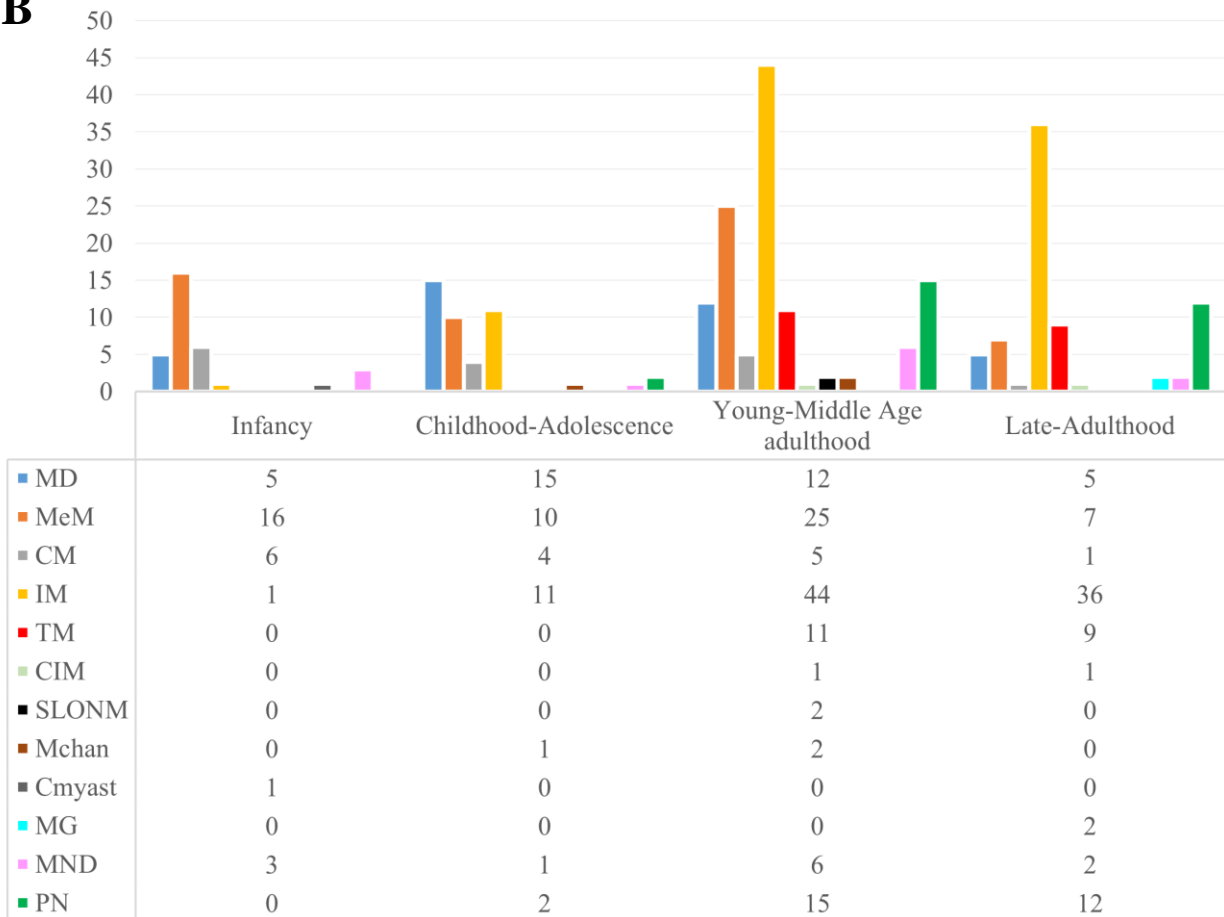
Peripheral neuropathies: Radiculopathies, Charcot-Marie-Tooth, Hereditary motor and sensory neuropathy-proximal type, Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, Guillain-Barré syndrome, Metabolic neuropathy, Vasculitis neuropathy, Toxic neuropathy

**Table 5. Categories (bold type), groups (underlined) and subgroups of the total series.**

**A**



**B**



**Figure 18. Number of cases in the different age-ranges and diagnostics.**

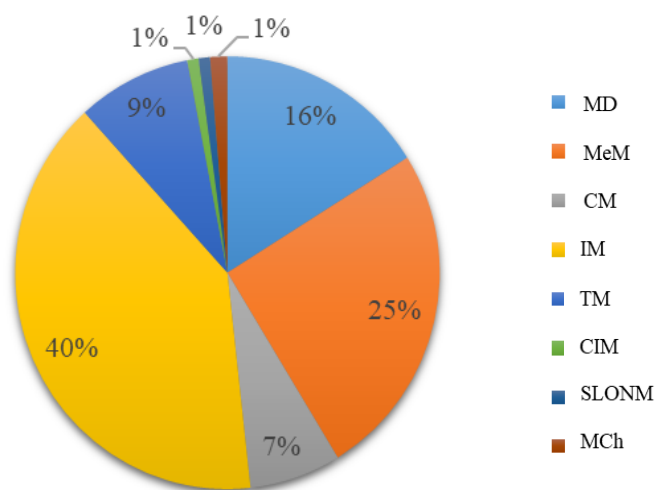
Distribution of the age-ranges according the three categories (A). Distribution of the diagnostics groups into four age-ranges at biopsy (B). MD: muscular dystrophies; MeM: metabolic myopathies; CM: congenital myopathies; IM: inflammatory myopathies; TM: toxic myopathies; CIM: critical illness myopathy; SLONM: sporadic late onset myopathy; Mchan: muscular channelopathies; CMyast: congenital myasthenia; MG: myasthenia gravis; MND: motor neuron disease, PN: peripheral neuropathy.



2.1.a. MYOPATHIES

Myopathies included 230 patients (130 males and 100 females), aged from 4 days to 82 years (Mdn 42.5 years; IQR 10-60). Most of them were adults (70.4%). The most frequent age-range at biopsy was young-middle adulthood (44.8%) (Figure 18A)

Myopathies were divided into eight groups according to diagnosis: MD (n=37), MeM (n=58), CM (n=16), IM (n=92), TM (n=20), critical-illness myopathy (CIM) (n=2), sporadic late-onset myopathy (SLONM) (n=2) and muscular channelopathies (MCh) (=3) (Figure 19).



**Figure 19. Distribution of cases in the myopathies category according to diagnostic groups.**  
 MD: muscular dystrophies; MeM: metabolic myopathies; CM: congenital myopathies; IM: inflammatory myopathies; TM: toxic myopathies; CIM: critical illness myopathy; SLONM: sporadic late-onset nemaline myopathy; MCh: muscular channelopathies.

**Muscular dystrophies**

This group included 37 patients with diagnosis of dystrophinopathy (n= 15) or other four different subgroups of MD: CMD (n=5), LGMD (n=13), EDMD (n=1) and OPMD (n=3). They were 26 males and 11 females, aged 1 month to 76 years (Mdn 14 years; IQR 4.5-32).

#### IV. CAPÍTULO 2 DUE: Diagnostic value and associated factors

The subgroup of dystrophinopathies included 15 patients: DMD (n=4), BMD (n=10) and 1 DMD-C, thus, 14 males and 1 female. The range of age was 11 months to 34 years (Mdn 1.5 years; IQR 0.9-3.5 for DMD and Mdn 10 years; IQR 5-23.5 for BMD).

##### **Metabolic myopathies**

This group encompassed 58 cases from four subgroups: MiM as the most frequent (n=49), GSDs (n=6), and MeM due to CPT-II (n=2) or MAD (n=1) deficiency. Biopsies were from 33 males and 25 females, aged between 3 weeks and 77 years (Mdn 25.5 years; IQR 1-52.3).

##### **Congenital myopathies**

CM group included 16 cases from four subgroups: NM (n=4), CNM (n=9) and two other more infrequent: congenital fibre type disproportion (CFTD) (n=1) and fibre type 1 uniformity (FT1U) (n=2). Patients were 10 males and 6 females, aged between 4 days and 65 years (Mdn 5.5; IQR 0.24-38.8).

##### **Inflammatory myopathies**

IM group was the largest in the total series. It encompassed 92 cases from four main subgroups: DM (n=32), PM (n=15), sIBM (n=7), IMNM (n=34), as well as other three more infrequent: granulomatous myositis (n=1); macrophagic myopathy (n=2); eosinophilic fasciitis (n=1). Biopsies were from 48 males and 44 females, aged between 8 months and 82 years (Mdn 57 years; IQR 42.5-6.8).

##### **Toxic myopathies**

TM group had 20 cases from four subgroups defined by the causing toxic: statins (n=5), chloroquine (n=1), colchicine (n=1) or corticosteroids (CSIM) (n=13). Biopsies

were from 11 females and 9 males, aged between 34 and 78 years (Mdn 54.5 years; IQR 44-75).

### **Other myopathies**

This category included three additional minority groups: CIM (n=2), SLONM (n=2) and MCh (n=3).

### 2.1.b. NEUROMUSCULAR JUNCTION DISEASES

Three cases were classified as NMJD: one congenital myasthenia (CMyast) diagnosis (a 12 days of age) and two generalized MG (age between 62 and 73 years).

### 2.1.c. NEUROGENIC DISORDERS

This category encompassed 41 patients (27 males and 14 females, Mdn 51 years; IQR 39-63.5). Most of them were adults (85.4%). As in myopathies, the most frequent age range was that of young-middle adulthood (51.2%). The cases classified as ND were divided into two groups: motor neuron diseases (MND) (n=13) and PN (n=28).

The group of MND had two subgroups: ALS (n=6) and SMA (n=7): 10 males and 3 females, aged 2 weeks to 75 years (Mdn 33 years; IQR 2.8-51.5).

PN group encompassed 28 patients of many different subgroups as radiculopathies (n=13), hereditary neuropathies (n=2) and acquired neuropathies (n=13) due to different causes (e.g. toxic, metabolic, vasculitis). This group included biopsies from 17 males and 11 females, aged 6 to 82 years (Mdn 57.5; IQR 47-65).

## 2.2. HISTOLOGICAL FINDINGS

The total series had 39.4% of biopsies with RFs (n=108), 42% with NFs (n=117) and 28.8% with EF (n=79). Complete distribution of those findings into all the patients of the total series in is reported in Appendix II.

Histological exam of muscle biopsies showed significantly higher proportions of cases with RFs and NFs in myopathies than in NMJD and ND categories (Figures 20, 21). The odds of myopathy were 4 times higher in biopsies with RFs than in those without RFs (OR 4.1 [95% CI: 1.8-9.7],  $P<0.001$ ), and 2 times higher in biopsies with NFs compared to those without NFs (OR 2.2 [95% CI: 1.1-4.6],  $P=0.024$ ).

Furthermore, not only the presence, but also the quantity of RFs was significantly higher in myopathies than in NMJD and ND categories (OR 8.1 [95% CI: 0.9-7.1],  $P=0.045$ ).

### 2.2.a. REGENERATIVE FIBRES

Myopathies showed significant association with presence of RFs (OR 4.1 [95% CI: 1.8-9.7]),  $P<0.001$ ). NDs showed significant association with absence of RFs (OR 0.2 [95% CI: 0.1-0.5],  $P<0.001$ ).

The group of MD did not showed significant difference to presence of RFs ( $P=0.110$ ). Only the subgroup of CMD demonstrated significant association with presence of RFs regarding to the rest of diagnosis in the total series (OR 3.3 [95% CI: 1.1-9.9],  $P=0.026$ ).

IM was the group with higher percentage of biopsies with RFs in the total series (68,5%). The odds of IM were 7 times higher in biopsies with RFs than in biopsies without RFs (OR 6.6 [95% CI: 3.7-11.5],  $P<0.001$ ). DM and IMNM, also showed

significant association with RFs comparing with all other diagnostics in the total series (OR 5.6 [95% CI: 2.4-13.1],  $P < 0.001$  and OR 15.6 [95% CI: 5.3-45.5],  $P < 0.001$ , respectively).

It should be noted that the odds of MeM were 5 times higher in biopsies without RFs than in biopsies with RFs (OR: 0.2 [95% CI: 0.1-0.4], ( $P < 0.001$ ). Same observation was evident for a subgroup of MeM (MiM), as well as for the group of PN (OR 0.2 [95% CI: 0.1-0.5],  $P < 0.001$  and OR 0.2 [95% CI: 0.1-0.7],  $P = 0.004$ ).

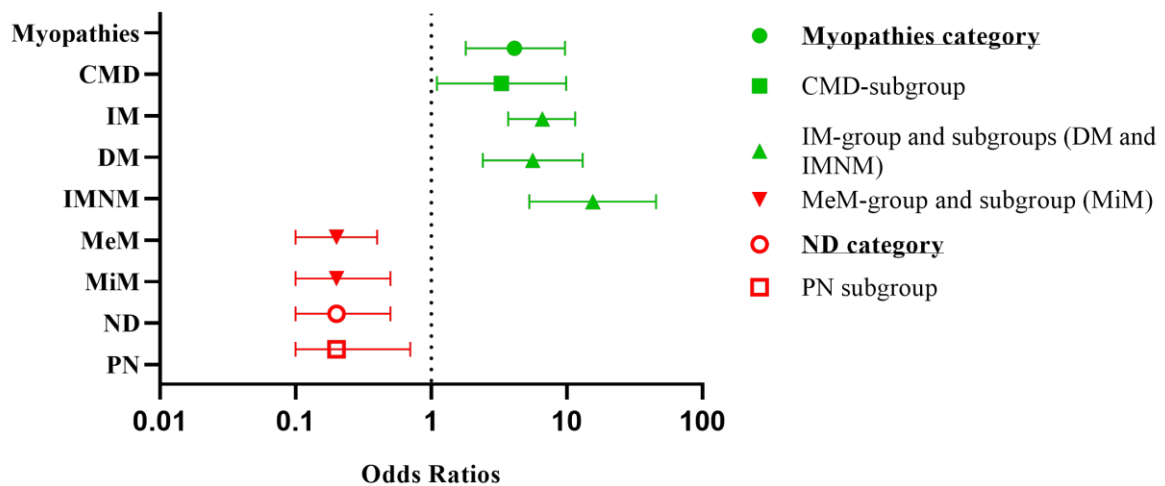


Figure 20. Representation of odds ratios of the different categories, groups and subgroups with significant association to presence of RFs in muscle biopsies among the total series.

Regarding the quantity of RFs, in the total series, abundant RFs were significantly associated to MD group (OR 3.8 [95% CI: 1.2-12.5],  $P = 0.019$ ), while few RFs were associated to MeM ( $P = 0.003$ ), CM ( $P = 0.04$ ), as well as to NP groups ( $P = 0.04$ ).

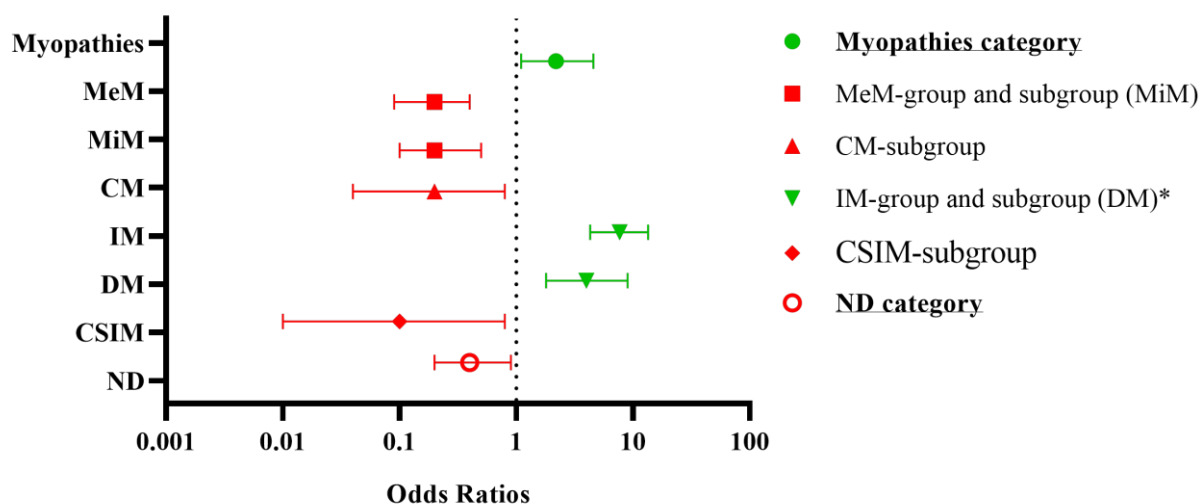
2.2.b. NECROTIC FIBRES

Myopathies showed significant association with presence of NFs (OR 2.2 [95% CI: 1.1-4.6], P=0.024), while ND category showed significant association with absence of NFs (OR 0.4 [95% CI: 0.2-0.9], P=0.026).

As for RFs, IM and MeM were the main groups with significant association to NFs. IM was the group with higher percentage of biopsies with NFs in the total series (73.9%). The odds of IM were 8 times higher in biopsies with NFs compared to biopsies without NFs (OR 7.7 [95% CI: 4.3-13.5], P<0.001). The IM subgroups DM and IMNM also showed significant association with NFs compared with the rest of diagnostics in the total series (OR 4 [95% CI: 1.8-9], P<0.001 and OR:-; P<0.001, respectively).

Regarding other groups, it should be noted that the odds of MeM and CM were 5 times higher in biopsies without NFs than in biopsies with NFs (OR 0.2 [95% CI: 0.09-0.4], P<0.001 and OR: 0.2 [95% CI: 0.04-0.8], P=0.012). Finally, MiM and CSIM also showed association to absence of NFs (OR: 0.2 [95% CI: 0.04-0.5], P<0.001 and OR: 0.1 [95% CI: 0.01-0.8], P<0.009, respectively) (Figure 21).

Regarding to the amount, in the total series, abundant NFs were significantly associated to IM (OR: 2.9 [95% CI: 1.3-6.2], P=0.007). The subgroup of IMNM also showed significant association with abundant NFs not only compared to other myopathies (OR: 3.2 [95% CI: 1.4-7.6], P=0.007), but also compared to the total series (OR: 3.7 [95% CI: 1.6-8.6], P=0.002).



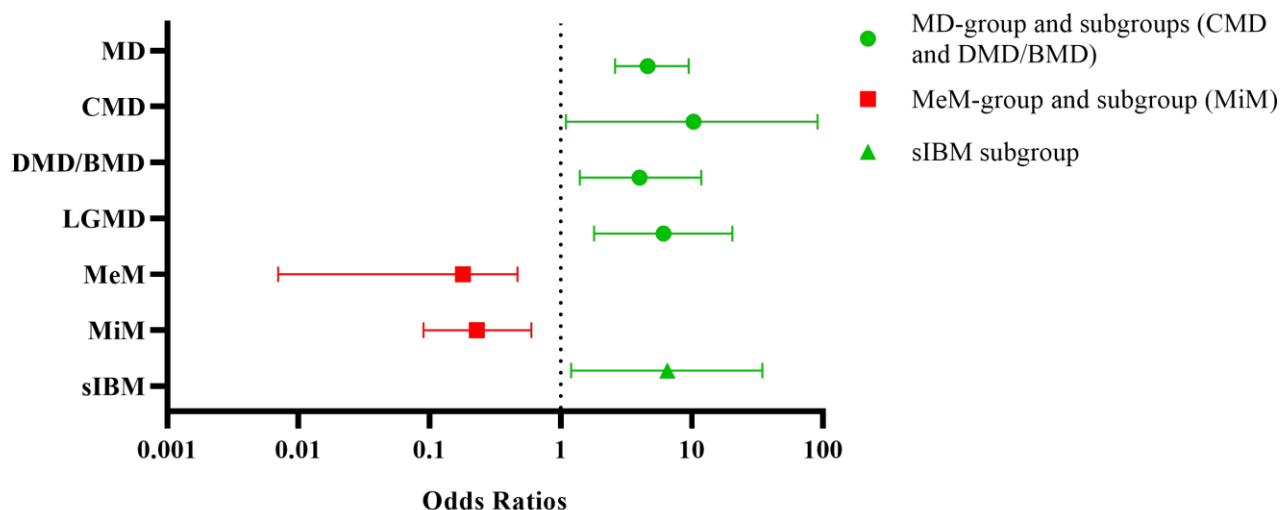
**Figure 21. Representation of odds ratios of the different categories, groups and subgroups with significant association) to presence of NFs in muscle biopsies among the total series. \* IMNM has significant association but as NFs were a constant, OR was not able to be calculated.**

### 2.2.c. ENDOMYSIAL FIBROSIS

The group of MD had the highest percentage of biopsies with EF in the total series. The odds of MD were 5 times higher in biopsies with EF than in biopsies without EF (OR 4.6 [95% CI: 2.6-9.5],  $P < 0.001$ ). Some subgroups of MD as CMD, dystrophinopathy and LGMD also showed significant association with EF compared to the total series (OR 10.3 [95% CI: 1.1-90.9],  $P = 0.025$  for CMD, OR 4 [95% CI: 1.4-11.8],  $P = 0.015$  for dystrophinopathy and OR 6.1 [95% CI: 1.8-20.4],  $P = 0.002$  for LGMD).

In IM, only the subgroup of sIBM showed significant association to EF (OR: 6.5 [95% CI: 1.2-34.5],  $P = 0.023$ ).

It should be noted that the odds of MeM were 6 times higher in biopsies without EF than in biopsies with EF (OR 0.18 [95% CI: 0.07-0.47],  $P < 0.001$ ) (Figure 22).



**Figure 22. Representation of odds ratios of the different groups or subgroups with significant association to presence of EF in muscle biopsies among the total series..**

#### 2.2.d. NEO-MYHC+ FIBRES

Due to technical reasons or scarce residual tissue material, we performed immunohistochemical study for neo-MyHC in 62.8% of biopsies (n=172). We identified neo-MyHC+ fibres in almost all biopsies (94.8%).

Among total series, the group of MeM was significantly associated with absence of neo-MyHC+ fibres. The odds MeM were 7 times higher in biopsies without neo-MyHC+ fibres than in biopsies with neo-MyHC+ fibres (OR 0.1 [95% CI: 0.03-0.6], P=0.012) (Figure 23).

Half of the biopsies with neo-MyHC+ fibres (59.5%) had them in abundance. The difference in the amount of neo-MyHC+ fibres in biopsies was significantly marked in IM (OR 2.1 [95% CI: 1.1-4.2], P=0.024). The subgroup of IM, IMNM, showed 4 times higher odds in biopsies with abundant neo-MyHC+ fibres compared to biopsies with few neo-MyHC+ fibres (OR: 3.6 [95% CI: 1.3-10], P=0.011) (Figure 24).



On the contrary, TM group was significantly associated with the presence of few neo-MyHC + fibres rather than abundant ones: proportion of TM was 15.2% in biopsies of the total series with few neo-MyHC + fibres vs 2.1% in biopsies with abundant neo-MyHC + fibres (OR 0.1 [95% CI: 0.02-0.6], P=0.004).

A group of ND, PN, was also associated with few neo-MyHC+ fibres rather than to abundant neo-MyHC+ fibres, compared to the total series (OR: 0.3 [95% CI: 0.10-0.7], P=0.004) (Figure 24).

Finally, comparing among subgroups of the same group, PM and CNM showed fewer neo-MyHC+ fibres than the other subgroups of IM and CM, respectively (OR 0.2 [95% CI: 0.04-0.9], P=0.044 and OR:-; P=0.015, respectively).

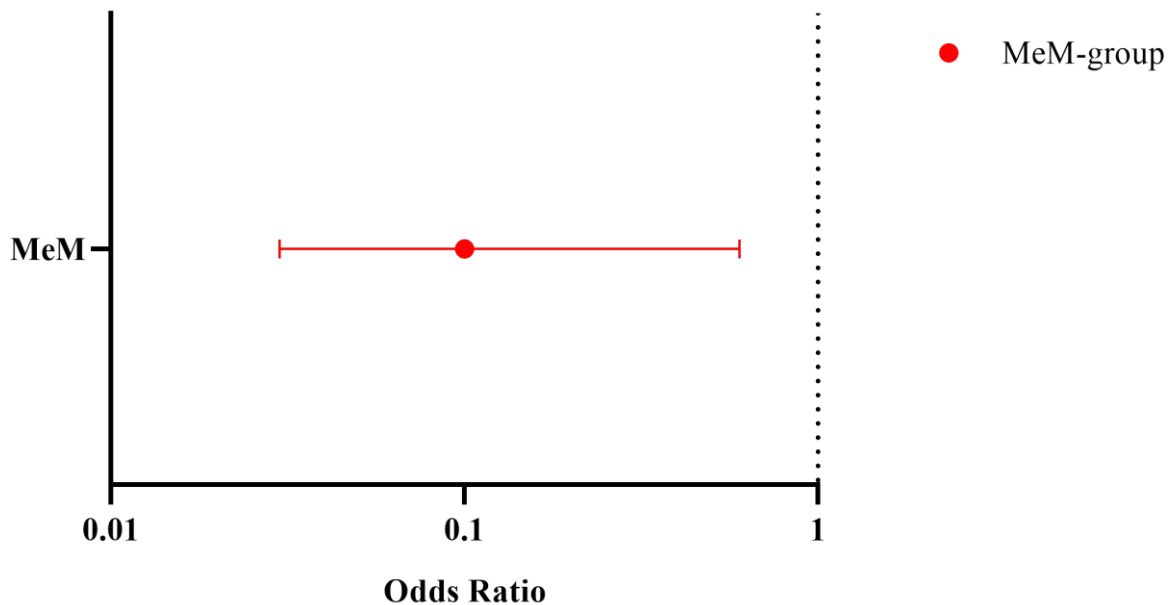
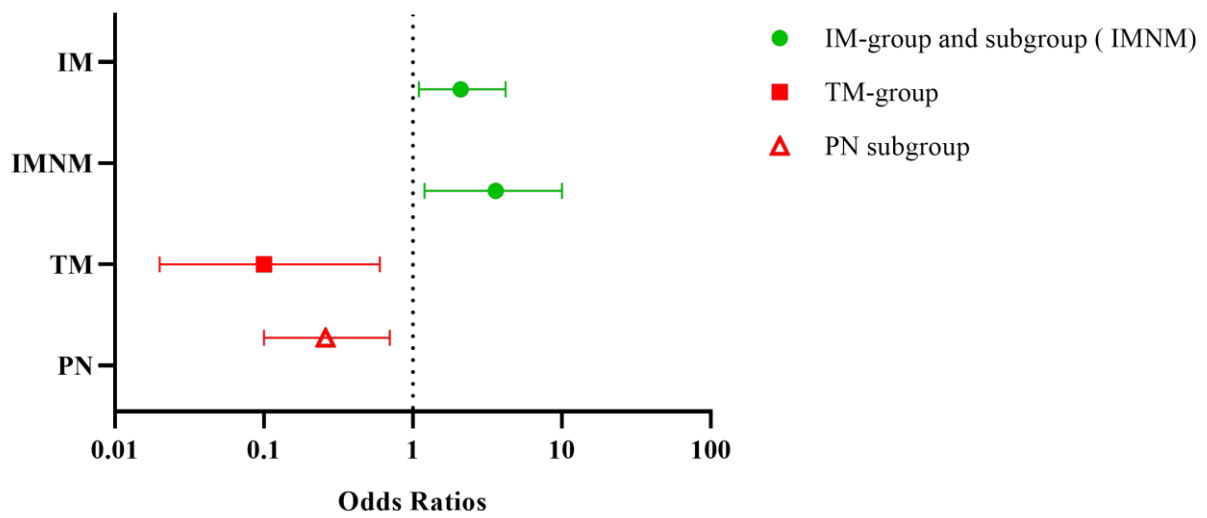


Figure 23. Representation of odd ratio of the MeM group to presence of neo-MyHC+ fibres in muscle biopsies.



**Figure 24. Representation of odd ratios of the groups and subgroups with significant association to presence of abundant neo-MyHC+ fibres in muscle biopsies among the total series. \* CSIM has significant association but few neo-MyHC+ fibres was a constant and OR was not able to be calculated.**

### **2.3. DIFFUSE UTROPHIN EXPRESSION (DUE) PATTERN**

Muscle biopsies employed as controls, as expected, showed that utrophin expression was restricted to capillary endothelial cells of endomysium and smooth muscle of arteries and veins.

SUE was observed in 60.6% of biopsies (n=166) in the total series. DUE was the pattern in 55.4% of biopsies with SUE (33.6% of the total series; n=92).

#### 2.3.a. RELATION WITH SEX

Most of biopsies with SUE were from males (59.6%), but we did not find significant differences between sexes (P=0.332). In the same way, most of the biopsies with DUE pattern were from males (68.5%), but in this case, we did find significant differences. Proportion of biopsies with DUE pattern was 40.1% in males, and 24.8% in females. Masculine sex doubled the odds of DUE pattern in biopsies (OR: 2 [95%CI: 1.2-3.4], P=0.008). However, if we excluded patients with dystrophinopathy from the total series we did not find significant difference between sexes.

#### 2.3.b. RELATION WITH AGE RANGES AT BIOPSY

Distribution of biopsies with SUE and DUE-pattern is represented in Table 6 and Figure 25.

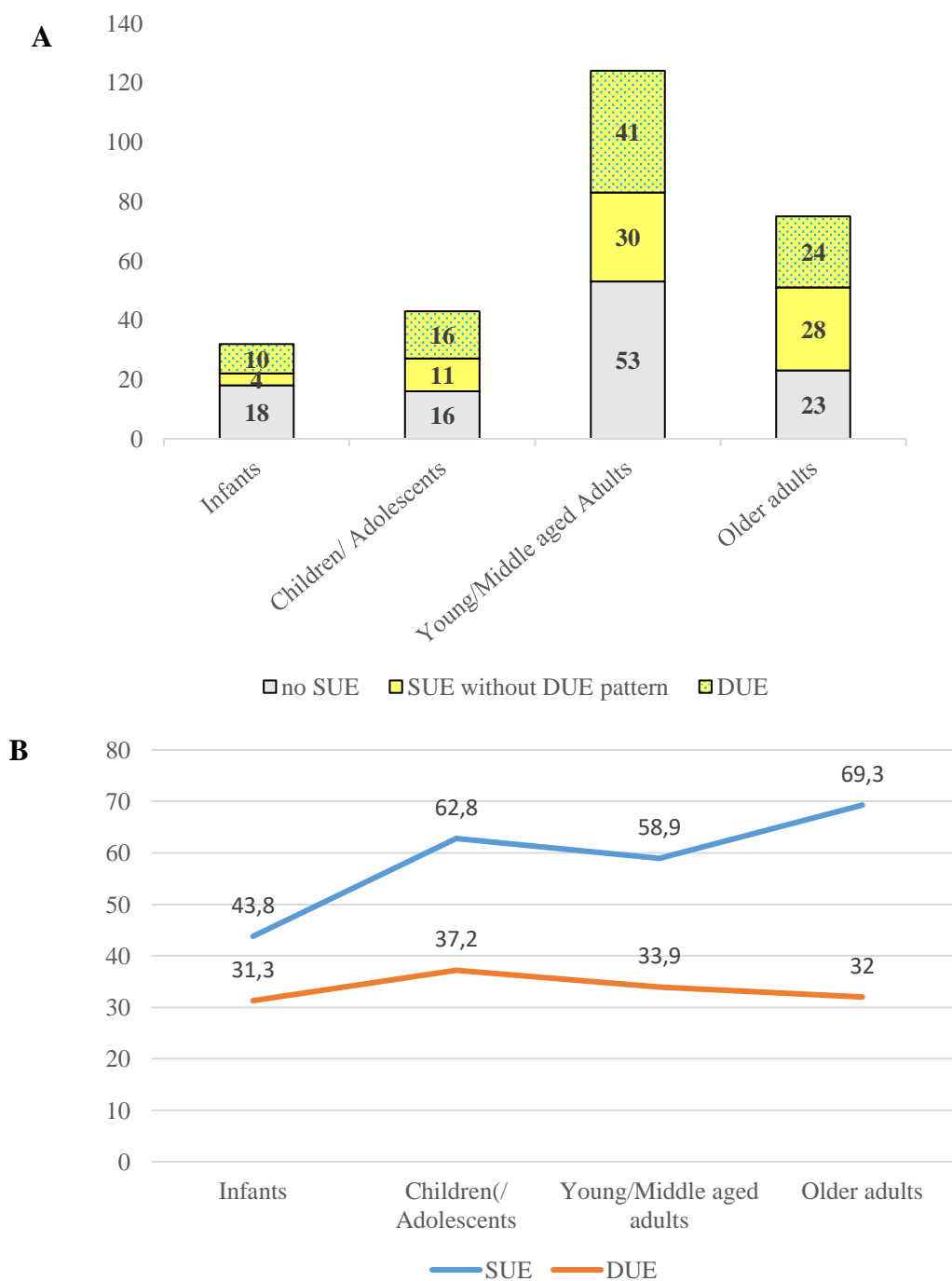
Most cases with SUE were adults (75.3%). We evidenced that 62.8% biopsies from adults showed SUE, while in minors, the percentage of biopsies with SUE was lower (54.7%). Regarding DUE pattern, most of biopsies with DUE were adults (71.7%). However, the percentage of biopsies with DUE-pattern was similar in minors and adults (34.7% vs 33.2%).

#### IV. CAPÍTULO 2 DUE: Diagnostic value and associated factors

DUE was the predominant pattern for biopsies with SUE in all age ranges, except in older adults. We did not find significant association between SUE or DUE-pattern and adults, minors nor any age-range. Nevertheless, the percentage of biopsies with SUE slightly increased with the age, while DUE remained similar (Figure 25B).

	<b>Infants</b>	<b>Children/Adolescents</b>	<b>Young-Middle aged adults</b>	<b>Older adults</b>
<b>SUE</b>	14 (43.8%)	27 (62.8%)	73 (58.9%)	52 (69.3%)
<b>DUE</b>	10 (31.3%)	16 (37.2%)	42 (33.9%)	24 (32%)
<b>SUE without DUE-pattern</b>	4 (12.5%)	11 (25.6%)	31 (25%)	28 (37.3%)
<b>Proportion of DUE pattern in biopsies with SUE</b>	71.4%	59.3%	57.6%	46.2%
<b>Cases in total series</b>	32	43	124	75

**Table 6. Distribution of biopsies with SUE and DUE-pattern in the total series according to different age ranges and percentage of biopsies with DUE-pattern among biopsies with SUE.**



**Figure 25. Representation of percentages of biopsies with SUE and DUE-pattern in the total series in the different age ranges.**

**A:** Representation of DUE pattern regarding SUE in biopsies of different age ranges.

**B:** Representation of the evolution of percentage of biopsies with SUE and DUE pattern in biopsies of the different age ranges.

### 2.3.c. RELATION WITH DIAGNOSTICS

Regarding the three categories we observed that in myopathy category, SUE was observed in 60.9% of biopsies (n=140) and DUE was the predominant pattern in biopsies with SUE (56.4%) (n=79; 34.3% of biopsies in this category). In NMJD category, SUE was observed in 2 out of 3 biopsies (66.7%) and DUE was evident only in one case. Finally, SUE was observed in 24 out of 41 biopsies from the ND category (58.5%), and DUE pattern was evident in 50% with SUE (n=12; 29.3% of biopsies in this category).

According to this data, although myopathy category had the highest proportion of biopsies with SUE and DUE, it was only slightly higher than proportion in ND category (60.9% vs 58.5% and 34.3% vs 29.3%). We did not find significant association between any category and SUE nor DUE pattern comparing to the other two categories, or comparing myopathies and ND neither.

#### **Myopathies**

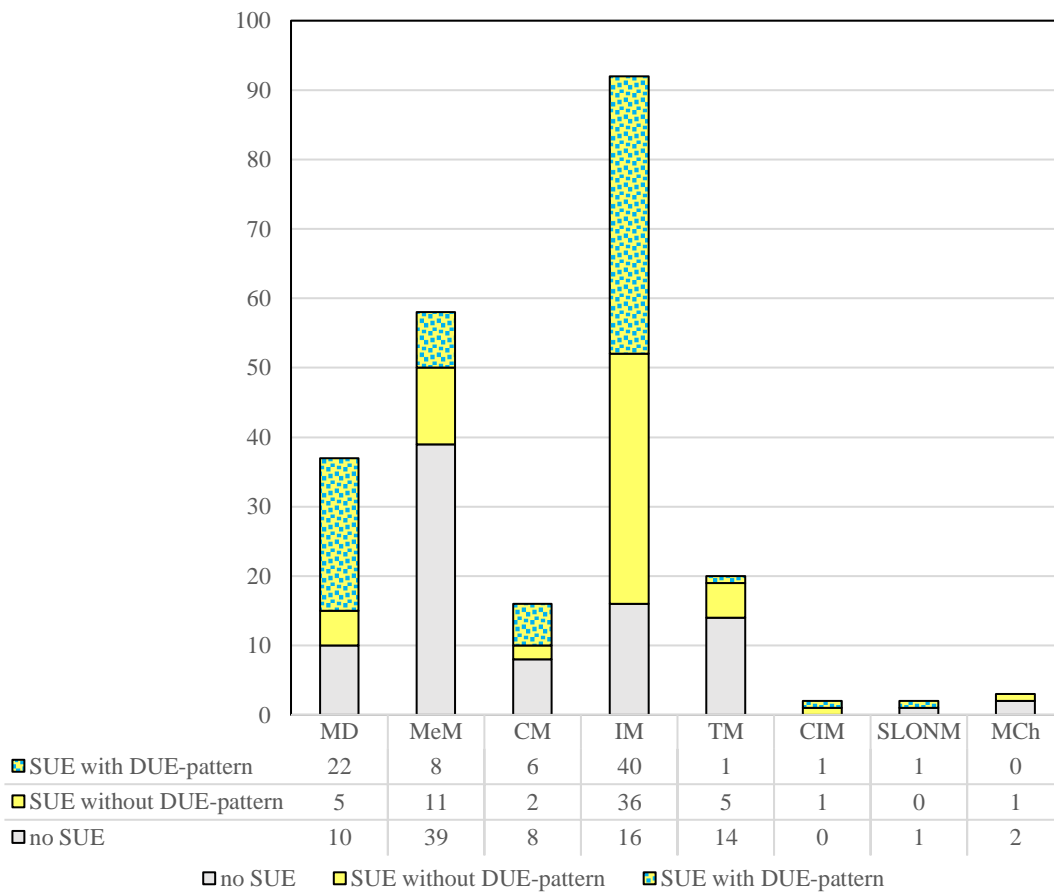
As a resume, among IM and MD groups, most of biopsies showed SUE (82.6% and 73%, respectively), while among MeM and TM groups, only a minority of biopsies showed SUE (32.8% and 30% respectively).

DUE was observed in most of the biopsies with SUE in MD (81.4%), CM (75%) and IM (52.6%), while was not the predominant pattern in MeM (42.1%) and TM (16.7%). Distribution of biopsies with SUE and DUE-pattern among the different myopathy groups is shown in Figure 26.

The main associations found between the myopathy groups and DUE pattern are discussed below:

Muscular dystrophies

Muscle fibres with SUE were evident in 27 biopsies (73%), and DUE was the predominant pattern (59.5% of biopsies) (Figure 27). DUE demonstrated significant association with MD group compared to other myopathies. The odds of MD were 3.5 higher in myopathies with DUE-pattern compared to those without it (OR 3.5 [95% CI: 1.7-7.1], P<0.001) (Figure 30).



**Figure 26. Distribution of biopsies with SUE, and DUE-pattern among the different groups of myopathies.**

MD: muscular dystrophies, MeM: metabolic myopathies, CM: congenital myopathies; IM: inflammatory myopathies; TM: toxic myopathies; CIM: critical illness-myopathy; SLONM: sporadic late-onset nemaline myopathy; MCh: muscular channelopathies.

*Dystrophinopathies*

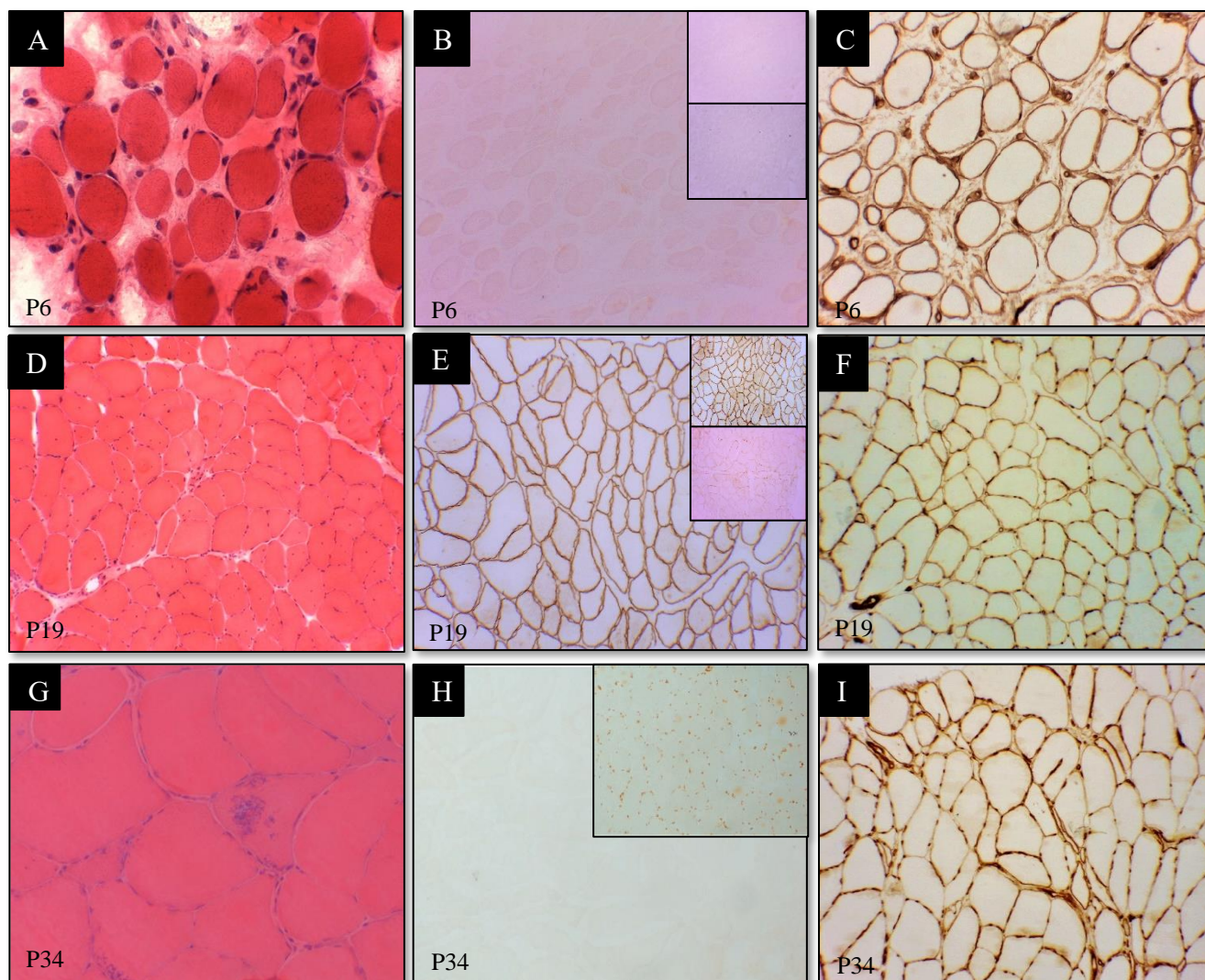
Muscle fibres with SUE were evident in 14 biopsies (93.3%), and DUE-pattern was present in 13 (86.7%): 100% of DMD, 80% of BMD and 100% of DMD-carrier.

Presence of SUE was almost constant. In the group of MD, the proportion of dystrophinopathy was 59.1% in biopsies with DUE compared to 13.3% in biopsies without DUE. The odds of dystrophinopathy were 9 times higher in biopsies of MDs with DUE pattern than in biopsies without DUE (OR: 9.4 [95% CI: 1.7-52.6], P=0.005) (Figure 30). Notice that we did not find significant differences between DMD and BMD biopsies regarding the presence of DUE (P=0.736).

*Other MDs*

SUE was evident in 13 biopsies of non-dystrophinopathy patients (59.1%), and DUE was again the predominant pattern, (69% of biopsies with SUE). However, if we excluded patients with dystrophinopathy, we did not find significant differences between the rest of MDs and other groups of myopathies regarding the presence of DUE pattern (P=0.268).





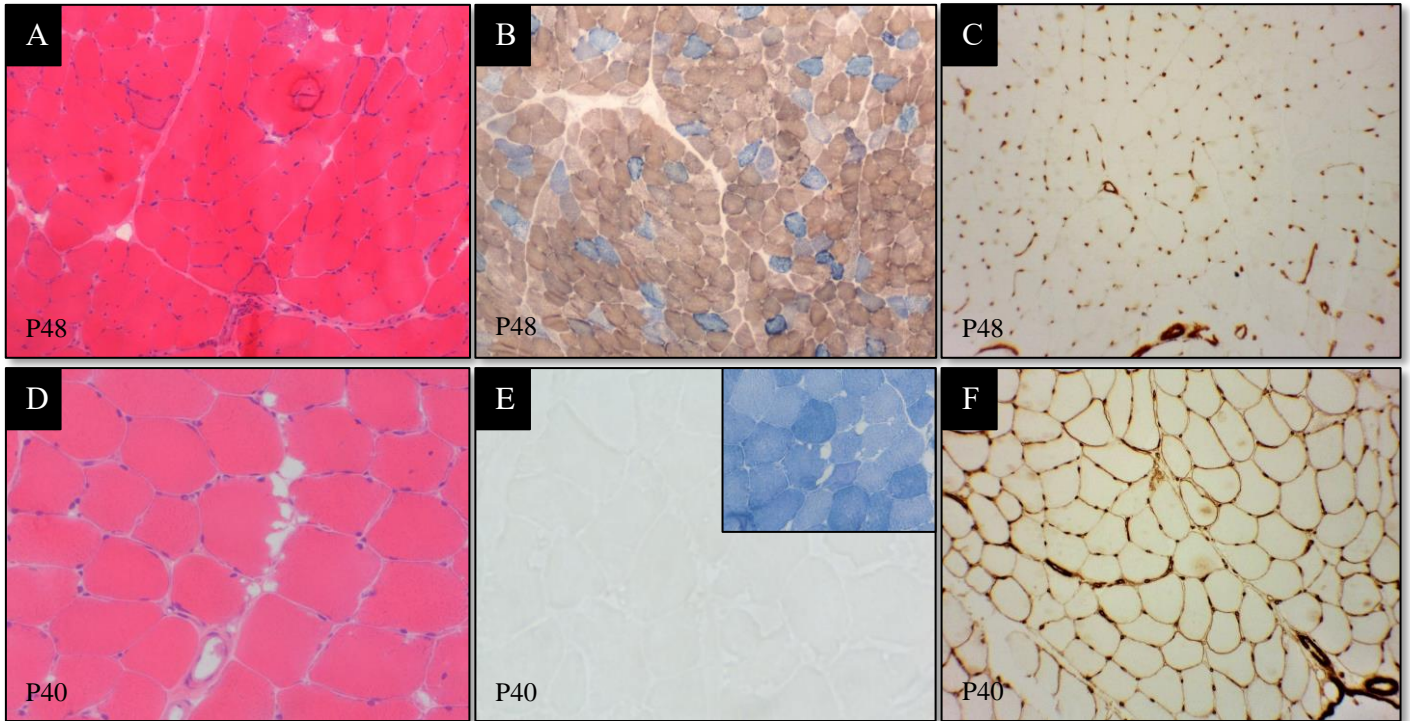
**Figure 27. MD group: examples of biopsies with DUE pattern.**

**DMD P6 (A-C):** H&E 20X (A); IHC for dystrophin 10X: absence of immunostaining for the three domains: -CT domain large, -NT domain right upper corner up, -RD right upper corner down (B); IHC for utrophin with DUE pattern 20X (C); **BMD P19 : (D-F):** H&E 10X (D); IHC for dystrophin 10X: absence of immunostaining for -NT domain: -CT domain large, -RD domain right upper corner up, -RD right upper corner down) (E); IHC for utrophin with DUE pattern 10X (F); **EDMD P34: (G-I):** H&E 20X (G); IHC for emerin 10X: absence of immunostaining (emerin control: right upper corner) (H); IHC for utrophin with DUE pattern 10X (I).

### Metabolic myopathies

SUE was evident only in 19 biopsies (32.8%). Half of them showed DUE pattern (13.8%), and most of the biopsies with DUE were MiM. However, in the MiM subgroup, DUE was a minority pattern among biopsies with SUE (6/16 cases, 37.5%). In GSDs, DUE was the only pattern observed among SUE (2/2 cases) (Figure 28).

MeM group was associated with absence of DUE. The odds of MeM was 5 times higher in myopathies without DUE-pattern than in those with DUE-pattern (OR 0.2 [95% CI: 0.1-0.5]  $P < 0.001$ ) (Figure 30).



**Figure 28. MeM group: examples of biopsies with IHC for utrophin.**

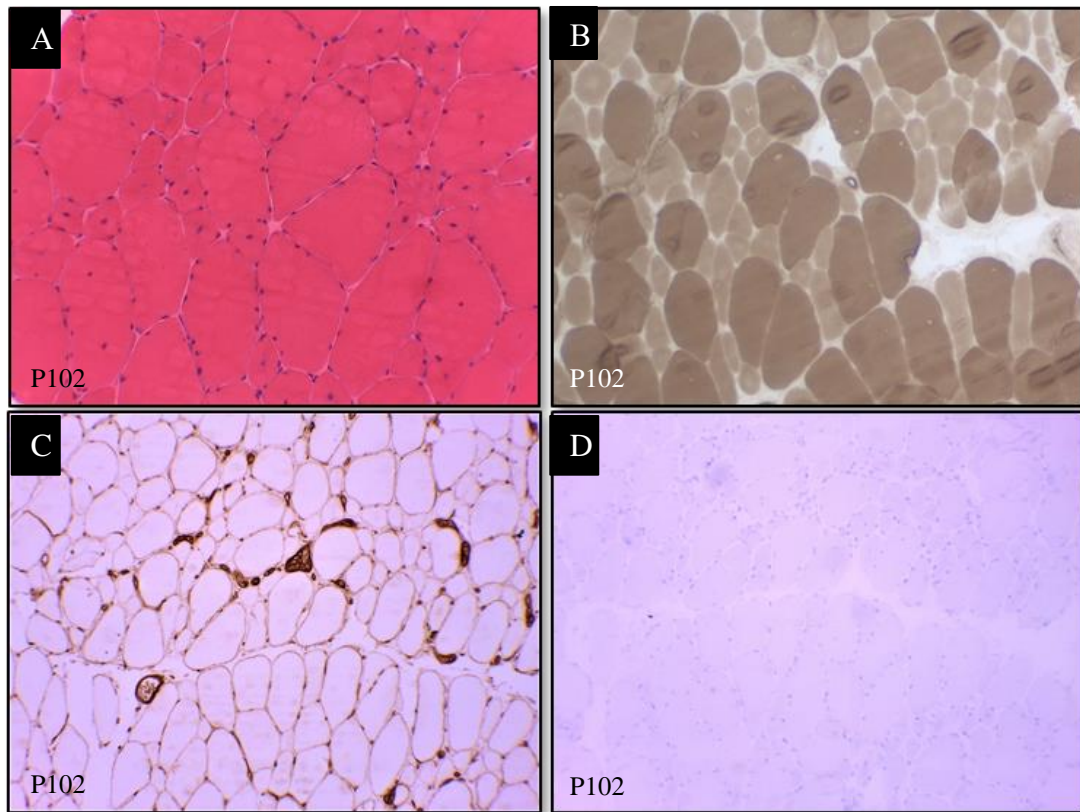
**MiM P48 (A-C):** H&E 10X (A); COX-SDH showing many COX-negative fibres 10X (B); IHC for utrophin with absence of SUE 10X (C).

**GSD type V P40 (D-F):** H&E 20X (D); FFL 20X: absence of staining (FFK staining as example in right upper corner) (E); IHC for utrophin with DUE pattern 10X (F).



Congenital myopathies

Half of the biopsies showed SUE (8/16). In those cases, DUE was the predominant pattern (6/8), representing 37.5% of the cases in this group: 55.6% of CNM and 25% of NM. Although many cases showed DUE pattern, we did not find statistically association regarding the rest of myopathies ( $P=0.783$ ) (Figure 29).



**Figure 29. CM group: examples of biopsy with IHC for utrophin.**

**CNM P102 (A-D):** H&E 20X, note small fibres with centralized nuclei (A); ATPase 9.4 pH 10X, note small fibres are type 1 (B); IHC for utrophin with DUE pattern 10X (C); IHC for neo-MyHC: note absence of immunostaining in this focus (isolated positive fibres were evident in other areas of the biopsy) (D).

### Inflammatory myopathies

Muscle fibres with SUE were evident in 76 biopsies (82.6%). DUE pattern was the most frequent pattern of SUE (40/76, 43.5%). sIBM and IMNM were the subgroups with more biopsies showing DUE (71.4% and 55.9%, respectively) while in DM and PM was much less frequent (37.5% and 13.3%, respectively). Notice that those cases of DM with DUE, usually showed higher intensity of the utrophin staining in perifascicular areas of the biopsy (Figure 31A-C), and 37.5% of DM exclusively showed SUE in a perifascicular immunostaining pattern.

DUE-pattern showed significant association with IM group comparing to the rest of myopathies: the odds of IM was almost double in myopathies with DUE compared to myopathies without DUE (OR 1.9 [95% CI: 1.1-3.4], P=0.017) (Figure 30).

Specific subgroups of IM also showed significant associations with presence of SUE and DUE-pattern. IMNM was associated with presence of SUE comparing to the rest of IMs (P=0.026) and the odds of IMNM was 3 times higher in myopathies with DUE than in myopathies without DUE (OR 2.9; 95%CI [1.4-6]; P=0.004) (Figure 30 and Figure 31D-E).

Interestingly, we found a significant association between absence of DUE-pattern and PM comparing to the rest of IMs. The odds of PM were 5 times higher in biopsies of IMs without DUE than in biopsies of IM with DUE (OR 0.2 [95% CI: 0.03-0.7], P=0.010 for DUE).

### Toxic myopathies

SUE was evident in 6 biopsies (30%), and DUE-pattern was only identified in one case (5%). This case was a patient with CSIM. The odds of TM vs other myopathies were

11 times higher in biopsies without DUE than in biopsies with DUE (OR: 0.09 [95% CI: 0.01-0.7], P=0.004) (Figure 30 and Figure 32).

Other myopathies

The rest of the groups of myopathies (CIM, SLONM, MCh) did not shown significant association with DUE. The number of cases with SUE and DUE are reported in Figure 26.

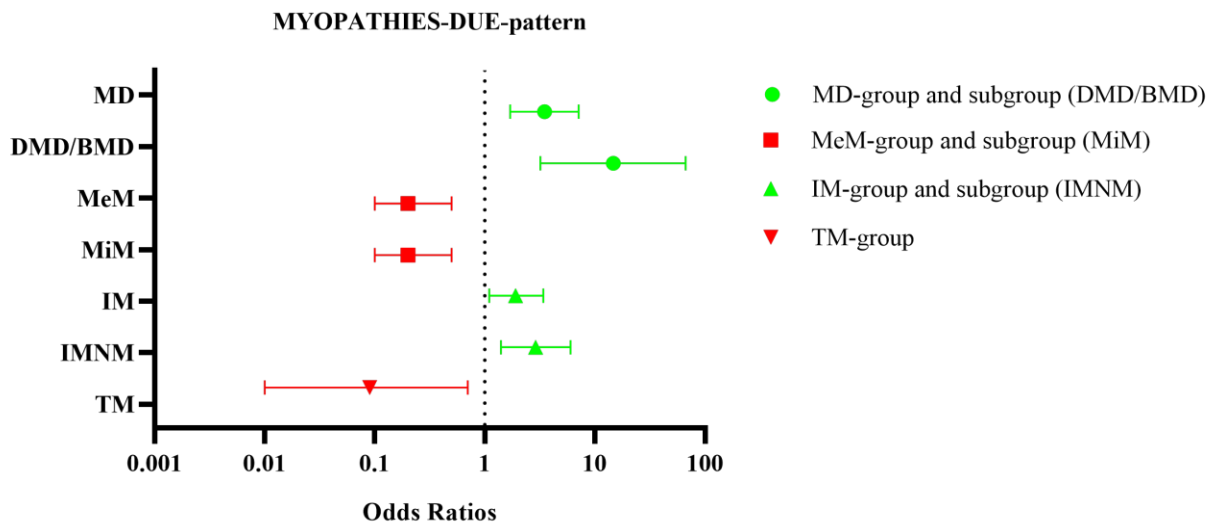
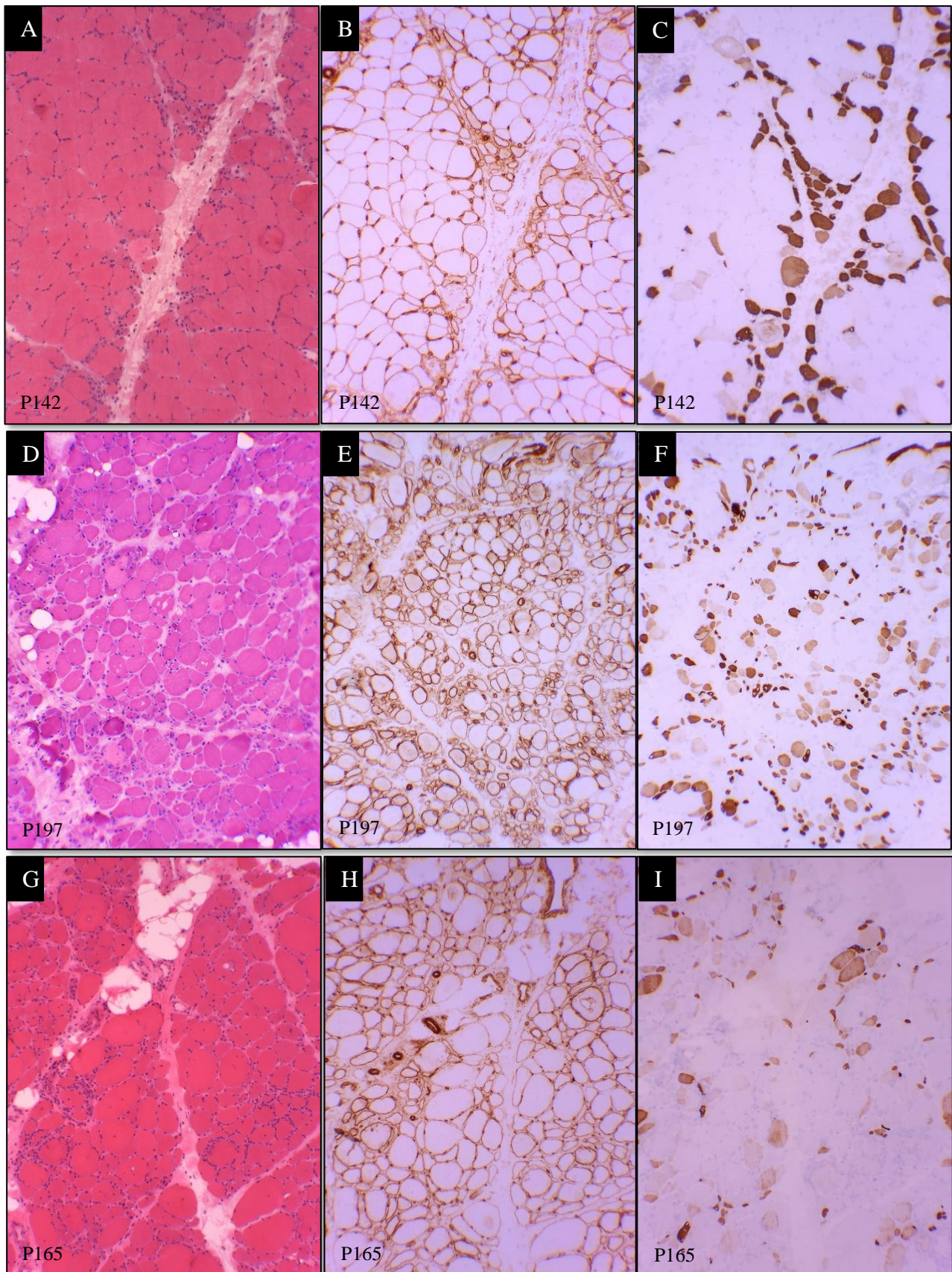


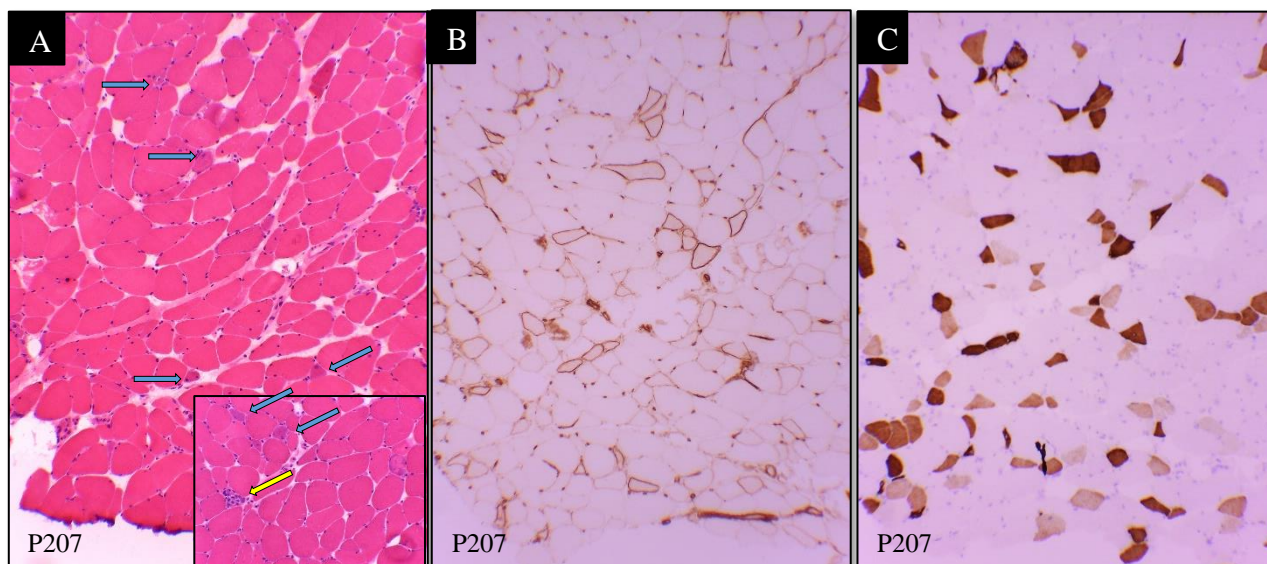
Figure 30. Representation of odds ratios of the different groups or subgroups with significant association to DUE pattern in muscle biopsies regarding the rest of myopathies.





**Figure 31. IM group: examples of biopsy with IHC for utrophin.** DM P142 (A-C): H&E 10X, note perifascicular distribution of atrophic fibres, RFs and NFs (A); IHC for utrophin with DUE pattern with higher intensity in perifascicular areas 10X (B); IHC for neo-MyHC: note a predominantly perifascicular immunostaining (C). IMNM P197 (D-F): H&E 10X (D); IHC for utrophin with DUE pattern 10X (E); IHC for neo-MyHC (F). sIBM P165 (G-I): H&E 10X (G); IHC for utrophin with DUE pattern 10X (H); IHC for neo-MyHC 10X (I).





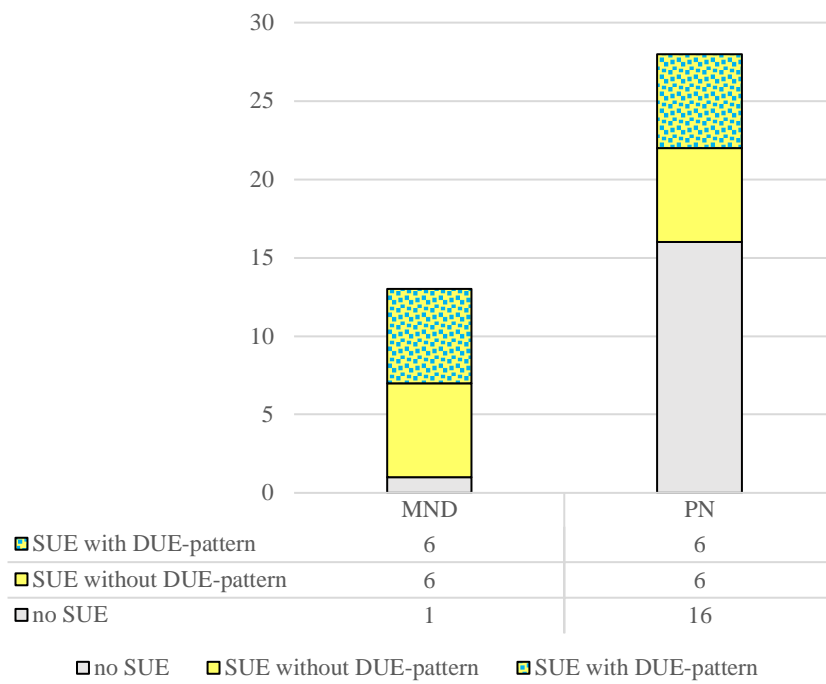
**Figure 32. TM group: example of biopsy with IHC for utrophin.**

**TM P207 (A-C):** H&E 10X, note isolated RFs (blue arrows) and one NF (yellow arrow in a magnification 20X) (A); IHC for utrophin with scattered fibres with SUE 10X (B); IHC for neo-MyHC 10X: widespread fibres with immunostaining. Mostly are the same fibres with SUE 10X (C).

### Neurogenic disorders

Almost all biopsies in the MND group showed SUE (92.3%), while only in 42.9% of biopsies from PN group. According to those findings, the odds of MND was 16 times higher in ND with SUE than in ND without SUE (OR 15.9 [95% CI: 1.8-142.9],  $P=0.003$ ) (Figure 33, Figure 34 and Figure 35).

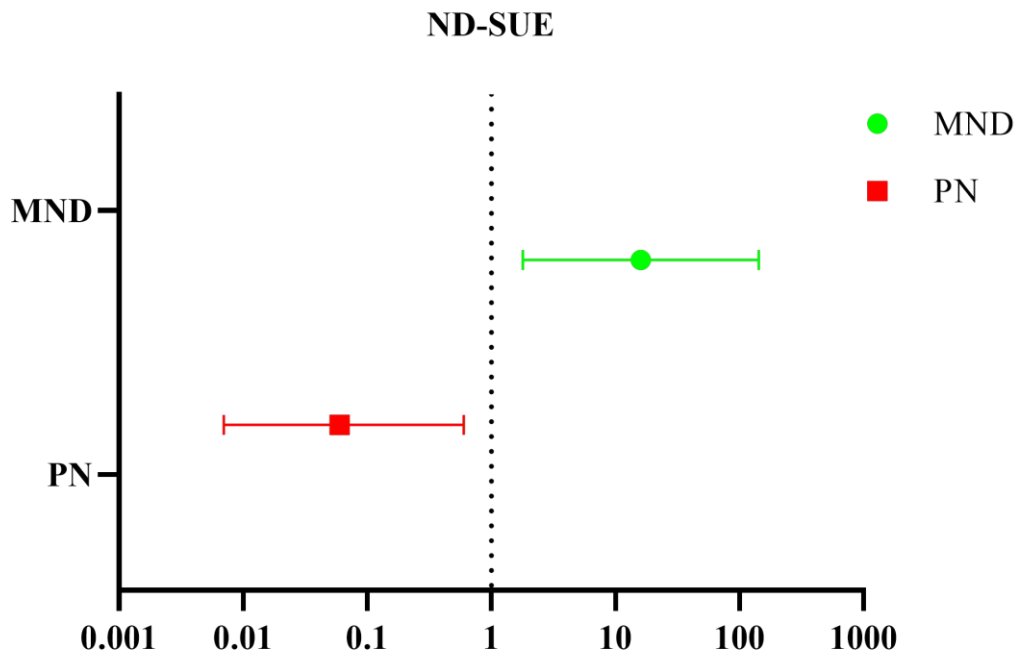
Regardless the presence of SUE, DUE was observed in 46.2% of biopsies from the group of MND and 21.4% from PN. However, DUE pattern did not showed any significant difference between them ( $P=0.146$ ).



**Figure 33. Distribution of biopsies with SUE, and those with DUE-pattern among the different groups of ND.**

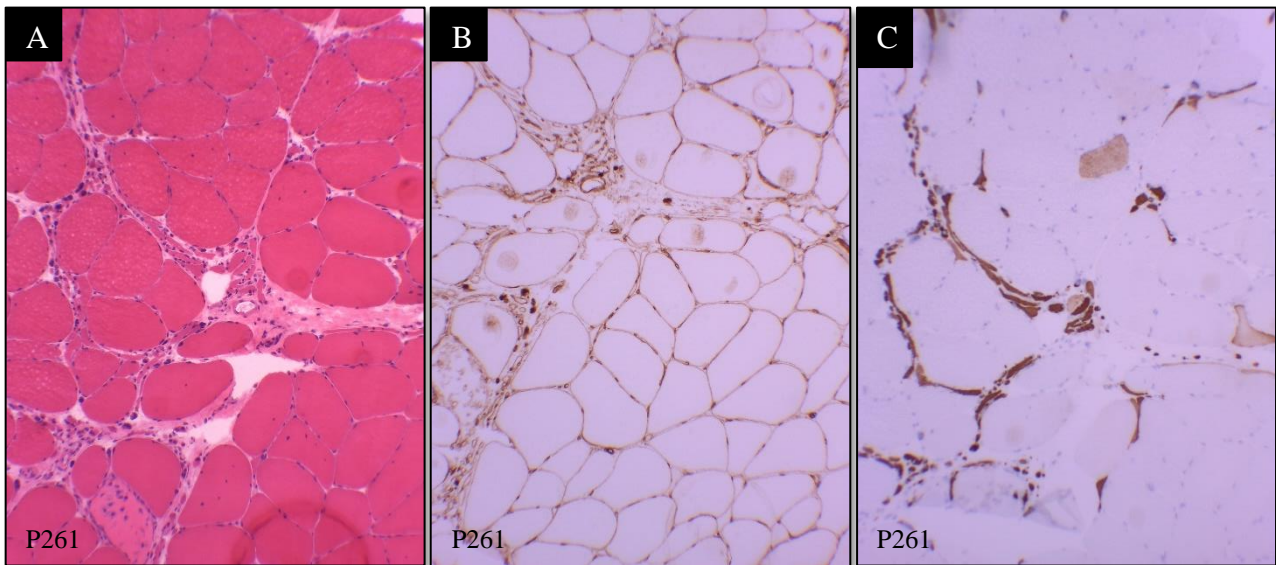
ND: neurogenic disorders; MND: motor neuron disease; PN: peripheral neuropathy.





**Figure 34. Representation of odds ratios of the different groups with significant association to SUE in muscle biopsies regarding to the rest of ND.**

ND: neurogenic disorders; SUE: sarcolemmal utrophin expression.



**Figure 35. ND category: example of biopsy with IHC for utrophin.**

PN P261 (A-C): H&E 20X, note grouped atrophic fibres and one NF (bottom of the image) (A); IHC for utrophin with DUE pattern 20X (B); IHC for neo-MyHC 20X: scattered atrophic fibres with immunostaining 20X (C).

### 2.3.d. RELATION WITH HISTOLOGICAL FINDINGS

SUE was evident in 87% of biopsies with RFs, 84.6% of biopsies with NFs and in 81% of biopsies with EF.

#### **Regenerative fibres**

Regarding DUE pattern and RFs in the total series, the proportion of biopsies with DUE was 54.6% in biopsies with RFs, and 19.9% in biopsies without RFs. (Figure 36). The odds of DUE pattern in the total series were 5 times higher in biopsies with RFs than in those without RFs (OR 4.8 [95% CI: 2.8-8.3],  $P < 0.001$ ).

In addition to the total series, significant association between RFs and DUE was found in myopathies (OR 5.2 [95% CI: 2.9-9.4],  $P < 0.001$ ), as well as in MD and IM groups (OR 10.7 [95% CI: 2.2-51.5],  $P = 0.002$ ; OR 6 [95% CI: 2-17.7],  $P = 0.001$ ). The strongest association was found in MD group, in which the odds of DUE pattern were 11 times higher in biopsies with RFs than in biopsies without RFs.

Significant difference between abundant RFs or few RFs and presence of DUE was not found in the total series. However, in the myopathy category, the odds of DUE pattern were doubled in biopsies with abundant RFs compared to biopsies with few RFs (OR 2.4 [95% CI: 1.1-5.5],  $P < 0.029$ ).

#### **Necrotic fibres**

Regarding DUE pattern and NFs in the total series, the proportion of biopsies with DUE was 54.7% in biopsies with NFs, and 17.8% in biopsies without NFs (Figure 36). The odds of DUE pattern in the total series were 6 times higher in biopsies with NFs than in those without NFs (OR 5.6 [95% CI: 3.2-9.6],  $P < 0.001$ ). The association between

presence of NFs and DUE was also confirmed after removing the influence of RFs (CMH OR 3.4 [95% CI: 1.8-6.3],  $P < 0.001$  for the total series).

Furthermore, significant association between NFs and DUE was also evident in myopathy category (OR 6.1 [95% CI: 3.3-11.2],  $P < 0.001$ ) and in MD and IM groups. The strongest association was found in with MD and IMNM groups, in which the odds of DUE pattern was 14 times and 8 times higher in biopsies with NFs than in biopsies without NFs, respectively (OR 13.6 [95% CI: 2.7-68],  $P = 0.001$  in MD group and OR 8.49 [95% CI: 2.3-30.7],  $P < 0.001$  in IMNM group).

Significant difference between abundant NF or few NF and presence of DUE was not found in the total series, or any group.

### **Endomysial fibrosis**

Regarding DUE pattern and EF in the total series, the proportion of biopsies with DUE pattern was 58.2% in biopsies with EF, and 23.6% in biopsies without EF (Figure 36). The odds of DUE pattern in the total series were 4.5 times higher in biopsies with EF than in biopsies without EF (OR 4.5 [95% CI: 2.6-7.9],  $P < 0.001$ ).

Significant association between EF and DUE was found in myopathies (OR 5.2 [95% CI: 2.8-9.6],  $P < 0.001$ ), and IM group (OR 5.3 [95% CI: 2-13.6],  $P < 0.001$ ), but unlike for RFs and NFs, EF was not significantly associated to DUE in MD group.

The association between presence of EF and DUE was also confirmed after removing the influence of RFs (CMH OR 3.6 [95% CI: 1.9-6.5],  $P < 0.001$  for the total series).

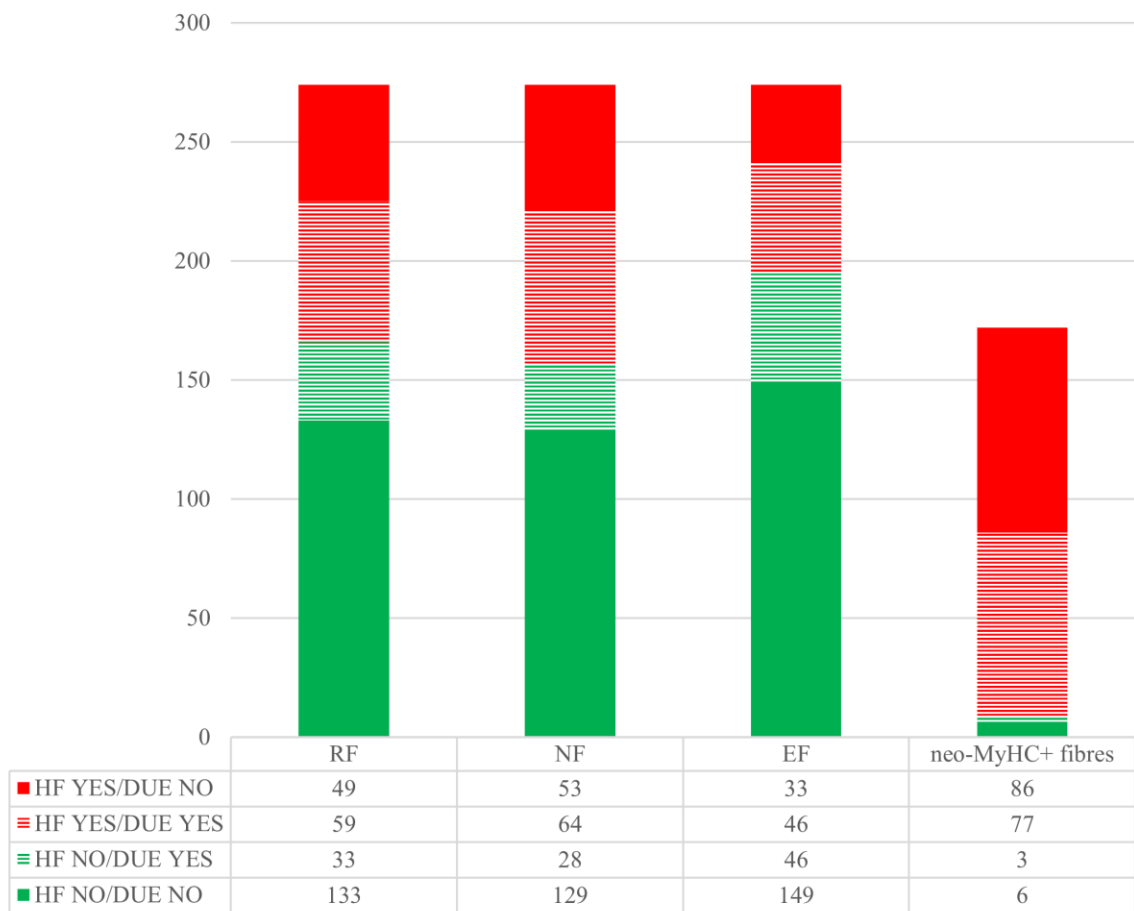
We did not find significant differences between high or mild EF and presence of DUE in the total series or in any group.

### **Neo-MyHC+ fibres**

Regarding DUE pattern and neo-MyHC+ fibers in the total series, DUE pattern was evident in 47.2% of biopsies with neo-MyHC+ fibres and in 33.3% of biopsies without neo-MyHC+ fibres (Figure 36), with no statistically significant differences (P=0.506).

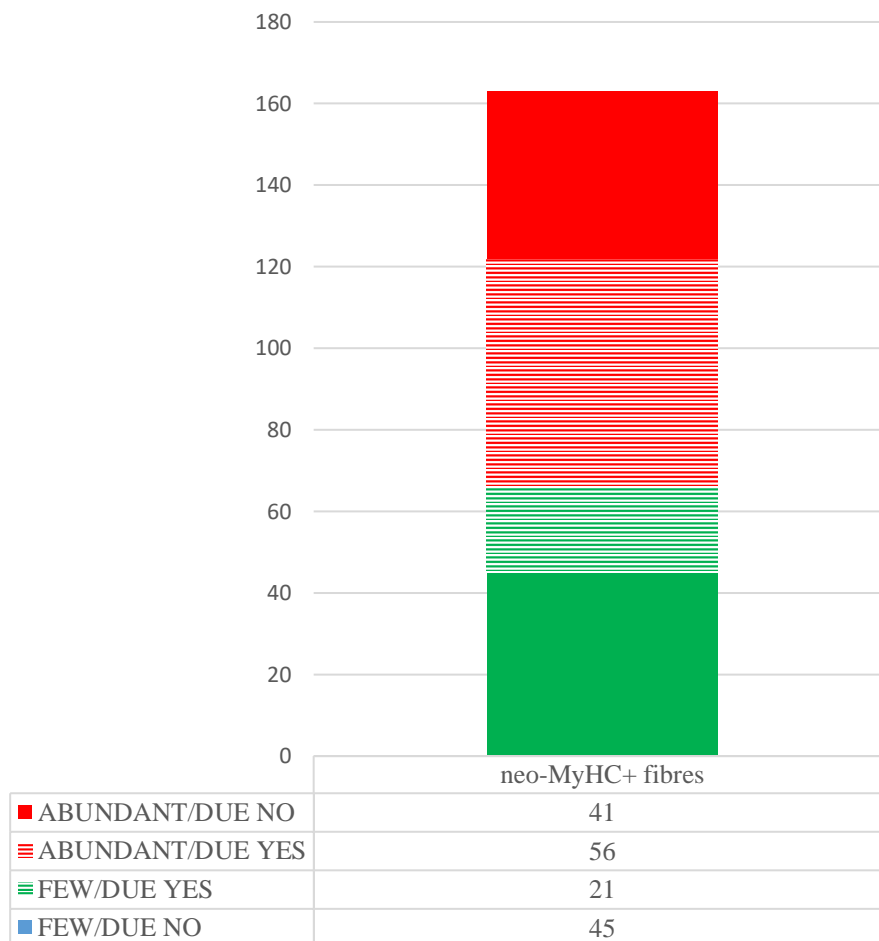
The proportion of biopsies with DUE was 57.7% in biopsies with abundant neo-MyHC+ fibres and 31.8% in biopsies with few neo-MyHC+ fibres (Figure 37). The odds of DUE in the total series were 3 times higher in biopsies with abundant neo-MyHC+ fibres than in those with few neo-MyHC+ fibres (OR 2.9 [95% CI: 1.5-5.6], P=0.001). This association was also found in the category of myopathies (OR 2.7 [95% CI: 1.3-5.7], P=0.007), as well as in the IM group, in which the odds of DUE pattern were 6 times higher in biopsies with abundant neo-MyHC+ fibres than in those with few neo-MyHC+ fibres (OR 5.6 [95% CI: 1.6-19.7], P=0.004).

IV. CAPÍTULO 2 DUE: Diagnostic value and associated factors



**Figure 36. Distribution of the different number of biopsies with/without RF, NF, EF or neo-MyHC+ fibres and presence/absence of DUE-pattern.**

RF: regenerative fibres; NF: necrotic fibres; EF: endomyxial fibrosis; HF: histological finding; DUE: diffuse utrophin expression.



**Figure 37. Distribution of the different number of biopsies with abundant/few neo-MyHC+ fibres and presence/absence of DUE-pattern.**  
 DUE: diffuse utrophin expression.

### 3. DISCUSSION

Utrophin is a protein with great structural similitude to dystrophin. SUE after foetal period in extrafusal fibres of skeletal muscle, outside the neuromuscular junction, has been explained as a compensatory mechanism for supporting sarcolemma in dystrophinopathies (Man et al., 1991, Tanaka et al, 1991, Voit et al., 1991, Khurana et al., 1991, Helliwell et al., 1992). Nevertheless, Helliwell et al. described that SUE is not only restricted to fibres with dystrophin deficiency, as it was also evident in fibres with normal expression of dystrophin in other myopathies (e.g. LGMD, CMD, IM) (Helliwell et al., 1992). Similar cases were described by other authors (Karpati et al., 1993, Teijeira et al., 1998, Lukáš, 1999, Shim et al., 2003). Additionally to SUE, a particular DUE pattern has been observed in muscle biopsies in dystrophinopathies, mainly in DMD (Helliwell et al., 1992, Sewry et al., 1994, Teijeiro et al., 1998), but this DUE pattern has not been widely described in other NMD in the literature.

We have evaluated the presence of both SUE and DUE and corroborated that utrophin is abnormally expressed not only in dystrophinopathies. Likewise, we demonstrated that DUE pattern can be found not only in dystrophinopathies but in many other entities, both myopathic and neurogenic. In fact, neither SUE nor DUE is significantly associated to any diagnostic category, so the presence of DUE itself does not distinguish a myopathy from a ND.

Thus, DUE was also observed in other myopathies as MD (CMD, LGMD, EDMD), MeM (GSD, MiM), CM (NM, CNM), IM (DM, PM, sIBM, IMNM) as well as in NMJD and ND (MND and PN), all of them with preserved sarcolemmal dystrophin expression.

Moreover, DUE was the predominant pattern in biopsies with SUE in the total series, myopathies, some groups of myopathies (e.g. MDs, CMs, and IMs) and subgroups (e.g. GSD, CNM, sIBM and IMNM) and even in one neurogenic subgroup (SMA). Those findings contribute to establish definitively that DUE pattern is not linked to the diagnosis of dystrophinopathies.

We found significant association between presence of DUE and MD. But, as expected, this association could be explained by the inclusion of dystrophinopathies (DMD and BMD) in the group of MD. Furthermore, we found a significant association between presence of DUE and IM, and additionally the subgroup of IMNM.

Interestingly, we additionally found a significant relation between absence of DUE and other two diagnostic groups (MeM and TM) compared to the rest of myopathies. These results would indicate that the presence of DUE in the muscle biopsy of a myopathy case would make the diagnosis of MD or IM the most probable, as well as the diagnosis of MeM or TM the least probable. These findings in the biopsy could be helpful to orientate the diagnosis, especially in those cases with non-specific clinical phenotype or no other clue findings in the muscle biopsy.

Although no significant association was found between ND and DUE, we outline that SUE was evident in almost 60% of muscle biopsies of this category, and almost 30% of all cases of NDs showed a DUE pattern. Even though in ND a correct diagnosis is usually straightforward based in clinical data and specific histopathological changes, there are cases with confusing pseudo-myopathic pattern (i.e. SMA), or pseudo-dystrophic pattern (i.e. long-standing neurogenic process) that could be doubtful. Therefore, it is important to remember that SUE is common and that DUE may be present in NDs as well, to avoid interpreting these cases as myopathies.



Beyond the compensatory function of utrophin originally proposed when dystrophin is absent or reduced, a regenerative role has also been proposed (Galvagni et al., 2002; Gramolini et al., 1999a, 1999b; Lin et al., 1998; Wilson et al., 1994; Helliwell et al., 1992). In line with this, we have observed SUE and DUE pattern in diagnostic groups with presence of RFs. In fact, we found significant association between the presence of RFs and DUE in the total series and in myopathies, specifically in MD and IM groups. Furthermore, not only the presence but abundant RFs were significantly associated with DUE pattern in myopathies. On other hand, neo-MyHC is a protein highly expressed in skeletal muscle fibres during the foetal period until 4-6 m after birth (Sewry et al., 2021), and it is expressed in RFs after necrosis (Ciciliot et al., 2010), in denervated fibres and after other forms of injury (Sewry et al., 2021). In our series, the presence of abundant neo-MyHC+ fibres was also associated with the presence of DUE in the total series and in the myopathies. Altogether, these findings confirm a relation between utrophin overexpression and the muscle regenerative process. According to this, muscle in myopathies triggering high regenerative activity, either acute or chronic, would more likely show DUE. In fact, in our series, MD and IM, both diagnostic groups significantly associated to abundant RFs and neo-MyHC+ fibres, respectively, were associated with presence of DUE as previously exposed. Conversely, the association with absence of DUE in the MeM and TM groups may be explained by the association to absence of RFs and to few neo-MyHC+ fibres, respectively.

Utrophin has been reported to be down-regulated prior to neo-MyHC in RFs (Wilson et al., 1994). In our series it must be noticed that in biopsies with DUE, the expression of utrophin was evident not only in RFs or neo-MyHC+ fibres, but also in fibres with normal appearance and absence of neo-MyHC immunostaining. The same findings have been reported in dystrophinopathy patients (Helliwell et al., 1992) and in

an animal model (Wilson et al., 1994). This expression of utrophin in those fibres with normal appearance was considered as a mark of fibres that have undergone a previous regenerative process as a mechanism of response to stress (Helliwell et al., 1992), or even as a protective role of utrophin in the already regenerated fibre against necrosis due to a second cycle of fibre degeneration (Wilson., 1994). However, in our large series we have also observed utrophin expression in normal fibres of NMDs different from dystrophinopathies, opening even more the question about the role of utrophin in NMDs.

We observed that presence of NFs was also associated with DUE in the total series, and in the category of myopathies, and specifically in IM group and sIBM subgroup, denoting that an active process of muscle degeneration with subsequent NFs could trigger DUE. The presence of EF denotes a chronic process in which muscle degeneration exceed regeneration. However, we found that EF is not an impediment for utrophin expression, as we found that presence of EF was associated to DUE in the myopathy category and some specific myopathy groups. Regarding the severity of EF, in the group of MD more than 90% of biopsies with mild EF showed DUE compared to 50% of biopsies with high EF that showed DUE. It might reflect a trend to support that a high level of EF probably hinder utrophin expression, which would be consistent with previous observations of an inverse correlation between level muscle fibrosis and utrophin in the mdx mice (Levi et al., 2015). Likewise, utrophin would protect against new cycles of damage as long as its expression persisted, with the corresponding delay in the development of abundant fibrosis that declines with the disease progression.

Finally, we evaluated the association of sex and age with DUE. Most of the biopsies with DUE corresponded to male patients (64.6%) and both the total series and the category of myopathies showed significant association between DUE and male sex. However, OR was not significant when excluding patients with dystrophinopathies (X-

linked inheritance), so this association might be influenced by the inclusion of dystrophinopathies in the analysis. Regarding age, utrophin is referred to decrease until 26th week (Clerk et al, 1993), and from then, the utrophin expression is similar to the adult skeletal muscle, being restricted to the neuromuscular junction. In our series, we did not find association between any age range at biopsy and DUE. This would support the pathogenic meaning of utrophin expression in a muscle biopsy regardless the age of the patient. Nevertheless, although the percentage of biopsies with SUE increased with the age range, DUE remained similar. However, in our series, the different diagnostic groups were not uniformly distributed by age range, which may determine this observation.

In conclusion, after the analysis of a large series of muscle biopsies, we have showed that DUE is not exclusive of dystrophinopathies, and it is evident in many other NMD, both myopathies and ND. Presence or absence of DUE pattern may help to orientate the diagnosis in certain biopsies with not conclusive clinical or histological findings. Among myopathies, DUE would support a diagnosis of MD and IM, while absence of DUE would support the diagnosis of MeM and TM; among ND, SUE would support a MND. DUE is both associated with RFs and abundant expression of neo-MyHC, confirming the involvement of utrophin in muscle regeneration. In addition, histological changes as NFs and EF are associated to DUE, which may indicate the capacity to respond to damage of the muscle fibre while viable. The presence of DUE in normal appearance myofibres of NMD would support that the role of utrophin exceeds the compensatory function in cases of dystrophin deficiency.



## **V. DISCUSIÓN FINAL**



## V. DISCUSIÓN FINAL

Las NMD son en general patologías crónicas, a menudo incapacitantes y sin tratamiento curativo, con un origen predominantemente genético. Su diagnóstico en muchas ocasiones es complejo y precisa de una conjunción de datos clínicos (una adecuada historia clínica que incluya antecedentes familiares y una exploración física sistemática por grupos musculares), y técnicas complementarias como el estudio electrofisiológico y la biopsia muscular. La incorporación de técnicas de imagen como la MRI, y sobre todo, de nuevos estudios genéticos han contribuido a dar una mayor definición a muchas entidades y por tanto mejorar el proceso diagnóstico.

El estudio de la biopsia muscular sigue siendo, no obstante, sumamente útil al definir patrones histológicos de afectación. Permite en la mayoría de ocasiones una buena aproximación diagnóstica inicial, y en el caso de que se identifiquen ciertos hallazgos con IHC o EM, incluso confirmar el diagnóstico.

Nos hemos centrado en el estudio de dos proteínas estructurales de la fibra muscular (titina y utrofina) para demostrar la utilidad de la EM y la IHC en la orientación diagnóstica de pacientes con NMD. Lo hacemos a propósito del estudio de patología relacionada con mutaciones en el gen *TTN*, y de la valoración de la expresión sarcolémica anómala de utrofina con patrón DUE, respectivamente.

Por un lado, es indudable el papel de la EM en el diagnóstico de NMD. Particularmente destaca su aportación en el grupo de las CM, donde ha permitido describir con detalle lesiones ultraestructurales que caracterizan morfológicamente verdaderos diagnósticos (e.g. lesiones de tipo *core* o *minicore*, cuerpos nemalínicos, agregados tubulares, CB o *caps*, entre otras). En estos y otros procesos, la descripción morfológica detallada ha orientado el diagnóstico y la clasificación de NMD, resultando ser, junto con el estudio histológico en LM, pruebas que aportan objetividad diagnóstica. Las técnicas de diagnóstico genético desarrolladas con posterioridad han venido a

## V. DISCUSIÓN FINAL

refrendar en gran medida los hallazgos morfológicos descritos con antelación, estableciendo firmes correlaciones entre histología/ultraestructura y genética.

En la actualidad, las técnicas de secuenciación masiva como la NGS, se han convertido en una potente herramienta diagnóstica, tanto por la capacidad intrínseca de la prueba, como por su cada vez mayor disponibilidad. Las técnicas de NGS amplían de manera extraordinaria la posibilidad de encontrar no sólo mutaciones ya conocidas sino también nuevas variantes (Vasli et al., 2013), cuyo significado es preciso intentar esclarecer para considerarlas bien como origen de la patología, bien como hallazgos no relacionados con esa patología concreta, o bien directamente sin relevancia clínica. En este sentido, estudios de segregación familiar o estudios funcionales pueden ayudar a hacer esa diferenciación.

Con esta consideración, hemos descrito las alteraciones histomorfológicas en biopsias musculares de pacientes con mutaciones en *TTN* consideradas como patogénicas, con especial atención al estudio ultraestructural, para establecer correlaciones entre el fenotipo y genotipo. Hemos definido las alteraciones o patrones de daño presentes en los distintos fenotipos clínicos, de cara a ayudar en la consideración patológica de futuras variantes o nuevos fenotipos clínicos relacionados con *TTN*. En este sentido, hemos descrito el amplio espectro de alteraciones histomorfológicas que pueden darse en biopsias musculares en estos pacientes, reconociendo patrones histológicos en los diferentes fenotipos clínicos, así como lesiones ultraestructurales comunes. Destacan agregados proteicos electrodensos como CB y nemalinas y disrupciones sarcoméricas heterogéneas. Además de desorganizaciones a modo de *minicores*, se ven otras más particulares, correspondientes a pequeñas desorganizaciones que afectan a uno sólo o pocos sarcómeros adyacentes. Junto a los focos de *streaming* de la línea Z a lo largo de todo el sarcómero o sólo en parte de él a modo de pequeños "banderines", hemos



## V. DISCUSIÓN FINAL

identificado en las formas recesivas unas áreas claras con pérdida de filamentos gruesos que parecen iniciarse con la disolución de la línea M y luego extenderse por toda la estructura sarcomérica, respetando la línea Z. La peculiaridad de estas características las distinguiría de otras de tipo “pequeños *minicores*” descritos en otras patologías y hace que convenga tenerlas en cuenta en caso de encontrar nuevas variantes génicas en *TTN*, con un cuadro clínico compatible.

La IHC es una técnica fundamental en el diagnóstico histopatológico, implantada de rutina en la práctica totalidad de Servicios de Anatomía Patológica, puesto que es una herramienta, rápida, económica, fácilmente reproducible y que aporta además objetividad diagnóstica. En el estudio de patología neuromuscular, en biopsias musculares, tiene un papel prioritario. Esto es así porque en muchas NMD hay alteraciones en la expresión proteica por pérdida total o parcial de inmunorreactividad o localización anómala. Éste último sería el caso de la utrofina. La SUE se ha relacionado clásicamente al déficit total o parcial de la distrofina en un tipo de distrofia muscular particular (distrofinopatías), con un patrón tipo DUE particular. Posteriormente se ha descrito SUE en fibras musculares de otras NMD (Helliwell et al., 1992; Lukáš, 1999; Teijeira et al., 1998) y se ha relacionado con fenómenos de regeneración (Gramolini et al., 1999; Lin et al., 1998; Wilson et al., 1994, Sewry et al., 1992), en series de casos limitados. No obstante, el patrón DUE no ha sido especialmente referido en la literatura.

En nuestra experiencia diaria observamos patrón DUE en biopsias musculares más allá de en distrofinopatías, por lo que nos planteamos la posibilidad de que se asociase significativamente también a otros grupos diagnósticos. Con nuestro trabajo hemos confirmado que el patrón DUE está presente en las distrofinopatías, tanto de DMD como en BMD sin diferencia significativa entre ambas. Pero también hemos demostrado que el patrón DUE no es exclusivo de las distrofinopatía, sino que también está presente en

## V. DISCUSIÓN FINAL

grupos de miopatías de muy diversa etiología sin déficit de distrofina, e incluso en ND. La presencia de este patrón no es de partida un elemento diferenciador entre miopatías y ND, por lo que no debe tenerse en cuenta en el diagnóstico diferencial. No obstante, dentro de la categoría de miopatías sí parece tener una capacidad diferenciadora. Encontramos DUE en la práctica totalidad de grupos, pero su presencia se asocia significativamente a las distrofias, fundamentalmente a las distrofinopatías y las IM. Por el contrario, la ausencia de DUE se asocia con las MeM y las TM. De manera similar, dentro de la categoría de las ND el hallazgo de SUE se asocia con las MND.

Asimismo, hemos confirmado la relación de la utrofina y del propio patrón DUE con la regeneración muscular y la presencia de fibras con expresión de neo-MyHC. De hecho, las IM, que se asocian con DUE, también lo hacen significativamente con la presencia de RF y abundantes fibras con neo-MyHC. Por el contrario, las MeM y las TM se asocian con ausencia de RF y/o escasa expresión de miosina neonatal, lo cual explicaría asimismo la asociación significativa entre esos grupos y la ausencia del patrón DUE. No obstante, el propio patrón DUE supone una expresión de utrofina que excede en gran medida el número de RF o con expresión de miosina neonatal. La expresión de utrofina en estas fibras de apariencia normal parece ir más allá de fenómenos de regeneración o de la propia compensación de déficit de distrofina. Se ha explicado por la persistencia de la capacidad de regeneración de la fibra muscular otorgando un papel protector (Wilson et al.,1994), que podría si no frenar, al menos enlentecer el proceso degenerativo.

En conclusión, hemos evidenciado la importante contribución que aportan la EM y la IHC en el estudio de patología relacionada con estas proteínas titina y utrofina. Una vez orientada la biopsia con técnicas convencionales, permiten: 1) en el caso de la titina, ayudar a considerar la probable patogenicidad de las mutaciones en *TTN*, tras la integración con los datos clínicos, y 2) en el caso de la utrofina, detectar una DUE, para

## V. DISCUSIÓN FINAL

orientar un posible diagnóstico, así como valorar la capacidad regenerativa persistente en el tejido. Del mismo modo, ambas técnicas abren nuevos planteamientos de estudio: a) confirmar la particularidad de las lesiones descritas en EM y del mecanismo subyacente a la distorsión sarcomérica en miopatías relacionadas con *TTN*, y b) identificar nuevos roles para la utrofina y valorar su potencial aplicación en terapia a modo de elemento protector para retrasar el daño de la fibra muscular en ciertas NMD.



## **VI. CONCLUSIONES /**

## **CONCLUSIONS**



## CAPÍTULO UNO

- I. Las mutaciones patogénicas de *TTN* provocan un amplio espectro de hallazgos histopatológicos que representan patrones reconocibles y alteraciones estructurales, que podrían ayudar a considerar la patogenicidad de futuras nuevas variantes de *TTN*.
- II. Dada la heterogeneidad de fenotipos clínicos, genética e histomorfología, el diagnóstico de las titinopatías debe ser resultado de la integración de los diferentes hallazgos. En pacientes con sospecha de titinopatía, la presencia de agregados electrodensos tipo CB y nemalinas, RV, internalización de núcleos y desorganizaciones sarcoméricas heterogéneas pueden ayudar al diagnóstico.
- III. Las disrupciones sarcoméricas descritas en pacientes con titinopatías son 1) áreas de desorganización miofibrilar focales y múltiples que se asemejan a *minicores*, 2) *streaming* de la línea Z a lo largo del sarcómero o bien a modo de pequeños "banderines", 3) lesiones particulares a modo de áreas claras con pérdida de miofilamentos y una línea Z casi intacta y 4) grandes áreas de acúmulo de material proteico con pérdida miofibrilar, por lo que su identificación en pacientes con esa sospecha podría contribuir a su diagnóstico.
- IV. Las áreas claras con pérdida de filamentos gruesos descritas en EM parecen iniciarse con la disolución de la línea M y luego extenderse por toda la estructura del sarcómero, y son particularmente diferentes de las lesiones clásicamente descritas como *minicores*, pero se necesitan análisis histopatológicos en mayor profundidad para valorar la especificidad de estas lesiones.

## CAPÍTULO DOS

V. El patrón DUE se asocia de forma significativa a las distrofinopatías, tanto DMD como BMD, pero no es exclusivo de ellas, ya que está presente en múltiples NMD con conservación de inmunoexpresión de distrofina, tanto miopatías como ND.

VI. La presencia de DUE no distingue entre miopatía y ND.

VII. La presencia de DUE apoya que una biopsia miopática corresponda a una MD o a una IM, mientras que la ausencia de DUE hace más probable que el diagnóstico sea MeM o TM.

VIII. El patrón DUE se asocia tanto con la presencia de RF como con la presencia de abundantes fibras con expresión de neo-MyHC, lo que confirma la participación de la utrofina en la regeneración muscular.

IX. La presencia de NF y EF se asocia con DUE, apoyando que la existencia de un daño agudo o crónico en la fibra muscular no impide su capacidad de regeneración con expresión de proteínas como la utrofina.

X. La presencia de patrón DUE en fibras musculares de apariencia normal en NMD con expresión de distrofina, apoya que el papel de la utrofina excede la función compensatoria en casos de deficiencia de distrofina, aunque se precisarían estudios adicionales para confirmar dichas funciones.



**CHAPTER ONE**

I. *TTN* pathogenic mutations lead to a large spectrum of histopathological findings, representing recognizable histological patterns and structural alterations that could help to support the pathogenicity of future novel *TTN* variants.

II. *TTN*-related myopathies have heterogenic clinical phenotypes, genetics and histomorphological features, so the different findings must be adequately integrated to achieve the diagnosis. In patients with suspected *TTN*-related myopathies, the presence of electron dense protein aggregates as CBs and nemaline bodies, RVs, internalized nuclei and sarcomere heterogeneous disorganizations, may help to the diagnosis.

III. Sarcomeric disruptions described in *TTN*-related myopathies are: 1) focal and multiple areas of myofibrillar disarray resembling minicores, 2) Z-line streaming spanning all along the sarcomere or resembling small “pennants”, 3) particular lesions as clear areas with loss of myofilaments with almost intact Z-line, and 4) large areas of accumulated protein material with myofibrillar loss. The identification of those sarcomeric disruptions in patients with this suspected pathology may contribute to diagnosis.

IV. Focal clear areas of myofibrillar disruption with loss of thick filaments may begin with the dissolution of the M-line and then can extend on the whole of the sarcomere structure. They seem particularly different from the classically described minicores, but further deep histopathological analyses are necessary to assess the exact specificity of these lesions.

**CHAPTER TWO**

V. DUE is significantly associated with dystrophinopathies (both DMD and BMD), but it is not exclusive to them, as it can be identified in different NMDs with dystrophin immunoexpression.

VI. Presence of DUE does not distinguish myopathy and ND.

VII. In a myopathy biopsy, the presence of DUE supports the diagnosis of MD or IM, while the absence of DUE makes more probable the diagnosis of MeM or TM.

VIII. DUE is associated with presence of RFs and abundant neo-MyHC+ fibres, supporting the involvement of utrophin in muscle regeneration.

IX. Presence of NFs and EF are also associated to DUE, supporting that instead an acute or chronic damage in the muscle fibre, regeneration capacity persists with expression of proteins as utrophin.

X. The presence of DUE in muscle fibres with normal appearance in NMD with normal expression of dystrophin supports that the role of utrophin exceeds its compensatory function in cases of dystrophin deficiency, although further studies are necessary to confirm that functions.

## **VII. APÉNDICES / APPENDICES**



**PUBLICACIÓN / PUBLICATION:**

Ávila-Polo R, Malfatti E, Lornage X, Cheraud C, Nelson I, Nectoux J, Böhm J, Schneider R, Hedberg-Oldfors C, Eymard B, Monges S, Lubieniecki F, Brochier G, Thao Bui M, Madelaine A, Labasse C, Beuvin M, Lacène E, Boland A, Deleuze JF, Thompson J, Richard I, Taratuto AL, Udd B, Leturcq F, Bonne G, Oldfors A, Laporte J, Romero NB. Loss of Sarcomeric Scaffolding as a Common Baseline Histopathologic Lesion in Titin-Related Myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2018, 77(12): 1101-1114.

doi: 10.1093/jnen/nly095

JCR Journal Impact Factor 2018: 3.460 (Q1 in category Pathology).



APPENDIX II

Diagnostics			Patient	Sex	Age at biopsy (y/m)	Muscle biopsed	SUE	DUE	RFs	neo-MyHC+ fibres	NFs	EF
Categories	Groups	Subgroups										
MYOPATHIES	DYSTROPHIES	CMD	1	M	1 m	Quadriceps	YES	YES	2	2*	1	0
		CMD	2	F	8 m	Quadriceps	NO	NO	2	2	1	2
		CMD	3	M	3 y	Quadriceps	YES	NO	0	NA	0	2
		CMD	4	F	3 y	Quadriceps	YES	NO	0	NA	0	2
		CMD	5	M	5 y	Quadriceps	YES	NO	2	NA	1	1
		DYS+	6	M	4 y	Quadriceps	YES	YES	2	2	1	2
		DYS+	7	M	1 y	Quadriceps	YES	YES	2	2	2	1
		DYS+	8	M	11 m	Quadriceps	YES	YES	1	NA	1	1
		DYS+	9	M	2 y	Quadriceps	YES	YES	2	2	2	1
		DYS++	10	M	12 y	NR	YES	YES	0	2	1	2
		DYS++	11	M	8 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0
		DYS++	12	M	21 y	Biceps	YES	YES	0	0	0	0
		DYS++	13	M	5 y	Quadriceps	YES	NO	2	2	0	0
		DYS++	14	M	14 y	Adductor hallucis	YES	YES	2	2	2	1
		DYS++	15	M	7 y	Quadriceps	YES	YES	2	2	0	0
		DYS++	16	M	1 y	Quadriceps	YES	YES	2	2	1	1
		DYS++	17	M	34 y	NR	YES	YES	0	1	1	0
		DYS++	18	M	5 y	Quadriceps	YES	YES	2	2	1	2
		DYS++	19	M	30 y	Gastrocnemius	YES	YES	1	1	2	0
		DYS+++	20	F	19 y	Quadriceps	YES	YES	0	0	0	1
		LGMD	21	F	57 y	Biceps	NO	NO	0	NA	0	2
		LGMD	22	F	13 y	Quadriceps	YES	YES	1	1	1	1
		LGMD	23	M	15 y	Gastrocnemius	YES	YES	2	2	2	1
		LGMD	24	M	35 y	Gastrocnemius	YES	YES	1	2	0	1
		LGMD	25	M	9 y	NR	YES	YES	2	2	2	1
		LGMD	26	F	29 y	Biceps	NO	NO	0	NA	0	0
		LGMD	27	F	20 y	NR	NO	NO	0	NA	2	2
		LGMD	28	F	10 y	Quadriceps	YES	YES	0	2	0	2
		LGMD	29	M	69 y	Gastrocnemius	YES	YES	2	1	2	1
		LGMD	30	M	18 y	NR	YES	YES	2	2	2	2
		LGMD	31	M	23 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0
		LGMD	32	M	22 y	Biceps	NO	NO	0	NA	0	0
		LGMD	33	F	61 y	Biceps	NO	NO	0	1	0	0

APPENDIX II

MYOPATHIES (cont.)	DYSTROPHIES (cont.)	EDMD	34	M	37 y	Quadriceps	YES	YES	0	2	1	0
		OPMD	35	F	76 y	NR	NO	NO	0	NA	0	0
		OPMD	36	F	68 y	NR	NO	NO	0	NA	0	0
		OPMD	37	M	60 y	NR	SI	NO	0	1	0	0
	METABOLIC MYOPATHIES	GSD†	38	M	6 y	NR	NO	NO	0	NA	0	0
		GSD††	39	M	50 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0
		GSD†††	40	F	40 y	NR	YES	YES	0	1	1	0
		GSD†††	41	M	26 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0
		GSD†††	42	M	28 y	Gastrocnemius	YES	YES	0	1	0	0
		GSD††††	43	M	45 y	NR	NO	NO	0	NA	0	0
		CPT2	44	M	34 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0
		CPT2	45	M	48 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0
		MiM	46	M	65 y	Quadriceps	YES	YES	1	NA	0	0
		MiM	47	F	47 y	Tibialis anterior	NO	NO	0	NA	0	0
		MiM	48	F	31 y	Deltoid	NO	NO	1	NA	0	0
		MiM	49	F	44 y	Biceps	NO	NO	0	NA	1	0
		MiM	50	M	77 y	Quadriceps	YES	NO	0	NA	0	0
		MiM	51	M	57 y	Deltoid	NO	NO	0	NA	0	0
		MiM	52	M	59 y	Tibialis anterior	YES	NO	0	NA	0	1
		MiM	53	M	47 y	Biceps	NO	NO	0	NA	1	0
		MiM	54	F	58 y	Biceps	YES	NO	0	NA	0	0
		MiM	55	F	17 y	Deltoid	YES	NO	0	NA	0	0
		MiM	56	F	59 y	Deltoid	NO	NO	1	NA	0	1
		MiM	57	F	63 y	Biceps	YES	NO	0	NA	2	0
		MiM	58	F	60 y	Biceps	YES	YES	0	1	2	1
		MiM	59	M	10 y	Quadriceps	YES	NO	0	NA	0	0
		MiM	60	M	57 y	Biceps	YES	NO	0	NA	0	0
		MiM	61	F	11 y	Quadriceps	NO	NO	0	1	0	0
		MiM	62	M	74 y	Biceps	NO	NO	0	NA	0	0
		MiM	63	M	23 y	Quadriceps	YES	YES	1	NA	0	2
		MiM	64	M	37 y	NR	NO	NO	1	1	1	0
		MiM	65	F	52 y	Biceps	YES	NO	0	NA	0	0
		MiM	66	F	41 y	Deltoid	NO	NO	0	NA	0	0
		MiM	67	M	53 y	NR	NO	NO	0	NA	0	0
	MiM	68	F	62 y	Biceps	YES	NO	0	NA	0	0	
	MiM	69	M	58 y	Deltoid	NO	NO	0	0	0	0	
	MiM	70	F	1 m	Quadriceps	YES	NO	0	2*	0	0	



APPENDIX II

MYOPATHIES (cont.)	METABOLIC MYOPATHIES (cont.)	MiM	71	M	1 y	Quadriceps	NO	NO	0	2	1	0	
		MiM	72	F	66 y	Biceps	NO	NO	0	0	0	0	
		MiM	73	M	25 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0	
		MiM	74	F	1 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0	
		MiM	75	M	2 y	NR	NO	NO	0	0	0	0	
		MiM	76	F	3 w	NR	YES	YES	0	2*	0	0	
		MiM	77	F	3 m	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0	
		MiM	78	M	4 m	Quadriceps	NO	NO	0	2	0	0	
		MiM	79	M	3 m	Quadriceps	YES	YES	0	2	0	0	
		MiM	80	F	8 m	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0	
		MiM	81	M	2 m	NR	NO	NO	0	2	0	0	
		MiM	82	M	18 y	Deltoid	NO	NO	0	NA	0	0	
		MiM	83	M	4 m	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0	
		MiM	84	F	7 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0	
		MiM	85	M	1 y	Quadriceps	NO	NO	0	1	1	0	
		MiM	86	M	11 m	Quadriceps	NO	NO	1	NA	0	0	
		MiM	87	M	8 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0	
		MiM	88	F	1 m	NR	NO	NO	0	2	0	0	
		MiM	89	F	5 m	Quadriceps	NO	NO	0	2	1	2	
		MiM	90	F	7 m	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0	
		MiM	91	F	4 y	NR	NO	NO	0	1	0	0	
		MiM	92	M	5 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0	
		MiM	93	M	3 y	Rectus abdominis	NO	NO	1	NA	0	0	
		MiM	94	F	28 d	Quadriceps	YES	YES	0	2*	0	0	
		MAD	95	M	44 y	NR	YES	NO	0	0	0	0	
		CONGENITAL MYOPATHIES	NemM	96	F	5 y	Quadriceps	NO	NO	1	2	0	0
			NemM	97	M	40 d	Quadriceps	NO	NO	0	2	0	1
			NemM	98	F	1 m	Quadriceps	YES	NO	0	2	0	1
NemM	99		M	4 d	Quadriceps	YES	YES	0	2*	0	0		
CNM	100		M	24 y	Quadriceps	YES	YES	0	1	2	0		
CNM	101		F	55 y	Biceps	YES	YES	0	1	0	2		
CNM	102		F	42 y	Deltoid	YES	YES	0	1	0	1		
CNM	103		M	29 y	Gastrocnemius	YES	NO	1	1	1	1		
CNM	104		M	42 d	Quadriceps	YES	YES	0	2*	0	0		
CNM	105		M	6 y	NR	NO	NO	1	NA	0	0		
CNM	106		F	65 y	NR	NO	NO	0	NA	0	0		
CNM	107		M	16 y	Quadriceps	YES	YES	1	1	0	0		

APPENDIX II

MYOPATHIES (cont.)	INFLAMMATORY MYOPATHIES	CNM	108	F	54 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	1
		CFTD	109	M	8 m	Quadriceps	NO	NO	0	2	0	0
		FTIU	110	M	3 y	NR	NO	NO	0	NA	0	1
		FTIU	111	M	10 m	Quadriceps	NO	NO	0	2	0	0
	DM	112	F	46 y	Biceps	YES	YES	2	2	2	0	
	DM	113	F	58 y	Deltoid	YES	NO	2	NA	2	0	
	DM	114	M	44 y	Deltoid	YES	YES	2	NA	1	0	
	DM	115	M	26 y	Quadriceps	YES	NO	1	NA	0	1	
	DM	116	M	48 y	Biceps	YES	YES	2	2	1	0	
	DM	117	M	30 y	Deltoid	YES	NO	1	NA	1	0	
	DM	118	M	25 y	Quadriceps	YES	NO	0	NA	0	0	
	DM	119	M	57 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0	
	DM	120	M	49 y	Biceps	YES	NO	1	NA	0	0	
	DM	121	F	57 y	Deltoid	YES	NO	2	2	2	2	
	DM	122	M	76 y	Quadriceps	YES	NO	2	2	2	2	
	DM	123	F	78 y	Deltoid	YES	NO	1	1	2	1	
	DM	124	M	46 y	Deltoid	YES	YES	2	2	2	0	
	DM	125	M	42 y	Gluteus	NO	NO	0	1	2	1	
	DM	126	F	81 y	Deltoid	YES	NO	2	2	2	1	
	DM	127	F	59 y	Quadriceps	YES	NO	0	1	0	0	
	DM	128	F	36 y	NR	YES	YES	1	2	1	1	
	DM	129	M	58 y	Deltoid	YES	YES	0	NA	2	2	
	DM	130	F	50 y	NR	YES	YES	2	2	0	0	
	DM	131	M	68 y	Deltoid	YES	NO	1	1	1	0	
	DM	132	M	78 y	Deltoid	YES	YES	2	2	2	0	
	DM	133	M	49 y	Deltoid	YES	YES	2	2*	2	2	
	DM	134	M	11 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	2	0	
	DM	135	M	8 m	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0	
	DM	136	F	6 y	NR	YES	NO	2	1	1	0	
	DM	137	F	6 y	Quadriceps	YES	NO	2	2	0	0	
	DM	138	M	50 y	Tibialis anterior	YES	NO	0	1	1	1	
	DM	139	M	3 y	Quadriceps	YES	NO	1	2	0	0	
	DM	140	F	9 y	Deltoid	YES	NO	2	2	1	0	
	DM	141	M	11 y	Quadriceps	YES	YES	2	1	1	0	
	DM	142	M	10 y	Quadriceps	YES	YES	2	2	2	0	
	DM	143	F	10 y	NR	YES	YES	2	2	2	1	
PM	144	M	52 y	NR	NO	NO	0	NA	0	0		

APPENDIX II

MYOPATHIES (cont.)	INFLAMMATORY MYOPATHIES (cont.)	PM	145	F	49 y	Biceps	YES	NO	0	NA	0	0
		PM	146	M	55 y	Biceps	YES	NO	1	1	1	0
		PM	147	F	39 y	Biceps	NO	NO	0	NA	0	0
	PM	148	F	60 y	Quadriceps	YES	YES	1	NA	1	1	
	PM	149	M	62 y	Deltoid	NO	NO	0	NA	0	0	
	PM	150	F	28 y	Deltoid	NO	NO	0	2	0	0	
	PM	151	F	61 y	Biceps	YES	NO	0	1	1	0	
	PM	152	F	28 y	Deltoid	NO	NO	0	1	1	0	
	PM	153	F	55 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0	
	PM	154	F	71 y	Quadriceps	YES	NO	2	2	0	0	
	PM	155	M	62 y	NR	NO	NO	0	0	0	0	
	PM	156	F	55 y	Quadriceps	YES	NO	0	1	0	0	
	PM	157	M	64 y	Quadriceps	YES	NO	0	1	0	0	
	PM	158	F	51 y	NR	YES	YES	1	2	0	0	
	sIBM	159	F	60 y	Biceps	NO	NO	0	NA	0	0	
	sIBM	160	M	47 y	Quadriceps	YES	YES	1	1	1	2	
	sIBM	161	M	61 y	Quadriceps	YES	YES	1	2	1	2	
	sIBM	162	M	63 y	Biceps	YES	YES	0	2	2	1	
	sIBM	163	M	64 y	NR	YES	YES	1	2	1	2	
	sIBM	164	F	72 y	Biceps	YES	NO	0	1	1	0	
	sIBM	165	M	39 y	Deltoid	YES	YES	2	2	1	1	
	IMNM•	166	M	59 y	Biceps	NO	NO	1	1	2	0	
	IMNM•	167	M	48 y	Quadriceps	YES	NO	2	NA	2	0	
	IMNM•	168	F	74 y	NR	YES	YES	1	NA	1	0	
	IMNM•	169	M	67 y	NR	YES	YES	0	1	1	0	
	IMNM•	170	M	63 y	NR	YES	YES	1	2	2	0	
	IMNM•	171	F	51 y	NR	YES	YES	1	1	1	0	
	IMNM•	172	M	58 y	Quadriceps	YES	NO	2	2	2	0	
	IMNM•	173	F	23 y	Deltoid	YES	NO	1	1	2	0	
	IMNM•	174	F	69 y	Deltoid	YES	YES	2	2	2	1	
IMNM•	175	F	47 y	Quadriceps	YES	NO	0	2	1	0		
IMNM•	176	F	50 y	NR	YES	YES	2	2	2	0		
IMNM•	177	F	68 y	NR	YES	YES	2	NA	2	2		
IMNM•	178	F	54 y	NR	YES	YES	2	2	2	0		
IMNM•	179	M	59 y	Quadriceps	YES	YES	2	NA	2	1		
IMNM•	180	F	57 y	Biceps	YES	NO	1	NA	2	0		
IMNM•	181	F	71 y	Quadriceps	YES	NO	0	2	2	0		

APPENDIX II

MYOPATHIES (cont.)	INFLAMMATORY MYOPATHIES (cont.)	IMNM••	182	F	74 y	Quadriceps	YES	YES	2	NA	2	1
		IMNM••	183	M	71 y	Deltoid	YES	YES	2	2	2	2
	IMNM••	184	F	66 y	Gastrocnemius	YES	NO	1	1	1	0	
	IMNM••	185	M	71 y	NR	YES	NO	1	2	2	0	
	IMNM••	186	F	61 y	Biceps	YES	YES	2	2	2	0	
	IMNM••	187	F	51 y	Quadriceps	YES	NO	2	2	1	0	
	IMNM••	188	M	74 y	Biceps	YES	YES	1	2	1	1	
	IMNM••	189	M	61 y	Deltoid	YES	NO	1	2	1	0	
	IMNM••	190	F	77 y	NR	YES	NO	2	2	2	2	
	IMNM••	191	M	65 y	Deltoid	YES	YES	2	2	2	0	
	IMNM••	192	M	68 y	Deltoid	YES	YES	2	2	2	1	
	IMNM••	193	F	35 y	Biceps	NO	NO	1	2	1	2	
	IMNM••	194	M	75 y	NR	YES	YES	2	2	1	0	
	IMNM••	195	F	58 y	Quadriceps	YES	NO	2	2	1	0	
	IMNM•••	196	M	58 y	Quadriceps	YES	YES	2	NA	2	0	
	IMNM•••	197	F	71 y	Deltoid	YES	YES	2	2	2	2	
	IMNM•••	198	M	45 y	NR	YES	NO	1	2	2	0	
	IMNM•••	199	M	67 y	NR	YES	YES	0	2	2	1	
	GM	200	M	82 y	Gastrocnemius	YES	YES	1	2	1	1	
	MM	201	F	15 y	Deltoid	YES	YES	0	0	0	1	
	MM	202	M	4 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0	
	EF	203	F	29 y	NR	NO	NO	0	0	0	0	
	TOXIC MYOPATHIES	SAM	204	F	50 y	NR	YES	NO	2	NA	1	0
		SAM	205	M	41 y	NR	NO	NO	1	1	1	0
		SAM	206	M	60 y	NR	NO	NO	0	1	1	0
		SAM	207	F	77 y	NR	YES	NO	2	2	1	0
		SAM	208	M	77 y	NR	YES	NO	2	2	2	0
		ChIM	209	F	70 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0
		CoIM	210	M	43 y	Quadriceps	NO	NO	0	1	0	0
CSIM		211	F	68 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0	
CSIM		212	M	41 y	Quadriceps	NO	NO	2	NA	0	1	
CSIM		213	F	49 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	1	
CSIM		214	F	54 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0	
CSIM		215	F	34 y	Gastrocnemius	NO	NO	0	NA	0	0	
CSIM		216	M	55 y	Gastrocnemius	YES	YES	0	1	0	0	
CSIM		217	F	62 y	NR	NO	NO	0	1	0	0	
CSIM		218	F	42 y	Quadriceps	NO	NO	0	1	0	0	

APPENDIX II

MYOPATHIES (cont.)	CSIM	219	F	78 y	Biceps	NO	NO	1	1	0	0	
		220	M	77 y	Quadriceps	NO	NO	2	1	0	0	
		221	M	78 y	Deltoid	YES	NO	0	1	0	0	
		222	M	47 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0	
		223	F	51 y	Quadriceps	YES	NO	0	1	0	0	
	CIM	224	F	68 y	Deltoid	YES	NO	0	1	0	1	
	CIM	225	M	21 y	Quadriceps	YES	YES	0	2	1	0	
	SLONM	226	F	41 y	Deltoid	NO	NO	0	NA	0	0	
	SLONM	227	M	38 y	Biceps	YES	YES	2	1	0	0	
	MChan	228	M	14 y	Biceps	NO	NO	0	NA	0	0	
		229	M	41 y	Biceps	YES	NO	0	NA	0	0	
		230	F	44 y	Biceps	NO	NO	0	NA	0	0	
	NMJD	ConMya	231	F	4 m	NR	NO	NO	0	2	0	1
		MG	232	F	62 y	Biceps	YES	YES	1	1	1	0
233			F	73 y	Biceps	YES	NO	0	NA	0	0	
NEUROGENIC DISORDERS	MOTOR NEURON DISEASES	ALS	234	M	49 y	NR	YES	NO	2	NA	0	1
		ALS	235	M	38 y	Gastrocnemius	YES	YES	0	2	3	0
		ALS	236	M	75 y	Biceps	NO	NO	0	NA	1	0
		ALS	237	M	40 y	Deltoid	YES	NO	0	2	0	2
		ALS	238	M	33 y	Quadriceps	YES	YES	0	2	0	1
		ALS	239	F	64 y	NR	YES	NO	0	2	0	0
		SMA	240	M	17 m	NR	YES	NO	0	NA	0	0
		SMA	241	M	20 m	Quadriceps	YES	NO	0	2	0	2
		SMA	242	F	54 y	Quadriceps	YES	YES	0	1	0	0
		SMA	243	M	2 w	Quadriceps	YES	YES	0	2	0	0
		SMA	244	M	28 y	Biceps	YES	YES	0	NA	0	1
		SMA	245	M	14 y	Quadriceps	YES	NO	0	2	0	0
		SMA	246	F	4 y	NR	YES	YES	1	2	1	2
	PERIPHERAL NEUROPATHIES	Radicul.	247	M	24 y	Gastrocnemius	YES	YES	0	1	1	1
		Radicul.	248	M	82 y	NR	NO	NO	0	NA	0	0
		Radicul.	249	F	44 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0
		Radicul.	250	F	74 y	NR	NO	NO	0	2	0	0
		Radicul.	251	M	51 y	Biceps	NO	NO	0	1	0	0
		Radicul.	252	M	63 y	Gastrocnemius	YES	NO	0	2	1	1
PERIPHERAL NEUROPATHIES	Radicul.	253	M	47 y	Gastrocnemius	NO	NO	0	NA	0	0	
	Radicul.	254	M	54 y	Quadriceps	YES	YES	1	2	0	0	
	Radicul.	255	F	61 y	Biceps	YES	NO	0	1	0	0	

APPENDIX II

NEUROGENIC DISORDERS (cont.)	PERIPHERAL NEUROPATHIES	Radicul.	256	M	65 y	Quadriceps	YES	NO	0	1	0	0
		Radicul.	257	M	69 y	Gastrocnemius	NO	NO	0	NA	0	0
		Radicul.	258	M	50 y	NR	NO	NO	0	1	0	0
		Radicul.	259	F	62 y	Tibialis anterior	NO	NO	0	1	0	0
		CMT	260	M	42 y	Quadriceps	YES	YES	0	1	0	0
		HMSN-O	261	F	51 y	Biceps	YES	YES	0	2	2	0
		CIDP	262	F	60 y	Peroneus longus	NO	NO	0	1	0	0
		GB	263	F	6 y	Gastrocnemius	NO	NO	0	NA	0	0
		GB	264	M	42 y	NR	NO	NO	0	1	0	1
		GB	265	M	58 y	NR	NO	NO	0	1	0	0
		MeN	266	M	58 y	Quadriceps	YES	YES	1	2	0	1
		MeN	267	F	73 y	Biceps	YES	NO	1	1	0	0
		MeN	268	M	45 y	Gastrocnemius	YES	YES	0	2	1	0
		MeN	269	F	57 y	NR	YES	NO	1	2	1	0
		VN	270	M	76 y	Peroneus longus	NO	NO	0	1	1	0
		VN	271	M	65 y	NR	NO	NO	0	1	1	0
		VN	272	F	55 y	NR	NO	NO	0	1	0	1
		TN	273	F	47 y	Quadriceps	NO	NO	0	NA	0	0
		CIDP	274	M	73 y	NR	YES	NO	0	1	1	0

**Chapter 2: Distribution of the patients in the total series according to diagnostics and histological findings in their muscle biopsies.**

M: male; F: female; NR: nor reported; NA: not available; y: years; m: months; d: days; SUE: sarcolemmal utrophin expression; DUE: difusse utrophin expression; RFs: Regenerative fibres: 0 (absence), 1 (few), 2 (abundant); NFs: Necrotic fibres: 0 (absence), 1 (few), 2 (abundant), neo-MyHC+ fibres: 0 (absence), 1 (few), 2 (abundant), 2\* (abundant, almost all fibres); EF: endomysial fibrosis: 0 (absence), 1 (mild), 2 (high).

Diagnostics: CMD: Congenital Muscular Dystrophies; DYS<sup>+</sup>: Duchenne Muscular Dystrophy; DYS<sup>++</sup>: Becker Muscular Dystrophy; DYS<sup>+++</sup>: Duchenne Muscular Dytrophy carrier; LGMD: Limb-Girdle Muscular Dystrophy; EDMD: Emery-Dreyfuss Muscular Dystrophy; OPMD: Oculopharyngeal Muscular Dystrophy; GSD<sup>†</sup>: Glycogenosis type II; GSD<sup>††</sup>: Glycogenosis type V; GSD<sup>†††</sup>: Glycogenosis type VII; CPT2: Carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency; MiM; Mitochondrial Myopathy; MAD: Myoadenylate deaminase deficiency; NeM: Nermaline Myopathy; CNM: Centronuclear Myopathy; CFTD: Congenital Fibre TyPE Disproportion; FT1U: Fibre type 1 uniformity; DM: Dermatomyositis; PM/OS: Polymyositis/Overlap Syndrome; sIBM: Sporadic Inclusion Bodies Myositis; IMNM<sup>•</sup>: Immune-Mediated Necrotizing Myopathy (antibodies not found/studied); IMNM<sup>••</sup>: Immune-Mediated Necrotizing Myopathy (anti-HMGCoA-R: anti-Hydroxi-Metil-CoA-Reductase) antibodies; IMNM<sup>•••</sup>: Immune-Mediated Necrotizing Myopathy (paraneoplastic); GM: Granulomatous Myositis; MM: Macrophagic Myopathy; EF: Eosinophilic Fasciitis; SAM: Statins-Associated Myopathy; ChM: Chloroquine Induced Myopathy; Col: Colchicine Induced Myopathy; CSIM: Corticosteroids-Induced Myopathy; CIM: Critical-illness Myopathy; SLONM: Sporadic Late-Onset Myopathy; MChan: Muscular Channelopathy; NMJD: Neuromuscular Junction Diseases; ConMya: Congenital Myasthenia; MG: Myasthenia Gravis; ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis; SMA: Spinal Muscular Atrophy; Radicul: Radiculopathy; CMT: Charcot-Marie Tooth; HMSN-O: Hereditary Motor and Sensitive Neuropathy-Okinawa type; CIDP: Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy; GB: Guillen-Barré; MeN: Metabolic Neuropathy; VN: Vasculitic Neuropathy; TN: Toxic Neuropathy;

## VIII. BIBLIOGRAFÍA





## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Arimura T, Bos JM, Sato A, Kubo T, Okamoto H, Nishi H, Harada H, Koga Y, Moulik M, Doi YL, Towbin JA, Ackerman MJ, Kimura A. Cardiac ankyrin repeat protein gene (ANKRD1) mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:334–42.
- Anderson JT, Rogers RP, Jarrett HW. Ca<sup>2+</sup>-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem* 1999;274:35375-80.
- Bang, ML; Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, Witt CC, Labeit D, Gregorio CC; Granzier H, Labeit S. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual 700-kDa titin isoform and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res* 2001; 89: 1065-1072.
- Bevilacqua JA, Monnier N, Bitoun M, Eymard B, Ferreiro A, Monges A, Lubieniecki F, Taratuto AL, Laquerrière A, Claeys KG, Marty I, Fardeau M, Guicheney P, Lunardi J, Romero NB. Recessive RYR1 mutations cause unusual congenital myopathy with prominent nuclear internalisation and large areas of myofibrillar disorganization. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011;37:271–84.
- Bessman SP, Carpenter CL. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Ann Rev Biochem* 1985; 54:831-62.
- Bidinost C, Pagnoni S, Martínez H, Rosa AL. Nuevas herramientas diagnósticas de biología molecular en enfermedades neuromusculares. *Rev Med Clin Condes* 2018;29(5):544-552.
- Blake DJ, Love DR, Tinsley J, Morris GE, Turley H, Gatter K, Dickson G, Edwards YH, Davies KE. Characterization of a 4.8 kb transcript from the Duchenne muscular dystrophy locus expressed in Schwannoma cells. *Hum Mol Genet* 1992;1:103-9.
- Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE. Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol* 1996;6:37-47.
- Blake DJ, Kroger S. The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci* 2000;23:92-99.
- Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 2002;82:291-329.
- Bork P, Sudol M. The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci* 1994;19:531-3.
- Buchwalow IB, Böcker W. *Immunohistochemistry: Basics and Methods*. 1<sup>a</sup> ed. Heidelberg: Springer; 2010.
- Buckle VJ, Guenet JL, Simon-Chazottes D, Love DR, Davies KE. Localisation of a dystrophin-related autosomal gene to 6q24 in man, and to mouse chromosome 10 in the region of the dystrophin (dy) locus. *Hum Genet* 1990;85:324-6.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Campbell KP, Kahl SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 1989; 338:259-62.
- Carmignac V, Salih MAM, Quijano-Roy S, Marchand S, Al Rayess MAM, Mukhtar MM, Urtizberea JA, Labeit S, Guicheney P, Leturcq F, Gautel M; Fardeau M; Campbell KP, Richard I, Estournet B, Ferreiro A. C-terminal titin deletions cause a novel early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy. *Ann Neurol* 2007; 61: 340-351.
- Castro-Ferreira R, Fontes-Carvalho R, Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF. Papel de la titina en la modulación de la función cardíaca y sus implicaciones fisiopatológicas. *Arq Bras Cardiol* 2011; 96(4):332-339.
- Ceyhan-Birsoy O, Agrawal PB, Hidalgo C, Schmitz-Abe K, Dechene ET, Swanson LC, Soemedi R, Vasli N, Iannaccone ST, Shieh PB, Shur B, Dennison JM, Lawlor MW, Laporte J, Markianos K, Fairbrother W, Granzier H, Beggs AH. Recessive truncating titin gene, TTN, mutations presenting as centronuclear myopathy. *Neurology* 2013; 81: 1205-1214.
- Chauveau C, Bonnemann CG, Julien C, Kho AL, Marks H, Talim B, Maury P, Arne-Bes MC, Uro-Coste E, Alexandrovich A, Vihola A, Schafer S, Kaufmann B, Medne L, Hübner N, Foley AR, Santi M, Udd B, Topaloglu H, Moore SA, Gotthardt M, Samuels ME, Gautel M, Ferreiro A. Recessive TTN truncating mutations define novel forms of core myopathy with heart disease. *Hum Mol Genet* 2014a; 23: 980-991.
- Chauveau C, Rowell J, Ferreiro A. A rising titan: TTN review and mutation update. *Human mutation* 2014b; 35 (9): 1046-1059.
- Chevron MP, Girard F, Claustres M, Demaille J. Expression and subcellular localization of dystrophin in skeletal, cardiac and smooth muscles during the human development. *Neuromusc Disord* 1994;4(5/6):419-32.
- Chinnery PF, Johnson MA, Walls TJ, Gibson GJ, Fawcett PR, Jamieson S, Fulthorpe JJ, Cullen M, Hudgson P, Bushby KM. A novel autosomal dominant distal myopathy with early respiratory failure: Clinico-pathologic characteristics and exclusion of linkage to candidate genetic loci. *Ann Neurol* 2001;49:443-52.
- Ciciliot S, Schiaffino S. Regeneration of mammalian skeletal muscle: basic mechanisms and clinical implications. *Curr Pharm Des* 2010;16(8):906-14.
- Clerk A, Morris GE, Dubowitz V, Davies KE, Sewry CA. Dystrophin-related protein, utrophin, in normal and dystrophic human fetal skeletal muscle. *Histochemical J* 1993;25:554-61.
- Collins MP, Mendell JR, Periquet MI, Sahenk Z, Amato AA, Gronseth GS, Barohn RJ, Jackson CE, Kissel JT. Superficial peroneal nerve/peroneus brevis muscle biopsy in vasculitic neuropathy. *Neurology* 2000;55(5):636-43.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Crosbie RH, Heighway J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 1997; 272:31221-4.
- Curtis E, Sewry C. Electron microscopy in skeletal muscle pathology. In: Stirling JW, Curry A, Eyden BP (eds.). *Diagnostic Electron Microscopy: a practical guide to interpretation and technique*. Chichester (UK):John Wiley & Sons Ltd; 2013 pp.89-116.
- De Cid R, Ben Yaou R, Roudaut C, Charton K, Baulande S, Leturcq F, Romero NB, Malfatti E, Beuvin M, Vihola A, Nelson I, Necctoux J, Ben-Aim L, Olaso R, Udd B, Bonne G, Eymard B, Richard I. A new titinopathy: infantile-juvenile onset Emery-Dreifuss like phenotype without cardiomyopathy. *Neurology* 2015;85:2126–35.
- Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, Watt DJ, Dickson G, Tinsley JM, Davies KE. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1997;90:717-27.
- Deenen JCW, Horlings CGC, Verschuuren JJGM, Verbeek ALM, van Engelen BGM. The epidemiology of neuromuscular disorders: a comprehensive overview of the literature. *J Neuromusc Dis* 2015;2:73-85.
- Duan D. Micro-utrophin therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Therapy* 2019;27:11:1872-4.
- Dubowitz V, Sewry CA, Oldfors A. *Muscle biopsy. A Practical Approach*. 4<sup>a</sup> ed. Londres: Saunders Elsevier; 2013.
- Dykstra MJ, Reuss LE. *Biological Electron Microscopy. Theory, Techniques, and Troubleshooting*. 2<sup>nd</sup> ed. Kluwer Academic Publishers/Plenum Publishers; 2003.
- Edström L; Thornell L-E, Albo J, Landin S, Samuelson M. Myopathy with respiratory failure and typical myofibrillar lesions. *J Neurol Sci* 1990; 96: 211-228.
- Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 1991;66(6):1121-31.
- Ervasti JM, Campbell KP. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 1993;122:809-23.
- Evilä A, Vihola A, Sarparanta J, Raheem O, Palmio J, Sandell S, Eymard B, Illa I, Rojas-García R, Hankiewicz K, Negrão L, Löppönen T, Nokelainen P, Kärppä M, Penttilä S, Screen M, Suominen T, Richard I, Hackman P, Udd B. Atypical phenotypes in titinopathies explained by second titin mutations. *Ann Neurol* 2014; 75:230-240.
- Evilä A, Arumilli M, Udd B, Hackman P. Targeted next-generation sequencing assay for detection of mutations in primary myopathies. *Neuromuscul Disord* 2016;26:7–15

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Fardeau M, Tomé, FMS. Non-neoplastic disorders of the skeletal muscle. In: Johannessen JV (ed). *Electron microscopy in human medicine, vol.4 Soft tissues, bones and joints*. London, UK: McGraw-Hill Inc;1981, pp. 257-319.
- Fernández-Marmiesse A, Carrascosa-Romero MC, Alfaro Ponce B, Nascimento A, Ortez C, Romero N, Palacios L, Jiménez-Mallebrera C, Jou C, Gouveia S, Couce ML. Homozygous truncating mutation in prenatally expressed skeletal isoform of TTN gene results in arthrogryposis multiplex congenital and myopathy without cardiac involvement. *Neuromuscul Disord* 2017;27: 188–92
- Fischer D, Kley RA, Strach K, Meyer C, Sommer T, Eger K, Rolfs A, Meyer W, Pou A, Pradas J, Heyer CM, Grossmann A, Huebner A, Kress W, Reimann J, Schöder R, Eymard B, Fardeau M, Udd B, Goldfarb L, Vorgerd M, Olivé M. Distinct muscle imaging patterns in myofibrillar myopathies. *Neurology* 2008; 71:758-65.
- Fuller G. *Exploración neurológica fácil*. 6ª ed. Barcelona, España; Elsevier;2020, pp.46-61.
- Fürst DO, Osborn M, Nave R, Weber K. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol* 1988; 106: 1563-1572.
- Galvagni F, Cantini M, Oliviero S. The utrophin gene is transcriptionally up-regulated in regenerating muscle. *J Biol Chem* 2002;277(21):19106-13.
- García Bragado F. Recomendaciones del Club de Neuropatología de la SEAP. Guía práctica en Neuropatología. La biopsia muscular. Aspectos Prácticos. En: Guerra Merino I (coord.). *Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España. Recomendaciones de los Clubes para el Diagnóstico Anatomopatológico*. Madrid: Sociedad Española de Anatomía Patológica;2015, pp.219-224.
- García del Moral R. *Laboratorio de Anatomía Patológica*. 1ª ed; Interamericana-McGraw-Hill; Madrid, 1993.
- Geneser F. *Histología*. 3ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2000.
- Gerull B, Gramlich M, Atherton J, McNabb M, Trombitas K, Sasse-Klaassen S, Seidman JG, Seidman C, Granzier H, Labeit S, Frenneaux M, Thierfelder L. Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nature Gen* 2002; 30; 201-204.
- Goudemant JF, Deconinck N, Tinsley JM, Demeure R, Robert A, Davies KE, Gillis JM. Expression of truncated utrophin improves pH recovery in exercising muscles of dystrophic mdx mice: a <sup>31</sup>P NMR study. *Neuromuscul Disord* 1998;8:371-379.
- Gramolini AO, Karpati G, Jasmin BJ. Discordant expression of utrophin and its transcript in human and mouse skeletal muscles. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999a;58(3):235-44.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Gramolini AO, Jasmin BJ. Expression of the utrophin gene during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Res* 1999b;27(17):3603-9.
- Granzier H, Labeit S. Cardiac titin: an adjustable multi-functional spring. *J Physiol* 2002; 541 (Pt2):335-42.
- Granzier H, Labeit S. The giant protein titin. A major player in myocardial mechanisms, signalling and disease. *Circ Res* 2004; 94(3):284-95.
- Gregorio CC, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S. Muscle assembly/ a titanic achievement? *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 18-25.
- Hackman P, Marchand S, Sarparanta J, Vihola A, Péniisson-Besnier I, Eymard B, Pardal-Fernández JM, Hammouda EH, Richard I, Illa I, Udd B. Truncating mutations in C-terminal titin may cause more severe tibial muscular dystrophy (TMD). *Neuromusc Disord* 2008; 18:922-928.
- Hackman P, Udd B, Bönnemann CG, Ferreiro A, Titinopathy Database Consortium. 219th ENMC International Workshop Titinopathies International database of titin mutations and phenotypes, Heemskerk, The Netherlands, 29 April–1 May 2016. *Neuromuscul Disord* 2017;27:396–407.
- Haravuori H, Vihola A, Straub V, Auranen M, Richard I, Marchand S, Voit T, Labeit S, Somer H, Peltonen L, Beckmann JS, Udd B. Secondary calpain3 deficiency in 2q-linked muscular dystrophy: titin is the candidate gene. *Neurology* 2001; 10; 56(7):869-77.
- Helliwell TR, Man Nt, Morris GE, Davies KE. The dystrophin-related protein, utrophin, is expressed on the sarcolemma of regenerating human skeletal muscle fibres in dystrophies and inflammatory myopathies. *Neuromusc Disord* 1992(2)3:177-184.
- Heffner RR, Jr, Balos LL. Skeletal muscle. In: Mills SE (ed). *Histology for Pathologists*, 3<sup>rd</sup>. ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2007, pp. 195-217.
- Helmes M, Trombitas K, Granzier H. Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res*. 1996; 79 (3): 619-26.
- Herman DS; Lam, L; Taylor MRG; Wang L; Teekakitikul P; Christodoulou D; Conner L; DePalma SR; McDonough B; Sparks E; Teodorescu DL; Cirino AL; Banner NR; Pennell DJ; Graw S; Merlo, M; Di Lenarda A; Sinagra G; Bos, JM; Ackerman MJ; Mitchell RN; Murry CE; Lakdawala NK; Ho, CY; Barton PJR; Cook SA; Mestroni, L; Seidman JG; Seidman CE. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2012; 366;7; 619-628.
- Hilton-Jones D, Squier MV. Dystrophin-associated protein complex: clinical implications. *Lancet* 1993;341(8844):528-9.
- Horowitz, R., Kempner, E. S., Bisher, M. E. & Podolsky, R. J. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature* 1986; 323: 160–164.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ibraghimov-Beskrovnaya O, Milatovich A, Ozcelik T, Yang B, Koepnick K, Francke U, Campbell KP. Human dystroglycan: skeletal muscle Cdna, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum Mol Genet* 1993;2:1651-7.
- Joyce NC, Oskarsson B, Jin LW. Muscle biopsy evaluation in neuromuscular disorders. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2012;23(3):609-31.
- Kalyuzhny AE. Immunohistochemistry. Essential Elements and Beyond (Kalyuzhny AE(ed): Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert). 1<sup>a</sup> ed. Suiza: Springer; 2016.
- Kamath S, Venkatanarasimha N, Walsh MA, Hughes PM. MRI appearance of muscle denervation. *Skeletal Radiol* 2008;37:397-404.
- Karpati G, Carpenter S, Morris GE, Davies KE, Guerin C, Holland P. Localization and quantitation of the chromosome 6-encoded Dystrophin-related protein in normal and pathological human muscle. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993;52(2):119-28.
- Khurana TS, Hoffman EP, Kunkel LM. Identification of a chromosome 6-encoded dystrophin-related protein. *J Biol Chem* 1990;265(28):16717-20.
- Khurana TS, Watkins SC, Chafey P, Chelly J, Tomé FMS, Fardeau M, Kaplan JC, Kunkel LM. Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromusc Disord* 1991;1(3):185-94.
- Kinbara K, Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Muscle specific calpain, p94, interacts with the extreme C-terminal region of connectin, a unique region flanked by two immunoglobulin C2 motifs. *Arch Biochem Biophys* 1997; 342: 99-107.
- Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988;53:219-26.
- Kornblum C, Lutterbey G, Bogdanow M, Kesper K, Schild H, Schröder R, Wattjes MP. Distinct neuromuscular phenotypes in myotonic dystrophy types 1 and 2. A whole body highfield MRI study. *J Neurol* 2006;253:753-61.
- Kurzban, GP and Wang, K. Giant polypeptides of skeletal muscletitin: sedimentation equilibrium in guanidine hydrochloride. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 1988;150, 1155-1161.
- Labeit S; Barlow DP; Gautel M; Gibson T; Holt J; Hsieh CL. Francke U; Leonard K; Wardasle J; Whiting A; Trinick J. A regular pattern of two types of 100-residue motif in the sequence of titin. *Nature* 1990; 345, 273-276.
- Labeit S, Lahmers S, Burkart C, Fong C, McNabb M, Witt S, Witt C, Labeit D, Granzier H. Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins. *J Mol Biol* 2006; 362: 664-681.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Laing NG. Genetics of neuromuscular disorders. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2012;49(2):33-48.
- Levi O, Genin O, Angelini C, Halevy O, Pines M. Inhibition of muscle fibrosis results in increases in both utrophin levels and the number of revertant myofibers in Duchenne muscular dystrophy. *Oncotarget* 2015;6(27):23249-60.
- Li Y, Huang J, Zhao YL, He J, Wang W, Davies KE, Nosé V, Xiao S. UTRN on chromosome 6q24 is mutated in multiple tumors. *Oncogene* 2007;26(42):6220-8.
- Linke WA, Rudy DE, Centner T, Gautel M, Witt C, Labeit S, Gregorio CC. I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *J Cell Biol.* 1999; 146 (3): 631-44.
- Linke WA, Kulke M, Li H, Fujita-Becker S, Neagoe C, Manstein DJ, Gautel M, Fernandez JM. PEVK domain of titin: an entropic spring with actin-binding properties; *J Struct Biol* 2002; 137; 194-205.
- Lopes LR; Zekavati A; Syrris P; Hubank M; Giambartolomei C; Dalageorgou C; Jenkins S; McKenna W; UK10k Consortium; Plagnol V; Elliott PM. Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing. *J Med Genet* 2013;50: 228-239.
- Love DR, Hill DF, Dickson G, Spurr NK, Byth BC, Marsden RF, Walsh FS, Edwards YH, Davies KE. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 1989;339:55-8.
- Love DR, Morris GE, Ellis JM, Fairbrother U, Marsden RF, Bloomfield JF, Edwards YH, Slater CP, Parry DJ, Davies KE. Tissue distribution of the dystrophin-related gene product and expression in the mdx and dy mouse. *Proc Nat Acad Sci* 1991; 88: 3243-7.
- Lukáš Z. The up-regulation of utrophin is not limited to muscular dystrophies. *Gen Physiol Biophys* 1999;18(1):87-89.
- Macias MJ, Hyvonen M, Baraldi E, Schultz J, Sudol M, Saraste M, Oschkinat H. Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature* 1996;382:646-9.
- Maloney P. The electron microscope. In: Hunter E. *Practical Electron Microscopy. A beginner's illustrated guide.* 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1993 pp.103-133.
- Man Nt, Ellis JM, Love DR, Davies KE, Gatter KC, Dickson G, Morris GE. Localization of the DMDL gene-encoded Dystrophin-related Protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines. *J Cell Biol* 1991; 115(6):1695-1700.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Man Nt, Thanh LT, Blake DJ, Davies KE, Morris GE. Utrophin, the autosomal homologue of dystrophin, is widely-expressed and membrane-associated in cultured cell lines. *FEBS* 1992;313(1):19-22.
- Maruyama, K; Kimura, S; Yoshidomi, H; Sawada, H and Kikuchi, M. Molecular size and shape of beta-connectin, an elastic protein of striated muscle. *J. Biochem* 1984; 95, 1423-1433.
- Maruyama K. Connectin/titin, giant elastic protein of muscle. *FASEB J* 1997; 11: 123-134.
- Matsumura K, Tomé FM, Collin H, Azibi K, Chaouch M, Kaplan JC, Fardeau M, Campbell KP: Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature* 1992;359:320-2.
- Matsumura K, Shasby DM, Campbell KP. Purification of dystrophin-related protein (utrophin) from lung and its identification in pulmonary artery endothelial cells. *FEBS* 1993;326(1,2,3):289-93.
- Mercuri E, Talim B, Moghadaszadeh B, Petit N, Brockington M, Counsell S, Guicheney P, Muntoni F, Merlini L. Clinical and imaging findings in six cases of congenital muscular dystrophy with rigid spine syndrome linked to chromosome 1p (RSMD1). *Neuromuscul Disord* 2002;12:631-38.
- Mohan H. *Patología*. 6ª ed. Buenos Aires; Editorial Panamericana; 2012.
- Navarro C. Distrofina y proteínas asociadas a la distrofina. Su evaluación en el laboratorio de patología neuromuscular. *Neurol* 1999;28:154-8.
- Nix JS, Moore SA. What every neuropathologist needs to know: the muscle biopsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2020;79,7:719-33.
- Oates EC, Jones KJ, Donkervoort S, Charlton A, Brammah S, Smith JE 3rd, Ware JS, Yau KS, Swanson LC, Whiffin N, Peduto AJ, Bournazos A, Waddell LB, Farrar MA, Sampaio HA, Teoh HL, Lamont PJ, Mowat D, Fitzsimons RB, Corbett AJ, Ryan MM, O'Grady GL, Sandaradura SA, Ghaoui R, Joshi H, Marshall JL, Nolan MA, Kaur S, Punetha J, Töpf A, Harris E, Bakshi M, Genetti CA, Marttila M, Werlauff U, Streichenberger N, Pestronk A, Mazanti I, Pinner JR, Vuillerot C, Grosman C, Camacho A, Mohassel P, Leach ME, Foley AR, Bharucha-Goebel D, Collins J, Connolly AM, Gilbreath HR, Iannaccone ST, Castro D, Cummings BB, Webster RI, Lazaro L, Vissing J, Coppens S, Deconinck N, Luk H-M, Thomas NH, Foulds NC, Illingworth MA, Ellard S, McLean CA, Phadke R, Ravenscroft G, Witting N, Hackman P, Richard I, Cooper ST, Kamsteeg E-J, Hoffman EP, Bushby K, Straub V, Udd B, Ferreira A, North KN, Clarke NF, Lek M, Beggs AH, Bönnemann CG, MacArthur DG, Granzier H, Davis MR, Laing NG. Congenital titinopathy: Comprehensive characterisation and pathogenic insights. *Ann Neurol* 2018; 83:1105-24.
- Oberman WM, Gautel M, Weber K, Fürst DO. Molecular structure of the sarcomeric M band: mapping of titin and myosin binding domains in myosin and the identification



## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- of a potential regulatory phosphorylation site in myomesin. *EMBO J* 1997; 16: 211-220.
- Ohlsson M; Hedberg C; Brådvik B; Lindberg C; Tajsharghi H; Danielsson O; Melberg A; Udd B; Martinsson T; Oldfors A. Hereditary myopathy with early respiratory failure associated with a mutation in A-band titin. *Brain* 2012; 135; 1682-1694.
- Paciello O, Papparella S. Histochemical and immunohistological approach to comparative neuromuscular diseases. *Folia Histochem et Cytobiol* 2009;47,2:143-152.
- Palmio J, Evilä A, Chapon F, Tasca G, Xiang F, Brådvik B, Eymard B, Echaniz-Laguna A, Laporte J, Kärppä M, Mahjneh I, Quinlivan R, Lafôret P, Damian M, Berardo A, Taratuto AL, Bueri JA, Tommiska J, Raivio T, Tuerk M, Göllitz P, Chevessier F, Sewry C, Norwood F, Hedberg C, Schöder, Edström L, Oldfors A, Hackman P, Udd B. Hereditary myopathy with early respiratory failure: occurrence in various populations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2014; 85, 345-353.
- Partanen J, Laulumaa V, Paljärvi L, Partanen K, Naukkarinen A. *J Neurol Sci* 1994; 125 (2):158-167.
- Pearce M, Blake DJ, Tinsley JM, Byth BC, Campbell L, Monaco AP, Davies KE. The utrophin and dystrophin genes share similarities in genomic structure. *Hum Mol Gen* 1993;2(11):1765-72.
- Pfeffer G; Elliott H; Griffin H; Barresi R; Miller J; Marsh J; Evilä A; Vihola A; Hackman P; Straub V; Dick DJ; Horvath R; Santibanez-Koref M; Udd B; Chinnery PF. Titin mutation segregates with hereditary myopathy with early respiratory failure. *Brain* 2012; 135; 1695-1713.
- Pfeffer G, Barresi R, Wilson IJ, Hardy SA, Griffin H, Hudson J, Elliott HR, Ramesh AV, Radunovic A, Winer JB, Vaidya S, Raman A, Busby M, Farrugia ME, Ming A, Everett C, Emsley HC, Horvath R, Straub V, Bushby K, Lochmüller H, Chinnery PF, Sarkozy A. Titin founder mutation is a common cause of myofibrillar myopathy with early respiratory failure. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014; 85; 3, 331-338.
- Poirier J. Cuadernos de Histología. 4ª ed. Madrid. Marbán; 1985.
- Posada M, Martín-Arribas C, Ramírez A, Villaverde A, Abaitua I. Enfermedades raras. Concepto, epidemiología y situación actual en España. *An Sist Sanit Navar* 2008;31(Supl.2):9-20.
- Prochniewicz E, Henderson D, Ervasti JM, Thomas DD. Dystrophin and utrophin have distinct effects on the structural dynamics of actin. *Proc Nat Acad Sci* 2009; 106: 7822-7.
- Rawn JD. *Biochemistry*, Neil Patterson Publishers, Burlington, NC 1989. p.468.
- Renard D. Serum CK as a guide to the diagnosis of muscle disease. *Pract Neurol* 2015;15:121.doi:10.1136/practneurol-2014-001031.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ridaura-Sanz C. Biopsia muscular. La biopsia en el diagnóstico de la enfermedad pediátrica. *Acta Pediatr Mex* 2008;29(6):347-54.
- Rivas Infante E. Recomendaciones del Club de Neuropatología de la SEAP. Guía práctica en Neuropatología. Procesamiento y evaluación de la biopsia de nervio periférico. En: Guerra Merino I (coord.). Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España. Recomendaciones de los Clubes para el Diagnóstico Anatomopatológico. Madrid: Sociedad Española de Anatomía Patológica;2015 pp.225-231.
- Romero NB, Clarke NF. Congenital myopathies. *Handb Clin Neurol* 2013;113:1321–36.
- Roberts RG, Bentley DR, Bobrow M. Infidelity in the structure of ectopic transcripts: a novel exon in lymphocyte dystrophin transcripts. *Hum Mutat* 1993;2:293-9.
- Roberts RG, Freeman TC, Kendall E, Vetrie DL, Dixon AK, Shaw-Smith C, Bone Q, Bobrow M. Characterization of DRP2, a novel human dystrophin homologue. *Nat Genet* 1996;13(2):223-6.
- Rybakova IN, Patel JR, Davies KE, Yurchenco PD, Ervasti JM. Utrophin binds laterally along actin filaments and can couple costameric actin with sarcolemma when overexpressed in dystrophin-deficient muscle. *Mol Biol Cell* 2002;13:1512-21.
- Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI. *Histología. Texto y Atlas Color*. 3ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 1997.
- Rossi, E; Faiella A; Zeviani M; Labeit S; Floridia G; Brunnello S; Cammarata M; Boncinelli E and Zuffardi O. Order of six loci at 2q24-31 and orientation of the HOXD locus. *Genomics* 1994; 24, 34-40.
- Rubio S, Pacheco-Orozco RA, Gómez AM, Perdomo S, García-Robles R. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Univ Med* 2020;61(2) <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed61-2.sngs>.
- Salih MA, Al Rayess M, Cutshall S, Urtizberca JA, Al-Turaiki MH, Ozo CO, Straub V, Akbar M, Abid M, Andeejani A, Campell KP. A novel form of familial congenital muscular dystrophy in two adolescents. *Neuropediatrics* 1998;29:289-93.
- Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975; 94(3):441-48.
- Savarese M, Sarparanta J, Vihola A, Udd B, Hackman P. Increasing role of titin mutations in neuromuscular disorders. *J Neuromuscul Dis* 2016;3:293–308.
- Savarese M, Maggi L, Vihola A, Jonson PH, Tasca G, Ruggiero L, Bello L, Magri F, Giugliano T, Torella A, Evilä A, Di Fruscio G, Vanakker O, Gibertini S, Vercelli L, Ruggieri A, Antozzi C, Luque H, Janssens S, Pasanisi MB, Fiorillo C, Raimondi M, Ergoli M, Politano L, Bruno C, Rubegni A, Pane M, Santorelli FM, Minetti C, Angelini C, De Bleecker J, Moggio M, Mongini T, Comi GP, Santoro L, Mercuri E, Pegoraro E, Mora M, Hackman P, Udd B, Nigro V. Interpreting

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- genetic variants in titin in patients with muscle disorders. *JAMA Neurol* 2018;75:557–65.
- Sewry CA, Matsumura K, Campbell KP, Dubowitz V. Expression of dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1994a;4(5/6):401-9.
- Sewry CA, Sansome A, Matsumura K, Campbell KP, Dubowitz V. Deficiency of the 50 kDa dystrophin-associated glycoprotein and abnormal expression of utrophin in two south Asian cousins with variable expression of severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1994b;4(2):121-9.
- Sewry CA, Feng L, Chambers D, Matthews E, Phadke R. Importance of immunohistochemical evaluation of developmentally regulated myosin heavy chains in human muscle biopsies. *Neuromuscul Disord* 2021;(5):371-84.
- Shim JY, Kim TS. Relationship between utrophin and regenerating muscle fibers in Duchenne Muscular Dystrophy. *Yonsei Med J* 2003;44(1):15-23.
- Song Y, Morales L, Malik AS, Mead AF, Greer CD, Mitchell MA, Petrov MT, Su LT, Choi ME, Rosenblum ST, LU X, VanBelzen DJ, Krishnankutty RK, Balzer FJ, Loro E, French R, Propert KJ, Zhou S, Kozyak BW, Nghiem PP, Khurana TS, Kornegay JN, Stedman H. Non-immunogenic utrophin gene therapy for the treatment of muscular dystrophy animal models. *Nature Medicine* 2019;25:1505-11.
- Straub V, Murphy A, Udd B, on behalf of the LGMD workshop study group. 229<sup>th</sup> ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies-Nomenclature and reformed classification Naarden, The Netherlands, 17-19 March 2017. *Neuromuscul Disord* 2018;28:702-10.
- Suzuki A, Yoshida M, Yamamoto H, Ozawa E. Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain and the first half of the carboxyl-terminal domain. *FEBS Lett* 1992;308:154-60.
- Tanaka H, Ishiguro T, Eguchi C, Saito K, Ozawa E. Expression of a dystrophin-related protein associated with the skeletal muscle cell membrane. *Histochemistry* 1991;96(1):1-5. doi:10.1007/BF00266753.
- Taratuto AL. Biopsia muscular en miopatías congénitas y distrofias musculares. *Neurol Arg* 2010; 2 (4):250-264.
- Teijeira S, Teijeiro A, Fernández R, Navarro C. Subsarcolemmal expression of utrophin in neuromuscular disorders: an immunohistochemical study of 80 cases. *Acta Neuropathol* 1998;96:481-6.
- Tennyson CN, Klamut HJ, Worton RG. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nature Genet* 1995;9:184-90.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Tinsley JM, Blake DJ, Roche A, Fairbrother U, Riss J, Byth BC, Knight AE, Kendrick-Jones J, Suthers GK, Love DR, Edwards YH, Davies KE. Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* 1992;360:591-3.
- Tinsley JM, Potter AC, Phelps SR, Fisher R, Trickett JI, Davies KE. Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* 1996; 384:349-353.
- Tinsley JM, Deconinck N, Fisher R, Khan D, Phelps S, Gillis J-M, Davies K. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nature* 1998; 4:1441.1444.
- Torres Seco F. Manual de técnicas en Histología y Anatomía Patológica. 1ª ed. Barcelona: Editorial Planeta; 2002.
- Toro C, Olivé M, Dalakas MC, Sivakumar K, Bilbao JM, Tyndel F, Vidal N, Farrero E, Sambuughin N, Goldfarb LG. Exome sequencing identifies titin mutations causing hereditary myopathy with early respiratory failure (HMERF) in families of diverse ethnic origins. *BMC Neurol* 2013; 13; 29. doi: 10.1186/1471-2377-13-29.
- Udd B. Limb-girdle type muscular dystrophy in a large family with distal myopathy: Homozygous manifestation of a dominant gene? *J Med Genet* 1992; 29: 383–389.
- Udd B, Partanen J, Halonen P, Falck B, Hakamies L, Heikkilä H, Ingo S, Kalimo H, Kääriäinen H, Laulumaa V. Tibial muscular dystrophy. Late adult-onset distal myopathy in 66 Finnish patients. *Arch Neurol*. 1993; 50(6):604-8.
- Uruha A, Hayashi YK, Oya Y, Mori-Yoshimura M, Kanai M, Murata M, Kawamura M, Ogata K, Matsumura T, Suzuki S, Takahashi Y, Kondo T, Kawarabayashi T, Ischii Y, Kokubun N, Yokoi S, Yasuda R, Kira J, Mitsuhashi S, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I. Necklace cytoplasmic bodies in hereditary myopathy with early respiratory failure. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015; 86; 5, 483-489.
- Vainzof M, Passos-Bueno MR, Pavanello RC, Zatz M. Is dystrophin always altered in Becker muscular dystrophy patients? *J Neurol Sci* 1995;131(1):99-104.
- Vasli N, Laporte J. Impacts of massively parallel sequencing for genetic diagnosis of neuromuscular disorders. *Acta Neuropathol* 2013;125: 173–85.
- Venance S, Tawil R. Neuromuscular Diseases: Approach to Clinical Diagnosis. In Tawil RN, Venance S (eds) *Neuromuscular Disorders*; New York, USA: Wiley-Blackwell; 2011, pp.1-8 (Gross RA, Mink JW (ed); *Neurology in Practice*).
- Villegas-Romero I, Ortíz-Prieto A, Navarro-Navarro I, Linares-Barrios M. Técnica quirúrgica de la biopsia muscular. *Actas Dermosifiliogr* 2021;112:368-369.
- Vissing, J. Exercise intolerance and myoglobinuria. In Lisak, RP, Truong, DD, Carroll, WM, Bhidayasiri, R (eds.). *International Neurology*; New Delhi, India; John Wiley & Sons; 2016, p. 516.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Vogel H, Zamecnik J. Diagnostic immunohistology of muscle diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64(3):181-93.
- Voit T, Haas K, Léger JOC, Pons F, Léger JJ. Xp21 Dystrophin and 6q Dystrophin-related Protein. Comparative immunolocalization using multiple antibodies. *Am J Pathol* 1991;139(5):969-76.
- Walters J, Baborie A. Muscle biopsy: what and why and when? *A. Pract Neurol* 2020;20:385-95.
- Wang K. Titin/connectin and nebulin: giant protein rulers of muscle structure and function. *Adv Biophys* 1996; 33; 123-134.
- Wattjes MP, Kley RA, Fischer D. Neuromuscular imaging in inherited muscle diseases. *Eur Radiol* 2010;20:2447-60.
- Weir AP, Burton EA, Harrod G, Davies KE. A- and B-utrophin have different expression patterns and are differentially up-regulated in mdx muscle. *J Biol Chem* 2002;277(47):45285-90.
- Wicklund MP. Approach to diseases of muscle. In Tawil RN, Venance S (eds) *Neuromuscular Disorders*; New York, USA: Wiley-Blackwell; 2011, pp.9-14 (Gross RA, Mink JW (ed); *Neurology in Practice*).
- Wilson LA, Cooper BJ, Dux L, Dubowitz V, Sewry CA. Expression of utrophin (dystrophin-related protein) during regeneration and maturation of skeletal muscle in canine X-linked muscular dystrophy. *Neuropathol and Appl Neurobiol* 1994;20:359-67.
- Witt CC, Olivieri N, Centner T, Kolmener B, Millevoi S, Labeit D, Jockusch H, Pastore A, Labeit S. A survey of the primary structure and the interspecies conservation of I-band titin's elastic elements in vertebrates. *J Struct Biol* 1998; 122: 1-10.
- Witt CC, Bukart C, Labeit D, McNabb M, Wu Y, Granzier H, Labeit S. Nebulin regulates thin filament length, contractility and Z-disk structure in vivo. *EMBO J* 2006; 25, 3843-3855.
- Young P, Ferguson C, Bañuelos S, Gautel M. Molecular structure of the sarcomeric Z-disk: two types of titin interactions lead to an asymmetrical sorting of alpha-actinin. *EMBO J* 1998; 17; 1614-1624.







UNIVERSIDAD DE GRANADA