



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Caracterización clínica y genética de las distrofias musculares: en busca de nuevos fenotipos

Andrés Eduardo Nascimento Osorio

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

TESIS DOCTORAL

CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y GENÉTICA DE LAS
DISTROFIAS MUSCULARES:
EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

Autor:

Andrés Eduardo Nascimento Osorio

Director de Tesis:

Dr. Daniel Natera de Benito

Tutor de Tesis:

Dr. Jaume Campistol Plana

Facultad de Medicina

Universidad de Barcelona

2024

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto no hubiera podido llevarse a cabo sin la inestimable ayuda y colaboración de los pacientes y muchas personas que han aportado sus esfuerzos en los diferentes trabajos que conforman esta tesis, a todos ellos quisiera expresarles mi gratitud.

En primer lugar, quisiera dar mi agradecimiento a mi director de tesis, el Doctor Daniel Natera de Benito, mente científica, generoso, preciso y eficiente. Es capaz de transformar la experiencia clínica del día a día en conocimiento, y superar el laberinto interminable de las publicaciones. Sin su apoyo esta tesis no hubiera sido posible.

A Carlos Ortiz su apoyo y amistad en los últimos 15 años, mano derecha en el cuidado de los pacientes en la unidad de neuromuscular, con una calidad humana excepcional, gran compañero apasionado por el aprendizaje y la docencia. A Jessica Expósito y Laura Carrera, neuropediatras comprometidas con la visión de la atención integral, han impulsado la mejor organización, planificación y compromiso en el cuidado de pacientes y familiares. Es importante destacar la dedicación, compromiso y trabajo coordinado con el equipo de la unidad de ensayos que ha permitido ofrecer nuevas opciones de tratamiento a nuestros pacientes y colaborar en el desarrollo de estas nuevas terapias que están cambiando la historia natural de algunas enfermedades. A Berta Estévez, la más joven integrante del equipo, su tenacidad en la compleja tarea del diagnóstico molecular, su capacidad investigadora, su implicación en la clínica y en especial la capacidad de explicar lo complejo de forma sencilla. A Jaume Colomer, nuestro padre profesional que nos inculcó con su ejemplo la pasión por las enfermedades neuromusculares, ejemplo de dedicación y perseverancia. A todo el equipo de la unidad de tratamiento integral del paciente neuromuscular (UTIN) responsables de la atención multidisciplinar de nuestros pacientes, al servicio de anatomía patológica y el equipo de Biobanco por todo el apoyo y dedicación. Poder compartir con un equipo tan especial ha sido un privilegio

Agradecer al equipo de la Dra. Janet Hoenicka coordinadora del Laboratorio de Neurogenética y Medicina Molecular y la Dra. Cecilia Jimenez-Mallebrera directora del laboratorio de investigación de enfermedades neuromusculares por su apoyo.

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Peter B Kang, a la Dra. Reghan Foley y a Carsten Bonnemann, a los neurólogos y neuropediatras de otros hospitales, por su invaluable apoyo y colaboración en los trabajos que hemos publicado conjuntamente.

A los pacientes y sus familias, nuestros grandes maestros, por su confianza y lucha, constante fuente de inspiración y motivación para seguir investigando y aprendiendo.

A mi familia en especial a Irene mi compañera de vida por estar siempre, a mis hijos Andrea y Nacho por darme la alegría e ilusión de seguir adelante. Gracias a todos por ser parte de este viaje académico y por ayudar a convertir nuestras ideas en realidades publicadas. Esta tesis es el reflejo del esfuerzo de muchos y el trabajo en equipo

ABREVIATURAS

6MWT	6-minute walking test
AD	Autosómico dominante
AR	Autosómico recesivo
BM	Miopatía de Bethlem
CK	Creatinquinasa
CMAP	Potencial de acción muscular
COL6-RD	Distrofia muscular por déficit de colágeno VI
CVF	Capacidad vital forzada
DGC	Complejo glicoproteico de la distrofina
DMC	Distrofia muscular congénita
Hz	Hertzio
LGMD	Distrofia muscular de cinturas (por su acrónimo en inglés: limb-girdle muscular dystrophy)
MFM-32	Medida de Función Motora 32
MRC	Medical Research Council
NGS	Next generation sequencing
NSAA	Evaluación Ambulatoria North Star
TH	Dominio de la triple hélice del colágeno VI
UCMD	Distrofia muscular congénita de Ullrich
VNI	Ventilación no invasiva
WB	Western blot

ÍNDICE

PUBLICACIONES.....	1
RESUMEN.....	3
I. INTRODUCCIÓN	5
1.1 DISTROFIAS MUSCULARES	5
1.2 CLASIFICACIÓN DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES	8
1.2.1 DISTROFIAS MUSCULARES CONGÉNITAS	10
1.2.2 DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS	14
1.3 DISTROFIAS MUSCULARES POR DÉFICIT DE COLÁGENO VI	17
1.4 DISTROFIAS MUSCULARES ASOCIADAS A DEFECTOS DE LOS DISTROGLICANOS	19
1.5 DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS SIN DIAGNÓSTICO GENÉTICO	21
II. HIPÓTESIS.....	23
III. OBJETIVOS.....	25
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	26
V. RESULTADOS.....	28
5.1 ESTUDIO 1: ASOCIACIÓN DEL MÁXIMO HITO MOTOR EN EDADES PRECOCES Y LA FUNCIÓN MOTORA A LARGO PLAZO EN PACIENTES CON DISTROFIA MUSCULAR POR DÉFICIT DE COLÁGENO VI	28
5.1.1 CORRELACIÓN ENTRE LA MÁXIMA HABILIDAD MOTORA Y LA CLASIFICACIÓN POSTERIOR DE LA ENFERMEDAD.....	28
5.1.2 CORRELACIÓN ENTRE LA MÁXIMA HABILIDAD MOTORA Y LA FUNCIÓN PULMONAR.....	36
5.1.3 CORRELACIÓN ENTRE LA MÁXIMA HABILIDAD MOTORA Y EL GENOTIPO.....	37
5.2 ESTUDIO 2: EFECTO A CORTO Y LARGO PLAZO DEL TRATAMIENTO CON PIRIDOSTIGMINA EN PACIENTES CON DISTROFIA MUSCULAR POR ALTERACIONES EN GMPPB	53
5.3 ESTUDIO 3: VARIANTES EN DTNA CAUSAN UNA DISTROFIA MUSCULAR DOMINANTE RELATIVAMENTE LEVE.....	71
5.3.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	71
5.3.2 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS.....	73
5.3.3 ESTUDIOS IN SILICO DE LAS VARIANTES IDENTIFICADAS EN DTNA	75
5.3.4 HALLAZGOS EN LAS BIOPSIAS MUSCULARES.....	78
5.3.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE α -DISTROBREVINA E INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA.....	83
5.3.6 ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA	85
VI. DISCUSIÓN	104

6.1 CATEGORIZACIÓN DE LOS FENOTIPOS DE DISTROFIA POR DÉFICIT DE COLÁGENO VI, CON EL OBJETIVO DE PREDECIR LA FUNCIÓN MOTORA Y RESPIRATORIA A LARGO PLAZO	106
6.2 IMPACTO DEL TRATAMIENTO CON ANTICOLINESTERÁSICOS EN PACIENTES CON DISTROFIA MUSCULAR POR <i>GMPPB</i>.....	112
6.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, ANATOMOPATOLÓGICAS Y FISIOPATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES CON DISTROFIA POR ALTERACIONES EN <i>DTNA</i>	114
<i>VII. CONCLUSIONES</i>.....	119
<i>VIII. BIBLIOGRAFÍA</i>.....	120

PUBLICACIONES

Tesis en formato de compendio de artículos:

Association of initial maximal motor ability with long-term functional outcome in patients with COL6-related dystrophies. *Neurology* 2021; 96 (10): e1413-e1424. Natera-de Benito D, Foley AR, Domínguez-González C, Orteiz C, Jain M, Mebrahtu A, Donkervoort S, Hu Y, Fink M, Yun P, Ogata T, Medina J, Vigo M, Meilleur KG, Leach ME, Dastgir J, Díaz-Manera J, Carrera-García L, Expósito-Escudero J, Alarcon M, Cuadras D, Montiel-Morillo E, Milisenda JC, Dominguez-Rubio R, Olivé M, Colomer J, Jou C, Jimenez-Mallebrera C, Bönnemann CG, **Nascimento A.**

Factor de impacto: 7,7

Cuartil: D1

Early and long-term effect of the treatment with pyridostigmine in patients with GMPPB-related congenital myasthenic syndrome. *Neuromuscul Disord.* 2020; 30 (9): 719-726. Bobadilla-Quesada EJ, Natera-de Benito D, Carrera-García L, Orteiz C, Exposito-Escudero J, Jimenez-Mallebrera C, Jou C, Codina A, Corbera J, Moya O, Saez V, Gonzalez-Quereda L, Gallano P, Colomer J, Cuadras D, Medina J, Yoldi ME, **Nascimento A.**

Factor de impacto: 2,7

Cuartil: Q2

Variants in *DTNA* cause a mild, dominantly inherited muscular dystrophy. *Acta Neuropathol.* 2023;145 (4): 479-496. **Nascimento A.** Bruels CC, Donkervoort S, Foley AR, Codina A, Milisenda JC, Estrella EA, Li C, Pijuan J, Draper I, Hu Y, Stafki SA, Pais LS, Ganesh VS, O'Donnell-Luria A, Syeda SB, Carrera-García L, Expósito-Escudero J, Yubero D, Martorell L, Pinal-Fernandez I, Lidov HGW, Mammen AL, Grau-Junyent JM, Orteiz C, Palau F, Ghosh PS, Darras BT, Jou C, Kunkel LM, Hoenicka J, Bönnemann CG, Kang PB, Natera-de Benito D.

Factor de impacto: 9,3

Cuartil: D1

INTRODUCCIÓN

RESUMEN

Las distrofias musculares son un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas que afectan la estabilidad y/o reparación del sarcolema, la membrana de las fibras musculares. Esta inestabilidad conduce a la degeneración progresiva del músculo esquelético debido a la pérdida gradual de fibras. Una caracterización clínica precisa y la identificación de nuevos fenotipos y genotipos son fundamentales para entender mejor la variabilidad clínica de estas enfermedades, permitiendo diagnósticos más tempranos, pronósticos más exactos, la identificación de nuevas dianas terapéuticas y la evaluación efectiva de los tratamientos.

Esta tesis se presenta como un compendio de publicaciones que tienen el objetivo común de definir mejor los fenotipos asociados a varios tipos de distrofias musculares, identificando factores pronósticos y de evolución de enfermedad, así como medidas objetivas para evaluar la función motora en estos pacientes, con la semiología clínica clásica como base constante en este proceso.

El análisis del máximo hito motor alcanzado a los 5 años en los pacientes con distrofia muscular por déficit de colágeno VI permite clasificar a los pacientes en tres grupos fenotípicos distintos: distrofia muscular congénita de Ullrich, fenotipo intermedio y miopatía de Bethlem. Esta clasificación fenotípica se correlaciona con la función motora y respiratoria de los pacientes a largo plazo, permitiendo predecir eventos relevantes de la enfermedad, como la edad de pérdida de la marcha y la edad de inicio de soporte respiratorio.

En pacientes con distrofia muscular por *GMPPB* se objetivó cómo el tratamiento con piridostigmina mejora significativamente la función motora en pocas horas y durante

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

el primer año. Sin embargo, a partir de ese momento, se evidenció un empeoramiento en las escalas funcionales motoras, lo que sugiere que el componente distrófico de la enfermedad, que es progresivo, persiste, a pesar del beneficio que suponen los anticolinesterásicos al mejorar la transmisión neuromuscular, afectada en la distrofia por *GMPPB*, ya que es una enfermedad con un componente miasteniforme además de distrófico.

Se aporta evidencia clínica, genética e histopatológica de la patogenicidad de variantes autosómicas dominantes en *DTNA*, añadiendo un nuevo gen al listado de genes causantes de distrofias musculares de cinturas. Nuestros hallazgos sugieren que el dominio coiled-coil de α -distrobrevina es intolerante a la variación genética en el músculo esquelético. Se ofrece una caracterización precisa del fenotipo asociado. La identificación de nuevos fenotipos y la comprensión de las variantes genéticas específicas son pasos cruciales hacia un tratamiento más personalizado y eficaz para los pacientes con distrofias musculares.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 DISTROFIAS MUSCULARES

Las distrofias musculares constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas que tienen en común que están causadas por alteraciones en la estabilidad y/o en la reparación de la membrana muscular, también denominada sarcolema, y que resultan en una degeneración del músculo esquelético derivada de una pérdida paulatina de fibras musculares. En la **figura 1** se muestra un esquema elaborado por Shin *et al* en el que se representan las proteínas cuya alteración da lugar a las distrofias musculares más prevalentes ¹. Existen características típicas en las biopsias musculares de los pacientes con distrofia: aumento en la variabilidad del tamaño de las fibras, presencia de núcleos internos, presencia de fibras regenerativas, así como aumento de tejido adiposo y conectivo a nivel de endomisio y perimisio. En la **figura 2** se muestran el conjunto de estas características que constituyen el denominado patrón distrófico.

Entre los signos y síntomas directamente derivados de la afectación muscular destacan por encima de los demás la debilidad muscular y la elevación de la creatinquinasa (CK) en suero, pero no es raro que los pacientes puedan presentar también otros síntomas como rabdomiólisis, mialgias o intolerancia al ejercicio ²⁻⁴.

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

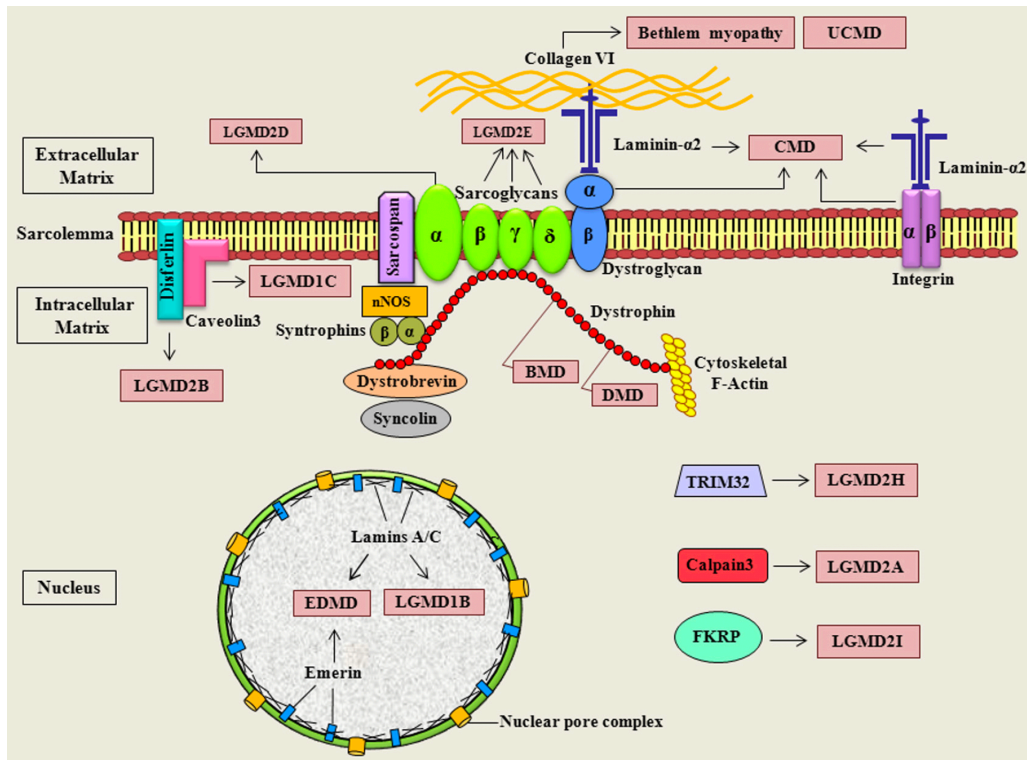


Figura 1. Bases genéticas de las distrofias musculares. Esquema de varias proteínas y las distrofias musculares asociadas causadas por su alteración ¹. BMD: distrofia muscular de Becker; CMD: distrofia muscular congénita; DMD: distrofia muscular de Duchenne; EDMD: distrofia muscular de Emery-Dreifuss; FKRP: proteína relacionada con fukutina; LGMD: distrofia muscular de cinturas; nNOS: sintasa neuronal de óxido nítrico; UCMD: distrofia muscular congénita de Ullrich.

La mayoría de las distrofias musculares limitan la función motora de las personas que las padecen y a menudo provocan una discapacidad motora que impacta significativamente en su capacidad para llevar a cabo las actividades básicas de la vida diaria. Los pacientes generalmente presentan una debilidad muscular proximal progresiva que afecta sobre todo a los músculos de las extremidades y a los músculos axiales, pudiendo verse también comprometidos los músculos respiratorios o la musculatura facial en algunos tipos concretos. Además de los músculos, algunos tipos de distrofias musculares pueden afectar también a otros órganos como el cerebro, el corazón o los ojos ⁵⁻¹⁰

INTRODUCCIÓN

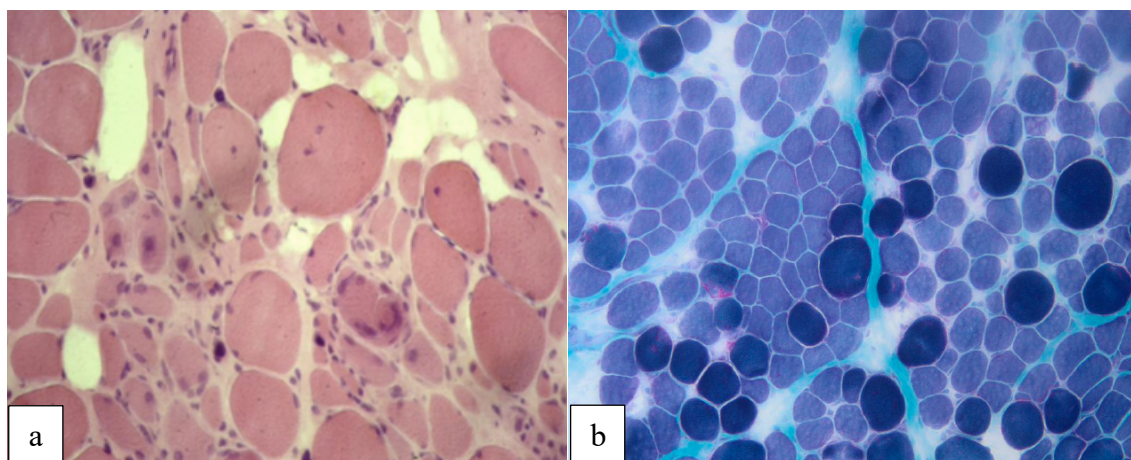


Figura 2. Imágenes de una biopsia muscular con tinción Hematoxilina – eosina (a) en un paciente con distrofia muscular. Se observan fibras redondeadas, con variabilidad de tamaño, necrosis y núcleos centrales. Tinción de tricrómico de Gomori (b) pone en evidencia el aumento del tejido conectivo.

La gravedad, edad de aparición, velocidad de progresión, tipo de herencia, complicaciones y pronóstico varían significativamente entre los distintos tipos de distrofias musculares ^{2,11-13}. En la **Figura 3** se muestran algunos pacientes con diferentes formas de distrofia muscular, lo que pone en evidencia la gran heterogeneidad clínica, en relación al inicio de síntomas, distribución de la debilidad y progresión.

La prevalencia de las distrofias musculares de forma global se estima en 16,1 por cada 100.000 personas (intervalo de confianza: 11,2 - 23,2). Por subtipos, las prevalencias estimadas para las distrofias musculares más frecuentes son las siguientes: (a) distrofia miotónica de Steinert: 8,3/100.000 personas, (b) distrofia facioescapulohumeral: 3,9/100.000 personas, (c) distrofia muscular de cinturas: 1,6/100.000 personas, (d) distrofias musculares congénitas: 0,9/100.000 personas ¹⁴.

Caracterizar clínicamente con precisión los diversos tipos de distrofia muscular e identificar fenotipos y genotipos que todavía no han sido descritos es esencial para avanzar en el conocimiento de estas enfermedades y comprender mejor la variabilidad clínica asociada a cada uno de sus subtipos. De este modo, se podrá ofrecer un

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

diagnóstico más precoz, pronósticos más precisos, identificar dianas terapéuticas y evaluar mejor la eficacia de los tratamientos ^{4,10}.

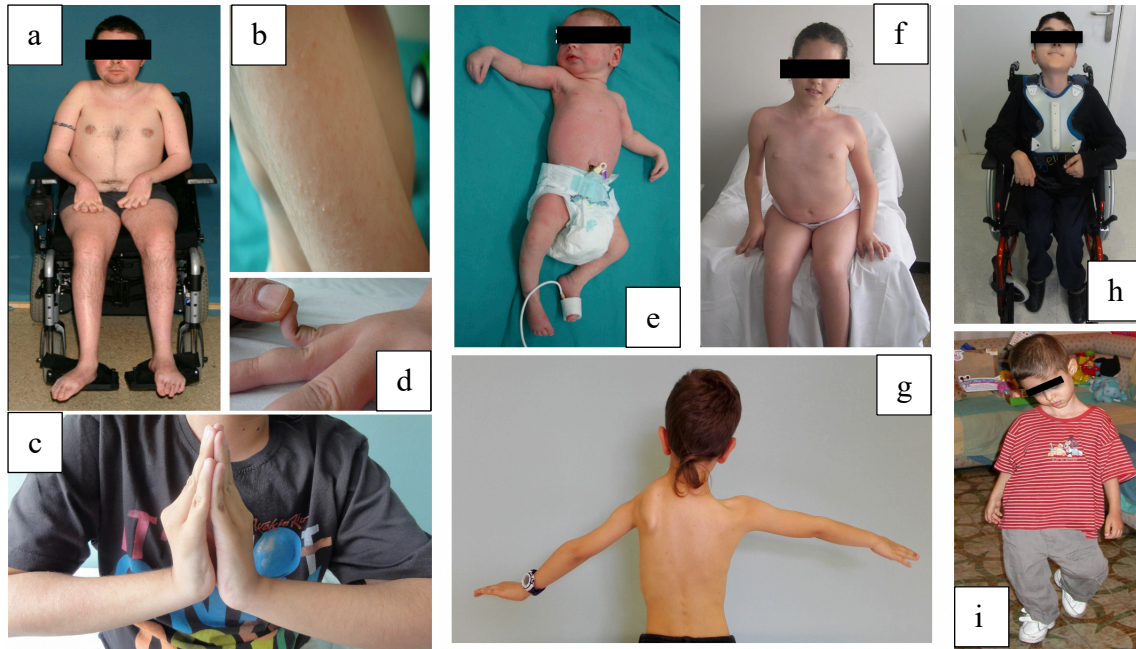


Figura 3. Imágenes de pacientes afectados de diferentes formas de distrofia muscular en diferentes edades y fases de la enfermedad, a,b,c,d) Distrofia muscular por déficit de colágeno VI, destaca la hiperqueratosis folicular, la hiperlaxitud articular de predominio distal y la retracción articular en codos, flexores de los dedos; e,f) Paciente con distrofia muscular congénita por déficit total de merosina, durante el período neonatal y la adolescencia, debilidad de predominio proximal y axial, máximo nivel motor alcanzado sedestación autónoma que generalmente desarrollan escoliosis; g) paciente con distrofia fascioescapulo humeral, se objetiva la debilidad escapular y la distribución asimétrica de la debilidad, rasgo característico de esta entidad; h,i) paciente afecto de distrofia muscular congénita por defecto en el gen LMNA, se observa a las edad de 3 años, se observa la debilidad de la musculatura cervical que causa caída cefálica, descrito como “dropped-head síndrome”, llama la atención la capacidad de caminar a pesar de no haber alcanzado el control cefálico, el mismo paciente en la adolescencia posterior a la pérdida deambulaci3n autónoma debido a la progresi3n de la debilidad y el desarrollo precoz de retracciones articulares.

1.2 CLASIFICACI3N DE LAS DISTROFIAS MUSCULARES

Las distrofias musculares se han clasificado tradicionalmente seg3n su presentaci3n cl3nica, edad de inicio, progresi3n y patr3n de herencia. Clasificar en

INTRODUCCIÓN

función de la edad a la que aparecen los primeros síntomas nos permite dividir las distrofias musculares en dos grandes grupos: (i) las distrofias musculares congénitas, que son distrofias musculares de aparición precoz y (ii) las distrofias musculares de cinturas, cuyos primeros síntomas aparecen más tarde. Además de estos dos grandes grupos, existen tipos específicos de distrofias musculares, como las distrofinopatías (distrofia muscular de Duchenne y de Becker), la distrofia miotónica de Steinert y la distrofia muscular facioescapulohumeral, que presentan fenotipos muy característicos y fácilmente reconocibles por los clínico expertos. Han sido ampliamente descritas desde hace décadas y, por ello, se mantienen como categorías propias dentro de la clasificación de las distrofias musculares, sin pertenecer ni al grupo de las distrofias musculares congénitas ni al de las distrofias musculares de cinturas ^{4,15}.

En las distrofias musculares hay pleiotropía genética, que quiere decir que mutaciones en el mismo gen pueden dar lugar a diferentes presentaciones fenotípicas. Este es el caso, por ejemplo, de las distrofias musculares por déficit de colágeno VI y de las distroglicanopatías, sobre las cuales profundizaremos más adelante, pero también de las sarcoglicanopatías o de las distrofias musculares por déficit de merosina, que pueden dar lugar tanto a distrofias musculares congénitas como a distrofias de cinturas. Un ejemplo aún más llamativo es el de las mutaciones en el gen *LMNA*, que puede causar una distrofia muscular congénita, una distrofia muscular de Emery-Dreifuss o, incluso, fenotipos sin afectación muscular ¹⁶⁻¹⁸. Además de pleiotropía génica, las distrofias musculares también presentan heterogeneidad genética, que significa que mutaciones en genes diferentes pueden causar fenotipos similares. Un ejemplo ilustrativo de esto son las distroglicanopatías que incluyen afectaciones estructurales del sistema nervioso central, como la enfermedad músculo-ojo-cerebro y el síndrome de Walker-Warburg. Inicialmente se pensó que estas enfermedades estaban causadas específicamente por mutaciones en genes concretos, como *POMT1* para el síndrome de Walker-Warburg y *POMGNT1* para la enfermedad músculo-ojo-cerebro. Sin embargo,

ahora sabemos que hay varios genes implicados en pasos convergentes de la glicosilación y que mutaciones en cualquiera de ellos pueden dar lugar a estos fenotipos

19–23

1.2.1 DISTROFIAS MUSCULARES CONGÉNITAS

Las distrofias musculares congénitas son un grupo de distrofias musculares definidas por la aparición de debilidad muscular antes de la adquisición de la marcha y retraso en la adquisición de los hitos motores ¹⁵. Se han descrito más de 35 genes asociados a distrofias musculares congénitas, dando lugar a un espectro de fenotipos que pueden asociar afectación de los músculos cardíacos/respiratorios, el sistema nervioso central y las estructuras oculares ²⁴. Los genes más prevalentes y los fenotipos que asocian se muestran en la **Tabla 1** ⁴, en la que las distrofias musculares congénitas se clasifican en base a la función de las proteínas alteradas. Se estima que la prevalencia general de las DMC es de 0,6 a 0,9 por cada 100.000 ^{25–27}.

Aunque existen diferencias geográficas, los tipos de distrofias musculares congénitas más prevalentes son la distrofia muscular por déficit de colágeno VI (12–19%), las distroglicanopatías (12–25%), las distrofias por déficit de merosina (10–37%) y las distrofias por selenoproteína (12%) ^{28–30}. En los últimos años se han relacionado varios nuevos genes con las distrofias musculares congénitas, pero a pesar de ello el rendimiento diagnóstico de las pruebas genéticas sigue siendo de alrededor del 60% ^{31,32}.

Varias de las proteínas afectadas en las distrofias musculares congénitas se localizan en la lámina basal o en la matriz extracelular que rodean a la célula muscular (principalmente laminina- α 2 o merosina, α -distroglicano y colágeno VI). La matriz extracelular es un tejido conectivo especializado que desempeña importantes funciones en el músculo, como la transmisión de la fuerza de contracción entre las fibras y la

INTRODUCCIÓN

regeneración muscular. La pérdida de la conexión estructural proporcionada por las proteínas de la matriz extracelular y las alteraciones en las vías de señalización celular que activan, contribuyen a la fisiopatología de las distrofias musculares congénitas, aunque los detalles de estos mecanismos aún no se conocen con exactitud. La **Figura 4**, elaborada por Veronica Pini y publicada en el trabajo de Alberto Zambon y Francesco Muntoni ¹⁵, muestra un esquema de las principales proteínas implicadas en las distrofias musculares congénitas y su localización dentro de la célula.

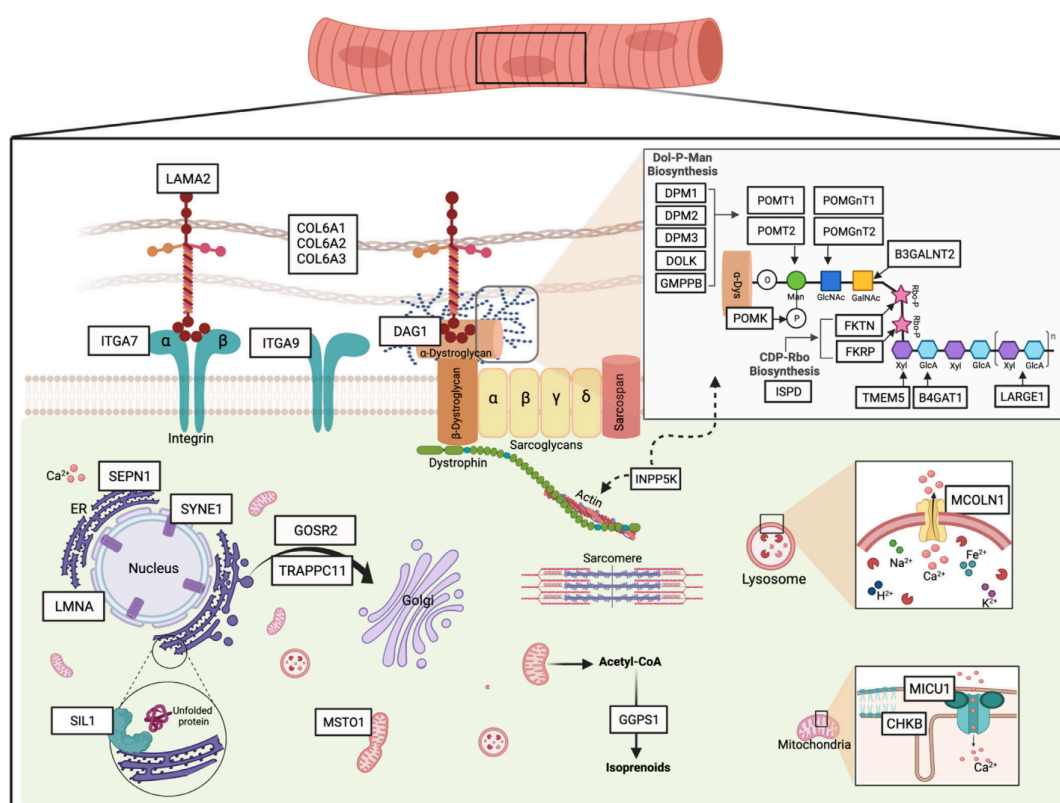


Figura 4. Esquema de las principales proteínas implicadas en las distrofias musculares congénitas y su localización dentro de la célula¹⁵.

La **Tabla 1** muestra la clasificación actual de las distrofias musculares congénitas, basada en la función de las proteínas alteradas ¹⁵. Las distrofias musculares congénitas causadas por defectos primarios de los distroglicanos o defectos en la glucosilación del α -distroglicano se denominan colectivamente distroglicanopatías e

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

incluyen diferentes fenotipos que van desde el síndrome de Walker-Warburg, la enfermedad músculo-ojo-cerebro, la distrofia muscular congénita con discapacidad intelectual, la distrofia muscular congénita con afectación cerebelosa, la elevación aislada de CK $\pm$ discapacidad intelectual, la cardiomiopatía aislada e incluso manifestaciones oculares aisladas. No es sorprendente que exista un continuo entre estas categorías clínicas/radiológicas^{33,34}.

Gen		Fenotipos de la enfermedad
DMC relacionadas con alteraciones en las proteínas estructurales de la matriz extracelular		
<i>LAMA2</i>		Distrofia muscular congénita por déficit de merosina
<i>COL6A1,</i> <i>COL6A2,</i> <i>COL6A3</i>		Distrofia muscular por déficit de colágeno VI tipo Ullrich
DMC por alteraciones en proteínas sarcolemas externas		
<i>ITGA7</i>		Distrofia muscular congénita relacionada con integrina $\beta 7$
DMC relacionadas con defectos primarios de distroglicanos o en la glucosilación del α-distroglicano		
<i>POMT1</i>		Síndrome de Walker-Warburg, enfermedad músculo-ojo-cerebro, distrofia muscular congénita con afectación cerebelosa, distrofia muscular congénita con discapacidad intelectual y microcefalia, distrofia muscular congénita sin discapacidad intelectual
<i>POMT2</i>		Síndrome de Walker-Warburg, enfermedad músculo-ojo-cerebro, distrofia muscular congénita con afectación cerebelosa, distrofia muscular congénita con discapacidad intelectual y microcefalia, distrofia muscular congénita sin discapacidad intelectual
<i>POMGNT1</i>		Síndrome de Walker-Warburg, enfermedad músculo-ojo-cerebro, distrofia muscular congénita con afectación cerebelosa, distrofia muscular congénita sin discapacidad intelectual
<i>FKRP</i>		Síndrome de Walker-Warburg, enfermedad músculo-ojo-cerebro, distrofia muscular congénita con discapacidad intelectual y microcefalia, distrofia muscular congénita sin discapacidad intelectual
<i>FCMD</i>		Fukuyama distrofia muscular congénita, distrofia muscular congénita con discapacidad intelectual, distrofia muscular congénita sin discapacidad intelectual
<i>LARGE</i>		Síndrome de Walker-Warburg, enfermedad músculo-ojo-cerebro, alteraciones de la sustancia blanca
<i>DPM2 y DPM3</i>		Distrofia muscular congénita con discapacidad intelectual y epilepsia grave
<i>ISPD</i>		Síndrome de Walker-Warburg, distrofia muscular de cinturas
<i>GTDC2</i>		Síndrome de Walker-Warburg
<i>B3GALNT2</i>		Síndrome de Walker-Warburg, enfermedad músculo-ojo-cerebro
<i>GMPPB</i>		Distrofia muscular congénita con discapacidad intelectual y epilepsia severa
<i>DAG1</i>		Distroglicanopatía primaria, distrofia muscular de cinturas con inicio temprano y discapacidad intelectual (RM normal en MRI), mutación alélica causa distrofia muscular congénita
<i>SGK196</i>		Enfermedad músculo-ojo-cerebro
DMC por defectos en proteínas del retículo endoplásmico		

INTRODUCCIÓN

SEPN1	Distrofia muscular congénita con rigid spine
DMC por defectos en proteínas de la membrana nuclear	
SYNE1	Distrofia muscular congénita con pulgares aducidos
LMNA	Laminopatía congénita distrofia muscular de Emery-Dreifuss
SYNE2	Distrofia muscular de Emery-Dreifuss
LUMA	Proteína transmembrana 43 distrofia muscular de Emery-Dreifuss
EMD	Distrofia muscular de Emery-Dreifuss
DMC por defectos en proteínas de la membrana mitocondrial	
CHKB	Distrofia muscular congénita mitocondrial

Tabla 1. Distrofias musculares congénitas asociadas con diferentes proteínas, adaptada a partir de la tabla de Mercuri *et al*⁴

1.2.2 DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS

Las distrofias musculares de cinturas (LGMD, por sus siglas en inglés) fueron descritas originalmente por John Walton y FJ Nattrass en 1954 para distinguir los trastornos musculares con patrón de debilidad que afectaba sobre todo a las cinturas escapular y pelviana y que podían afectar tanto a hombres como a mujeres, de la distrofia muscular de Duchenne ligada al cromosoma X³⁵. El nombre definió el patrón de debilidad y ayudó a diferenciarlo de otras distrofias frecuentes, como la distrofia muscular facioescapulohumeral y la distrofia miotónica. Hasta el momento se han identificado más de 30 tipos diferentes de distrofias musculares de cinturas, con algunas características compartidas por todos: (1) son heredadas de forma autosómica; (2) pueden presentarse desde la infancia hasta la edad adulta; y (3) dan lugar a una debilidad muscular proximal progresiva. Al margen de estas similitudes, hay varios aspectos que varían según el tipo de distrofia muscular, entre los que destacan la herencia dominante o recesiva y el impacto en la función cardíaca y/o respiratoria³⁶.

La clasificación de las distrofias musculares de cinturas ha sido revisada recientemente. Históricamente, se subdividían según la herencia autosómica dominante o recesiva. La clasificación original denominaba a la herencia dominante como LGMD1 y a la herencia recesiva como LGMD2, seguida de una letra para indicar el subtipo según la mutación genética, en orden de descubrimiento (por ejemplo, LGMD2A). Sin embargo, al irse descubriendo nuevos tipos de distrofias musculares de cinturas, en el año 2016 las formas recesivas ya abarcaban desde LGMD2A hasta LGMD2Z. La abundancia de subtipos y la falta de nuevas letras para los genes LGMD2 impulsaron un movimiento para revisar la definición de mutaciones causantes de enfermedades y el esquema de clasificación. En la nueva nomenclatura, las formas dominantes se denominan LGMD-D y las formas recesivas se denominan LGMD-R³⁷. En un intento de restringir las LGMD a su definición original, se eliminaron cinco subtipos al limitar el fenotipo predominante

INTRODUCCIÓN

a la debilidad de patrón de cintura. En todos los casos, la patología muscular de los subtipos eliminados no demostraba un proceso verdaderamente distrófico, o los genes encajaban en categorías alternativas, como miopatía metabólica o miofibrilar ^{36,37}. Como se muestra en la **Tabla 2**, la clasificación actual también incluye un elemento descriptivo adicional relacionado con la mutación genética.

Las distrofias musculares de cinturas autosómicas dominantes, que representan aproximadamente un 10% de todas las distrofias de cinturas, tienden a tener una edad de debut más tardía, una progresión relativamente más lenta y, a menudo, una elevación menor de la creatinquinasa. Las distrofias musculares de cinturas autosómicas recesivas tienen una edad de debut más temprana y una progresión relativamente más rápida, así como una elevación significativa de creatinquinasa. En conjunto, las LGMD tienen una prevalencia mundial estimada de 0,8 a 6,9 casos por cada 100.000 personas.

Como se ha expuesto previamente, las distrofias musculares de cinturas presentan pleiotropía genética, con mutaciones en el mismo gen que pueden dar lugar a diferentes presentaciones fenotípicas. Hay distrofias musculares congénitas y distrofias musculares de cinturas que comparten la misma causa genética y que se diferencian fundamentalmente por la edad de aparición de los primeros síntomas y por la gravedad de la debilidad. Este es el caso de las distrofias musculares por déficit de colágeno VI y de las distroglicanopatías, en las cuales el hecho de asociarse a un fenotipo de distrofia muscular congénita o distrofia muscular de cinturas puede representar simplemente un espectro genético de la misma enfermedad.

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

Tipo de distrofia de cinturas	Herencia	Gen	Proteína	Localización Principal
LGMD D1 DNAJB6-related	AD	<i>DNAJB6</i>	Co-chaperona DNAJB6	Proteína asociada al sarcómero
LGMD D2 TNPO3-related	AD	<i>TNPO3</i>	Transportina-3	Núcleo
LGMD D3 HNRNPDL-related	AD	<i>HNRNPDL</i>	Proteína ribonucleoproteica nuclear D-	Núcleo
LGMD D4 calpain3-related	AD	<i>CAPN3</i>	Calpaina-3	Proteínas miofibrilares
LGMD D5 collagen 6-related	AD	<i>COL6A1, COL6A2, COL6A3</i>	Colágeno VI	Matriz extracelular
LGMD R1 calpain3-related	AR	<i>CAPN3</i>	Calpaina-3	Proteínas miofibrilares
LGMD R2 dysferlin-related	AR	<i>DYSF</i>	Disferlina	Proteína asociada al sarcolema
LGMD R5 γ -sarcoglycan-related	AR	<i>SGCG</i>	γ -sarcoglicano	Proteína asociada al sarcolema
LGMD R3 α -sarcoglycan-related	AR	<i>SGCA</i>	α -sarcoglicano	Proteína asociada al sarcolema
LGMD R4 β -sarcoglycan-related	AR	<i>SGCB</i>	β -sarcoglicano	Proteína asociada al sarcolema
LGMD R6 δ -sarcoglycan-related	AR	<i>SGCD</i>	δ -sarcoglicano	Proteína asociada al sarcolema
LGMD R7 telethonin-related	AR	<i>TCAP</i>	Teletonina (titin-cap)	Proteína asociada al sarcómero (disco Z)
LGMD R8 TRIM32-related	AR	<i>TRIM32</i>	TRIM32 (ubiquitina ligasa)	Proteína asociada al sarcómero (disco Z)
LGMD R9 FKRP-related	AR	<i>FKRP</i>	Proteína relacionada con fukutina	Enzimas relacionadas con la glicosiltransferasa
LGMD R10 titin-related	AR	<i>TTN</i>	Titina	Proteína del sarcómero
LGMD R11 POMT1-related	AR	<i>POMT1</i>	Proteína O-manosil-transferasa 1	Enzimas relacionadas con la glicosiltransferasa
LGMD R12 anoctamin5-related	AR	<i>ANO5</i>	Anoctamina 5	Proteína transmembrana (posiblemente retículo sarcoplásmico)
LGMD R13 Fukutin-related	AR	<i>FKTN</i>	Fukutina	Enzimas relacionadas con la glicosiltransferasa
LGMD R14 POMT2-related	AR	<i>POMT2</i>	Proteína O-manosil-transferasa 2	Enzimas relacionadas con la glicosiltransferasa
LGMD R15 POMGNT1-related	AR	<i>POMGNT1</i>	Proteína O-unida a la manosa- β -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa	Enzimas relacionadas con la glicosiltransferasa
LGMD R16 α -dystroglycan-related	AR	<i>DAG1</i>	Distroglioproteína asociada con distrofina 1	Proteína asociada al sarcolema

INTRODUCCIÓN

LGMD R17 plectin-related	AR	<i>PLEC1</i>	Plectina-1	Proteína asociada al sarcómero (disco Z)
LGMD R18 TRAPPC11-related	AR	<i>TRAPPC11</i>	Subunidad 11 del complejo del tráfico de proteínas TRAPP	Retículo endoplásmico
LGMD R19 GMPPB-related	AR	<i>GMPPB</i>	GDP-manosil pirofosfatasa B	Enzimas relacionadas con la glicosiltransferasa
LGMD R20 ISPD-related	AR	<i>ISPD</i>	Proteína relacionada con el dominio ISPD	Enzimas relacionadas con la glicosiltransferasa
LGMD R21 POGLUT1-related	AR	<i>POGLUT1</i>	Proteína O-glucosil-transferasa 1	Retículo endoplásmico
LGMD R22 collagen 6-related	AR	<i>COL6A1, COL6A2, COL6A3</i>	Colágeno VI	Matriz extracelular
LGMD R23 laminin α 2-related	AR	<i>LAMA2</i>	Merosina	Matriz extracelular
LGMD R24 POMGNT2-related	AR	<i>POMGNT2</i>	Proteína manosa beta 1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa 2	Retículo endoplásmico

Tabla 2. Clasificación de las distrofias musculares de cinturas ^{4,37}

1.3 DISTROFIAS MUSCULARES POR DÉFICIT DE COLÁGENO VI

Las distrofias musculares por déficit de colágeno VI están causada por variantes patogénicas autosómicas recesivas o autosómicas dominantes en cualquiera de los genes *COL6A1*, *COL6A2* o *COL6A3*. Estos genes codifican tres cadenas α diferentes que, en conjunto, forman monómeros y tetrámeros de colágeno VI, componentes de la matriz extracelular que tienen un papel relevante en los músculos esqueléticos y en los tendones ³⁸⁻⁴³. El colágeno VI es sintetizado y secretado fundamentalmente por los fibroblastos del endomisio que está entre las fibras musculares y no por las propias fibras musculares. Dentro de la célula las tres cadenas (α 1, α 2 y α 3) se unen para formar un monómero básico de colágeno VI que se asocia con otros monómeros para formar dímeros y tetrámeros, que finalmente se secretan al exterior celular para unirse entre sí y formar microfibrillas ¹⁵.

Los signos clínicos característicos de las distrofias musculares por déficit de colágeno VI son debilidad muscular, hiperlaxitud de las articulaciones distales, retracciones de las articulaciones proximales e insuficiencia respiratoria progresiva por

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

afectación relativamente precoz del músculo diafragma³⁸⁻⁴³. Las distrofias musculares por déficit de colágeno VI no asocian afectación cardíaca o del sistema nervioso central. Las distrofias musculares por déficit de colágeno VI abarcan un continuo de formas clínicas superpuestas que van desde los graves fenotipos tipo distrofia de Ullrich hasta formas más leves conocidas como miopatía de Bethlem, pasando por fenotipos intermedios^{39,41,42}. La edad de inicio de los síntomas y la gravedad varían considerablemente, pudiendo presentarse desde el periodo neonatal, en las formas más graves con incapacidad de conseguir la ambulación autónoma, hasta debutar en la edad adulta en los fenotipos más leves.

Debido a que no existen límites objetivos que delimiten unos fenotipos de distrofia por déficit de colágeno VI de los otros, es difícil determinar en qué fenotipo deben ser categorizados algunos de los pacientes con distrofias por déficit de colágeno VI, especialmente durante sus primeros años de vida. Se ha propuesto emplear la edad de pérdida de la marcha para clasificar a los pacientes, pero esto tiene asociado la desventaja de no tener un criterio para poder clasificar a los niños que no la han perdido, sobre todo teniendo en cuenta que la pérdida de marcha en la distrofia muscular por déficit de colágeno VI en los pacientes que caminan de niños no suele producirse antes de que cumplan los 10-20 años de edad^{38,44-47}.

Categorizar fenotípicamente con precisión a los pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI desde sus primeros años de vida es relevante para optimizar la atención clínica que se les ofrece y también para diseñar adecuadamente los futuros ensayos clínicos de las estrategias terapéuticas que ya están en fase de desarrollo⁴⁸⁻⁵⁹. Es fundamental disponer de criterios clínicos objetivos que permitan clasificar de una forma sencilla a los pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI desde las fases iniciales de la enfermedad, que es precisamente en las edades en las que probablemente se llevarán a cabo los ensayos clínicos.

1.4 DISTROFIAS MUSCULARES ASOCIADAS A DEFECTOS DE LOS DISTROGLICANOS

El distroglicano es un componente del complejo distrofina-glicoproteína, que es esencial para la relación de la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina intracelular. El distroglicano está codificado por el gen *DAG*, con un solo ARN mensajero que posteriormente se divide en dos subunidades (α y β). La subunidad α requiere complejas modificaciones postraduccionales para poder unirse a varias proteínas de la matriz extracelular y sinápticas como, por ejemplo, lamininas, agrina y neuexina. El término "distroglicanopatías" comprende un grupo de trastornos en los que el distroglicano o, más frecuentemente, la O-manosilación del α -distroglicano está alterada. Los estudios sobre la historia natural de las distroglicanopatías son difíciles de realizar debido a su baja frecuencia y a su extrema variabilidad fenotípica ^{15,60,61}.

La correlación genotipo-fenotipo se complica por el hecho de que el mismo gen a menudo se asocia con diferentes fenotipos y que la severidad depende en gran medida del grado de defecto de glicosilación más que del gen principalmente involucrado. Unos 20 genes se han asociado con distroglicanopatías secundarias, codificando principalmente glicosiltransferasas esenciales para los diferentes pasos de la O-glicosilación, pero también enzimas involucradas en la síntesis de nucleótidos de azúcar (dolicol-P-manosa), proteínas necesarias para unir la estructura central del α -distroglicano con la región de unión a ligandos distales, y proteínas recientemente reconocidas para el tráfico de membranas del Golgi ⁶².

Las características clínicas más frecuentes son la elevación de CKs, la debilidad progresiva que afecta predominantemente a los músculos proximales y una combinación variable de afectación estructural cerebral y ocular. La combinación de estos hallazgos es la base de la clasificación actual, que incluye desde formas sindrómicas de distrofia muscular congénita con afectación cerebral muy grave, como

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

el síndrome de Walker Warburg, la distrofia muscular congénita de Fukuyama o la enfermedad músculo-ojo-cerebro, hasta las distrofias musculares de cinturas ^{60,61,63,64}.

Se han identificado al menos 13 genes implicados de forma directa o indirecta en la vía de la O-glicosilación (*POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, *FKRP*, *Fukutin*, *LARGE*, *ISPD*, *GTDC2*, *B3GALNT2*, *B3GNT1*, *TMEM5*, *GMPPB*, *SGK7196*) ^{65,66}. Además, variantes patogénicas del gen que codifica para el distroglicano (*DAG1*) pueden interferir específicamente en su glicosilación y causar también una distroglicanopatía.

Desde 2013 se han descrito pacientes con variantes patogénicas bialélicas en el gen *GMPPB* con un espectro fenotípico que va desde la distrofia muscular congénita hasta formas de distrofia de cinturas. Los pacientes suelen presentar debilidad proximal, elevación de CKs y características distróficas en la biopsia muscular, así como defectos en la glicosilación del α -distroglicano ^{67,68}. Posteriormente, en el año 2015, se asociaron defectos en *GMPPB* con fenotipos de síndromes miasténicos congénitos, con alteraciones en la transmisión de la unión neuromuscular en los estudios neurofisiológicos, clínica de fatigabilidad y respuesta positiva a los anticolinesterásicos ⁶⁹. En muchos de los pacientes con mutaciones en *GMPPB* existe un solapamiento de síntomas que incluyen aquellos propios de las distrofias musculares y de las miastenias congénitas ⁷⁰.

Los síndromes miasténicos congénitos son un grupo heterogéneo de enfermedades causadas por mutaciones en genes implicados en la transmisión neuromuscular ⁷¹⁻⁷⁴. Además de *GMPPB*, se han identificado otros 4 genes que codifican proteínas involucradas en la glicosilación de proteínas que causan síndromes miasténicos congénitos ^{72,73,75-77}.

GMPPB es una enzima con un rol importante tanto para la O-glicosilación, que afecta a la O-glicosilación del α -distroglicano, como para la N-glicosilación, que involucra al β -distroglicano ^{68,78}. La N-glicosilación es esencial para el adecuado funcionamiento receptor de acetilcolina: durante la N-glicosilación, los residuos de carbohidratos se

INTRODUCCIÓN

distribuyen a través de las cuatro subunidades del receptor de acetilcolina, especialmente en las subunidades γ y δ ⁷⁹. Esto es esencial para el correcto plegamiento de las subunidades del receptor de acetilcolina, el ensamblaje apropiado del complejo pentamérico y posteriormente, el desarrollo y mantenimiento de la placa motora⁸⁰. Por tanto, las mutaciones en *GMPPB* darán lugar a un deterioro de la transmisión de señales en la unión neuromuscular.

Escasos estudios han sido publicados con relación a la respuesta a la piridostigmina, salbutamol y 3,4-diaminopirimidina en pacientes con distrofia muscular por *GMPPB*^{81,82}. Los estudios previos no han incluido en su metodología evaluaciones estandarizadas de la función motora para medir de la forma más objetiva posible el impacto del tratamiento con piridostigmina a corto y largo plazo.

1.5 DISTROFIAS MUSCULARES DE CINTURAS SIN DIAGNÓSTICO GENÉTICO

La investigación traslacional realizada en los últimos años ha potenciado el intercambio de información entre médicos e investigadores del campo de las enfermedades neuromusculares, acelerando el proceso de diagnóstico en muchos casos y facilitando el descubrimiento de genes o la expansión de fenotipos en genes ya conocidos. Agrupar pacientes, sin diagnóstico genético pero con un fenotipo similar, siempre ha sido de gran utilidad para encontrar la etiología genética. Actualmente la participación en proyectos colaborativos internacionales como SolveRD⁸³, y el empleo de herramientas como el Clinical Patient Management System (CPMS) de las ERNs⁸⁴ y MatchMaker Exchange^{85,86} han facilitado de forma exponencial la posibilidad de encontrar otros pacientes con estos fenotipos similares sin diagnóstico genético y alguna variante genética candidata, acortando significativamente la denominada odisea diagnóstica de estos pacientes.

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

A pesar de todos estos avances, sigue existiendo una proporción de pacientes con distrofias musculares de cinturas sin diagnóstico genético, incluyendo pacientes con las denominadas distrofias musculares de cinturas paucisintomáticas. Algunos pacientes afectados no presentan una debilidad marcada, sino que muestran una variedad de síntomas algo más sutiles ^{4,87}. En pacientes con este tipo de distrofias y en los que los estudios genéticos no han identificado una causa genética evidente, la biopsia muscular sigue siendo una herramienta diagnóstica muy útil para confirmar la histopatología distrófica y los hallazgos inmunohistoquímicos que a veces demuestran un defecto específico de alguna proteína del sarcolema ⁸⁸.

Descubrir nuevos genes cuya alteración de lugar a distrofias musculares requiere en la mayoría de los casos un abordaje multiómico y estudios funcionales. Este descubrimiento es crucial, ya que permite no solo un diagnóstico más preciso y temprano, sino que potencialmente también puede dar lugar a desarrollar terapias específicas y personalizadas. Además, conocer la base genética de la enfermedad facilita la asesoría genética para las familias afectadas y contribuye a la comprensión global de la fisiopatología de estas distrofias. El avance en el diagnóstico genético es, por tanto, un pilar fundamental en la mejora de la calidad de vida de los pacientes y en el esfuerzo por mejorar la calidad de vida de las personas que padecen estas enfermedades neuromusculares.

II. HIPÓTESIS

2.1 HIPÓTESIS GENERAL

Las distrofias musculares son un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas caracterizadas por alteraciones en la estabilidad y/o reparación del sarcolema, lo que da lugar a una pérdida progresiva de fibras musculares. Se clasifican en dos grandes grupos: distrofias musculares congénitas y distrofias musculares de cinturas, en función de la edad de aparición de los primeros síntomas. Estos grupos, a su vez, se subclasifican en subtipos en función del gen alterado. Todavía no se ha caracterizado completamente el fenotipo asociado a cada uno de estos subtipos y se cree que existen subtipos asociados a genes que aún no han sido descubiertos.

Nuestra hipótesis es que el fenotipado de precisión y la aplicación estandarizada de escalas funcionales en el seguimiento de los pacientes con distrofia muscular, junto con la aplicación de técnicas de secuenciación masiva orientadas por las características clínicas de los pacientes, permitirá definir mejor el fenotipo asociado a cada tipo de distrofia muscular y también permitirá identificar nuevos fenotipos asociados a este grupo tan heterogéneo de enfermedades.

2.1 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- Los fenotipos de la distrofia muscular por déficit de colágeno VI pueden clasificarse en tres categorías en base a la máxima capacidad motora alcanzada por los pacientes a los 5 años de edad y estos fenotipos correlacionan con la función motora y pulmonar a largo plazo.
- La aplicación de escalas funcionales motoras permite objetivar y cuantificar el grado de respuesta a fármacos en la distrofia muscular por *GMPPB*, en la cual una proporción

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

significativa de pacientes también presenta síntomas típicos de miastenia y cuya función motora aparentemente mejora al ser tratados con piridostigmina.

- Variantes patogénicas en el gen *DTNA*, que codifica la α -distrobrevina, un componente del complejo distrofina-distroglicano del sarcolema, pueden dar lugar a una distrofia muscular en humanos que no ha sido descrita previamente.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Definir con precisión el fenotipo asociado a varios tipos de distrofias musculares, identificando factores pronósticos y de evolución de enfermedad, así como medidas objetivas para evaluar la función motora estos pacientes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Categorizar los fenotipos de individuos con distrofias por déficit de colágeno VI en base al máximo hito motor alcanzado a los 5 años de edad, con el objetivo de predecir su función motora y respiratoria a largo plazo.
- Describir la fatigabilidad y el impacto del tratamiento con anticolinesterásicos en pacientes con distrofia muscular congénita causada por variantes patogénicas en el gen *GMPPB*.
- Describir las características clínicas, anatomopatológicas y fisiopatológicas de los pacientes con distrofia muscular por variantes en el gen *DTNA*.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron todos los pacientes seguidos en la Unidad de Neuromuscular del Hospital Sant Joan de Déu con distrofias musculares por déficit de colágeno VI, por variantes en *GMPPB* y por variantes en *DTNA*. En el caso del estudio sobre distrofia por déficit de colágeno VI también fueron incluidos pacientes seguidos en el National Institute of Neurological Disorders and Stroke del NIH de Estados Unidos, en el Hospital 12 de Octubre (Madrid), en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona), en el Hospital de Bellvitge (Barcelona) y en el Hospital Clinic (Barcelona). En el caso del estudio sobre distrofia por variantes en el gen *DTNA* también fueron incluidos pacientes seguidos en el National Institute of Neurological Disorders and Stroke del NIH de Estados Unidos, en el Boston Children's Hospital y en la Universidad de Minnesota. Se obtuvo consentimiento informado por parte de los pacientes o sus tutores, en el caso de los menores de edad, para participar en los estudios. Los estudios cumplieron con los criterios éticos de las instituciones participantes.

En todos los pacientes se habían identificado variantes patogénicas por técnicas de secuenciación que se especifican con detalle en cada uno de los artículos publicados. También se especifican en los artículos las metodologías empleadas para preparar y capturar las librerías de ADN, las herramientas bioinformáticas empleadas y las bases de datos públicas utilizadas para identificar las variantes informadas previamente y también para determinar la frecuencia de las nuevas variantes observadas. Asimismo, se exponen las herramientas empleadas para hacer estudios *in silico*.

La metodología empleada para los estudios histológicos, inmunohistoquímicos, de inmunofluorescencia y ultraestructurales se detalla en los artículos, especialmente en el que se describen las características de los pacientes con distrofia muscular por alteraciones en *DTNA*. Como breve resumen, las secciones de tejido muscular

RESULTADOS

congelado en nitrógeno líquido fueron procesadas usando tinciones histoquímicas rutinarias, incluyendo hematoxilina y eosina (H&E), tricrómico de Gomori modificado, nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), succinato deshidrogenasa (SDH), citocromo c oxidasa (COX), ácido periódico de Schiff (PAS) y Oil Red O ⁸⁹. El análisis de inmunofluorescencia se realizó en secciones de las biopsias musculares congeladas en nitrógeno líquido utilizando los anticuerpos listados en los artículos. Se prepararon secciones ultrafinas para microscopía electrónica y se examinaron con microscopía electrónica de transmisión (modelo JEOL 1100). Se obtuvieron micrografías electrónicas utilizando la cámara CCD Gatan Orius (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Alemania).

V. RESULTADOS

5.1 ESTUDIO 1: ASOCIACIÓN DEL MÁXIMO HITO MOTOR EN EDADES PRECOCES Y LA FUNCIÓN MOTORA A LARGO PLAZO EN PACIENTES CON DISTROFIA MUSCULAR POR DÉFICIT DE COLÁGENO VI

Este trabajo se llevó a cabo en una cohorte 119 pacientes (62 hombres, 57 mujeres) con distrofia muscular por déficit de colágeno VI seguidos en España (n = 54) y en Estados Unidos (n = 65). Todos los pacientes tenían escalas de función motora recogidas. El rango de edad de los pacientes fue de 5-73 años (media: 23.2 ± 16.1 años) en el momento de la última evaluación clínica. Se identificaron variantes patogénicas confirmadas en *COL6A1*, *COL6A2* o *COL6A3* en 115 pacientes (97%), y en 4 pacientes se encontró evidencia inmunohistoquímica de COL6 significativamente disminuido, mal localizado o ausente en su biopsia muscular, con confirmación genética molecular pendiente. Los datos de función motora y pulmonar de 23 de los pacientes estadounidenses se habían descrito previamente ⁹⁰.

5.1.1 CORRELACIÓN ENTRE LA MÁXIMA HABILIDAD MOTORA Y LA CLASIFICACIÓN POSTERIOR DE LA ENFERMEDAD

Los pacientes se categorizaron en 3 grupos según la capacidad motora máxima alcanzada a los 5 años de edad (**Tabla 3**). (1) 38 pacientes (32%) alcanzaron la capacidad de levantarse del suelo solo con apoyo y, por lo tanto, se clasificaron como “Distrofia de Ullrich (UCMD, por sus siglas en inglés)”. Los pacientes de este grupo de UCMD fueron evaluados clínicamente por última vez a una edad media de 12 años (rango: 5–34 años, DE ± 6.7 años). (2) 35 pacientes (29%) lograron la capacidad de levantarse del suelo sin ayuda (pudiendo potencialmente apoyarse en sus piernas o

RESULTADOS

empleando la maniobra de Gowers) pero nunca pudieron subir 4 escalones sin agarrarse de la barandilla y, por lo tanto, se clasificaron como COL6-RD intermedio. La edad media en el momento de la última evaluación clínica para el grupo intermedio fue de 19 años (rango 6–48 años, DE $\pm$ 10.5 años). (3) 46 pacientes (39%) lograron la capacidad de levantarse del suelo sin ayuda y subir 4 escalones sin agarrarse de la barandilla y, por lo tanto, se clasificaron como “Miopatía de Bethlem” (BM, por sus siglas en inglés). La edad media en el momento de la última evaluación clínica para los pacientes con BM fue de 34.4 años (rango 5–73 años, DE $\pm$ 18.3 años).

Fenotipo	Pacientes n (%)	Edad última evaluación (años)	MFM-32	NSAA	6MWT (metros)	CVF (%) predicho	Rango de edad pérdida de marcha	Edad cuando 25% de pacientes dejaron de caminar (en años)	Proporción de pacientes que caminaban a los 20 años	Edad cuando 25% de pacientes usaban VNI (en años)	Proporción de pacientes con VNI a los 20 años
UCMD	38/119 (32%)	12 y ($\pm$ 6.7)	44.17 ($\pm$ 17.40)	1.8 ($\pm$ 4.4)	27.5 ($\pm$ 72.6)	38.5% ($\pm$ 19.8)	4-15 a	4 a	0%	8 a	79.4%
Intermediate	35/119 (29%)	19 y ($\pm$ 10.5)	62.47 ($\pm$ 15.17)	10.7 ($\pm$ 8.9)	257.2 ($\pm$ 169.8)	58.7% ($\pm$ 19)	6-12 a	12 a	72%	14 a	29.8%
BM	46/119 (39%)	34.4 y ($\pm$ 18.3)	79.72 ($\pm$ 12.23)	21.9 ($\pm$ 8.4)	442.3 ($\pm$ 106.5)	76.3% ($\pm$ 22.1)	Todos caminaban	Todos caminaban	100%	Menos del 25% usaban VNI	0%

Tabla 3. Características clínicas de la cohorte de pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI estudiados. Abreviaturas: BM = Miopatía de Bethlem; CVF = Capacidad vital forzada; MFM-32 = Medida de Función Motora-32 (puntuación total de 96); VNI = Ventilación no invasiva; NSAA = Evaluación Ambulatoria North Star (puntuación total de 34); 6MWT = Prueba de caminata de seis minutos; UCMD = Distrofia muscular congénita de Ullrich.

Ocho de los 38 pacientes clasificados como UCMD (21%) nunca lograron la deambulaci3n independiente. La p3rdida de la capacidad de caminar, definida por la dependencia de una silla de ruedas a tiempo completo en aquellos pacientes que habían logrado la deambulaci3n independiente, ocurri3 en 30 pacientes en el momento del estudio: 22 de 30 con UCMD (rango 4–15 años), 8 de 35 pacientes con COL6-RD intermedio (rango 6–12 años), y 0 de 46 pacientes con BM, ya que todos mantenían la

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

capacidad de caminar en su última evaluación de seguimiento. Si bien los rangos de edad de la pérdida de la capacidad para caminar entre los pacientes clasificados como UCMD y aquellos clasificados como COL6-RD intermedio mostraron cierto solapamiento, las diferencias en la edad en el momento de la pérdida de la capacidad para caminar entre los subgrupos de distrofia por déficit de colágeno VI fueron estadísticamente significativas ($p < 0.001$).

Aquellos pacientes que lograron un hito motor máximo más alto y que, por lo tanto, se clasificaron en subgrupos de distrofia por déficit de colágeno VI menos graves, obtuvieron puntuaciones más altas en las escalas de función motora realizadas en el momento de la última evaluación clínica, independientemente de su edad en ese momento. La asociación entre la capacidad motora máxima inicial alcanzada y las puntuaciones de todas las escalas funcionales motoras evaluadas—MFM-32 (incluidos

RESULTADOS

cada uno de sus 3 dominios funcionales: D1, D2 y D3), NSAA y 6MWT—fue estadísticamente significativa estadísticamente ($p < 0.001$) (**Figura 5**).

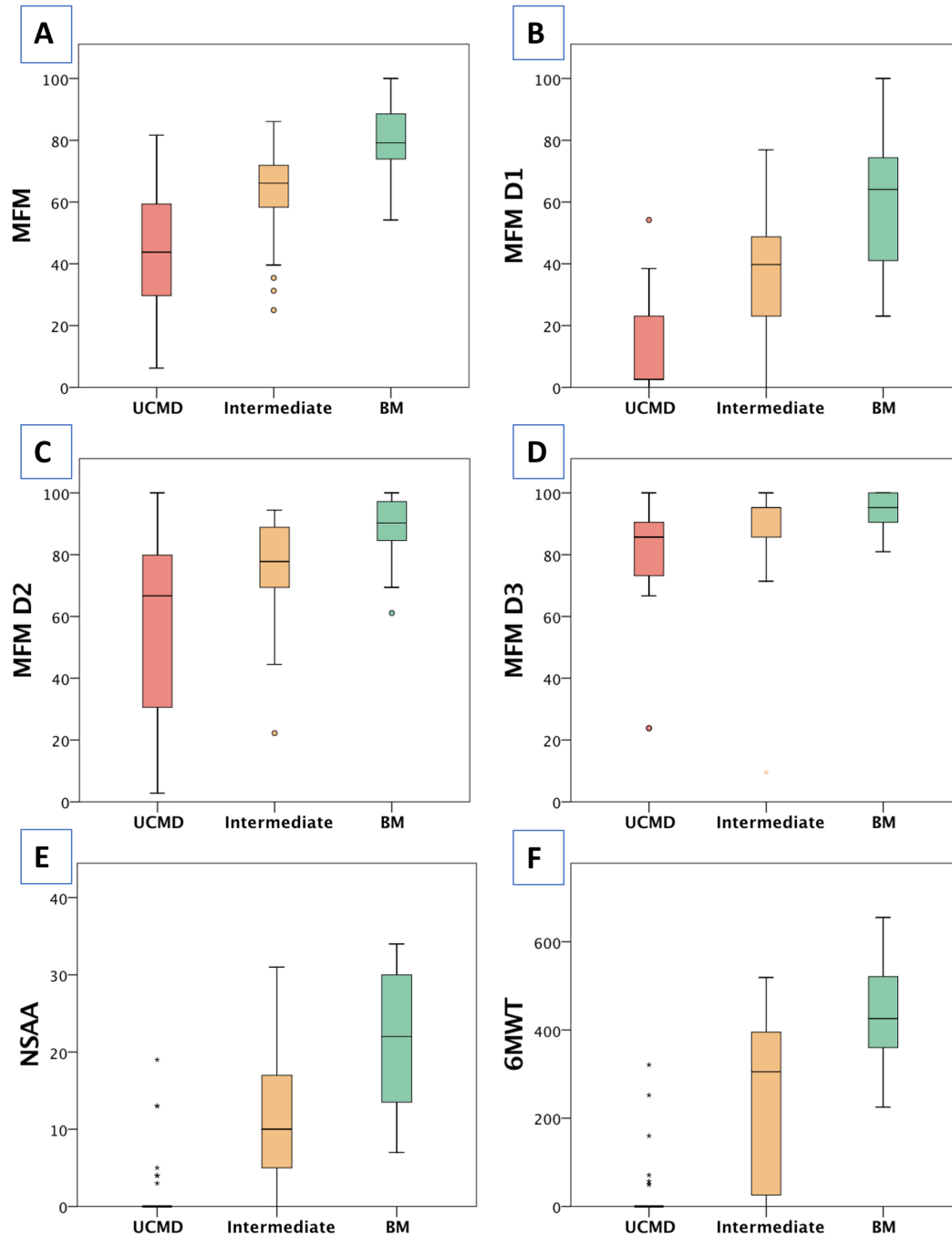


Figura 5. Función motora de los pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI en función de su fenotipo. Se observa una correlación directa y altamente significativa entre las puntuaciones de todas las escalas de función motora evaluadas: (A) Medida de Función Motora (MFM)-32 (incluyendo cada uno de sus 3 dominios funcionales: [B] D1, [C] D2 y [D] D3), (E) Evaluación Ambulatoria North Star (NSAA) y (F) prueba de caminata de 6 minutos (6MWT) y el fenotipo de distrofia relacionada con el colágeno VI (COL6-

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

RD) (basado en la clasificación propuesta aquí utilizando la función motora máxima alcanzada) ($p < 0.001$, prueba de Kruskal-Wallis). Los diagramas de caja representan medianas y cuartiles; los bigotes significan los percentiles 5 y 95.

Analizamos el efecto de la edad en las puntuaciones de las escalas motoras funcionales en los 3 subgrupos fenotípicos de distrofia por déficit de colágeno VI. Como esperábamos, hubo una correlación inversa entre las puntuaciones de todas las escalas motoras evaluadas y la edad, tanto para la cohorte en su conjunto como para cada uno de los 3 subgrupos (**Figura 6**). Entre los pacientes pertenecientes al mismo subgrupo fenotípico, cuanto mayor era la edad, menores eran sus puntuaciones correspondientes en las evaluaciones de MFM-32, NSAA y 6MWT. Se detectó una disminución significativamente más pronunciada en la puntuación de MFM-32 con la edad en el grupo UCMD ($p = 0.03$). Es destacable que los pacientes clasificados en los subgrupos con fenotipos más leves (COL6-RD intermedio y BM) eran mayores en promedio en el momento de la última evaluación clínica y a pesar de eso tenían puntuaciones más altas en las escalas de función motora. Las curvas de Kaplan-Meier que muestran la probabilidad estimada de pérdida de la capacidad de caminar por edad y grupo fenotípico **Figura 7**.

RESULTADOS

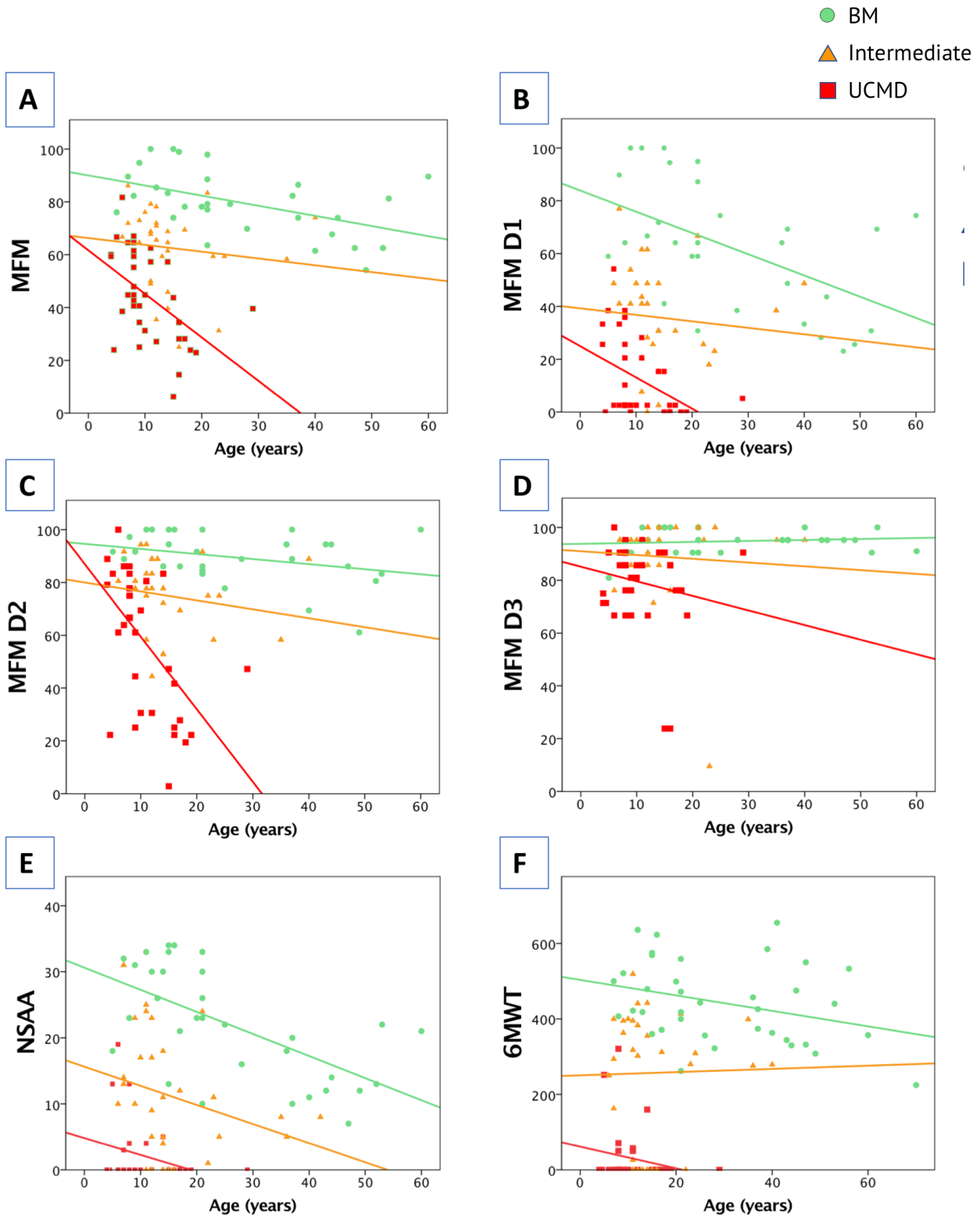


Figura 6. Función motora de los pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI en función de su edad. (A–F) Se observa una relación indirecta entre las puntuaciones de todas las escalas de función motora y la edad, tanto para toda la cohorte de distrofia por déficit de colágeno VI como para cada uno de

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

los fenotipos. Se detectó una disminución más pronunciada de la puntuación total de MFM en relación con la edad (A) para aquellos pacientes dentro del subgrupo UCMD ($p = 0.03$). BM = miopatía de Bethlem; D1 = dominio 1; D2 = dominio 2; D3 = dominio 3; NSAA = Evaluación Ambulatoria North Star; 6MWT = prueba de caminata de 6 minutos; UCMD = distrofia muscular congénita de Ullrich.

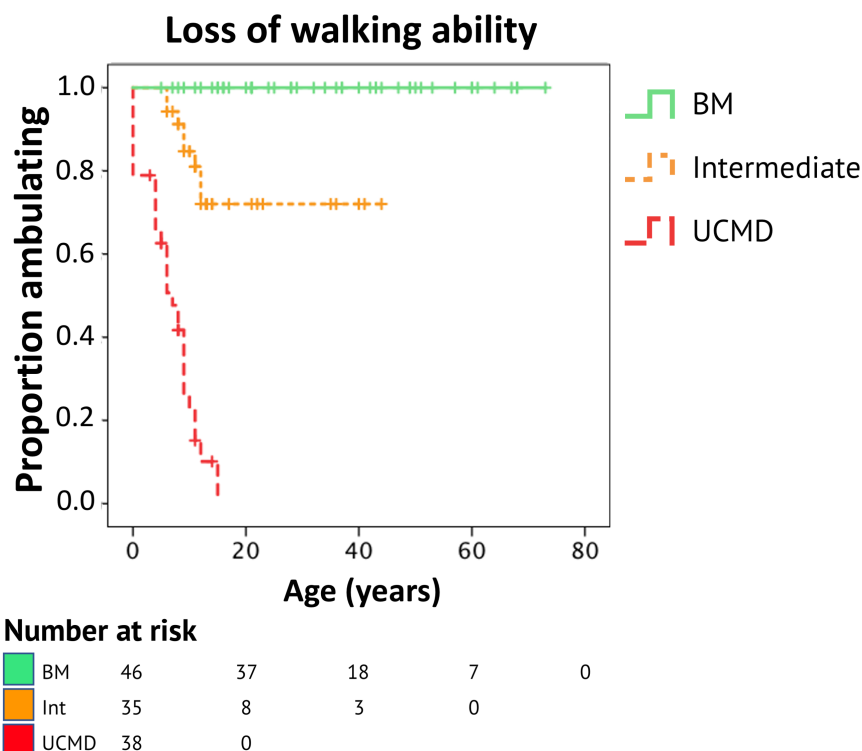


Figura 7. Pérdida de la marcha en pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI en función de su fenotipo. Las curvas de Kaplan-Meier muestran la probabilidad de pérdida de la capacidad de caminar (LoA) según la edad y la clasificación fenotípica de la distrofia por déficit de colágeno VI (COL6-RD). BM = miopatía de Bethlem; UCMD = distrofia muscular congénita de Ullrich.

RESULTADOS

Las correlaciones entre el MFM-32, el NSAA y el 6MWT fueron sólidas y estadísticamente significativas ($p < 0.001$). En la **Figura 8** se muestra una matriz de correlación que compara las diferentes escalas de función motora y la función pulmonar medida mediante la capacidad vital forzada. La validez concurrente entre las escalas MFM-32 y NSAA fue de 0.92, entre MFM-32 y 6MWT fue de 0.89, y entre NSAA y 6MWT fue de 0.95. El 6MWT correlacionó inversamente de manera significativa ($p < 0.001$) con el tiempo empleado para realizar la prueba de correr 10 metros ($r_s = -0.71$) y la prueba de subir 4 escalones ($r_s = -0.80$). Este último hallazgo significa que los individuos que cubrieron distancias más largas en 6MWT tendían a correr 10 metros más rápido y subir 4 escalones más rápido.

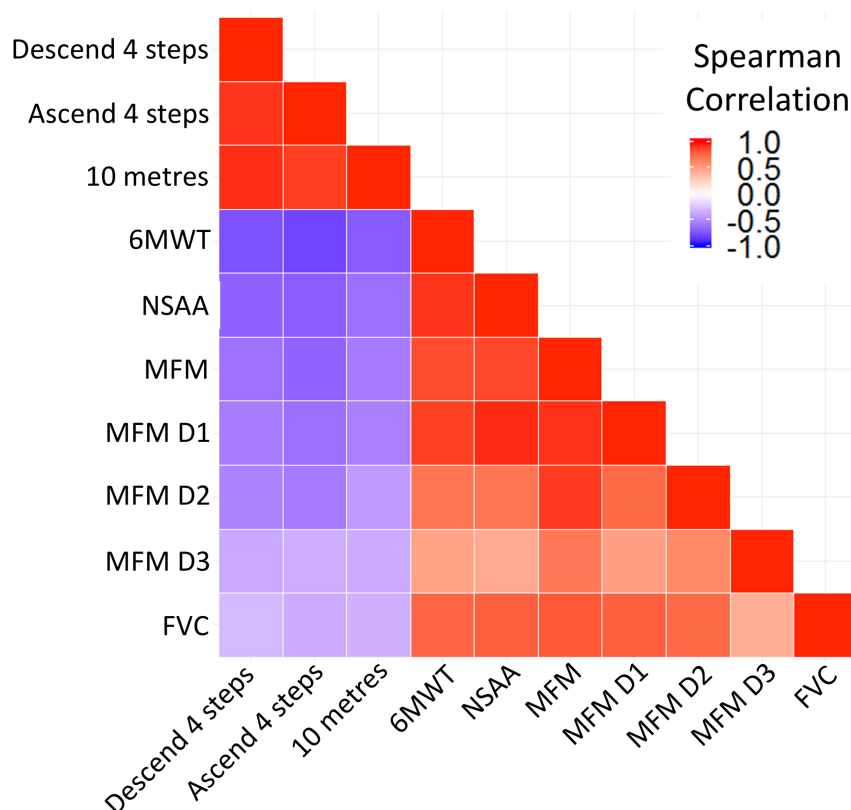


Figura 8. Correlación de las evaluaciones de función motora y de función respiratoria. La matriz de correlación compara diferentes escalas de función motora y de función pulmonar que fueron medidas en nuestra cohorte de pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI. El rojo indica una correlación positiva; el morado indica una correlación negativa. D1 = dominio 1; D2 = dominio 2; D3 = dominio 3; MFM = Medida de Función Motora; NSAA = Evaluación Ambulatoria North Star; 6MWT = prueba de caminata de 6 minutos.

5.1.2 CORRELACIÓN ENTRE LA MÁXIMA HABILIDAD MOTORA Y LA FUNCIÓN PULMONAR

La relación entre la medición de la CVF en la prueba de función pulmonar y la máxima habilidad motora fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$). La distribución de los valores de CVF mostró una relación directa con la gravedad del fenotipo clínico. La relación entre la edad y la CVF para los 3 subgrupos de COL6-RD también fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$). De manera similar a la disminución pronunciada de la puntuación promedio de las escalas funcionales motoras en los pacientes con UCMD, el promedio de CVF por edad fue menor entre los subgrupos de UCMD y COL6-RD intermedio (**Figura 9**).

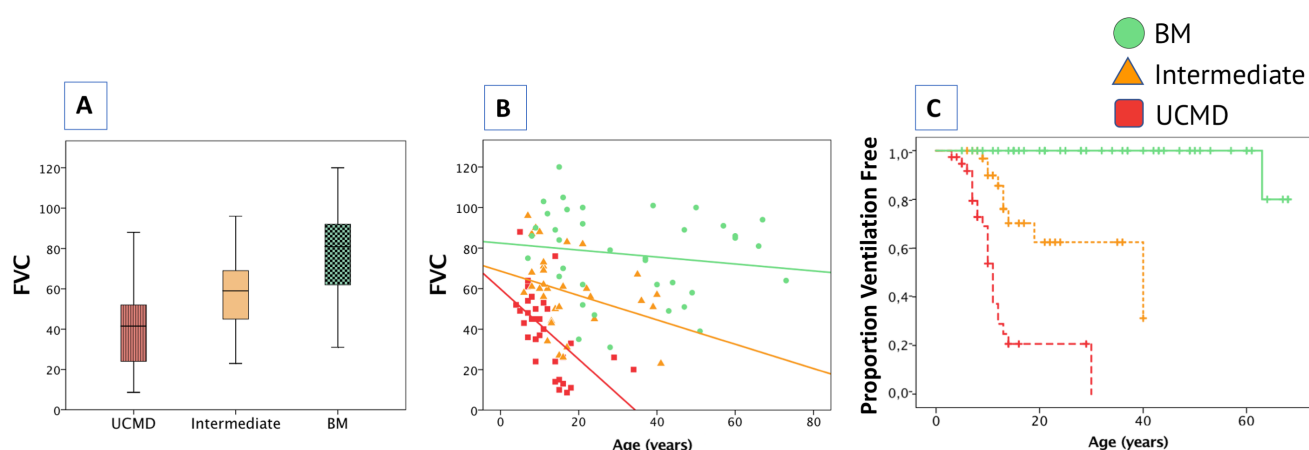


Figura 9. Función pulmonar y ventilación no invasiva (VNI) en pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI según su fenotipo. La relación entre la función pulmonar y el fenotipo (basada en la clasificación propuesta que se basa en el máximo hito motor alcanzado) es altamente significativa desde el punto de vista estadístico ($p < 0.001$), como se demuestra mediante (A) diagramas de caja (que representan medianas y cuartiles con bigotes que indican los percentiles 5 y 95) y (B) diagramas de dispersión. (C) Las curvas de Kaplan-Meier muestran la probabilidad de iniciar ventilación no invasiva (VNI) según la edad y la clasificación fenotípica. BM = miopatía de Bethlem; FVC = capacidad vital forzada; UCMD = distrofia muscular congénita de Ullrich.

RESULTADOS

En el momento en el que se llevó a cabo este estudio, 33 pacientes empleaban ventilación no invasiva (VNI) nocturna en forma de presión positiva en las vías respiratorias con dos niveles (BiPAP). De los 38 pacientes con UCMD, 23 (61%) habían iniciado VNI en el momento de este estudio. La edad promedio en el momento de la iniciación de VNI en pacientes con UCMD fue de 10.1 años (DE $\pm$ 4.9 años). De los 35 pacientes con COL6-RD intermedio, 9 (26%) habían comenzado VNI nocturna en el momento del estudio, con una edad promedio en el momento de la iniciación de VNI de 15.6 años (DE $\pm$ 9.6 años). Solo 1 de los 46 pacientes con BM estaba usando VNI nocturna en el momento de la última evaluación clínica, que se había iniciado a los 63 años de edad. Las curvas de Kaplan-Meier que muestran la probabilidad estimada de ventilación libre demostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) entre los 3 subgrupos de COL6-RD, con el 50% de los pacientes con UCMD en BiPAP a los 12 años de edad. Las diferencias también fueron estadísticamente significativas a los 20 años de edad: el 79.4% de los pacientes con UCMD, el 29.8% de los pacientes intermedios y el 0% de los pacientes con BM estaban usando VNI nocturna en forma de BiPAP.

5.1.3 CORRELACIÓN ENTRE LA MÁXIMA HABILIDAD MOTORA Y EL GENOTIPO

Se identificaron 87 mutaciones diferentes en los 115 pacientes con diagnóstico genético confirmado. Estas mutaciones se distribuyeron a lo largo de los 3 genes COL6 con 41 (47%) en COL6A1, 32 (37%) en COL6A2 y 14 (16%) en COL6A3. Se detectaron 49 mutaciones dominantes diferentes (24 en COL6A1, 15 en COL6A2 y 10 en COL6A3) y 38 mutaciones recesivas (17 en COL6A1, 17 en COL6A2 y 4 en COL6A3). Un total de 84 pacientes portaban mutaciones de dominantes, mientras que 31 pacientes tenían mutaciones bialélicas recesivas: 8 en homocigosis y 23 en heterocigosis compuesta. Las variantes están codificadas según los transcritos de RefSeq NM_001848.2 para COL6A1, NM_001849.3 para COL6A2 y NM_004369.3 para COL6A3.

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

Las mutaciones que actúan de manera dominante-negativa más frecuentes fueron (1) mutaciones en el sitio de splicing que resultan en la omisión de exones de la triple hélice y (2) cambios en los aminoácidos de glicina que afectan a los residuos dentro del dominio de la triple hélice. Aproximadamente un tercio de los casos (40 de 115) fueron causados por mutaciones dominantes de omisión de exones dentro de las partes 5' de los dominios TH de cualquiera de las 3 cadenas COL6. Aproximadamente otro tercio de los casos (37 de 115) resultaron de sustituciones de glicina dominantes en el dominio TH, agrupadas principalmente en los tripletes Gly-X-Y 3–20 en la parte 5' del dominio. En general, las mutaciones de omisión de exones en los exones 5' que codifican para el dominio TH resultaron en fenotipos consistentes con BM en el 48.5% de los casos, COL6-RD intermedio en el 25% y UCMD en el 27.5%. De manera similar, en pacientes con sustituciones de glicina dentro del dominio TH, el 38% resultaron en BM, el 38% en COL6-RD intermedio y el 24% en UCMD. Un estudio previo propuso que las sustituciones de glicina en la región crítica que incluye los tripletes Gly-X-Y 10 a 15 en el extremo N-terminal del dominio TH tienden a resultar en fenotipos más graves que aquellas sustituciones de glicina ubicadas en el dominio TH pero fuera de esta región crítica ⁹¹, que se confirmó en una revisión de 194 casos de pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI con sustituciones de glicina en el dominio TH ⁹². En nuestra cohorte, también encontramos una mayor proporción de fenotipos leves en aquellos pacientes cuyas sustituciones de glicina estaban ubicadas fuera de la región crítica: el 55% de los pacientes con sustituciones de glicina fuera de la región crítica mostraron un fenotipo BM (18% fenotipo COL6-RD intermedio, 27% fenotipo UCMD), mientras que solo el 25% de los pacientes con sustituciones de glicina dentro de la región crítica mostraron el fenotipo BM (50% fenotipo COL6-RD intermedio, 25% fenotipo UCMD). La tercera causa de distrofia por déficit de colágeno VI dominante en términos de frecuencia (6 de 115) en nuestro estudio fue la recientemente descrita sustitución recurrente de novo de un par de bases en el intrón 11 de COL6A1 (c.930 + 189 C>T), que resulta en

RESULTADOS

la inserción de un pseudoexón, interrumpiendo el extremo N-terminal del dominio TH⁹³. Solo 1 de estos 6 pacientes fue capaz de levantarse del suelo sin ayuda y, además, ese mismo paciente comenzó a usar silla de ruedas a los 6 años de edad e inició la VNI en forma de BiPAP a los 12 años, por lo que se evidencia que también había progresado a un fenotipo clínico de UCMD.

Al igual que con la sustitución en el intrón 11 de *COL6A1*, otras mutaciones dominantes también mostraron una fuerte asociación con fenotipos específicos: los 5 individuos que portaban la mutación de splicing *COL6A1* c.1056+1 G>A (intrón 14) y los 3 con la sustitución de glicina *COL6A3* c.6239 G>A (exón 17) invariablemente resultaron en un fenotipo BM. La sustitución de glicina recurrente *COL6A1* c.877 G>A (exón 10) resultó en fenotipos leves o intermedios: se observó un fenotipo COL6-RD intermedio en 8 de 11 individuos que la portaban, y los otros 3 de 11 mostraron un fenotipo BM. En contraste, también se identificaron pacientes que portaban la misma mutación y mostraban heterogeneidad en su fenotipo, incluyendo, por ejemplo, la mutación *COL6A3* c.6210+1 G>A (intrón 16), que se identificó en un paciente con fenotipo BM, otro con fenotipo COL6-RD intermedio y 2 con fenotipo UCMD.

En las mutaciones recesivas también se identificaron algunas correlaciones genotipo-fenotipo. La primera es que los individuos que son heterocigotos compuestos para 2 mutaciones de omisión de exones o 2 mutaciones de cambio de aminoácidos fuera del dominio TH resultaron en fenotipos relativamente leves: el 62.5% resultaron en BM (10 pacientes) y el 37.5% en el subtipo COL6-RD intermedio (6 pacientes), sin casos detectados de UCMD. La segunda es que las mutaciones homocigotas que introducen codones de terminación prematura tienden a resultar en fenotipos graves (2 de 2 pacientes tenían un fenotipo UCMD). El fenotipo de aquellos pacientes con una mutación truncante (codones de terminación prematura o mutaciones de cambio de marco) en heterocigosis compuesta con una mutación de cambio de aminoácidos o de

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

omisión de exones también resultó en fenotipos relativamente graves; sin embargo, los fenotipos fueron más heterogéneos, dependiendo de la segunda mutación: el 22% resultaron en BM, el 11% en COL6-RD intermedio y el 67% en UCMD.

ARTICLE

Association of Initial Maximal Motor Ability With Long-term Functional Outcome in Patients With COL6-Related Dystrophies

Daniel Natera-de Benito, MD, PhD,* A. Reghan Foley, MD,* Cristina Domínguez-González, MD, Carlos Ortez, MD, Minal Jain, DSc, PT, Aron Mebrahtu, BS, Sandra Donkervoort, MS, CGC, Ying Hu, MS, Margaret Fink, BS, Pomi Yun, MPH, Tracy Ogata, BS, Julita Medina, MD, Meritxell Vigo, MD, Katherine G. Meilleur, PhD, Meganne E. Leach, MSN, Jahannaz Dastgir, DO, Jordi Díaz-Manera, MD, PhD, Laura Carrera-García, MD, Jessica Expósito-Escudero, MD, Macarena Alarcon, MD, Daniel Cuadras, PhD, Elena Montiel-Morillo, MPT, José C. Milisenda, MD, PhD, Raul Domínguez-Rubio, MD, Montse Olivé, MD, PhD, Jaume Colomer, MD, PhD, Cristina Jou, MD, Cecilia Jimenez-Mallebrera, PhD, Carsten G. Bönnemann, MD,* and Andres Nascimento, MD*

Correspondence

Dr. Natera-de Benito
dnatera@
sjdhospitalbarcelona.org

Neurology® 2021;96:e1413-e1424. doi:10.1212/WNL.0000000000011499

Abstract

Objective

To accurately categorize the phenotypes of individuals with collagen VI–related dystrophies (COL6-RDs) during the first years of life to predict long-term motor function and pulmonary function, to provide phenotype-specific anticipatory care, and to improve clinical trial readiness.

Methods

This retrospective, multicenter, international study analyzed the relationship of long-term motor and pulmonary function with the initial maximal motor ability achieved in individuals with COL6-RD.

Results

We studied 119 patients with COL6-RD from Spain (n = 54) and the United States (n = 65). The early maximal motor milestones of ability to rise from the floor unassisted and ability to climb 4 steps without holding onto a railing demonstrated reliability in distinguishing between 3 COL6-RD phenotypic subgroups: (1) Ullrich congenital muscular dystrophy, (2) intermediate COL6-RD, and (3) Bethlem myopathy. Long-term motor function and pulmonary function are strongly correlated with the maximal motor ability achieved during the first years of life. Maximal motor capacity can predict other disease-relevant events such as the age at loss of ambulation and the need for the initiation of nocturnal noninvasive ventilation.

Conclusion

This work proposes a prospective phenotypic classification for COL6-RDs that will enable an accurate prediction of a patient's COL6-RD phenotype during the first years of life. The ability to establish a patient's COL6-RD phenotypic classification early will enable a more accurate prognosis of future motor and pulmonary function, thus improving anticipatory clinical care, and it will be instrumental in aiding the design of future clinical trials by allowing early stratification of trial cohorts.

*These authors contributed equally to this work.

From the Neuromuscular Unit (D.N.-d.B., C.O., L.C.-G., J.E.-E., M.A., J.C., C.J., C.J.-M., A.N.), Neuropaediatrics Department, Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona; Center for the Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), ISCIII, Spain; Neuromuscular and Neurogenetic Disorders of Childhood Section (A.R.F., S.D., Y.H., M.F., P.Y., T.O., M.E.L., J.D., C.G.B.), National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Rehabilitation Medicine Department (M.J., A.M.), Clinical Research Center, and Neuromuscular Symptoms Unit (K.G.M.), Tissue Injury Branch, National Institute of Nursing Research, NIH, Bethesda, MD; Department of Neurology (C.D.-G., E.M.-M.), Hospital Universitario 12 de Octubre, Research Institute (imas12), Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; Department of Rehabilitation and Physical Medicine (J.M., M.V.), Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; Neuromuscular Diseases Unit (J.D.-M.), Department of Neurology, Hospital de La Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona and Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER); Statistics Department (D.C.), Fundació Sant Joan de Déu; Department of Internal Medicine (J.C.M.), Hospital Clinic, Universitat de Barcelona and CIBERER, Villarroel 170; Neuropathology Unit (R.D.-R., M.O.), Department of Pathology and Neuromuscular Unit, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain; and Department of Pathology (C.J.), Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain.

Go to Neurology.org/N for full disclosures. Funding information and disclosures deemed relevant by the authors, if any, are provided at the end of the article.

Copyright © 2021 American Academy of Neurology

e1413

Glossary

BiPAP = bilevel positive airway pressure; BM = Bethlem myopathy; CMD = congenital muscular dystrophy; COL6 = collagen VI; COL6-RD = COL6-related dystrophy; FVC = forced vital capacity; LoA = loss of ambulation; MFM-32 = Motor Function Measure-32; NIV = noninvasive ventilation; NSAA = North Star Ambulatory Assessment; 6MWT = 6-minute walk test; TH = triple helical; UCMD = Ullrich CMD.

Dominant or recessive mutations in *COL6A1*, *COL6A2*, or *COL6A3* affect the complex assembly and secretion of collagen VI (COL6), a muscle extracellular matrix protein, and result in a congenital muscular dystrophy (CMD) subtype known as the COL6-related dystrophies (COL6-RDs).^{1,2} The COL6-RDs encompass a continuum of overlapping clinical phenotypes ranging from Ullrich CMD (UCMD) to Bethlem myopathy (BM) with intermediate phenotypes in between. Clinical hallmarks of the COL6-RDs include muscle weakness, distal joint hyperlaxity, contractures of proximal joints, and progressive respiratory insufficiency in most patients.^{1,3–13} Previous attempts at categorizing COL6-RD phenotypes either lacked clearly delineated boundaries or were dependent on the timing of the loss of ambulation (LoA), which is often between 10 and 20 years of age.^{1,14–17} In particular, predictive phenotypic characterization in COL6-RDs has remained challenging.

In this study, we stratified the phenotypes of a large cohort of patients with COL6-RD into 3 categories according to the maximal motor capacity achieved by the age of 5 years and then correlated the proposed COL6-RD classification with long-term motor and pulmonary function. Establishing an accurate phenotypic classification of the COL6-RDs from an early age would enable clinicians to more precisely counsel patients and their families about the projected clinical course, thus enabling appropriate anticipatory care. An earlier, confident phenotype subtype classification would also aid in the design of viable, COL6-RD subtype-specific outcome measures and clinical trial stratification, thus improving clinical trial preparedness of the COL6-RD patient population as a whole for the therapeutic approaches that are currently under development.^{18–21}

Methods

Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

Data were collected in accordance with ethics guidelines of each of the institutions involved. Written informed consent and age-appropriate assent for study participation were obtained by a qualified investigator for US patients (protocol 12-N-0095, approved by the Institutional Review Board of the NIH).

Study Design and Patients

This is a retrospective, multicenter study with the aim of characterizing the long-term motor and pulmonary function

in patients with COL6-RD on the basis of developmental motor milestones in early childhood. To this end, the relationship of long-term motor and pulmonary function with the maximal motor ability achieved was analyzed.

Clinical data of patients with a genetically or pathologically confirmed diagnosis of COL6-RD were reviewed at 6 different centers with neuromuscular expertise in the United States and Spain: 1 specialized clinical research center in the United States (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NIH, Bethesda, MD) and 5 specialized neuromuscular centers in Spain (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona; Hospital 12 de Octubre, Madrid; Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; Hospital de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona; and Hospital Clínic, Barcelona). Patients with pathogenic mutation/s in *COL6A1*, *COL6A2*, or *COL6A3* found on direct Sanger sequencing or on next-generation sequencing, including whole exome sequencing, or evidence of significantly decreased or mislocalized COL6 on immunohistochemical studies performed on muscle biopsy or dermal fibroblasts were included in this study. Phenotypic data were collected from patient and family interviews, medical records, and patient questionnaires, with an emphasis on motor development milestones achieved, as well as relevant events such as initiation and LoA.

Clinical Information and Outcome Assessment Measures

Demographic information such as age and sex and natural history data, including age at symptom onset (by parental recollection and by verification of medical records), age at clinical diagnosis, and history of motor developmental milestones gained or lost, were collected. Other relevant medical and surgical history information was captured, with attention to pulmonary function. Methods of diagnosis (clinical phenotype, immunohistochemical studies of COL6 expression performed on muscle biopsy and/or dermal fibroblasts and/or molecular genetic confirmation) and family history of COL6-RD were collected. Genotype was also collected on all patients in whom genetic testing had been performed.

Spirometry techniques were performed according to international standards.²² Upright (seated) forced vital capacity (FVC) measurements (expressed as percent predicted) were captured in all patients. Data on the motor milestones of independent walking, rising from the floor unassisted, and climbing a minimum of 4 steps without holding onto a railing were collected for all patients. These 3 motor milestones were specifically selected following a pilot study performed in 40

RESULTADOS

patients with COL6-RD in Spain (Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain) in which the following 6 developmental motor milestones were captured and assessed for their the ability to predict future maximal motor ability: independent sitting, independent walking, running, jumping, rising from the floor unassisted, and climbing a minimum of 4 steps without the use of a railing. Jumping was defined as being able to jump a minimum of 10 cm off the ground with both feet.²³ Running was defined as a gait that demonstrates an aerial phase during which no limbs touch the ground. From this pilot study, 3 maximal motor milestones—-independent walking, rising from the floor (from a supine position to a standing position) unassisted (except for potentially pushing off one's own legs/use of the Gowers' maneuver), and climbing a minimum of 4 steps without holding onto a railing—seemed to more reliably reflect the phenotype and were more objective. Therefore, they were chosen for use in collecting motor function data from the present cohort.

Motor function testing included the Motor Function Measure-32 (MFM-32),^{24,25} 6-minute walk test (6MWT),^{26–31} the North Star Ambulatory Assessment (NSAA),^{24,32,33} and timed function tests.³¹ The MFM-32 scale consists of 32 items that are subdivided in 3 functional dimensions: D1, which tests standing and transfers; D2, which tests axial and proximal motor function; and D3, which tests distal motor function.^{24,25} This scale was performed in all of the patients. The 6MWT, NSAA, and timed function tests were performed only in ambulant patients. Motor function testing was performed by trained clinical evaluators.

Patient Phenotypes and Clinical Classification

Patients were divided into 3 COL6-RD phenotypic subgroups based on the maximal motor ability achieved at 5 years of age: achieved rising from the floor only with assistance (UCMD), achieved rising from the floor unassisted (intermediate COL6-RD), and achieved stair climbing (ascending a minimum of 4 steps without holding onto a railing) (BM). Maximal motor ability achieved was assigned an ordinal variable because all the patients who were able to ascend 4 steps without holding onto a railing were also able to rise from the floor unassisted.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with Statistical Package for the Social Sciences 24.0 (IBM SPSS Statistics 24.0, Chicago, IL). Demographic and medical characteristics of patients are summarized with descriptive statistics. Data are presented as mean $\pm$ SD or as median and range when appropriate. The Kruskal-Wallis test was used to evaluate the association between maximal motor ability achieved and function scales and the association between maximal motor ability achieved and pulmonary function. An α level of 0.01 was used as the criterion for statistical significance. A linear regression model, including the interaction between age and phenotype, was used to compare the effect of age on motor function scale scores among the 3 phenotypic groups.

We performed time-to-event analyses of LoA and initiation of noninvasive ventilation (NIV) with age (years) as the time variable and LoA or initiation of NIV as events. Median age at LoA and at initiation of NIV corresponding 95% confidence intervals were estimated (taking into account censored data) by plotting empirical Kaplan-Meier curves for patient groups defined by maximal motor ability achieved, with the above-described grouping. Cox proportional hazard models were used to estimate and compare age-related risks of both LoA and initiation of NIV. Statistical significance was also set at $p < 0.01$.

To examine the concurrent validity between MFM-32 total scale score, the 3 MFM-32 domains, NSAA score, 6MWT, timed test of 10-m run, ascending 4 steps, and descending 4 steps, and percent predicted FVC, Spearman rank-order correlations were performed. Correlations were designated as large when they were >0.70 or <-0.70 .

Data Availability

The data not published are available from the corresponding author and will be shared with any qualified investigator on reasonable request.

Results

Demographics

Our cohort totaled 119 patients (62 male, 57 female) with COL6-RD from Spain ($n = 54$) and from the United States ($n = 65$). All of the patients had motor function scales on record. Patients ranged in age from 5 to 73 years (mean 23.2 ± 16.1 years) at the time of last clinical evaluation. Confirmed pathogenic mutations were identified in *COL6A1*, *COL6A2*, or *COL6A3* in 115 patients (97%), and muscle biopsy immunohistochemical evidence of significantly decreased, mis-localized, or absent COL6 with pending molecular genetic confirmation was found in 4 patients. Motor function and pulmonary function data from 23 US patients with COL6-RD have been described previously.³⁴

Correlation Between Early Motor Maximal Ability and Later Disease Category

Patients were separated into 3 groups according to maximal motor ability achieved by 5 years of age (table 1). (1) Thirty-eight patients (32%) achieved the ability to rise from the floor only with support and thus were categorized as having UCMD. Patients in this UCMD group were last clinically assessed at a mean age of 12 years (range: 5–34 years, SD ± 6.7 years). (2) Thirty-five patients (29%) achieved the ability to rise from the floor unassisted (except for potentially pushing off one's legs/use of the Gowers' maneuver) but were never able to ascend 4 steps without holding onto a railing and thus were categorized as having intermediate COL6-RD. The mean age at the time of last clinical assessment for the intermediate group was 19 years (range 6–48 years, SD ± 10.5 years). (3) Forty-six patients (39%) achieved the abilities to

Table 1 Clinical Characteristics of COL6-RD Phenotypes

COL6-RD Phenotype	Patients, n (%)	Age at last clinical assessment, y	MFM-32 Score	NSAA Score	6MWT, m	FVC, % predicted	Range of Age at LoA, y	Age When 25% of Patients Lose Ambulation, y ^a	Proportion of Patients Able to Walk at 20 y, %	Age When 25% of Patients Initiate NIV, y	Proportion of Patients Who Use NIV at 20 y, %
UCMD	38/119 (32)	12 (±6.7)	44.17 (±17.40)	1.8 (±4.4)	27.5 (±72.6)	38.5 (±19.8)	4–15	4	0	8	79.4
Intermediate COL6-RD	35/119 (29)	19 (±10.5)	62.47 (±15.17)	10.7 (±8.9)	257.2 (±169.8)	58.7 (±19)	6–12	12	72	14	29.8
BM	46/119 (39%)	34.4 (±18.3)	79.72 (±12.23)	21.9 (±8.4)	442.3 (±106.5)	76.3 (±22.1)	All ambulant	All ambulant	100	<25% of patients use NIV	0

Abbreviations: BM = Bethlem myopathy; COL6-RD = collagen VI-related dystrophy; FVC = forced vital capacity; LoA = loss of ambulation; MFM-32 = Motor Function Measure-32 (total score of 96); NIV = noninvasive ventilation; NSAA = North Star Ambulatory Assessment (total score of 34); 6MWT, 6-minute walk test; UCMD = Ullrich congenital muscular dystrophy.

^a Defined as full-time wheelchair dependence.

rise from the floor unassisted and to ascend 4 steps without holding onto a railing and thus were categorized as having BM. The mean age at the time of last clinical assessment for the patients with BM was 34.4 years (range 5–73 years, SD ± 18.3 years).

Eight of the 38 patients classified as having UCMD (21%) never achieved independent ambulation. LoA as defined by full-time wheelchair dependence in those patients who had attained independent ambulation occurred in 30 patients at the time of this study: 22 of 30 with UCMD (range 4–15 years), 8 of 35 patients with intermediate COL6-RD (range 6–12 years), and 0 of 46 patients with BM, because all remained ambulant at their last follow-up assessment. While the age ranges at LoA between those patients classified as having UCMD and those patients classified as having intermediate COL6-RD demonstrated an overlap, differences in the age at the time of LoA between the established COL6-RD subgroups were statistically significant ($p < 0.001$).

Those patients who achieved a higher initial maximal motor ability and thus were classified in COL6-RD subgroups associated with milder phenotypic severity obtained higher scores in the motor function scales performed at the time of last clinical assessment, regardless of their age at that time. The association between the initial maximal motor ability achieved and the scores of all the function scales assessed—MFM-32 (including each of its 3 functional domains: D1, D2, and D3), NSAA, and 6MWT—was highly significant statistically ($p < 0.001$) (figure 1).

We analyzed the effect of age on motor function scale scores and the effect of age on the 3 phenotypic subgroups of COL6-RD. As we expected, there was an inverse correlation between the scores of all of the function scales tested and age, both for the cohort as a whole and for each of the 3 subgroups (figure 2). Among patients belonging to the same phenotypic subgroup, the greater the age was, the lower their corresponding

scores were in MFM-32, NSAA, and 6MWT assessments. A significantly sharper decline in the MFM-32 score with age was detected in the UCMD group ($p = 0.03$). It is notable that the patients classified in the subgroups with milder phenotypes (intermediate COL6-RD and BM) were older on average at the time of last clinical assessment and had higher motor function scale scores. Kaplan-Meier curves depicting the estimated probability of LoA by age and phenotypic group are shown in figure 3.

The correlations between the MFM-32, the NSAA, and the 6MWT were robust and statistically significant ($p < 0.001$). A correlation matrix comparing the different motor function scales and pulmonary function as measured by FVC is shown in figure 4. Concurrent validity between the MFM-32 and the NSAA scales was 0.92, between the MFM-32 and the 6MWT was 0.89, and between the NSAA and the 6MWT was 0.95. The 6MWT inversely correlated significantly ($p < 0.001$) with the timed 10-m run ($r_s = -0.71$) and ascend 4 steps ($r_s = -0.80$) tests. This latter finding means that individuals who covered longer distances in 6MWT tended to run 10 m faster and ascend 4 steps faster.

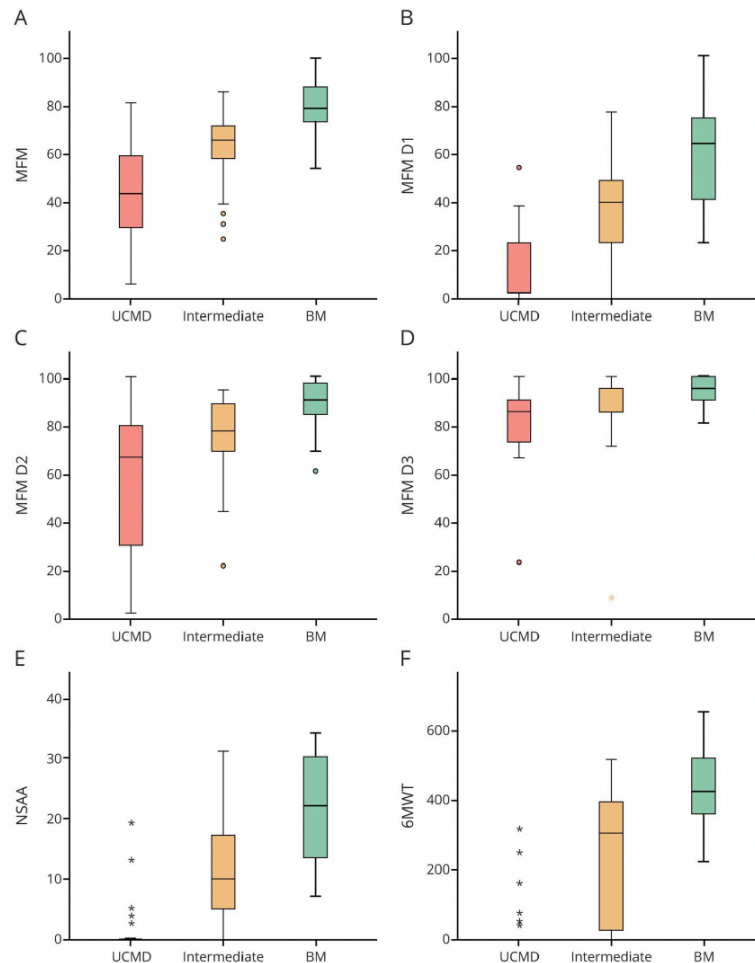
Correlation Between Maximal Motor Capacity and Pulmonary Function

The relationship between the pulmonary function testing measurement of FVC and maximal motor capacity was highly statistically significant ($p < 0.001$). The distribution of FVC values demonstrated a direct relationship with severity of clinical phenotype. The relationship between age and FVC for the 3 COL6-RD subgroups was also highly significant ($p < 0.001$). In a similar way that the mean score of the motor function scales was associated with a sharper decline in UCMD patients, the mean FVC by age was lower among the UCMD and intermediate COL6-RD subgroups (figure 5).

Nocturnal NIV in the form of bilevel positive airway pressure (BiPAP) had been initiated in a total of 33 patients at the time

RESULTADOS

Figure 1 Motor Function in Patients with COL6-RD by Phenotype

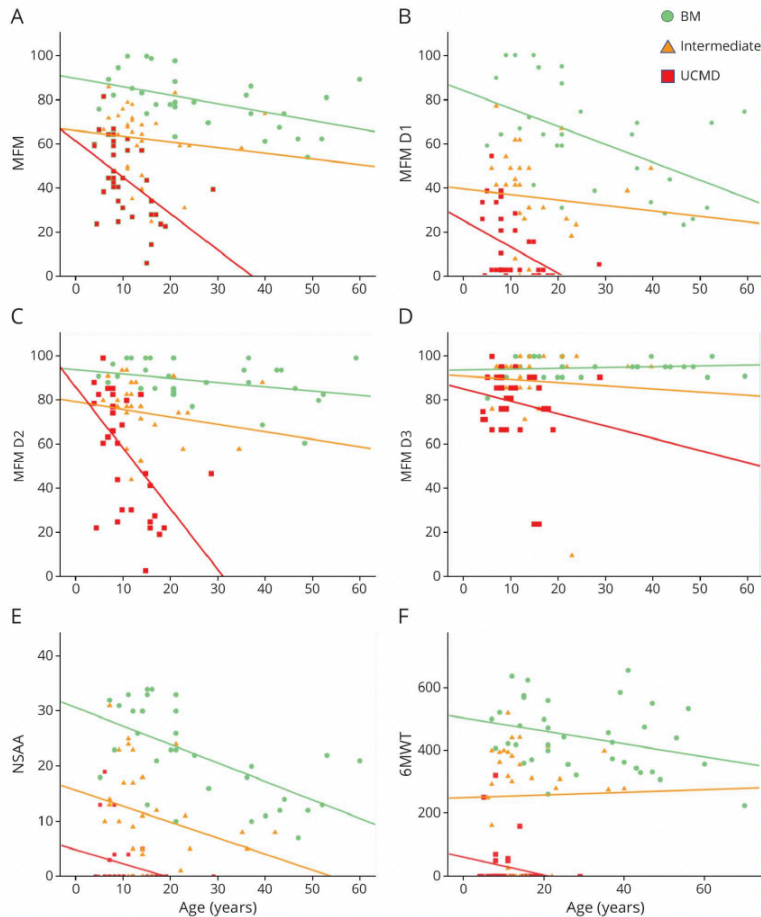


Highly significant direct correlation is seen between the scores of all the motor function scales assessed: (A) Motor Function Measure (MFM)-32 (including each of its 3 functional domains: [B] D1, [C] D2, and [D] D3), (E) North Star Ambulatory Assessment (NSAA), and (F) 6-minute walk test (6MWT) and collagen VI-related dystrophy (COL6-RD) phenotype (based on the classification proposed here using maximal motor function achieved) ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis test). Box plots show that, regardless of current age, patients whose maximal motor function achieved was climbing 4 steps without holding onto a railing (categorized as Bethlem myopathy [BM]) obtain higher scores in the motor function scales than those whose maximal motor function achieved was rising from the floor unassisted (intermediate COL6-RD) and those who did not achieve either of these 2 milestones (Ullrich congenital muscular dystrophy [UCMD]). Box plots represent medians and quartiles; whiskers signify the 5th and 95th percentiles.

of this study. Of the 38 patients with UCMD, 23 (61%) had initiated NIV at the time of this study. The average age at initiation of NIV in patients with UCMD was 10.1 years ($SD \pm 4.9$ years). Of the 35 patients with intermediate COL6-RD, 9 (26%) had started nocturnal NIV at the time of the study, with an average age at the time of NIV initiation of 15.6 years

($SD \pm 9.6$ years). Only 1 of the 46 patients with BM was using nocturnal NIV at the time of last clinical assessment, which had been initiated at 63 years of age. Kaplan-Meier curves depicting estimated ventilation-free probability demonstrated a statistically significant ($p < 0.001$) difference between the 3 COL6-RD subgroups, with 50% of patients with UCMD on

Figure 2 Motor Function and Age



(A–F) An indirect relationship is seen between the scores of all the motor function scales and age, both for the entire collagen VI–related dystrophy (COL6-RD) cohort and for each of the COL6-RD phenotypes. A significantly sharper decline in the Motor Function Measure (MFM) total score in relation to age (A) was detected for those patients within the UCMD subgroup ($p = 0.03$). BM = Bethlem myopathy; D1 = domain 1; D2 = domain 2; D3 = domain 3; NSAA = North Star Ambulatory Assessment; 6MWT = 6-minute walk test; UCMD = Ullrich congenital muscular dystrophy.

BiPAP by 12 years of age. Differences were also statistically significant by the age of 20 years: 79.4% of the patients with UCMD, 29.8% of the intermediate patients, and 0% of the patients with BM were using nocturnal NIV in the form of BiPAP.

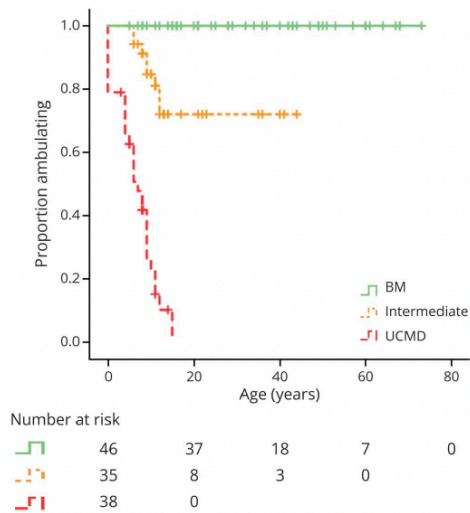
Correlation Between Genotype and Disease Category Based on Early Motor Maximal Ability

Eighty-seven different mutations were identified in the 115 patients with genetically confirmed diagnosis. These

mutations were distributed along the 3 *COL6* genes with 41 (47%) in *COL6A1*, 32 (37%) in *COL6A2*, and 14 (16%) in *COL6A3* (table e-1 available from Dryad, doi:10.5061/dryad.2v6wwpzkk). Forty-nine different dominantly acting mutations (24 in *COL6A1*, 15 in *COL6A2*, and 10 in *COL6A3*) and 38 recessively acting mutations (17 in *COL6A1*, 17 in *COL6A2*, and 4 in *COL6A3*) were detected. A total of 84 patients harbored dominantly acting mutations, while 31 patients carried recessively acting biallelic mutations: 8 in homozygosity and 23 as compound heterozygous alleles. Variants are

RESULTADOS

Figure 3 LoA in Patients With COL6-RD by Phenotype

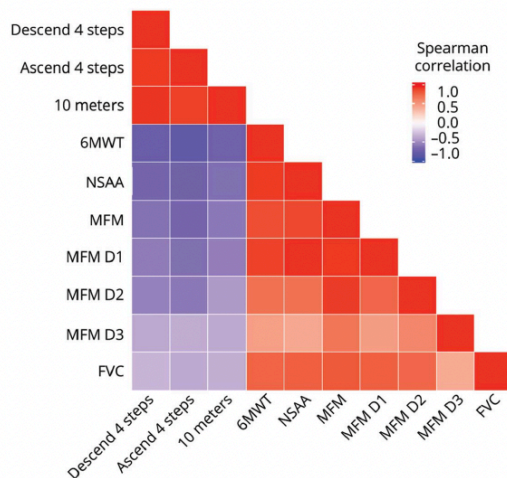


Kaplan-Meier curves depict the probability of loss of ambulation (LoA) by age and collagen VI-related dystrophy (COL6-RD) phenotypic classification BM = Bethlem myopathy; UCMD = Ullrich congenital muscular dystrophy.

numbered according to RefSeq transcripts NM_001848.2 for COL6A1, NM_001849.3 for COL6A2, and NM_004369.3 for COL6A3.

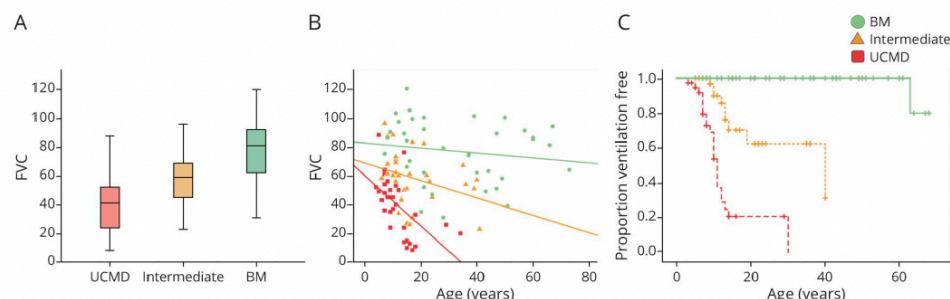
The most common mutations acting in a dominant-negative fashion were (1) splice-site mutations resulting in-frame triple helical (TH) exon skipping and (2) missense changes affecting glycine residues located within TH domain. Roughly one-third of cases (40 of 115) were caused by dominant exon-skipping mutations within the 5' part of the TH domains of any of the 3 COL6 chains. Approximately another one-third of cases (37 of 115) resulted from dominant glycine substitutions in the TH domain, clustered mainly in Gly-X-Y triplets 3–20 at the 5' part of the domain. Overall, exon-skipping mutations in the 5' exons encoding for the TH domain resulted in phenotypes consistent with BM in 48.5% of cases, intermediate COL6-RD in 25%, and UCMD in 27.5%. Similarly, in patients with glycine substitutions within the TH domain, 38% resulted in BM, 38% in intermediate COL6-RD, and 24% in UCMD. One study proposed that glycine substitutions in the critical region including Gly-X-Y triplets 10 to 15 in the N-terminal of the TH domain tend to result in more severe phenotypes than those glycine substitutions located in the TH but outside this critical region,³⁵ as it was confirmed in a review of 194 cases of patients with COL6-RD with glycine substitutions in the TH domain of the COL6.³⁶ In our cohort, we also found a higher proportion of milder COL6-RD phenotypes in those patients whose glycine substitutions were located outside the critical region: 55% of patients with glycine substitutions outside the critical region showed a BM phenotype (18% intermediate COL6-RD phenotype, 27% UCMD phenotype), whereas only 25% of patients with glycine substitutions within the critical region showed the milder BM phenotype (50% intermediate COL6-RD phenotype, 25% UCMD phenotype). The third

Figure 4 Correlation of Motor Function and Pulmonary Function Assessments



Correlation matrix compares different motor function scales and pulmonary function as measured by forced vital capacity (FVC) in our cohort of patients with collagen VI-related dystrophy. Red indicates positive correlation; purple indicates negative correlation. D1 = domain 1; D2 = domain 2; D3 = domain 3; MFM = Motor Function Measure; NSAA = North Star Ambulatory Assessment; 6MWT = 6-minute walk test.

Figure 5 Pulmonary Function and NIV in Patients With Col6-RD by Phenotype



Relationship between pulmonary function and collagen VI-related dystrophy (COL6-RD) phenotype (based on the classification proposed here using maximal motor function achieved) is highly statistically significant ($p < 0.001$) as demonstrated by (A) box plots (representing medians and quartiles with whiskers signifying the 5th and 95th percentiles) and (B) scatterplots. (C) Kaplan-Meier curves depict the probability of initiation of noninvasive ventilation (NIV) by age and COL6-RD phenotypic classification. BM = Bethlem myopathy; FVC = forced vital capacity; UCMD = Ullrich congenital muscular dystrophy.

cause of autosomal dominant COL6-RD in terms of frequency (6 of 115) in our study was the recently described recurrent de novo base pair substitution in intron 11 of *COL6A1* (c.930 + 189 C>T), which results in a dominantly acting splice-gain event and the insertion of a pseudoexon, disrupting the N-terminal end of the TH domain.³⁷ The ability to rise from the floor unassisted was reported as being attained by only 1 of these 6 patients. That same patient started using a wheelchair by 6 years of age and started NIV in the form of BiPAP by 12 years of age and thus had progressed to a clinical phenotype of UCMD.

As with the substitution in intron 11 of *COL6A1*, other dominant mutations also showed a strong association with specific phenotypes: the 5 individuals who harbored the *COL6A1* c.1056+1 G>A splicing mutation (intron 14) and the 3 with the *COL6A3* c.6239 G>A glycine substitution (exon 17) invariably resulted in a BM phenotype. The recurrent *COL6A1* c.877 G>A glycine substitution (exon 10) resulted in mild or intermediate phenotypes: an intermediate COL6-RD phenotype was observed in 8 of 11 individuals who harbored it, and the other 3 of 11 showed a BM phenotype. In contrast, patients harboring the same mutation while manifesting a varying range of phenotypic severity were also noted, including, for example, the mutation *COL6A3* c.6210+1 G>A (intron 16), which was identified in 1 patient with BM phenotype, 1 with intermediate COL6-RD phenotype, and 2 with UCMD phenotype.

For the recessively acting mutations, some genotype-phenotype correlations were also identified. The first is that individuals who are compound heterozygous for 2 exon-skipping mutations or 2 missense mutations outside the TH domain resulted in relatively mild phenotypes: 62.5% resulted in BM (10 patients) and 37.5% in the intermediate COL6-RD subtype (6 patients), with no detected cases of UCMD. The

second is that homozygous mutations that introduce premature termination codons tend to result in severe phenotypes (2 of 2 patients had an UCMD phenotype). The phenotype of those patients with a truncating mutation (premature termination codons or frameshift mutations) in compound heterozygosity with a missense or exon-skipping mutation also resulted in relatively severe phenotypes; however, the phenotypes were more heterogeneous, depending on the second mutation: 22% resulted in BM, 11% in intermediate COL6-RD, and 67% in UCMD.

Discussion

The ability to accurately categorize patients with COL6-RD into clinically relevant phenotypic subgroups from the first years of life will help in optimizing anticipatory clinical care and in assisting in the design of clinical trials for the therapeutic strategies currently in development.^{18–21,37,38} Natural history and cohort studies of individuals with COL6-RD have highlighted the difficulty of distinguishing between COL6-RD phenotypes, especially for those phenotypes falling between UCMD and BM and, in particular, for those phenotypes bordering established phenotypes.^{1,10,17} Clear clinical criteria for differentiating between COL6-RD phenotypes in such gray areas surrounding phenotypic boundaries are lacking. Furthermore, the use of motor milestones such as attaining the ability to jump and run, albeit useful, is not able to distinguish phenotypically between patients with COL6-RD during the first years of life.

The 2 motor milestones of rising from the floor unassisted and climbing 4 steps without use of a railing had been selected among the 6 motor developmental milestones previously collected as part of a pilot study of motor function milestones in patients with COL6-RD that assessed sitting unassisted, independent walking, running, jumping, rising from the floor

RESULTADOS

unassisted, and climbing a minimum of 4 steps without holding onto a railing. Sitting unassisted and independent ambulation were not able to discriminate among the COL6-RD phenotypes because the vast majority of patients had achieved these milestones. The motor milestones of running and jumping were found to be prone to misinterpretation among patients and parents who participated in the pilot study. Thus, these milestones were not collected as part of this multicenter study.

Here, we demonstrate that the use of 2 early maximal motor milestones, the ability to rise from the floor unassisted and the ability to ascend 4 steps without holding onto a railing, can reliably distinguish between various COL6-RD phenotypes in a clinically meaningful manner and has the potential for accurately providing a prognosis of disease severity and progression. Our data show that long-term motor function is strongly related to pulmonary function in all patients with COL6-RD. We demonstrate that initial maximal motor capacity can predict other disease-relevant events such as the age at LoA and the need for the initiation of nocturnal NIV. This work shows that classifying patients with COL6-RD into phenotypic groups that exhibit differences in long-term motor function and pulmonary function is effective for studying COL6-RD subgroup-specific natural history and for improving clinical trial readiness for the COL6-RD population as a whole.

Some dominantly acting mutations were found to be strongly associated with specific phenotypes. Among them is the recurrent *COL6A1* deep intronic mutation (c.930 + 189C>T) which demonstrates a phenotype of a relative paucity of prominent symptoms during the first 1 to 2 years of life followed by an accelerated progression to a severe UCMD phenotype. Some patients with this mutation achieved independent ambulation, but independent ambulation is subsequently lost between 6 and 9 years of age, consistent with UCMD. Given this new, consistent observation of rapid progression in phenotypic severity associated with this genotype and the potential that our proposed COL6-RD classification may not be as accurate in prospectively predicting the COL6-RD phenotype in this particular group of patients, work on defining this mutation-specific phenotype in an international cohort is underway.

Our study also confirms other previously proposed general genotype-phenotype correlations for COL6-RDs such as the severe phenotype associated with glycine substitutions located in the critical region including Gly-X-Y triplets 10 to 15 in the N-terminal region of the TH domain. We also provide some hypotheses that may be useful to predict the phenotype in those patients with recessively acting mutations.

Of note, individuals with an intermediate COL6-RD phenotype show a progressive deterioration of pulmonary function that is comparatively steeper than the decline in motor function over the same age range. Although the motor

function trajectory of individuals with intermediate COL6-RD may at times be difficult to distinguish from that of individuals with BM, the pulmonary function trajectory of these 2 phenotypes is highly distinct. Indeed, the pivotal contribution of this proposed classification is its ability to anticipate a decline in pulmonary function. Given the ability of this classification to predict COL6-RD phenotypes from an early age and result in anticipatory clinical care, the risk of unrecognized or underrecognized hypoventilation, historically the leading cause of morbidity and mortality in the COL6-RDs, should be significantly decreased.

This study has some limitations. We performed a retrospective review of the clinical data that had been collected in the course of patients' clinical care; therefore, most but not all parameters were available for every patient. Furthermore, the maximal motor milestones recorded in the medical record that were not captured on video and are no longer possible to demonstrate clinically may have reduced accuracy due to recall bias. This is particularly the case in the attainment of the ability to rise from the floor, because whether this milestone was achieved without assistance is used to predict a future phenotype of intermediate COL6-RD vs UCMD and would be most accurate if documented after direct observation or review of a video recording of this milestone. For this reason, robust prospective natural history studies with the collection of maximal motor milestone data by either direct observation or video capturing are essential for validating this phenotypic classification. Prospective natural history data collection would also be useful for validating the time-to-event analyses performed in this study (displayed by Kaplan-Meier curves in figures 3 and 5).

Our study has demonstrated some evidence of overlap for age at LoA and age at the initiation of NIV between the UCMD and intermediate COL6-RD phenotypes, namely for patients whose phenotypes fall along the boundary between UCMD and intermediate COL6-RD. While an overlap in phenotypic categorization is not entirely unexpected, given that COL6-RDs manifest along a continuous phenotypic spectrum, it is important to recognize that in reference to the timing of NIV initiation, variability in clinical care between centers and patient compliance/lack of compliance may result in significant variability in the timing of NIV initiation, even when clinically indicated. It is our hope that our proposed prospective classification using early maximal motor milestones to predict future motor function and pulmonary function may prove to be an effective means for individual patient-level prognostication, which, if used across centers, could positively affect care, including the timing of the initiation of NIV. Furthermore, a prospective COL6-RD natural history study would provide the opportunity to better determine the ability of the motor milestone of rising from the floor unassisted to accurately distinguish between the intermediate and UCMD phenotypes.

We note that for patients with Duchenne muscular dystrophy in whom variability on motor function tests has historically

complicated the interpretation of clinical trials, latent class trajectory modeling based on 6MWT or NSAA trajectories has proved to be useful in characterizing subgroups of patients with Duchenne muscular dystrophy.^{39,40} This type of analysis requires the availability of longitudinal motor function scale scores starting at early ages, which was not available for all the patients in this COL6-RD retrospective study. In a future prospective natural history study in patients with COL6-RD, the use of latent class trajectory modeling could be considered as a means of potential validation for the phenotypic classification proposed here.

Our study of a large cohort of patients with COL6-RD from Spain and the United States (n = 119) identifies 2 initial maximal motor function milestones, the ability to rise from the floor unassisted and the ability to climb 4 steps without holding onto a railing, as predictive of the corresponding COL6-RD phenotypic subgroups as follows: (1) achieved rising from the floor only with assistance (UCMD), (2) achieved rising from the floor unassisted (intermediate COL6-RD), and (3) achieved stair climbing (ascending a minimum of 4 steps without use of a railing) (BM). This classification offers a probabilistic approach for predicting the future phenotype of individual patients with COL6-RD from an early age, thus resulting in improved anticipatory care and clinical trial readiness.

Previous studies of patients with COL6-RD had categorized patient phenotypes on the basis of motor function features such as LoA or the achievement of running or jumping; however, none of those proposed phenotypic classifications allowed accurate phenotypic identification from an early age. In contrast, this proposed prospective phenotypic classification for COL6-RDs should enable clinicians to predict a patient's future COL6-RD phenotype from the first years of life. We suggest that our proposed phenotypic classification may be as definitive and relevant from a clinical research perspective as the phenotypic classification of patients with spinal muscular atrophy.⁴¹ This study adds to prior studies of COL6-RDs in demonstrating that the early maximal motor function achieved correlates with both motor function and pulmonary function long term. We believe that this classification will help clinicians in providing a more accurate prognosis of future motor function and pulmonary function, thus enabling optimized anticipatory clinical care. This proposed COL6-RD classification will also aid in the design of clinical trials by enabling the phenotypic stratification of clinical trial cohorts in patients with COL6-RD from an early age. Given the goal of making the therapeutic strategies currently in development available to patients with COL6-RD during the first years of life, the accurate prediction of phenotypic subtype from an early age will improve the clinical trial readiness of young patients with COL6-RD.

Acknowledgment

The authors thank the patients and their family members for their participation in this study. They also wish to

acknowledge the contribution of Fundación Noelia (Spanish association of patients with COL6-RD) in helping to coordinate patient participation in this study.

Study Funding

This study was partially supported by the Instituto de Salud Carlos III and cofunded with European Regional Development Fund "A Way to Achieve Europe" Río Hortega Grant CM17/00054 (D.N.-d.B) and grant PI19/00122 (C.J.M) and intramural funds of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NIH (C.G.B).

Disclosure

Daniel Natera-de Benito was partially supported by Instituto de Salud Carlos III, Río Hortega Grant CM17/00054. Cecilia Jimenez-Mallebrera is partially supported by Instituto de Salud Carlos III and cofunded with European Regional Development Fund "A Way to Achieve Europe" grant PI19/00122. Carsten G. Bönnemann is supported by intramural funds of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NIH. The rest of authors report no disclosures. Go to Neurology.org/N for full disclosures.

Publication History

Received by *Neurology* August 24, 2020. Accepted in final form December 29, 2020.

Appendix Authors

Name	Location	Contribution
Daniel Natera-de Benito, MD, PhD	Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain	Conceived and designed the study, major role in the acquisition of the data, analyzed the data, interpreted the data, and drafted the manuscript for intellectual content
A. Reghan Foley, MD	NIH, Bethesda, MD	Designed and conceptualized the study, major role in the acquisition of the data, analyzed the data, interpreted the data, and drafted the manuscript for intellectual content
Cristina Domínguez-González, MD	Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain	Collected the data, performed the analysis, and revised the manuscript for intellectual content
Carlos Ortiz, MD	Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain	Collected the data, performed the analysis, and revised the manuscript for intellectual content
Minal Jain, DSc, PT	NIH, Bethesda, MD	Major role in the acquisition of the data and revised the manuscript for intellectual content

RESULTADOS

Appendix (continued)

Name	Location	Contribution
Aron Mebrahtu, BS	NIH, Bethesda, MD	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Sandra Donkervoort, MS, CGC	NIH, Bethesda, MD	Major role in the acquisition of the data and revised the manuscript for intellectual content
Ying Hu, MS	NIH, Bethesda, MD	Performed the analysis and revised the manuscript for intellectual content
Margaret Fink, BS	NIH, Bethesda, MD	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Pomi Yun, MPH	NIH, Bethesda, MD	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Tracy Ogata, BS	NIH, Bethesda, MD	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Julita Medina, MD	Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Meritxell Vigo, MD	Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Katherine G. Meilleur, PhD	NIH, Bethesda, MD	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Meganne E Leach, MSN	NIH, Bethesda, MD	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Jahannaz Dastgir, DO	NIH, Bethesda, MD	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Jordi Díaz-Manera, MD, PhD	Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Laura Carrera-García, MD	Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Jessica Expósito-Escudero, MD	Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Macarena Alarcon, MD	Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Daniel Cuadras, PhD	Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain	Performed the statistical analysis
Elena Montiel-Morillo, MPT	Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content

Appendix (continued)

Name	Location	Contribution
José C. Milisenda, MD, PhD	Hospital Clinic, Barcelona, Spain	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Raul Dominguez-Rubio, MD	IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Montse Olivé, MD, PhD	IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Jaume Colomer, MD, PhD	Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain	Collected the data and revised the manuscript for intellectual content
Cristina Jou, MD	Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain	Performed the analysis and revised the manuscript for intellectual content
Cecilia Jimenez-Mallebrera, PhD	Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain	Performed the analysis and revised the manuscript for intellectual content
Carsten G. Bönnemann, MD	NIH, Bethesda, MD	Designed and conceptualized the study, major role in the acquisition of the data, analyzed the data, interpreted the data, and drafted the manuscript for intellectual content
Andres Nascimento, MD	Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain	Designed and conceptualized the study, major role in the acquisition of the data, analyzed the data, interpreted the data, and drafted the manuscript for intellectual content

References

1. Foley AR, Quijano-Roy S, Collins J, et al. Natural history of pulmonary function in collagen VI-related myopathies. *Brain* 2013;136:3625–3633.
2. Lamandé SR, Bateman JF. Collagen VI disorders: insights on form and function in the extracellular matrix and beyond. *Matrix Biol Int Soc Matrix Biol* 2018;71–72: 348–367.
3. Mohassel P, Reghan Foley A, Bönnemann CG. Extracellular matrix-driven congenital muscular dystrophies. *Matrix Biol* 2018;71–72:188–204.
4. Bönnemann CG. The collagen VI-related myopathies: muscle meets its matrix. *Nat Rev Neurol* 2011;7:379–390.
5. Yonekawa T, Nishino I. Ullrich congenital muscular dystrophy: clinicopathological features, natural history and pathomechanism(s). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015;86:280–287.
6. Lampe AK, Flanigan KM, Bushby KM, Hicks D. Collagen type VI-related disorders. In: *GeneReviews*. Seattle: University of Washington; 1993-2020.
7. Deconinck N, Richard P, Allamand V, et al. Bethlem myopathy: long-term follow-up identifies COL6 mutations predicting severe clinical evolution. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015;86:1337–1346.
8. Graziano A, Bianco F, D'Amico A, et al. Prevalence of congenital muscular dystrophy in Italy: a population study. *Neurology* 2015;84:904–911.
9. Sframenti M, Sarkozy A, Bertoli M, et al. Congenital muscular dystrophies in the UK population: clinical and molecular spectrum of a large cohort diagnosed over a 12-year period. *Neuromuscul Disord* 2017;27:793–803.
10. Lee J, Park H, Park Y, Kim S, Choi Y. Clinical, pathologic, genetic features of collagen 6-related myopathy in Korea. *Neuromuscul Disord* 2015;25:S266.
11. Okada M, Kawahara G, Noguchi S, et al. Primary collagen VI deficiency is the second most common congenital muscular dystrophy in Japan. *Neurology* 2007;69: 1035–1042.

12. Peat RA, Smith JM, Compton AG, et al. Diagnosis and etiology of congenital muscular dystrophy. *Neurology* 2008;71:312–321.
13. Clement EM, Feng L, Mein R, et al. Relative frequency of congenital muscular dystrophy subtypes: analysis of the UK diagnostic service 2001–2008. *Neuromuscul Disord* 2012;22:522–527.
14. Rodríguez MA, Barquero LMDR, Ortez CI, et al. Differences in adipose tissue and lean mass distribution in patients with collagen VI related myopathies are associated with disease severity and physical ability. *Front Aging Neurosci* 2017;9:1–11.
15. Cruz S, Figueroa-Bonaparte S, Gallardo E, et al. Bethlem myopathy phenotypes and follow up: description of 8 patients at the mildest end of the spectrum. *J Neuromuscul Dis* 2016;3:267–274.
16. Toni S, Morandi R, Busacchi M, et al. Nutritional status evaluation in patients affected by Bethlem myopathy and Ullrich congenital muscular dystrophy. *Front Aging Neurosci* 2014;6:1–10.
17. Briñas L, Richard P, Quijano-Roy S, et al. Early onset collagen VI myopathies: genetic and clinical correlations. *Ann Neurol* 2010;68:511–520.
18. Marrosu E, Ala P, Muntoni F, Zhou H. Gapmer antisense oligonucleotides suppress the mutant allele of COL6A3 and restore functional protein in Ullrich muscular dystrophy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2017;8:416–427.
19. Gualandi F, Manzati E, Sabatelli P, et al. Antisense-induced messenger depletion corrects a COL6A2 dominant mutation in Ullrich myopathy. *Hum Gene Ther* 2012;23:1313–1318.
20. Bolduc V, Zou Y, Ko D, Bönnemann CG. siRNA-mediated allele-specific silencing of a COL6A3 mutation in a cellular model of dominant Ullrich muscular dystrophy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014;3:1–11.
21. Noguchi S, Ogawa M, Kawahara G, Malicdan MC, Nishino I. Allele-specific gene silencing of mutant mRNA restores cellular function in Ullrich congenital muscular dystrophy fibroblasts. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014;3:e171.
22. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005;26:319–338.
23. Natera-de Benito D, Alarcon M, Ortez C, et al. Clinical and genetic characterization of collagen VI-related myopathies: difficulties in phenotypic characterization in the first years of life. *Neuromuscul Disord* 2017;27:S105.
24. Meilleur KG, Jain MS, Hyman LS, et al. Results of a two-year pilot study of clinical outcome measures in collagen VI- and laminin alpha2-related congenital muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 2015;25:43–54.
25. Bérard C, Payan C, Hodgkinson I, Fermanian J. A motor function measure scale for neuromuscular diseases: construction and validation study. *Neuromuscul Disord* 2005;15:463–470.
26. Pane M, Mazzone ES, Sormani MP, et al. 6 Minute walk test in Duchenne MD patients with different mutations: 12 month changes. *PLoS One* 2014;9:1–7.
27. McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, et al. The 6-minute walk test and other endpoints in Duchenne muscular dystrophy: longitudinal natural history observations over 48 weeks from a multicenter study. *Muscle and Nerve* 2013;48:343–356.
28. Li AM, Yin J, Yu CCW, et al. The six-minute walk test in healthy children: reliability and validity. *Eur Respir J* 2005;25:1057–1060.
29. Geiger R, Strassak A, Trembl B, et al. Six-minute walk test in children and adolescents. *J Pediatr* 2007;150:395–399.
30. Gibbons WJ, Fruchter N, Sloan S, Levy RD. Reference values for a multiple repetition 6-minute walk test in healthy adults older than 20 years. *J Cardiopulm Rehabil* 2001;21:87–93.
31. Li AM, Yin J, Au JT, et al. Standard reference for the six-minute-walk test in healthy children aged 7 to 16 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:174–180.
32. Mazzone E, Martinelli D, Berardinelli A, et al. North Star Ambulatory Assessment, 6-minute walk test and timed items in ambulant boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2010;20:712–716.
33. Tiziano FD, Lomastro R, Di Pietro L, et al. Clinical and molecular cross-sectional study of a cohort of adult type III spinal muscular atrophy patients: clues from a biomarker study. *Eur J Hum Genet* 2013;21:630–636.
34. Jain MS, Meilleur K, Kim E, et al. Longitudinal changes in clinical outcome measures in COL6-related dystrophies and LAMA2-related dystrophies. *Neurology* 2019;93:e1932–e1943.
35. Pace RA, Peat RA, Baker NL, et al. Collagen VI glycine mutations: perturbed assembly and a spectrum of clinical severity. *Ann Neurol* 2008;64:294–303.
36. Butterfield RJ, Foley AR, Dastgir J, et al. Position of glycine substitutions in the triple helix of COL6A1, COL6A2, and COL6A3 is correlated with severity and mode of inheritance in collagen VI myopathies. *Hum Mutat* 2013;34:1558–1567.
37. Bolduc V, Foley AR, Solomon-Degefa H, et al. A recurrent COL6A1 pseudoexon insertion causes muscular dystrophy and is effectively targeted by splice-correction therapies. *JCI Insight* 2019;4:e124403.
38. Aguti S, Bolduc V, Ala P, et al. Exon-skipping oligonucleotides restore functional collagen VI by correcting a common COL6A1 mutation in Ullrich CMD. *Mol Ther Nucleic Acids* 2020;21:205–216.
39. Mercuri E, Signorovitch JE, Swallow E, et al. Categorizing natural history trajectories of ambulatory function measured by the 6-minute walk distance in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2016;26:575–583.
40. Muntoni F, Domingos J, Manzur AY, et al. Categorising trajectories and individual item changes of the North Star Ambulatory Assessment in patients with Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 2019;14:e0221097.
41. Zerres K, Schöneboom SR. Natural history in proximal spinal muscular atrophy: clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications. *Arch Neurol* 1995;52:518–523.

5.2 ESTUDIO 2: EFECTO A CORTO Y LARGO PLAZO DEL TRATAMIENTO CON PIRIDOSTIGMINA EN PACIENTES CON DISTROFIA MUSCULAR POR ALTERACIONES EN *GMPPB*

En este estudio se evaluó la respuesta al tratamiento con piridostigmina en 3 hermanos de 19 años, 15 años y 10 años con la variante (NM_013334.3): c.553C > T; p.Arg185Cys en homocigosis. Presentaban un cuadro clínico con características tanto de distrofia muscular de cinturas como de síndrome miasténico congénito. Las manifestaciones clínicas fueron similares en los 3 hermanos, caracterizadas por la debilidad muscular progresiva y fluctuante, con fatigabilidad asociada. El patrón de debilidad mostraba una debilidad prominente en los músculos proximales de las extremidades y que no afectaba los músculos faciales, oculares ni bulbares, además de presentar cataratas y discapacidad intelectual leve (**Figura 10**). Los primeros síntomas aparecieron entre los 5 y los 7 años, siendo los más llamativos la dificultad para levantarse del suelo y una imposibilidad para caminar largas distancias. La CK estaba elevada en los tres casos, oscilando entre 800 y 3000 UI/l y en la resonancia cerebral se objetivó una hipoplasia leve del cerebelo con folias prominentes, aunque sin encontrarse signos cerebelosos en el examen clínico. En la resonancia magnética muscular se observó una marcada infiltración de grasa en los músculos paravertebrales y más leve en los músculos semitendinoso y sartorio (**Figura 11**). Los 2 hermanos más mayores tenían una escoliosis grave, con ángulos de Cobb de 85° y 100° a los 16 y 12 años, respectivamente (**Figura 12**). En la biopsia muscular se observó un patrón distrófico y una reducción del α -dístroglicano (**Figura 13**). En los estudios neurofisiológicos se detectó una disminución patológica del 25% en el músculo abductor del meñique tras la estimulación repetitiva a 3 Hz.

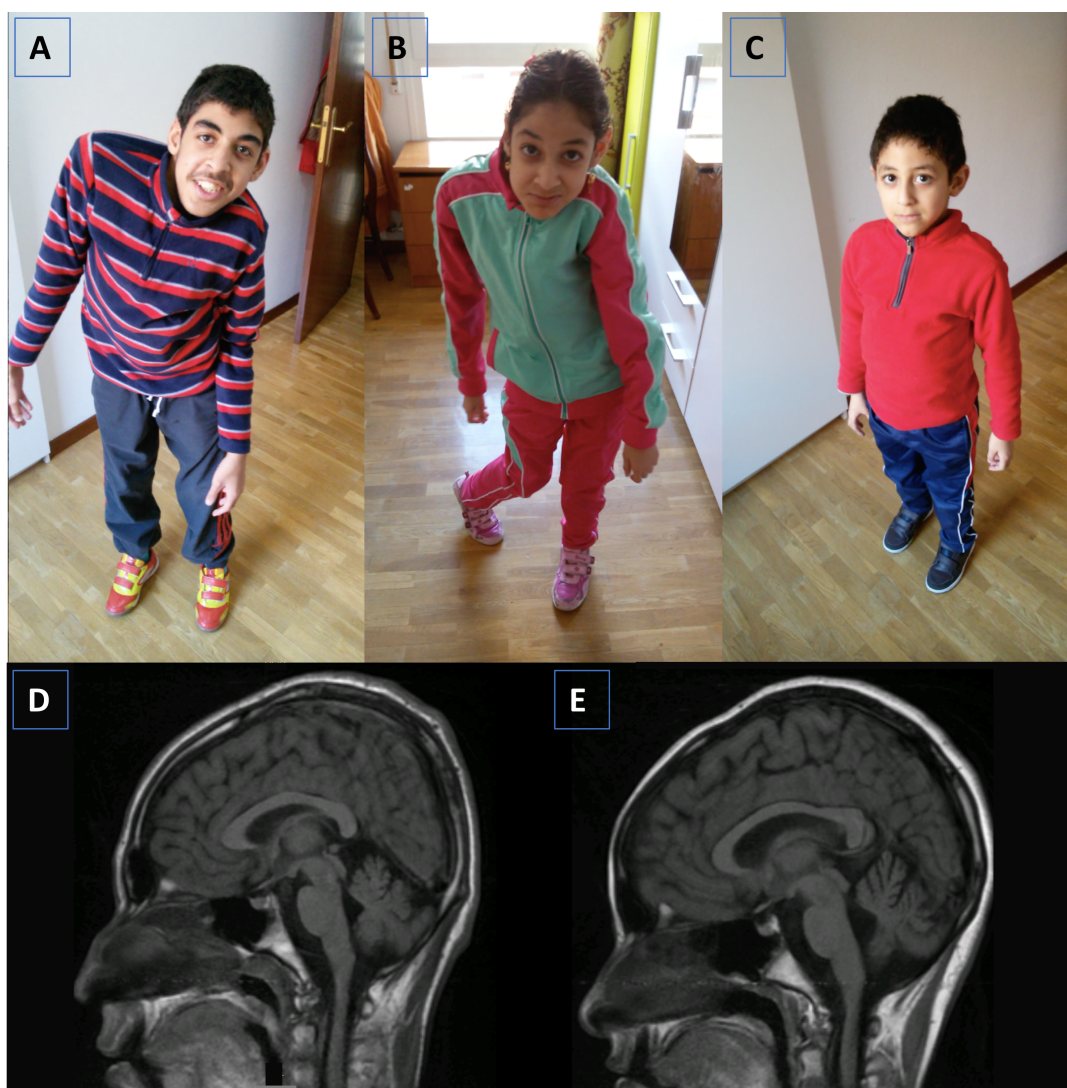


Figura 10. Características clínicas y radiológicas en pacientes con distrofia muscular por *GMPPB*.

Se observó debilidad muscular proximal en los tres pacientes. Se muestra en los pacientes 1 (A) y 2 (B) la deformidad del tronco secundaria a la debilidad axial. No se observa ptosis ni oftalmoplejía en ninguno de los tres pacientes. Se observó una hipoplasia leve del cerebelo con folia prominente en los pacientes 1 y 2 (D, E).

RESULTADOS

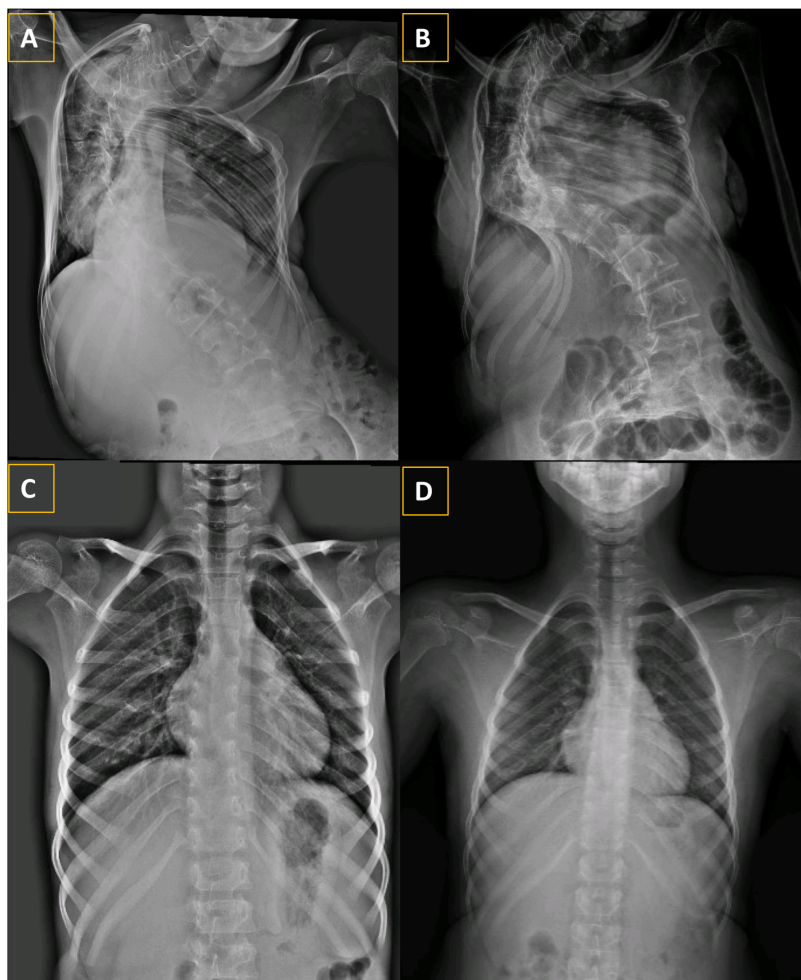


Figura 11. Radiografías de columna en pacientes con CMS relacionado con GMPPB. Se observó escoliosis en los pacientes 1 (A) y 2 (B), pero no en el paciente 3 (C y D). El ángulo de Cobb del paciente 1 fue de 185° a los 16 años (A) y el del paciente 2 fue de 100° a los 12 años (B). En las radiografías realizadas a los 6 y a los 10 años en el paciente 3 no se observó escoliosis (C, D).

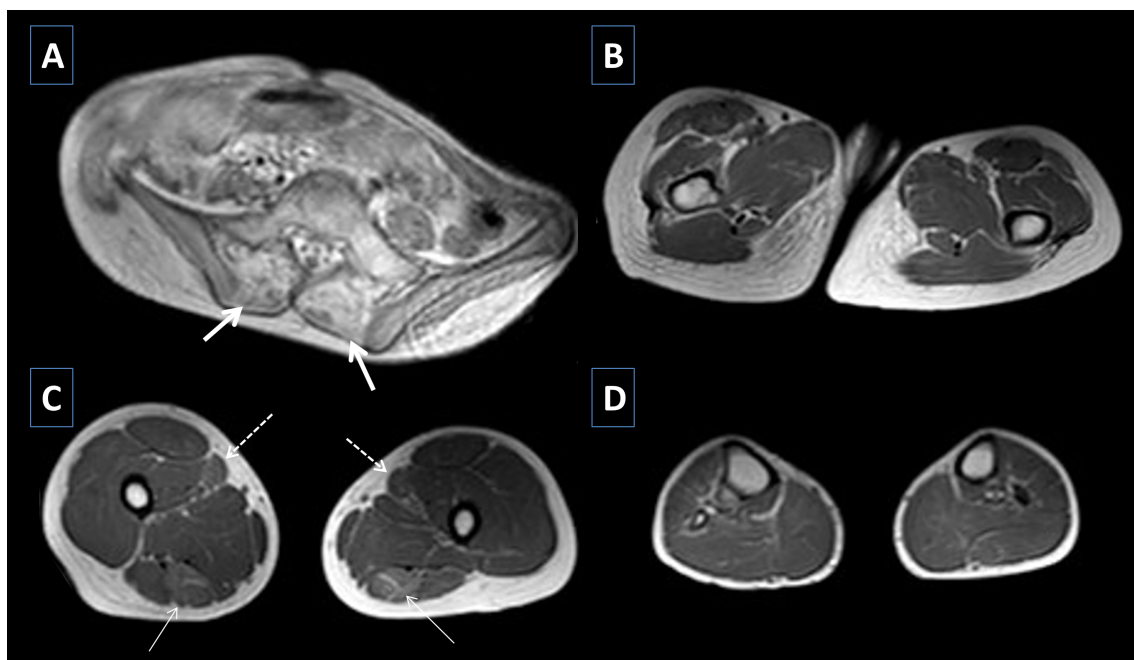


Figura 12. Características de la resonancia magnética muscular en el paciente 2 a los 12 años. En los cortes axiales en secuencias T1 se observa (A) una marcada infiltración grasa en los músculos paravertebrales (flechas) y (C) una leve infiltración grasa en los músculos semitendinoso (flechas largas y delgadas) y sartorio (flechas discontinuas). Todos los demás músculos están preservados.

RESULTADOS

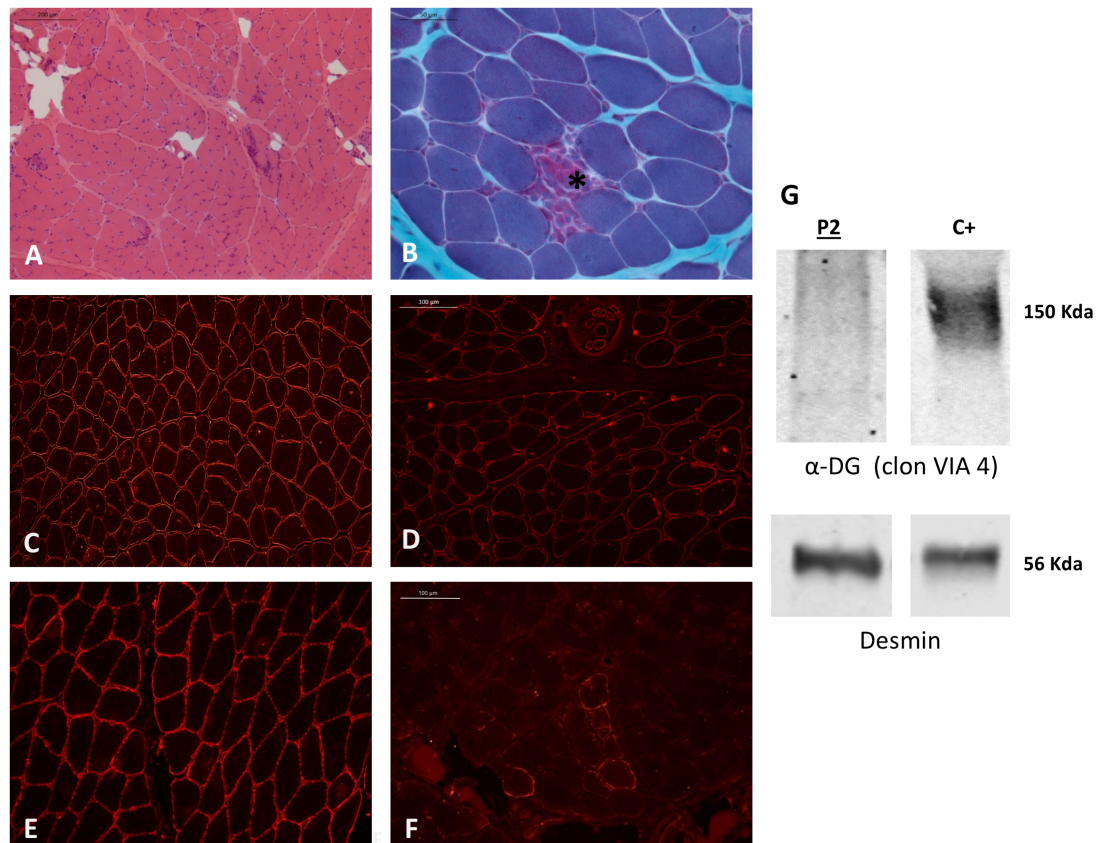


Figura 13. Biopsia muscular del paciente 2. Se observa un patrón distrófico en las tinciones de hematoxilina-eosina (A) y tricrómico de Gomori (B). Se muestra necrosis con fagocitosis en la tinción de Gomori (*). β -dístroglicano estaba levemente reducido en el paciente (D) en comparación con el control (C), y α -dístroglucano estaba muy reducido (E: control; F: paciente 2). (G) El western blot de α -DG (05-298. Clon VIA4. Millipore) se realizó utilizando cuarenta microgramos del homogeneizado de la biopsia muscular del paciente, así como un control muscular. La cantidad de α -DG se normalizó con desmina (NCL-DES-DERII. Leica) y muestra que la cantidad de proteína es comparable entre el sujeto y el control. El análisis de inmunoblot muestra una banda ancha a 156 Kda correspondiente a α -DG en el control, siendo claramente menor en el paciente 2.

El tratamiento con piridostigmina se inició a los 16 años en el paciente 1, a los 12 en el paciente 2 y a los 6 en el paciente 3. Se prescribió una dosis total de 120 mg tres veces al día a cada uno de ellos. Se agregó salbutamol cuatro meses después de iniciar la piridostigmina, con una dosis de 2 mg tres veces al día (un total de 6 mg/día). No se observaron efectos adversos, pero se retiró 8 meses después porque los pacientes no reportaron un aumento en la mejoría clínica.

Evaluación antes del inicio del tratamiento

Se detectaron dificultades para caminar en los tres pacientes, con una prueba de marcha de 6 minutos (6MWT) que osciló entre 17 y 100 m. Los pacientes tardaron entre 13 y 40 segundos en correr 10 metros. Las puntuaciones de NSAA estuvieron entre 9 y 15. Ninguno de los pacientes fue capaz de subir escaleras sin agarrarse a la barandilla y solo P2 y P3 pudieron levantarse del suelo. Los detalles sobre todas las evaluaciones de la función motora se muestran en la **Tabla 4** y en la **Figura 14**.

RESULTADOS

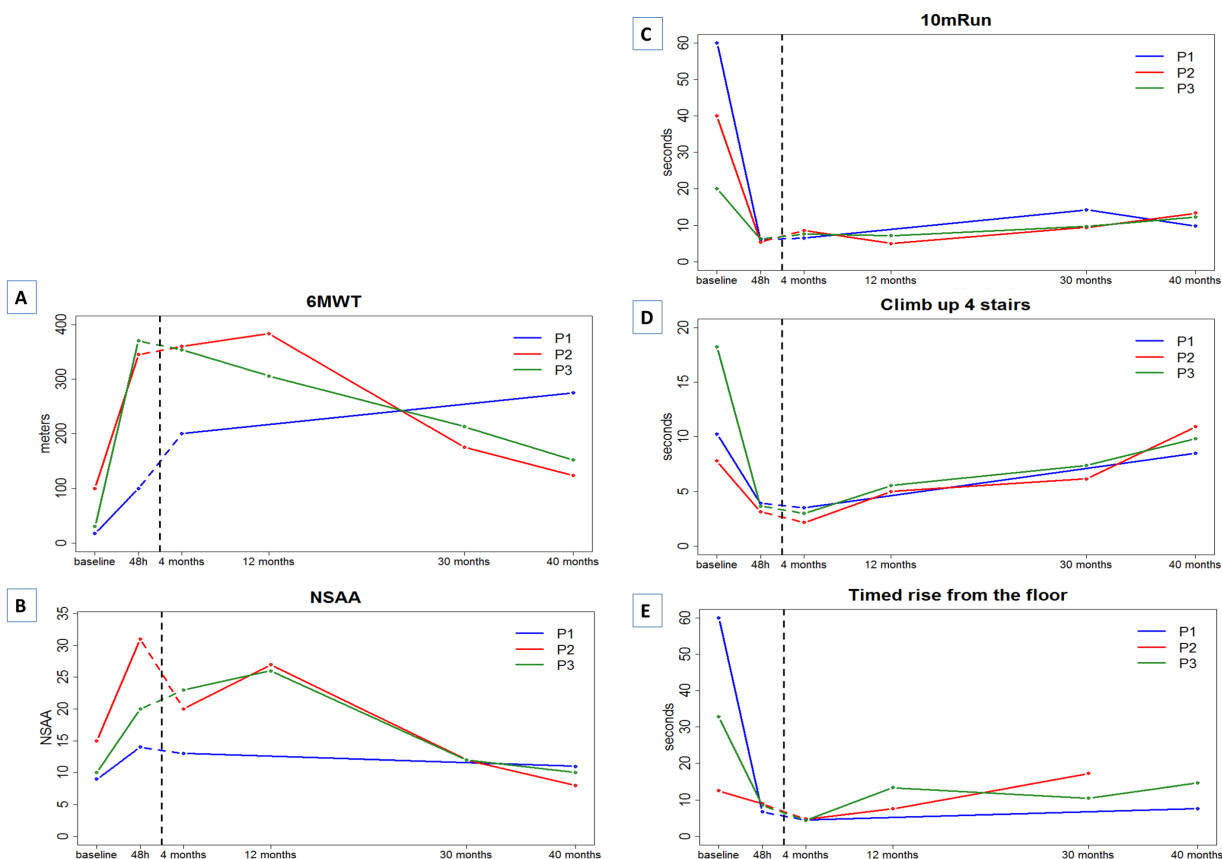


Figura 14. Función motora medida mediante escalas en los pacientes con distrofia muscular por GMPPB para evaluar su respuesta al tratamiento

Evaluación a corto plazo (48 horas después del tratamiento):

Todos los pacientes mostraron una marcada mejoría en las escalas de función motora realizadas 48 horas después de iniciar el tratamiento. Se observó al menos un aumento triple en la 6MWT en los tres pacientes, siendo especialmente notable en el caso de P3 (de 30 a 370 metros). P1 fue capaz de levantarse del suelo y, de igual manera, sus dos hermanos disminuyeron significativamente sus tiempos para hacerlo (**Tabla 4**). En cuanto a la carrera de 10 metros, los tiempos disminuyeron al menos un 50% en todos los casos. Finalmente, se objetivó un aumento medio de 10 puntos en la puntuación de NSAA, que osciló entre 5 (P1) y 16 (P2) (**Figura 14**).

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

	Paciente 1		Paciente 2		Paciente 3	
	0 días	17 m (21") (Unable to complete the assessment)	0 días	100 m (1'43")	0 días	30 m (60")
6MWT	48 horas	100 m (1'42") without support	48 horas	345 m (6')	48 horas	370 m (6')
	4 meses	200 m (3'23")	4 meses	360 m	4 meses	354 m
	12 meses	No pudo realizarse	12 meses	383 m	12 meses	306 m
	30 meses	No pudo realizarse	30 meses	175 m	30 meses	213 m
	40 meses	275 m	40 meses	124 m	40 meses	152 m
NSAA 34/34	0 días	9	0 días	15	0 días	10
	48 horas	14	48 horas	31	48 horas	20
	4 meses	13	4 meses	20	4 meses	23
	12 meses	No pudo realizarse	12 meses	27	12 meses	26
	30 meses	No pudo realizarse	30 meses	12	30 meses	12
Tiempo para levantarse desde el suelo	40 meses	11	40 meses	8	40 meses	10
	0 días	No pudo realizarse	0 días	12"52	0 días	32"81
	48 horas	6"72	48 horas	9"	48 horas	8"50
	4 meses	4"49	4 meses	4"75	4 meses	4"39
	12 meses	No pudo realizarse	12 meses	7"55	12 meses	13"36
Carrera 10 metros	30 meses	No pudo realizarse	30 meses	17"28 apoyado en una silla	30 meses	10"45
	40 meses	7"62	40 meses	No pudo realizarse	40 meses	14"66
	0 días	13"	0 días	40"	0 días	20"
	48 horas	6"02	48 horas	5"37	48 horas	6"28
	4 meses	6"47	4 meses	8"59	4 meses	7"62
Subir 4 escalones	12 meses	No pudo realizarse	12 meses	5"	12 meses	7"11
	30 meses	14"21	30 meses	9"44	30 meses	9"68
	40 meses	9"78	40 meses	13"34	40 meses	12"30
	0 días	10"25 agarrado barandilla	0 días	7"79 agarrado barandilla	0 días	18"22 agarrado barandilla
	48 horas	3"92	48 horas	3"15	48 horas	3"64
Bajar 4 escalones	4 meses	3"49	4 meses	2"15	4 meses	2"99
	12 meses	No pudo realizarse	12 meses	4"98	12 meses	5"52
	30 meses	No pudo realizarse	30 meses	6"14	30 meses	7"38
	40 meses	8"48	40 meses	10"92	40 meses	9"83
	0 días	7"48	0 días	5"19	0 días	10"51
Capacidad vital forzada	48 horas	3"58	48 horas	3"29	48 horas	3"20
	4 meses	3"99	4 meses	2"16	4 meses	3"13
	12 meses	No pudo realizarse	12 meses	3"48	12 meses	5"84
	30 meses	No pudo realizarse	30 meses	4"73	30 meses	5"66
	40 meses	6"40	40 meses	8"69	40 meses	8"16
Capacidad vital forzada	0 días	24%	0 días	26%	0 días	81%
	12 meses	25%	12 meses	29%	12 meses	85%
	30 meses	45%	30 meses	22%	30 meses	83%
	36 meses	42%	36 meses	36%	36 meses	80%
	45 meses	44%	45 meses	28%	45 meses	74%

Tabla 4. Resultados de las escalas funcionales motoras en el seguimiento a corto y largo plazo en pacientes con distrofia muscular por *GMPPB* tratados con piridostigmina. Los valores de distancia están en metros.

RESULTADOS

6MWT: Prueba de caminata de seis minutos; NSAA: Evaluación Ambulatoria North Star; 10 mrun: Carrera de 10 metros.

Evaluaciones a largo plazo:

Las puntuaciones de las escalas funcionales motoras se mantuvieron estables después de 4 y 12 meses de tratamiento, con resultados relativamente similares a los de la evaluación a corto plazo. En las evaluaciones de 30 y 40 meses, en contraste, se detectó una disminución moderada en dos de los tres hermanos (P2, P3). Sin embargo, las puntuaciones de todos ellos seguían siendo significativamente mejores que las encontradas antes del inicio del tratamiento (**Figura 14**). Además, cabe mencionar que P1 y P2 se sometieron a cirugía de escoliosis en el mes 22 después del inicio del tratamiento, a los 17 y 13 años, respectivamente. En comparación con sus hermanos, llama la atención que P3 tiene 10 años y no ha desarrollado escoliosis. Las evaluaciones de P1 se realizaron solo parcialmente en el mes 12 y el mes 30 debido al dolor relacionado con la escoliosis y la intervención quirúrgica, respectivamente. A pesar del tratamiento con piridostigmina, se detectó un cierto grado de fatigabilidad en los tres pacientes durante el examen más reciente realizado 40 meses después del inicio del tratamiento. Ninguno de los tres hermanos pudo mantener los brazos levantados durante más de 25 segundos cuando se les pidió realizar la maniobra de abducción sostenida de los brazos a 90° mientras estaban sentados (P1: 20 s; P2 y P3: 25 s). Además, los tres pacientes mostraron una disminución significativa en la velocidad de marcha a lo largo de la 6MWT (0,71 m/s en el primer minuto vs 0,44 m/s en el intervalo de 2-6 min).

Función pulmonar

La capacidad vital forzada del paciente 1 mejoró desde el momento antes de iniciar tratamiento hasta la espirometría que se hizo a los 45 meses de tratamiento,

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

mientras que se mantuvo relativamente estable en los pacientes 2 y 3 (**Tabla 4**). No se realizaron pruebas de espirometría en los primeros 12 meses después del inicio de la piridostigmina, por lo que no se pudieron evaluar los cambios a corto plazo en la función pulmonar.



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Neuromuscular Disorders 30 (2020) 719–726



www.elsevier.com/locate/nmd

Early and long-term effect of the treatment with pyridostigmine in patients with *GMPPB*-related congenital myasthenic syndrome

Edna Julieth Bobadilla-Quesada^{a,1}, Daniel Natera-de Benito^{a,1,*}, Laura Carrera-García^a, Carlos Orteza^a, Jessica Exposito-Escudero^a, Cecilia Jimenez-Mallebrera^a, Cristina Jou^b, Anna Codina^b, Joan Corbera^b, Obdulia Moya^c, Veronica Saez^a, Lidia Gonzalez-Quereda^d, Pia Gallano^d, Jaume Colomer^a, Daniel Cuadras^e, Julita Medina^c, María Eugenia Yoldi^f, Andrés Nascimento^a

^aNeuromuscular Unit, Neuropaediatrics Department, Institut de Recerca Hospital Sant Joan de Déu and CIBERER U703, Barcelona, Spain

^bDepartment of Pathology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

^cRehabilitation and Physical Unit Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

^dDepartment of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and CIBERER U705, Barcelona, Spain

^eStatistics Department, Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

^fPediatric Neurology Unit, Department of Pediatrics, Navarra Health Service, Navarrabiomed, Pamplona, Spain

Received 15 April 2020; received in revised form 16 July 2020; accepted 20 July 2020

Abstract

GMPPB mutations cause congenital myasthenic syndromes (CMS) overlapping with muscular dystrophy. Treatment with pyridostigmine has been reported to be effective in those patients. Nevertheless, results of functional motor assessments to determine its precise impact on the short and long term were not available. We describe the response to treatment with pyridostigmine in three siblings with *GMPPB*-related CMS using functional motor scales performed regularly over a period of 40 months. The beneficial effect of the treatment was outstanding within the first hours, with all the scales showing a dramatic increase in only two days. This remarkable improvement remained steady during 12 months but a moderate decrease was subsequently detected in two of the three patients. Despite this decline in the scores of the scales at the end of follow up, the functional motor status of the patients was still significantly better than it was before starting treatment. The introduction of pyridostigmine at an early age of the disease in one of the patients, before the onset of scoliosis, may have had a protective effect on it.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Congenital myasthenic syndrome; Dystroglycanopathy; Muscular dystrophy; *Gmppb*; Pyridostigmine; Motor functional scales.

1. Introduction

Congenital myasthenic syndromes (CMS) consist of a heterogeneous group of disorders due to mutations in genes involved in the signal transmission of the neuromuscular junction [1,2]. Different genes encoding proteins involved in glycosylation have been identified causing CMSs [3,4]. *GMPPB* is one of them, since it encodes the enzyme GDP-

mannose pyrophosphorylase B that catalyses the conversion of mannose-1-phosphate and GTP to GDP-mannose [4], essential for the glycosylation of key proteins involved in the neuromuscular junction development and function. Mutations in *GMPPB* have been described causing a broad phenotypic spectrum, with phenotypes ranging from CMS with associated muscular dystrophy to LGMD (LGMD R19 *GMPPB*-related) [4,5], and including rhabdomyolysis [6].

GMPPB is an important enzyme for both O-glycosylation, affecting glycosylation of alpha-dystroglycan (α -DG), and N-glycosylation, involving beta-dystroglycan (β -DG) [7]. Interestingly, N-glycosylation is essential for the

* Corresponding authors.

E-mail address: dnatera@sjdhospitalbarcelona.org (D. Natera-de Benito).

¹ Both authors have equal contribution

<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2020.07.009>

0960-8966/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

acetylcholine receptor (AChR) to function properly. During N-glycosylation, carbohydrate moieties are distributed through the four subunits of AChR, especially on the γ and δ subunits [8]. This is essential for the correct folding of acetylcholine receptor subunits, the appropriate assembly of the pentameric complex and, subsequently, the accurate development and maintenance of the endplate [9]. Therefore, mutations in *GMPPB* will give rise to a signal transmission impairment at the neuromuscular junction.

Patients with *GMPPB*-related CMS have prominent limb-girdle weakness with minimal or absent craniobulbar manifestations [10]. Patients are responsive to acetylcholinesterase inhibitors alone or combined with 3,4-diaminopyridine and/or salbutamol [11]. Belaya et al. reported eight patients with *GMPPB*-dystroglycanopathies and myasthenic component that benefited from pyridostigmine treatment; three of them with pyridostigmine plus salbutamol and one with pyridostigmine, salbutamol and 3,4-diaminopyrimidine [12]. An improvement in strength, particularly in proximal muscles, and exercise tolerance was observed. Luo et al. reported other three patients with

GMPPB-LGMD overlapping CMS with total and partial response to pyridostigmine for the myasthenic component [5].

Standardized motor assessments measuring the impact of the treatment with pyridostigmine have not been previously published. We describe the early and long-term response to treatment with pyridostigmine in three patients with *GMPPB*-related CMS using functional motor scales. Pulmonary function tests data are also included.

2. Material and methods

This is a prospective study to determine the clinical response to pyridostigmine in three patients with *GMPPB*-related CMS. Early and long-term effect was assessed over a period of 40 months through periodical physical examinations, including two validated functional motor scales: Six-minute walking test (6MWT) and North Star Ambulatory Assessment (NSAA). Patients were evaluated at baseline pre-treatment (0 day), 48 h after anticholinesterase onset (early term) and at 4, 12, 30 and 40-month follow-up (long term).



Fig. 1. Clinical and radiological features in patients with *GMPPB*-related CMS.

Proximal muscle weakness was observed in the three patients. Note in P1 (A) and P2 (B) the trunk deformity secondary to axial weakness. Ptosis or ophthalmoplegia are not observed in any of the three patients. A mild cerebellum hypoplasia with prominent folia was noted in patients 1 and 2 (D, E).

RESULTADOS



Fig. 2. Spine radiographies in patients with *GMPPB*-related CMS. Scoliosis was observed in patients 1 (A) and 2 (B) but not in patient 3 (C and D). Cobb angles of 85° at 16 years and 100° at 12 years were found in patient 1 (A) and 2 (B), respectively. Note the straight spine of patient 3 at the ages of 6 and 10 years (C, D).

2.1. Patients

Three siblings aged 19 (P1, male), 15 (P2, female) and 10 years old (P3, male) with a *GMPPB*-related CMS due to the previously described homozygous mutation (NM_013334.3): c.553C > T; p.Arg185Cys were followed up in our Neuromuscular Unit. Clinical manifestations were homogeneous in the 3 siblings, characterized by the presence of progressive and fluctuating fatigable muscle weakness (prominent in proximal limb muscles and sparing facial, eye and bulbar muscles), cataracts, and mild intellectual disability (Fig. 1). Presentation was at 5–7 years and included difficulties in rising from the floor and limited march tolerance, improving with rest. High creatine phosphokinase (CPK) was detected in all the three cases, ranging between 800 and 3000 U/L. Mild cerebellum hypoplasia with prominent folia was noted through cerebral magnetic resonance imaging (MRI) in P1 and P2 (Fig. 1), although cerebellar signs were not found on clinical examination. T1-weighted sequences of muscle MRI in P2 showed a

marked fat infiltration in paravertebral muscles, and milder in semitendinosus and sartorius muscles (Fig. 2). Scoliosis was observed in P1 and P2, with Cobb angles of 85° and 100° at 16 and 12 years, respectively, but not in P3 (Fig. 3).

A muscular biopsy was performed in P1, showing a dystrophic pattern and reduced immunolabeling of alpha-dystroglycan (α -DG). Reduction of α -DG was also detected in immunoblotting (Fig. 4). A pathological decrement of 25% was detected in P1 after repetitive nerve stimulation studies at 3 Hz in abductor digiti minimi muscle.

2.2. Treatment

Pyridostigmine was started at the age of 16 in P1, 12 in P2, and 6 in P3. A total of 120 mg three times a day was prescribed in each one of them. Salbutamol was added four months after pyridostigmine was initiated, with a dose of 2 mg three times a day (total of 6 mg / day). Adverse effects were not observed, but it was withdrawn 8 months later because patients did not report an increase in clinical improvement

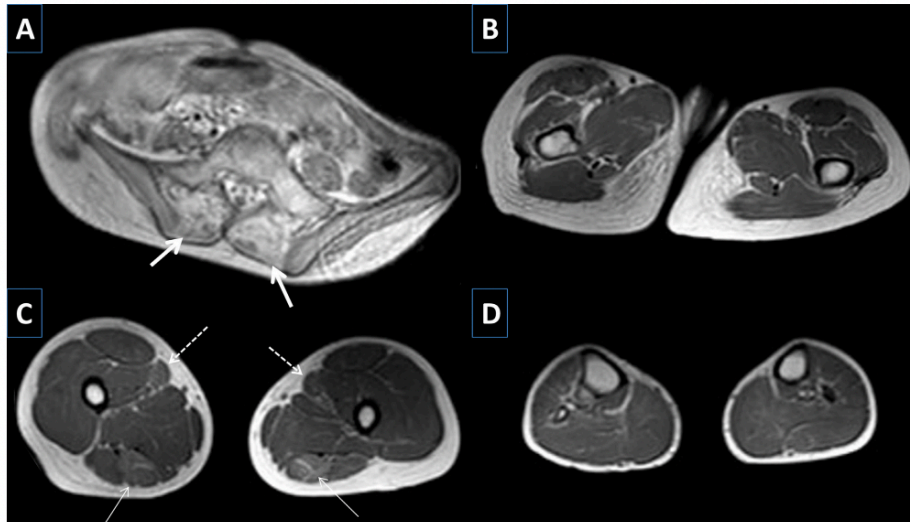


Fig. 3. Muscle MRI features in patient 2 at 12 years old. Axial views in T1-weighted sequences show (A) a marked fatty infiltration in paravertebral muscles (arrows) and (C) a mild fatty infiltration in semitendinosus (thin long arrows) and sartorius muscles (discontinuous arrows). In contrast, all the other muscles are spared.

with respect to what they previously obtained with the onset of pyridostigmine.

2.3. Motor function assessments

Motor functional scales widely used in muscular dystrophies were selected to assess the response to treatment: Six-minute walking test (6MWT) and North Star Ambulatory Assessment (NSAA). 6MWT has been used to assess the ambulatory capacity and functional progression in various neuromuscular diseases [12–15], mostly in Duchenne muscular dystrophy [16] but also in congenital myasthenic syndromes [17,18]. The NSAA is a scale designed for Duchenne muscular dystrophy, but it is also used for other neuromuscular conditions, and it consists of 17 items, where item 1 corresponds to standing and item 17 to running [19–21]. Each item can be scored as follows: 0 = Unable to achieve independently; 1 = Modified method but without any physical assistance; 2 = Able to achieve without any assistance. The final score can range from 0, if the patient fails in all the activities, to 34, if all the activities are achieved [22]. The NSAA also allows to measure some timed items such as 10 metres run (10 mrun) and time to rise from the floor. The four stair-climb test (4SC), used in other neuromuscular diseases [23], was also included in the assessment of these patients.

Patients were evaluated at baseline pre-treatment (0 day), 48 h after anticholinesterase onset (early term) and at 4, 12, 30 and 40 months (long term). Assessments were performed

in the same location in order to minimize the measurement variability and they were carried out by the same team of physiotherapists, who have a wide experience in the use of functional scales in patients with neuromuscular disorders.

2.4. Pulmonary function tests

Spirometry techniques were performed according to international standards [24]. Forced vital capacity (FVC) measurements (expressed as percent predicted) were captured at baseline pre-treatment (0 day) and at 12, 30, 36 and 45 months.

3. Results

3.1. Baseline

Difficulties for walking were detected in all three patients, with 6MWT ranging from 17 to 100 m. Patients took between 13 and 40 s in 10 mrun. NSAA scores were between 9 and 15. None of the patients were able to climb stairs without handling into the railing and only P2 and P3 were able to rise from the floor. Details regarding all the motor function assessment are shown in Table 1 and Fig. 5.

Early-term assessment (48 h after treatment): All patients showed a marked improvement in functional motor scales performed 48 h after the treatment was initiated. At least a threefold increase in 6MWT was observed in the three patients, being particularly striking in the case of P3 (from

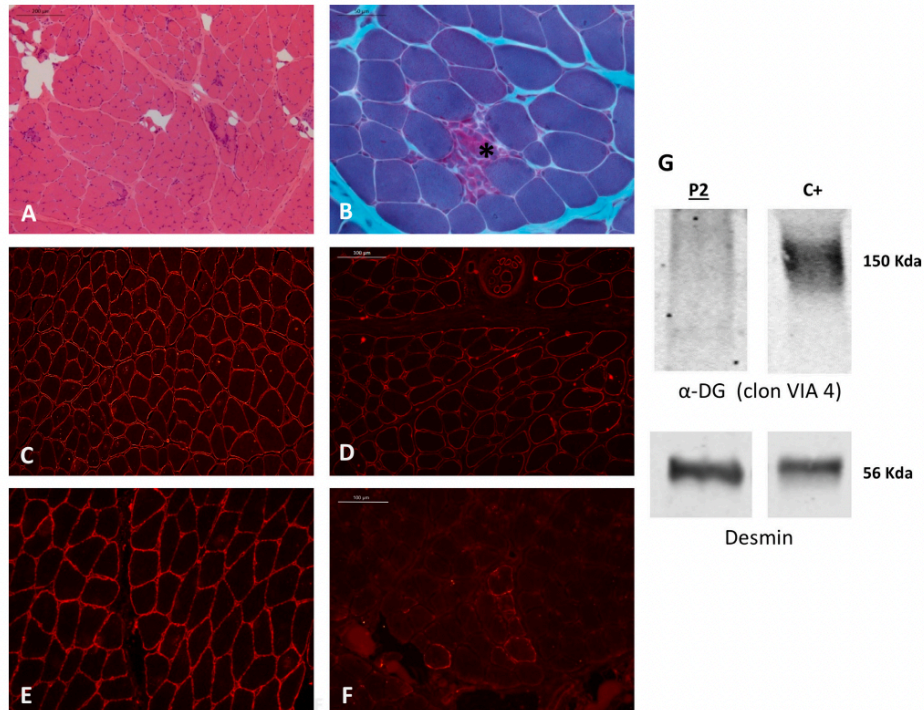


Fig. 4. Muscle biopsy in patient 2. A dystrophic pattern is observed in hematoxylin-eosin (A) and modified Gomori trichrome stains (B). Note the myonecrosis with phagocytosis in Gomori stain (*). While β -dystroglycan immunostaining was mildly reduced in patient 2 (D) compared to control (C), a severe reduction was observed in α -dystroglycan immunolabeling (E: control; F: patient 2). (G) Western Blotting of α -DG (05–298, Clone VIA4, Millipore) was performed using forty micrograms of the patient muscle biopsy homogenate as well as a muscle control. The amount of α -DG was normalized with desmin (NCL-DES-DER11, Leica), and it indicates that the amount of protein is comparable between the subject and control. Immunoblot analysis shows a broad band at 156 Kda corresponding to α -DG in control, being clearly lower expressed in patient 2.

30 m to 370 m). P1 was able to rise from floor and, in the same way, their two siblings significantly decreased their times to do it (Table 1). Regarding 10mrun, times decreased at least 50% in all the cases. Finally, a mean increase of 10 points in NSAA score was objectified, ranging from 5 (P1) to 16 (P2) (Fig. 5).

Long-term assessments: Scores of the functional assessments remained stable after 4 and 12 months of treatment, with relatively similar results compared with those of the early-term assessment. At 30 and 40-month assessments, in contrast, a moderate decline was detected in two of the three siblings (P2, P3). Nevertheless, the scores of all of them were still significantly better than those found before treatment onset (Fig. 5). In addition, it is worth mentioning that P1 and P2 underwent scoliosis surgery at month 22 after treatment onset, at 17 and 13 years old, respectively. Interestingly, P3 is 10 years old and he has not developed scoliosis. Assessments of P1 were only partly

carried out at month 12 and month 30 due to pain related to scoliosis and surgical intervention, respectively.

In spite of the treatment with pyridostigmine, a certain degree of fatigability was still detected in the three patients during most recent exam performed at 40 months after the onset of treatment. Neither of the three siblings was able to hold their arms up for more than 25 s when we asked them the maneuver of sustained abduction of the arms to 90° while sitting (P1: 20 s; P2 and P3: 25 s). In addition, the three patients exhibited a significant decline in walking speed along the 6MWT (0.71 m/s in the first minute vs 0.44 m/s in 2–6 min interval).

3.2. Pulmonary function

FVC of patient 1 improved from baseline to spirometry at 45 months of treatment, while it remained relatively stable in patients 2 and 3 (Table 1). No spirometry tests were

Table 1

Data obtained in the scales evaluated at early and long term follow up in patients with GMPPB-CMS treated with pyridostigmine. Values of distance are in metres. 6MWT: Six-minute walk test; NSAA: North Star Ambulatory Assessment; 10 mrun: 10 metres run.

	Patient 1		Patient 2		Patient 3	
	0 days	17 m (21'') (Unable to complete the assessment)	0 days	100 m (1'43'')	0 days	30 m (60'')
6MWT	48 h	100 m (1'42'') without support	48 h	345 m (6')	48 h	370 m (6')
	4 months	200 m (3'23'')	4 months	360 m	4 months	354 m
	12 months	Unable to perform	12 months	383 m	12 months	306 m
	30 months	Unable to perform	30 months	175 m	30 months	213 m
	40 months	275 m	40 months	124 m	40 months	152 m
NSAA 34/34	0 days	9	0 days	15	0 days	10
	48 h	14	48 h	31	48 h	20
	4 months	13	4 months	20	4 months	23
	12 months	Unable to perform	12 months	27	12 months	26
	30 months	Unable to perform	30 months	12	30 months	12
	40 months	11	40 months	8	40 months	10
Timed rise from floor	0 days	Unable to perform	0 days	12''52	0 days	32''81
	48 h	6''72	48 h	9''	48 h	8''50
	4 months	4''49	4 months	4''75	4 months	4''39
	12 months	Unable to perform	12 months	7''55	12 months	13''36
	30 months	Unable to perform	30 months	17''28 supported on chair	30 months	10''45
10mrun	40 months	7''62	40 months	Unable to perform	40 months	14''66
	0 days	13''	0 days	40''	0 days	20''
	48 h	6''02	48 h	5''37	48 h	8''28
	4 months	6''47	4 months	8''59	4 months	7''62
	12 months	Unable to perform	12 months	5''	12 months	7''11
Ascend 4 steps	30 months	14''21	30 months	9''44	30 months	9''68
	40 months	9''78	40 months	13''34	40 months	12''30
	0 days	10''25 aided with railing	0 days	7''79 aided with railing	0 days	18''22 aided with railing
	48 h	3''92	48 h	3''15	48 h	3''64
	4 months	3''49	4 months	2''15	4 months	2''99
Descend 4 steps	12 months	Unable to perform	12 months	4''98	12 months	5''52
	30 months	Unable to perform	30 months	6''14	30 months	7''38
	40 months	8''48	40 months	10''92	40 months	9''83
	0 days	7''48	0 days	5''19	0 days	10''51
	48 h	3''58	48 h	3''29	48 h	3''20
Forced vital capacity	4 months	3''99	4 months	2''16	4 months	3''13
	12 months	Unable to perform	12 months	3''48	12 months	5''84
	30 months	Unable to perform	30 months	4''73	30 months	5''66
	40 months	6''40	40 months	8''69	40 months	8''16
	0 days	24%	0 days	26%	0 days	81%
	12 months	25%	12 months	29%	12 months	85%
	30 months	45%	30 months	22%	30 months	83%
	36 months	42%	36 months	36%	36 months	80%
	45 months	44%	45 months	28%	45 months	74%

performed in the first 12 months after the pyridostigmine onset, and therefore early-term changes in pulmonary function could not be assessed.

4. Discussion

Pyridostigmine has been proposed as a beneficial treatment in patients with GMPPB-related CMS and overlapping

phenotypes. In treatable rare diseases like this, the need to objectively and quantitatively assess the response to pharmacological treatments is increasingly required. Here, we measured the impact of this treatment in three patients using recognized motor functional scales. The response to treatment was outstanding within the first hours, with all the scores of the scales showing a dramatic increase in only two days. This remarkable improvement remained steady during 12

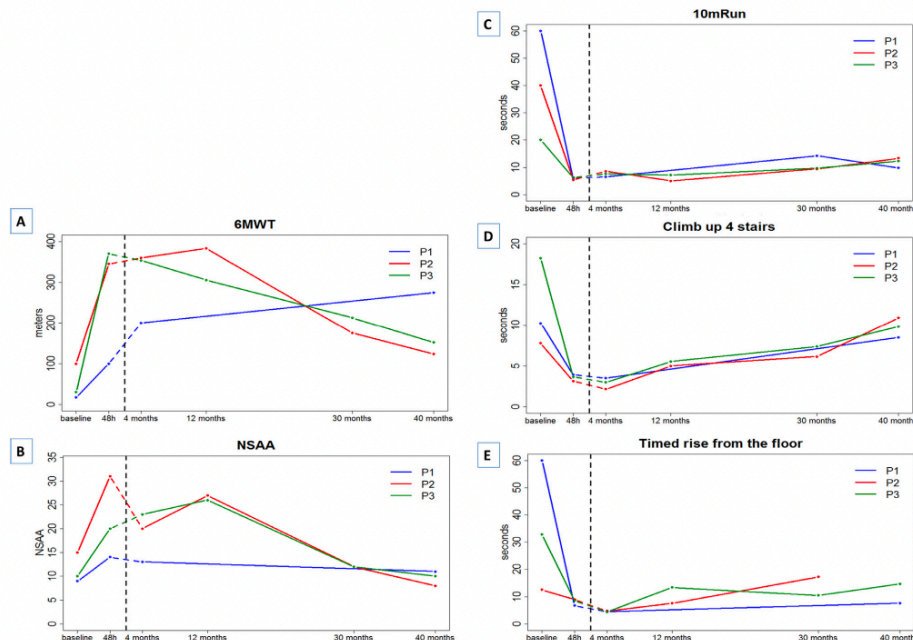


Fig. 5. Motor function assessment in patients with *GMPPB*-CMS.

months but a moderate decrease was subsequently detected. Despite this decline in the scores of the scales at the end of follow up, the functional motor status of the patients was still significantly better than it was before starting treatment.

Intrinsic conditions such as the degenerative nature of *GMPPB*-CMS could explain this functional motor decline after 12 months of treatment. We hypothesize that it may be partially associated with the natural history of the dystrophic condition. In our cohort of patients, not only this intrinsic factor may affect the results. Extrinsic factors such as scoliosis and its surgical complications must also be taken into account in the progression of the disease, since they affected the clinical follow-up and functionality of the patients to a greater or lesser extent. Scoliosis is a relevant factor to be considered in terms of disease progression. In our cohort, the introduction of pyridostigmine at an early age of the disease in the patient 3, before the scoliosis onset, seems to have had a protective effect on it. Patient 2 already showed a severe scoliosis when she was 12 years old, almost the same age than patient 3 at last follow up, showing that progression of scoliosis in patient 3 has been slower than those observed in their siblings. Of note, even in those older patients, or those patients in whom fatty infiltration is observed in some muscles by MRI, like patients 1 and 2, the treatment with pyridostigmine conferred a clear benefit in terms of motor function. This

finding highlights the importance of considering this treatable entity in all unsolved patients with muscular dystrophy, given that CMS due to *GMPPB* mutations may frequently remain undiagnosed due to its frequent presentation with a muscular dystrophy phenotype with no demonstrable effect on the neuromuscular junction [11].

According to our results and even taking into account the heterogenic clinical presentation of *GMPPB*-related disorders, we consider acetylcholine inhibitors as the first therapeutic option in patients harbouring *GMPPB* mutations mainly from early stages of the disease, including those cases in which fatigability is not clearly observed. Fatigability could be presented overlapping with other symptoms and is not always easy to be objectified [25]. Use of other treatments including salbutamol and 3,4-diaminopyrimidine may also be considered as a complementary treatment [26].

Implementation of scales focused on health-related quality of life and activities of daily living may be considered in the future to measure the response to treatment.

5. Conclusion

Our study advances our knowledge about the impact of the treatment with pyridostigmine in patients with *GMPPB*-related CMS. An outstanding response to treatment was

observed in all the patients in a few hours and within the first year. Nonetheless, a decrease in the functional motor scales one year after the onset of treatment was detected. It suggests that, in spite of the beneficial response to cholinesterase inhibitors, the progressive course associated to the dystrophic component of the condition persists. This highlights the need for further prospective studies focusing on validation of our results.

Acknowledgements

We are indebted to the “Biobanc de l’Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació” integrated in the Spanish Biobank Network of ISCIII for the sample and data procurement.

The authors warmly thank the members of the reported family for their participation in this study.

Funding statements

Daniel Natera-de Benito was partially supported by Instituto de Salud Carlos III, Río Hortega Grant CM17/00054.

Pia Gallano and Lidia Gonzalez work were supported by a grant PI 15/01898 from Instituto de Salud Carlos III and a grant from Mutua Madrileña.

This work was supported in part by grants from Spanish Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (grant number PI19/00122 for CJM), and European Regional Development Fund (ERDF), “A way to achieve Europe.

References

- [1] Vanhaesebrouck AE, Beeson D. The congenital myasthenic syndromes: expanding genetic and phenotypic spectrums and refining treatment strategies. *Curr Opin Neurol* 2019;32:696–703.
- [2] Engel AG, Shen XM, Selcen D, Sine SM. Congenital myasthenic syndromes: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Lancet Neurol* 2015;14:420–34.
- [3] Houlden H. Defective N-linked protein glycosylation pathway in congenital myasthenic syndromes. *Brain* 2013;136:692–5.
- [4] Carss KJ, Stevens E, Foley AR, Cirak S, Riemersma M, Torelli S, et al. Mutations in GDP-mannose pyrophosphorylase B cause congenital and limb-girdle muscular dystrophies associated with hypoglycosylation of α -dystroglycan. *Am J Hum Genet* 2013;93:29–41.
- [5] Luo S, Cai S, Maxwell S, Yue D, Zhu W, Qiao K, et al. Novel mutations in the C-terminal region of GMPPB causing limb-girdle muscular dystrophy overlapping with congenital myasthenic syndrome. *Neuromuscul Disord* 2017;27:557–64.
- [6] Cabrera-Serrano M, Ghaoui R, Ravenscroft G, Johnsen R, Davis M, Corbett A, et al. Expanding the phenotype of GMPPB mutations. *Brain* 2015;138:836–44.
- [7] Sarkozy A, Torelli S, Mein R, Henderson M, Phadke R, Feng L, et al. Mobility shift of beta-dystroglycan as a marker of GMPPB gene-related muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2018;89:762–8.
- [8] Nomoto H, Takahashi N, Nagaki Y, Endo S, Arata Y, Hayashi K. Carbohydrate structures of acetylcholine receptor from Torpedo californica and distribution of oligosaccharides among the subunits. *Eur J Biochem* 1986;157:233–42.
- [9] Rickert KW, Imperiali B. Analysis of the conserved glycosylation site in the nicotinic acetylcholine receptor: potential roles in complex assembly. *Chem Biol* 1995;2:751–9.
- [10] Rodríguez Cruz P, Palace J, Beeson D. The Neuromuscular Junction and Wide Heterogeneity of Congenital Myasthenic Syndromes. *Int J Mol Sci* 2018;19:1677.
- [11] Belaya K, Rodríguez Cruz PM, Liu WW, Maxwell S, McGowan S, Farrugia M, et al. Mutations in GMPPB cause congenital myasthenic syndrome and bridge myasthenic disorders with dystroglycanopathies. *Brain* 2015;138:2493–504.
- [12] Lammers A, Hislop A, Flynn Y, Haworth S. The 6-minute walk test: normal values for children of 4–11 years of age. *Arch Dis Child* 2008;93:464–8.
- [13] Kierkegaard M, Tollbäck A. Reliability and feasibility of the six-minute walk test in subjects with myotonic dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2007;17:943–9.
- [14] Wokke J, Escolar D, Pestronk A, Jaffe K, Carter G, van den Berg L, et al. Clinical features of late-onset Pompe disease: a prospective cohort study. *Muscle Nerve* 2008;38:1236–45.
- [15] Burke G, Hiscock A, Klein A, Niks E, Main M, Manzur A, et al. Salbutamol benefits children with congenital myasthenic syndrome due to DOK7 mutations. *Neuromuscul Disord* 2013;23:170–5.
- [16] McDonald CM, Henricson EK, Han JJ, Ted Aresch RT, Nicorici A, Elfring GL, et al. The 6-minute walk test as a new outcome measure in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2010;41:500–10.
- [17] Lorenzoni PJ, Scola RH, Kay CSK, Filla L, Miranda A, Pinheiro J, et al. Salbutamol therapy in congenital myasthenic syndrome due to DOK7 mutation. *J Neurol Sci* 2013;331:155–7.
- [18] Witherspoon JW, Vasavada RP, Waite MR, Shelton M, Chrismer I, Wakim P, et al. 6-minute walk test as a measure of disease progression and fatigability in a cohort of individuals with RYR1-related myopathies. *Orphanet J Rare Dis* 2018;13:105.
- [19] Eagle M, Scott E, Main M. G.P.1.08 Steroids in Duchenne muscular dystrophy (DMD): natural history and clinical evaluation using the North Star Ambulatory Assessment (NSAA). *Neuromuscul Disord* 2007;17:774.
- [20] Mazzone ES, Messina S, Vasco G, Main M, Eagle M, D’Ámico A, et al. Reliability of the North Star Ambulatory Assessment in a multicentric setting. *Neuromuscul Disord* 2009;19:458–61.
- [21] Ricotti V, Ridout DA, Pane M, Main M, Mayhew A, Mercuri E, et al. The NorthStar Ambulatory Assessment in Duchenne muscular dystrophy: considerations for the design of clinical trials. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016;87:149–55.
- [22] Messina S, Vita GL, Sframeli M, Mondello S, Mazzone E, D’Ámico A, et al. Health-related quality of life and functional changes in DMD: a 12-month longitudinal cohort study. *Neuromuscul Disord* 2016;26:189–96.
- [23] Bushby K, Connor E. Clinical outcome measures for trials in Duchenne muscular dystrophy: report from International Working Group meetings. *Clin Investig (London)* 2011;1:1217–35.
- [24] Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005;26:319–38.
- [25] Rodríguez Cruz PM, Belaya K, Basiri K, Sedghi M, Ferrugia ME, Holton J, et al. Clinical features of the myasthenic syndrome arising from mutations in GMPPB. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016;87:802–9.
- [26] Thompson R, Bonne G, Missier P, Lochmüller H. Targeted therapies for congenital myasthenic syndromes: systematic review and steps towards a treatatolome. *Emerg Top Life Sci* 2019;3:19–37.

5.3 ESTUDIO 3: VARIANTES EN DTNA CAUSAN UNA DISTROFIA MUSCULAR DOMINANTE RELATIVAMENTE LEVE

Se incluyeron en este estudio 4 familias con individuos con variantes en heterocigosis simple en DTNA.

5.3.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

La mayoría de los pacientes presentaban mialgias e intolerancia al ejercicio (10/12), con una edad de inicio variable, que fue desde la infancia temprana hasta la cuarta década de la vida. No se detectó debilidad muscular en ningún paciente de la familia A, pero se identificó una debilidad proximal de las extremidades inferiores (Escala MRC: 4/5) en tres de los pacientes de las familias B y C. Los pacientes de las familias A y C referían calambres musculares asociados con la actividad física. No se identificó miotonía en ningún paciente, ni tampoco hipertrofia de gemelos. Se detectó una elevación persistente de CK sérica en 11 de los 12 pacientes de las cuatro familias (**Tabla 5**). El paciente A.III.1 tuvo un episodio de rabdomiólisis con un pico de CK sérica de 87.800 UI/L a los 20 años. Dos pacientes (B.III.3 y D.III.2) fueron diagnosticados con trastorno del espectro autista, y otros dos (B.I.1 y C.II.1) presentaron problemas de neurodesarrollo más leves; los cuatro individuos portaban la delección c.1567_1587 en DTNA; no se realizaron resonancias magnéticas cerebrales en ninguno de estos pacientes (**Tabla 5**). En contraste, ninguno de los pacientes de la familia A, con la variante c.1585G > A en DTNA, mostró deterioro cognitivo.

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

Pte	Fam	Sexo	Edad	CK (UI/L)	Debilidad	Mialgias	Intol ejercicio	Rabdomiolisi s	Biopsia muscular	Cognitivo	Variante genética
A.II.2	A	H	55 a	1780	No	Sí	Sí	No	Variabilidad tamaño fibras, núcleos internos, patron intermiofibrilar irregular, discrete aumento tejido conectivo en endomisio y/o perimisisio	No	c.1585G>A; p.(Glu529Lys)
A.II.4	A	M	51 a	150-200	No	Sí	Sí	No	No realizada	No	c.1585G>A; p.(Glu529Lys)
A.II.7	A	M	49 a	380	No	Sí	Sí	No	Variabilidad tamaño fibras, núcleos internos, patron intermiofibrilar irregular, discrete aumento tejido conectivo en endomisio y/o perimisisio	No	c.1585G>A; p.(Glu529Lys)
A.III.1	A	H	24 a	830-1590	No	Sí	Sí	Sí	Variabilidad tamaño fibras, núcleos internos, patron intermiofibrilar irregular, discrete aumento tejido conectivo en endomisio y/o perimisisio	No	c.1585G>A; p.(Glu529Lys)
A.III.2	A	M	18 a	490-3990	No	Sí	Sí	No	Variabilidad tamaño fibras, núcleos internos, patron intermiofibrilar irregular, discrete aumento tejido conectivo en endomisio y/o perimisisio	No	c.1585G>A; p.(Glu529Lys)
B.I.1	B	H	70 a	elevadas	No	No	No	Desconocido	No realizada	Retraso aprendizaje	c.1567-1587; p.(523-529del7)
B.II.4	B	H	40 a	elevadas	No	Sí	No	Desconocido	Núcleos internos y áreas focales de inflamación. Atrofia de fibras leve-moderada sin regenerativas. Se interpret inicialmente como psible miositis	No	c.1567-1587; p.(523-529del7)
B.III.1	B	H	8 a	3000-3500	Sí	Sí	Sí	Desconocido	No realizada	Desconocido	c.1567-1587; p.(523-529del7)
B.III.3	B	H	16 a	4000-6000	Sí (debut 8a)	Sí	Sí	No	Marcada variabilidad tamaño fibras, inflamación parcheada endo y perimisial, agregados focales parcheados en forma de regeneración, algunos con vacuolas. Infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos, eosinófilos y algunos neutrófilos, localizado en fibras y vasos sanguíneos	TEA y TDAH	c.1567-1587; p.(523-529del7)
C.II.1	C	H	12 a	8000	Sí (hip adduction and hip extension 4+/5)	Sí	Sí	No	Cambios miopáticos incluyendo núcleos internos y predominio de fibras tipo 1	Trastorno aprendizaje	c.1567-1587; p.(523-529del7)
D.II.3	D	H	43 a	388	No	No	No	Desconocido	No realizada	Desconocido	c.1567-1587; p.(523-529del7)
D.III.2	D	H	8 a	2500-5100	No	Sí	Sí	No	Variabilidad tamaño de las fibras, núcleos internos, algunos focos de linfocitos en endomisio y algunos focos de miofagocitosis. Pequeños focos de fibras regenerativas basofílicas.	TEA	c.1567-1587; p.(523-529del7)

Tabla 5. Características clínicas de los pacientes con distrofia por DTNA

RESULTADOS

Los estudios de conducción nerviosa y la electromiografía realizados en los pacientes A.II.4 a los 51 años y C.II.1 a los 8 años mostraron velocidades de conducción normales y potenciales de unidades motoras de baja amplitud y corta duración, compatibles con una afectación de músculo. No hubo evidencia de un trastorno de la unión neuromuscular, ya que la estimulación nerviosa repetitiva en músculos distales a 3 y 50 Hz no mostró una respuesta decremental ni incremental, respectivamente. No se realizó electromiografía de fibra única. Se detectaron fasciculaciones activas en el deltoides, bíceps, tríceps, flexores del antebrazo, vasto lateral, vasto intermedio y isquiotibiales mediante ultrasonido muscular en el individuo C.II.1 a los 12 años. Una prueba de ejercicio de antebrazo isquémico realizada en el individuo A.III.2 mostró una trayectoria normal de los niveles de lactato y amoníaco en plasma durante la prueba.

La resonancia magnética de cuerpo entero del paciente A.III.2 a los 14 años reveló una hiperintensidad de la señal T1 que sugiere una infiltración grasa en los glúteos máximos y en el tensor de la fascia lata, sin signos de edema, mientras que la resonancia magnética de las extremidades inferiores en el paciente C.II.1 a los 12 años mostró un volumen muscular e intensidades de señal normales. Las evaluaciones cardíacas con ecocardiografía realizadas en los pacientes A.II.2, A.III.1, A.III.2 y C.II.1 a los 54, 23, 18 y 12 años fueron normales. Las transaminasas hepáticas de todos los pacientes fueron normales, así como una ecografía abdominal realizada en el individuo A.III.2. Una biopsia hepática realizada en el paciente C.II.1 a los 8 años mostró focos raros de inflamación lobular y tractos portales con una reacción ductular mínima y sin evidencia de enfermedad de almacenamiento de glucógeno, lo que sugiere una hepatitis reactiva leve no específica.

5.3.2 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

El WES identificó la variante heterocigota *DTNA* (MIM*601,239) [chr18:34,863,985G > A (GRCh38/hg38)] (NM_001390.5; c.1585G > A, p.(Glu529Lys))

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

en el paciente A.III.2, y una delección heterocigota en marco en *DTNA* [chr18:34,863,966–34,863,986 (GRCh38/hg38)] (NM_001390.5; c.1567_1587del, p.(Gln523_Glu529del)) en los pacientes B.I.1, B.II.4, B.III.1, B.III.3, C.I.1, C.II.1, D.II.3 y D.III.2. Estas variantes estaban ausentes en las bases de datos poblacionales, afectaban a residuos altamente conservados de la proteína y se predijo que eran patogénicas según los predictores *n silico*: la variante c.1585G > A tiene una puntuación CADD de 32 y la variante c.1567_1587del una puntuación CADD de 22.2. No se identificaron variantes patogénicas en *DTNA* en el WES realizado en los individuos no afectados B.I.2, B.II.1, B.II.3, C.I.2 y D.II.4. La secuenciación de Sanger confirmó la presencia de la variante heterocigota c.1567_1587del en los cuatro miembros afectados de la familia B y su ausencia en los miembros no afectados de la familia B.

El análisis de segregación realizado mediante secuenciación de Sanger en los miembros de la familia A identificó la variante heterocigota c.1585G > A en los cinco miembros afectados de la familia A (A.II.2, A.II.4, A.II.7, A.III.1, A.III.2), mientras que estaba ausente en los cuatro miembros no afectados que fueron secuenciados (A.II.1, A.II.3, A.II.5, A.II.6) (**Figura 15**). No se identificaron otras variantes patogénicas o probablemente patogénicas en *DTNA* ni en otros genes, excepto la variante monoalélica *POMGNT1* (NM_001243766.1): c.187C > T, p.Arg63* que se encontró en el individuo A.III.2 y en su madre asintomática (A.II.1) pero no en su hermano afectado (A.III.1) ni en otros parientes. No se identificaron variantes patogénicas o probablemente patogénicas en *SGCA*, *SGCB*, *SGCG*, *SGCD* ni en ningún otro gen conocido de distrofia muscular en ninguno de los exomas de los individuos afectados.

RESULTADOS

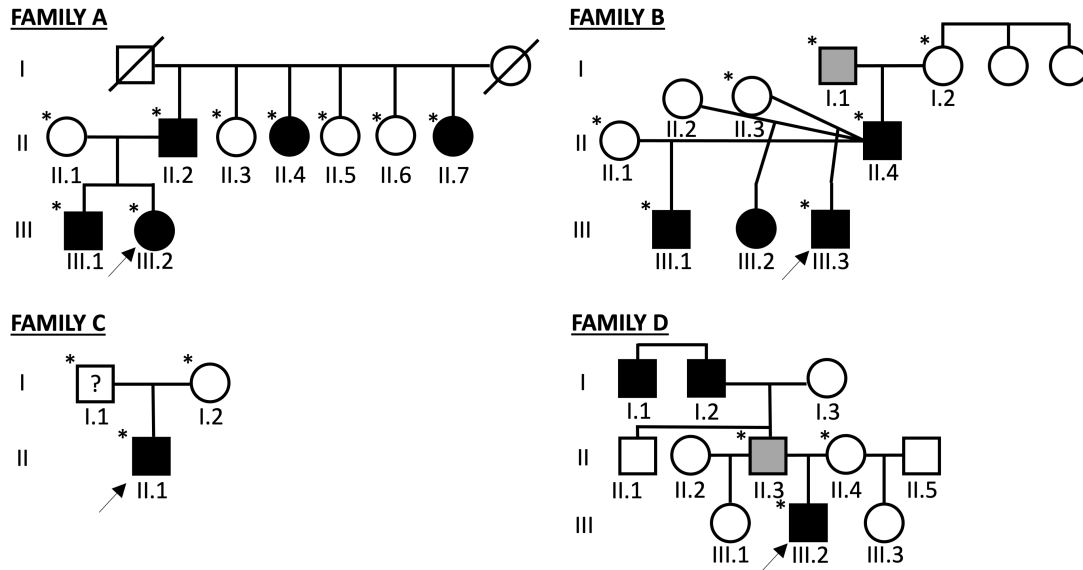


Figura 15. Árboles genealógicos de las 4 familias con variantes en *DTNA* incluidas en este estudio.

Las flechas indican los probandos, los círculos indican mujeres, los cuadrados indican hombres, los símbolos oscuros denotan individuos afectados (el color gris indica un fenotipo más leve), y un signo de interrogación en el recuadro indica que el fenotipo no se conoce. Los asteriscos marcan los individuos en los que se obtuvo ADN y se realizó segregación.

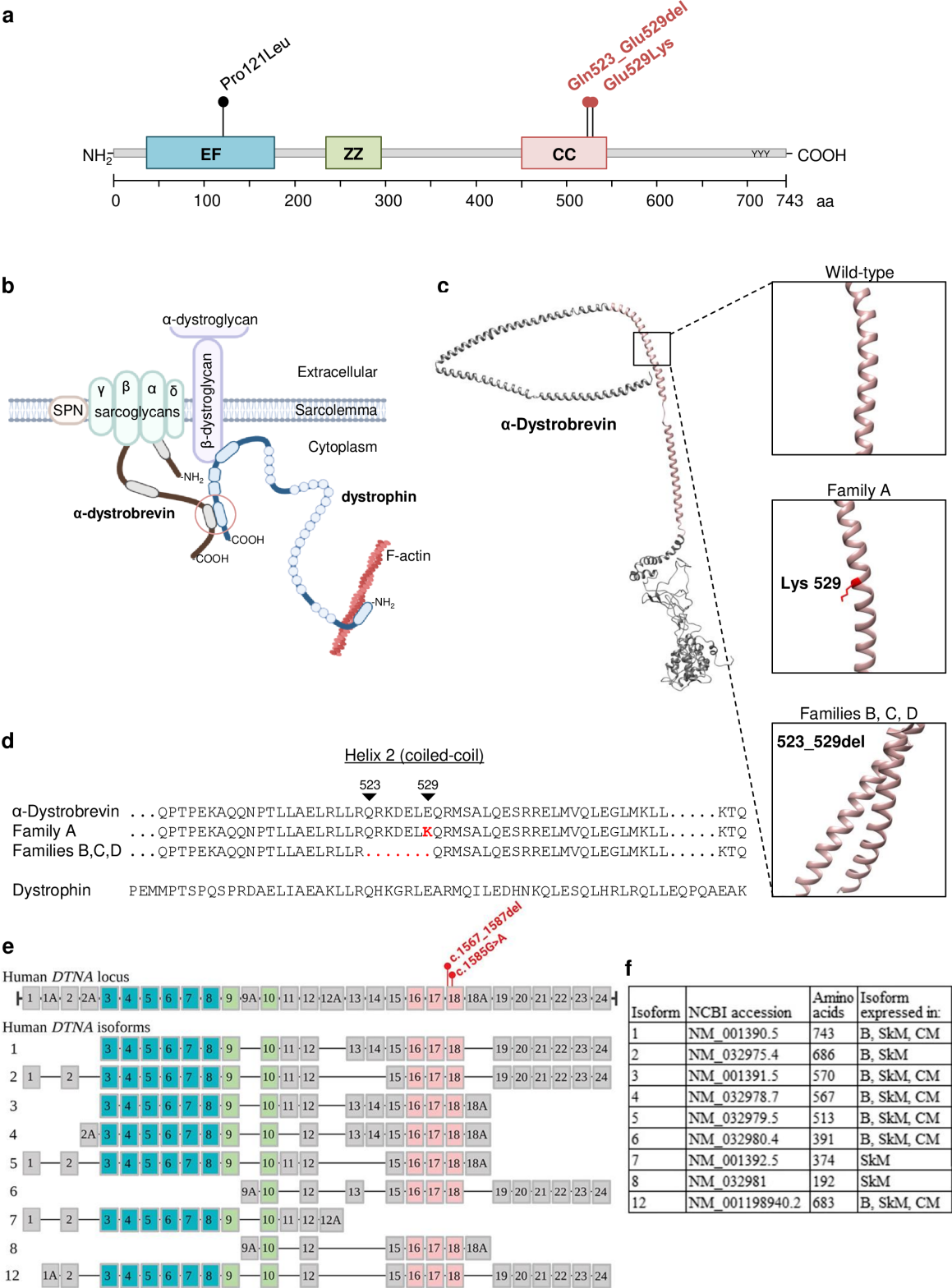
5.3.3 ESTUDIOS IN SILICO DE LAS VARIANTES IDENTIFICADAS EN *DTNA*

Ambas variantes *DTNA* c.1585G > A; p.(Glu529Lys) y c.1567_1587del; p.(Gln523_Glu529del) se encuentran en la segunda hélice del dominio de coiled-coil de α -distrobrevina. Este dominio de coiled-coil media la interacción con distrofina, indicando que la α -distrobrevina actúa como un andamio estructural que vincula el DGC con el citoesqueleto intracelular (**Figura 16 a, b**). Las herramientas de predicción estructural de proteínas sugieren que las variantes introducen cambios sutiles en la estructura secundaria de la proteína (**Figura 16 c, d**). Basado en datos de gnomAD, *DTNA* no es tolerante a variantes de pérdida de función, y MetaDome mostró que las variantes se ubicaron en una región mayormente intolerante a la variación genética. La **Figura 16 e**,

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

f muestra la estructura genómica de *DTNA* humano y los isoformas comunes, incluyendo anotaciones de las ubicaciones de las dos variantes encontradas en las cuatro familias.

RESULTADOS



DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

Figura 16. Análisis *in silico* de las variantes de DTNA encontradas en las cuatro familias incluidas en nuestra cohorte. (a) Estructura de dominio de α -dystrobrevin (Uniprot: Q9Y4J8) y ubicación de las variantes encontradas en las familias A, B, C y D (en rojo), así como la variante reportada previamente asociada con miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo (en negro). (b) Representación esquemática parcial del complejo glicoproteico de distrofina (DGC). (c) Estructura 3D modelada de α -dystrobrevina wild-type con el dominio coiled-coil indicado en salmón. Residuos modelados de individuos wild-type y afectados indicados en recuadros. Todos los residuos en todas las estructuras 3D fueron modelados con una confianza superior al 90% utilizando el software Phyre2. (d) Alineación de secuencia de parte de los dominios coiled-coil de α -dystrobrevin wild-type y mutado, y distrofina wild-type. Abreviaturas: EF: EF hand region; ZZ: dominio zinc-binding; CC: coiled-coil. (e) Estructura genómica de DTNA humano indicando las dos variantes encontradas en las cuatro familias. También se muestra una representación esquemática de los exones incluidos en 9 isoformas de DTNA expresadas en músculo esquelético. Los exones que codifican los dominios EF de unión al calcio están sombreados en azul verdoso, los exones que codifican los dominios de dedo de zinc están sombreados en verde lima, y los exones que codifican el dominio coiled-coil están sombreados en salmón. (f) Se enumeran las isoformas seleccionadas de DTNA (Uniprot: Q9Y4J8-1 a Q9Y4J8-8 y Q9Y4J8-13) con el número de acceso al transcriptoma del National Center for Biotechnology Information (NCBI), el número de aminoácidos y los tejidos en los que las isoformas están altamente expresadas. B, cerebro; SkM, músculo esquelético; CM, músculo cardíaco.

5.3.4 HALLAZGOS EN LAS BIOPSIAS MUSCULARES

Se realizaron biopsias musculares a 8 pacientes (4 de la familia A, 2 de la familia B, 1 de la familia C y 1 de la familia D) a una edad media de 27 años (rango: 8-48 años). Las características principales de las biopsias musculares se muestran en las **Figuras 17 y 18** y en las **Tablas 5 y 6**. La histología muscular mostró variabilidad en el tamaño de las fibras, algunas fibras con núcleos internos y una alteración del patrón intermiofibrilar, con algunas áreas desprovistas de tinción para enzimas oxidativas (NADH y SDH). Se detectaron división de fibras y algunas fibras regenerativas. Se observó un leve aumento del tejido conectivo endomisial o perimisial con fibrosis o infiltración grasa. La biopsia muscular obtenida del cuádriceps del paciente B.III.3 a los 8 años mostró necrosis de fibras y fibras en regeneración.

RESULTADOS

El análisis por inmunofluorescencia de las muestras musculares de 4 pacientes (3 de la familia A (*DTNA* c.1585G > A; p.(Glu529Lys)) y 1 de la familia C (*DTNA* c.1567-1587del; p.(Gln523_Glu529del)) mostró una reducción consistente de la inmunorreactividad de la α -distrobrevina en el sarcolema, así como una reducción variable en los niveles de inmunorreactividad de varias otras proteínas dentro del complejo distrofina-distroglicano, incluyendo distrofina, α , β , δ y γ -sarcoglicanos, y α y β -distroglicanos (**Figura 18 y Tabla 6**). No se observó una ausencia total de ninguna de las proteínas estudiadas en ninguna de las biopsias. Se identificaron 10 uniones neuromusculares en la biopsia muscular del paciente A.III.1 mediante inmunofluorescencia. La morfología de estas uniones neuromusculares era ligeramente diferente de la de las uniones neuromusculares de un control: las uniones neuromusculares del paciente A.III.1 eran más delgadas, en contraste con la apariencia grande de "luna creciente" de una unión neuromuscular típica (**Figura 19**).

La microscopía electrónica realizada en la biopsia del paciente A.III.1 mostró fibras musculares con variabilidad en el tamaño y estructura sarcomérica normal. En el sarcolema, se observaron pliegues leves hacia el espacio extracelular, así como una redundancia mínima de la membrana basal en el espacio extracelular, sin engrosamiento de la lámina basal. Los hallazgos no específicos incluyeron gránulos de lipofuscina y desechos pseudomiélinicos que estaban dentro del rango normal (**Figura 17**).

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

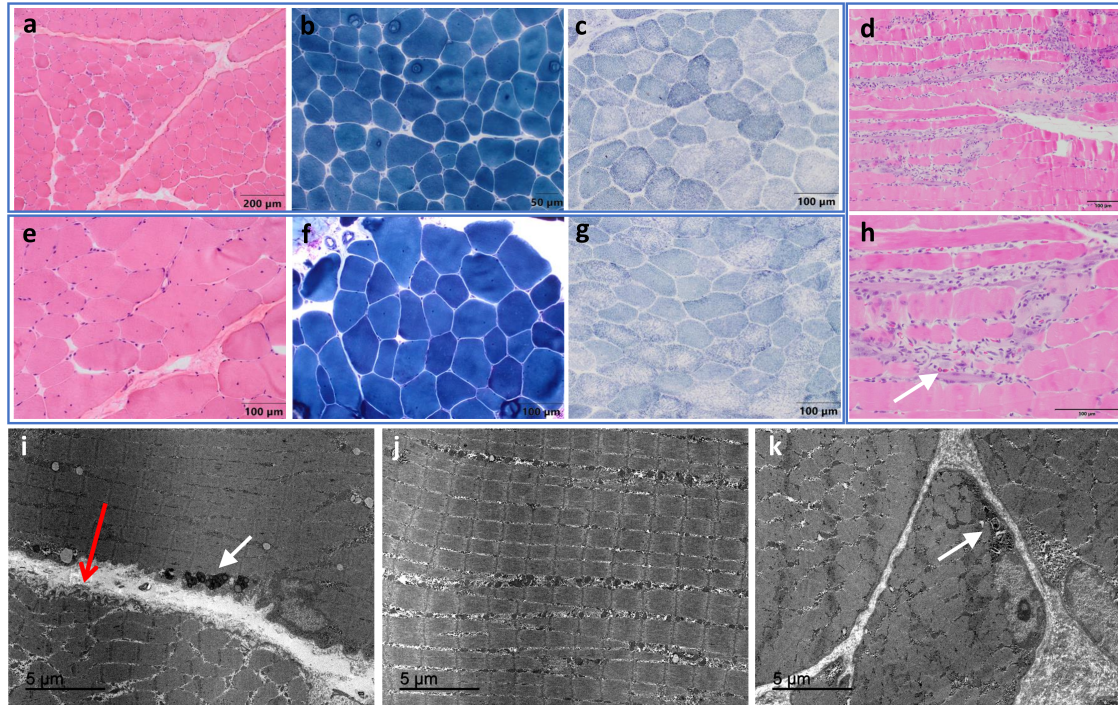


Figura 17. Hallazgos en las biopsias de pacientes con distrofia por *DTNA*. La biopsia del paciente A.III.2 se tomó a los 17 años (a–c) y la biopsia del paciente A.III.1 a los 23 años (e–g). Se observó variabilidad en el tamaño de las fibras (rango: 31–105 μm en el paciente A.III.2; rango 37–178 μm en el paciente A.III.1) y fibras con núcleos internos (10.9% en el paciente A.III.2 y 26% en el paciente A.III.1) en tinciones de hematoxilina y eosina (H&E) y tricrómico modificado de Gomori, así como aumento leve de tejido conectivo endomisial o perimisial con fibrosis o reemplazo graso (a, b, e, f). Se identificó un patrón intermiofibrilar irregular, con pequeñas áreas sin tinción para enzimas oxidativas, con SDH (c, g). La biopsia del paciente B.III.3 mostró fibras musculares necróticas y regenerativas, así como algunos eosinófilos (flecha blanca en h). d, h La microscopía electrónica realizada en el paciente A.III.1 mostró fibras musculares con variabilidad en el tamaño de las fibras y estructura sarcomérica normal. i–k Se observaron ligeros pliegues en el espacio extracelular en el sarcolema, así como una redundancia mínima de la membrana basal en el espacio extracelular, sin engrosamiento de la lámina basal (flecha larga roja delgada abierta en i). Se observaron gránulos de lipofusina no específicos (flecha blanca en i) y restos pseudomiélinicos (flecha blanca en k). Las barras de escala están indicadas en los paneles.

RESULTADOS

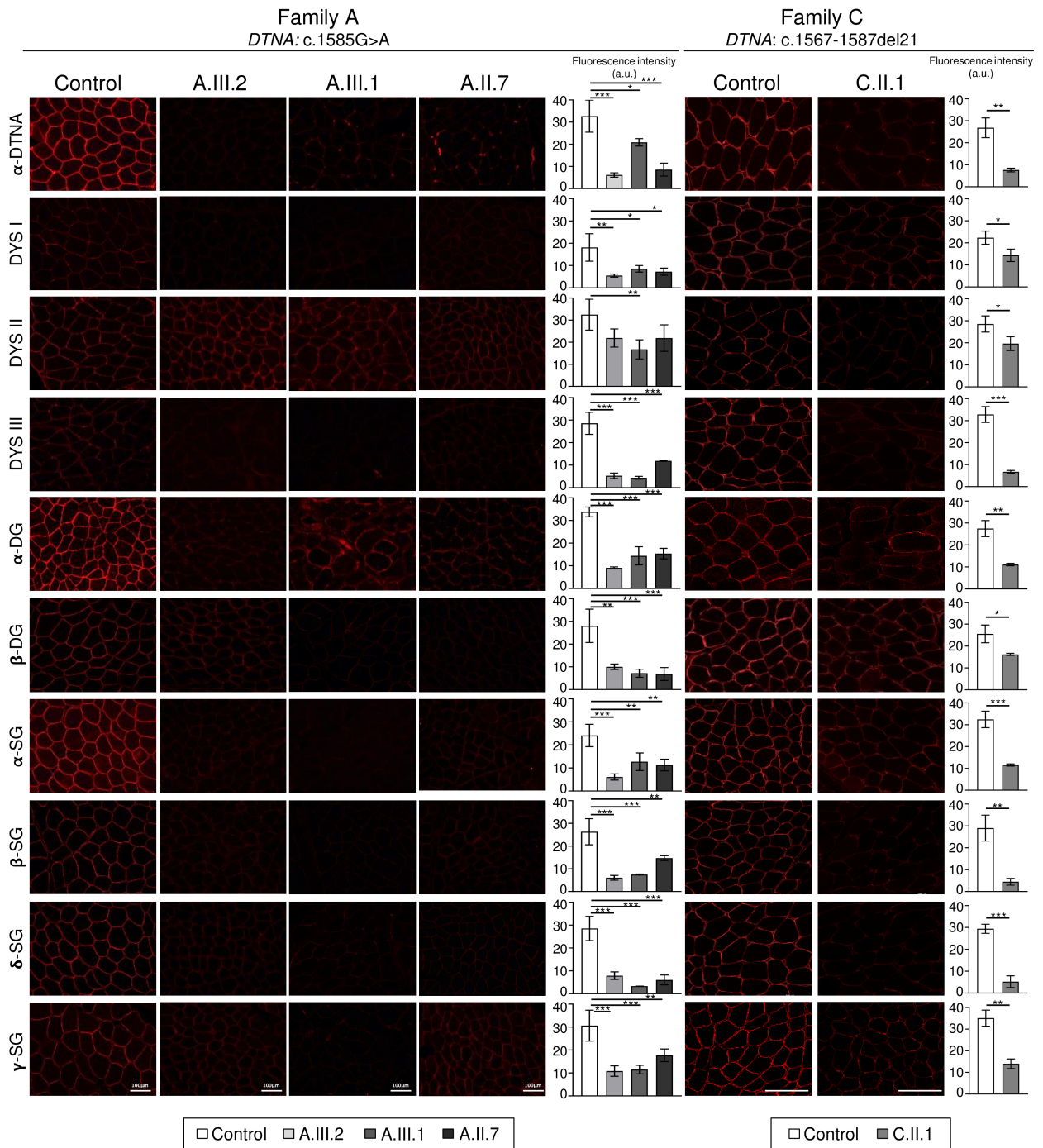


Figura 18. La inmunofluorescencia mostró una intensidad de señal significativamente reducida en varias proteínas del sarcolema en pacientes de las familias A y C, que portan las variantes DTNA c.1585G > A; p.Glu529Lys y c.1567_1587del21; p.Gln523_Glu529del7. Imágenes representativas de α-distrobrevina y diferentes proteínas del complejo distrofina-glicoproteína en controles sanos y pacientes

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

(familia A: A.III.2, A.III.1, A.II.7; familia C: C.II.1) y cuantificación de la intensidad de señal de fluorescencia (media $\pm$ SD; n = 3; se realizaron análisis estadísticos utilizando la prueba t de Student (familia C) y ANOVA de una vía, seguida de la prueba post hoc de Tukey–Kramer (familia A)). *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001. Además de la inmunorreactividad reducida de α -distrobrevina en el sarcolema, se identificaron reducciones variables en los niveles de inmunorreactividad de otras proteínas en el complejo distrofina-glicoproteína, incluyendo distrofina, α , β , δ y γ -sarcoglicanos y α y β -distroglucanos. β -DG β -distroglucano, DYS1 anticuerpo distrofina 1 (dominio de varilla), DYS2 anticuerpo distrofina 2 (dominio C-terminal), DYS3 anticuerpo distrofina 3 (dominio N-terminal), α -DG α -distroglucano, α -SG α -sarcoglicano, β -SG β -sarcoglicano, δ -SG δ -sarcoglicano, γ -SG γ -sarcoglicano, α -DTNA α -dystrobrevin. Barras de escala, 100 μ m; a.u. unidades arbitrarias.

	A.III.2	A.III.1	A.II.7	A.II.2	C.II.1
Beta-espectrina	++++	+++	++++	++++	
DYS1	++	++	++	+++	++
DYS2	+++	+	++++	++	+
DYS3	+	-	++++	+	+
Beta-distroglicano	++++	++	++++	++	+++
Alfa-distroglicano (VIA4)	++	+	++++	++	
Alfa-distroglicano (IIH6)	+	+	+++	++	+++
Alfa-sarcoglicano	+++	-	++	+	+
Beta-sarcoglicano	+	++	++	++	+
Delta-sarcoglicano	+++	+	+++	+	
Gamma-sarcoglicano	++	+	+++	+	+
Alfa-distrobrevina	+++	++	+	+	+

Tabla 6. Variabilidad de la reducción de proteínas del sarcolema en pacientes con distrofia muscular por *DTNA* que tenían la variante c.1585G>A; p.Glu529Lys (familia A) y con la variante c.1567-1587del21; p.Gln523_Glu529del7 (familia C). ++++ = tinción normal; +++ = ligeramente disminuido; ++ = moderadamente disminuido; + = muy disminuido; - = ausente.

RESULTADOS

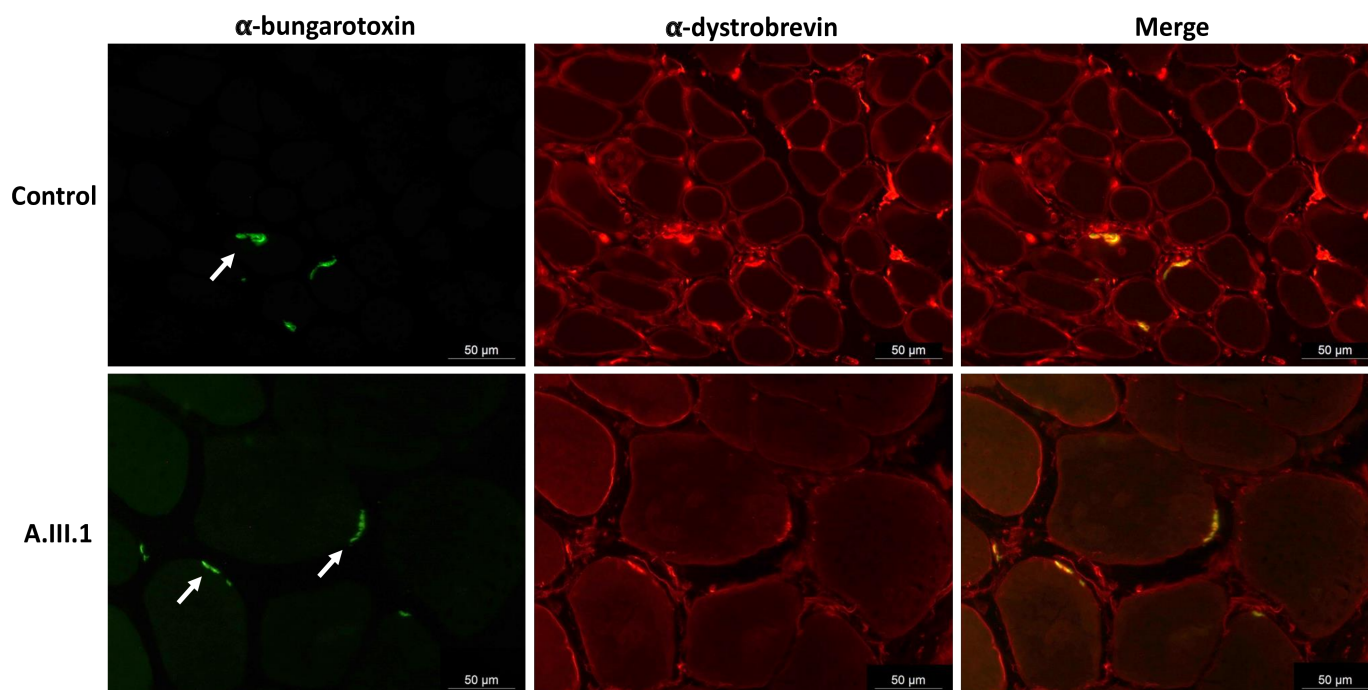


Figura 19. Imagen de la unión neuromuscular. Las tinciones de inmunofluorescencia para α -dystrobrevina se fusionaron con imágenes de tinción de receptores de acetilcolina marcados con α -bungarotoxina fluorescente para mostrar que las uniones neuromusculares en el paciente A.III.1 eran más delgadas en comparación con las uniones neuromusculares del control (flechas). Barras de escala: 50 μ m.

5.3.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE α -DISTROBREVINA E INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA

En contraste con la inmunorreactividad reducida en el sarcolema encontrada en la inmunofluorescencia de los cortes histológicos, no se detectaron alteraciones en los niveles de expresión de la proteína α -dystrobrevina en el análisis por western blot de extractos totales de proteína de muestras de biopsia muscular de los pacientes de la familia A. Los western blots mostraron una disminución en la expresión de α , δ y γ -sarcoglicanos en el músculo de los pacientes de la familia A en comparación con los controles, mientras que los niveles de expresión de distrofina usando anticuerpos DYS1, DYS2 y DYS3 en pacientes de la familia A fueron normales.

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

Una interacción entre la α -distrobrevina de longitud completa y la sintrofina se detectó mediante ensayos de pull-down con GST y western blot. Esta interacción se interrumpió cuando se expresó un constructo de *DTNA* que contenía la delección c.1567_1587 en mioblastos C2C12 (**Figura 20**). Los ensayos de proliferación, migración y diferenciación/fusión realizados en mioblastos C2C12 transfectados transitoriamente con *DTNA* wild-type fusionado con GST y un constructo de *DTNA* que contenía la delección c.1567_1587, también fusionado con GST, mostraron una disminución en la proliferación de células transfectadas con el constructo de delección c.1567_1587 en comparación con las transfectadas con el constructo de *DTNA* wild-type, sin diferencias en los patrones de migración y diferenciación/fusión de mioblastos.

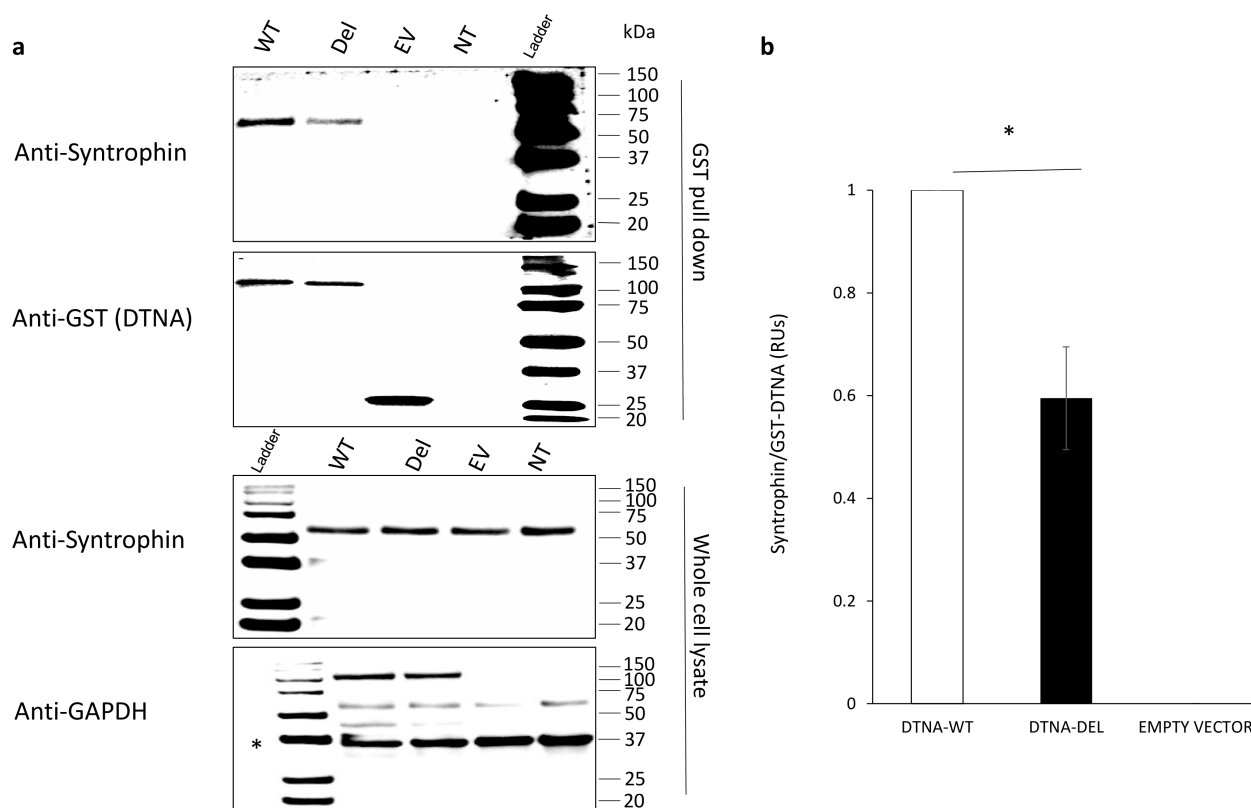


Figura 20. Ensayos de inmunoprecipitación y GST pull-down. (a) Los lisados fueron preparados a partir de células C2C12 que fueron transfectadas transitoriamente con *DTNA* wild-type (WT) fusionado a GST, *DTNA* variante (Del) fusionado a GST, y vector vacío conteniendo GST como control negativo (EV). También

RESULTADOS

incluimos un control celular no transfectado (NT). Las entradas y los GST pulldowns fueron analizados por inmunotransferencia con anticuerpos anti-sintrofina, anti-GST, y anti-GAPDH (el asterisco indica la banda de GAPDH). La inmunotransferencia anti-sintrofina del GST pulldown muestra una sintrofina disminuida para el constructo de delección versus DTNA WT, mientras que la inmunotransferencia anti-GST no muestra diferencias discernibles en los niveles de α -dystrobrevin. En contraste, la inmunotransferencia anti-sintrofina del lisado completo de la célula no muestra diferencias discernibles en los niveles de sint

5.3.6 ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA

Los niveles de expresión de los 65 transcritos conocidos de *DTNA* se cuantificaron a partir de los datos de RNAseq. Entre estos, solo el transcrito ENST00000681470 mostró una sobreexpresión significativa y ninguno de los transcritos tuvo una reducción significativa de la expresión en las muestras de músculo esquelético analizadas de tres individuos con la variante c.1585G > A en *DTNA* en comparación con los controles.



Variants in *DTNA* cause a mild, dominantly inherited muscular dystrophy

Andres Nascimento^{1,2,3} · Christine C. Bruels⁴ · Sandra Donkervoort⁵ · A. Reghan Foley⁵ · Anna Codina^{2,6} · Jose C. Milisenda⁷ · Elicia A. Estrella^{8,9} · Chengcheng Li¹⁰ · Jordi Pijuan^{3,11} · Isabelle Draper¹² · Ying Hu⁵ · Seth A. Stafki⁴ · Lynn S. Pais^{8,13,14} · Vijay S. Ganesh^{8,13,14,15} · Anne O'Donnell-Luria^{8,13,14} · Safoora B. Syeda⁵ · Laura Carrera-García^{1,2} · Jessica Expósito-Escudero^{1,2} · Delia Yubero^{3,16} · Loreto Martorell^{3,16} · Iago Pinal-Fernandez^{17,18} · Hart G. W. Lidov¹⁹ · Andrew L. Mammen^{17,18} · Josep M. Grau-Junyent^{3,7} · Carlos Ortiz^{1,2,3} · Francesc Palau^{3,11,16} · Partha S. Ghosh⁹ · Basil T. Darras⁹ · Cristina Jou^{2,3,6} · Louis M. Kunkel⁸ · Janet Hoenicka^{3,11} · Carsten G. Bönnemann⁵ · Peter B. Kang^{4,20} · Daniel Natera-de Benito^{1,2}

Received: 17 November 2022 / Revised: 10 February 2023 / Accepted: 10 February 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

DTNA encodes α -dystrobrevin, a component of the macromolecular dystrophin–glycoprotein complex (DGC) that binds to dystrophin/utrophin and α -syntrophin. Mice lacking α -dystrobrevin have a muscular dystrophy phenotype, but variants in *DTNA* have not previously been associated with human skeletal muscle disease. We present 12 individuals from four unrelated families with two different monoallelic *DTNA* variants affecting the coiled-coil domain of α -dystrobrevin. The five affected individuals from family A harbor a c.1585G > A; p.Glu529Lys variant, while the recurrent c.1567_1587del; p.Gln523_Glu529del *DTNA* variant was identified in the other three families (family B: four affected individuals, family C: one affected individual, and family D: two affected individuals). Myalgia and exercise intolerance, with variable ages of onset, were reported in 10 of 12 affected individuals. Proximal lower limb weakness with onset in the first decade of life was noted in three individuals. Persistent elevations of serum creatine kinase (CK) levels were detected in 11 of 12 affected individuals, 1 of whom had an episode of rhabdomyolysis at 20 years of age. Autism spectrum disorder or learning disabilities were reported in four individuals with the c.1567_1587 deletion. Muscle biopsies in eight affected individuals showed mixed myopathic and dystrophic findings, characterized by fiber size variability, internalized nuclei, and slightly increased extracellular connective tissue and inflammation. Immunofluorescence analysis of biopsies from five affected individuals showed reduced α -dystrobrevin immunoreactivity and variably reduced immunoreactivity of other DGC proteins: dystrophin, α , β , δ and γ -sarcoglycans, and α and β -dystroglycans. The *DTNA* deletion disrupted an interaction between α -dystrobrevin and syntrophin. Specific variants in the coiled-coil domain of *DTNA* cause skeletal muscle disease with variable penetrance. Affected individuals show a spectrum of clinical manifestations, with severity ranging from hyperCKemia, myalgias, and exercise intolerance to childhood-onset proximal muscle weakness. Our findings expand the molecular etiologies of both muscular dystrophy and paucisymptomatic hyperCKemia, to now include monoallelic *DTNA* variants as a novel cause of skeletal muscle disease in humans.

Keywords α -Dystrobrevin · Dystrophin · hyperCKemia · Muscle sarcolemmal proteins · Myalgia · Rhabdomyolysis

Andres Nascimento, Christine C. Bruels, Peter B. Kang, and Daniel Natera-de Benito have contributed equally to the manuscript.

✉ Peter B. Kang
pkang@umn.edu
✉ Daniel Natera-de Benito
daniel.natera@sjd.es

Extended author information available on the last page of the article

Introduction

Muscular dystrophies are associated with defects of muscle membrane stability and repair that lead to dystrophic changes in skeletal muscle and a combination of clinical symptoms including muscle weakness, rhabdomyolysis, elevations of serum creatine kinase (CK) levels, exercise intolerance, and/or myalgias. Some affected individuals do

Published online: 17 February 2023

Springer

not have prominent weakness, instead presenting with more subtle constellations of symptoms [28, 40]. In settings where genetic testing, and in particular next-generation sequencing, is readily available, this diagnostic modality often yields a definitive, molecular diagnosis [31]. When genetic testing does not indicate a genetic/molecular etiology, muscle biopsy continues to be a useful diagnostic tool for confirming dystrophic histopathology and immunohistochemical findings which sometimes demonstrate a specific sarcolemmal protein defect.

Several genes linked to muscular dystrophy, including *DMD*, *FKRP*, *DYSF*, *CAV3*, *SGCG*, *SGCB*, and *ANO5*, have been associated with variable phenotypes including hyperCKemia/rhabdomyolysis, myalgia, and exercise intolerance, which have sometimes been referred to as ‘pseudometabolic phenotypes’ [5, 11, 27, 32–34, 40, 44]. Despite this, in many individuals with paucisymptomatic hyperCKemia, the genetic etiology remains elusive [43]. It is therefore likely that new muscular dystrophy genes remain to be identified in families with more subtle manifestations of this disease category.

DTNA encodes α -dystrobrevin, a component of the macromolecular dystrophin–glycoprotein complex (DGC) that binds to dystrophin/utrophin and α -syntrophin [2, 30]. α -Dystrobrevin plays a major role in stabilization of the DGC, but also in mobility and turnover of acetylcholine receptors [2, 14]. A secondary deficiency of α -dystrobrevin

has been described in individuals with Duchenne muscular dystrophy and other muscular dystrophies [20, 29]. Absence of α -dystrobrevin is associated with muscular dystrophy in mice [16] and a single case report-associated variants in *DTNA* with a dominantly inherited left ventricular non-compaction cardiomyopathy without skeletal muscle involvement [17].

Here, we present 12 individuals from four unrelated families with dominantly inherited missense variants in *DTNA*, presenting with phenotypes ranging from hyperCKemia to a mild form of muscular dystrophy (Fig. 1). Our findings broaden the molecular etiologies of both muscular dystrophy and paucisymptomatic hyperCKemia.

Methods

Recruitment of individuals, clinical examinations, and sample collection

Individuals with muscular dystrophy and/or paucisymptomatic hyperCKemia were ascertained and enrolled from neuromuscular units in Spain and the USA. Data were collected and analyzed in accordance with the ethics guidelines of Hospital Sant Joan de Déu, Boston Children’s Hospital, the National Institutes of Health, and the University of Minnesota. Written informed consent for study participation was

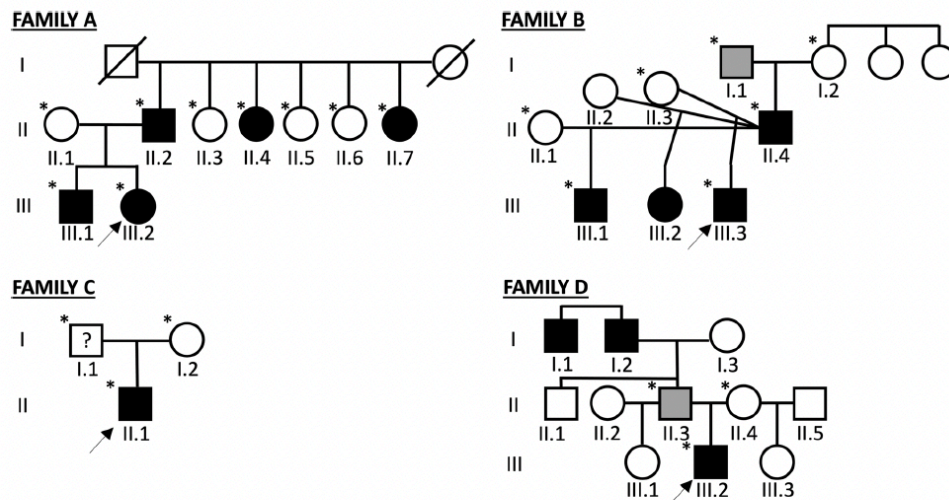


Fig. 1 Pedigrees of the four families with *DTNA* variants included in this study. Arrows indicate probands, circles indicate females, squares indicate males, filled in symbols denote affected individuals (the gray

color indicates a milder phenotype), and a question mark in the box indicates that the phenotype is not known. Asterisks mark individuals from whom DNA samples were obtained

obtained. All individuals in this cohort underwent clinical examination. Blood and/or saliva samples for DNA analyses were collected from the 12 affected individuals, 9 asymptomatic informative family members, and 1 family member with an undetermined phenotype (Fig. 1). Symptomatic individuals were considered to be those with myalgias, exercise intolerance, muscle weakness, and/or hyperCKemia. Data on clinical electromyography studies, muscle MRIs, and muscle biopsies were collected for individuals who underwent one or more of these tests.

Molecular genetic analyses

DNA was extracted from peripheral blood samples of 12 affected individuals (A.II.2, A.II.4, A.II.7, A.III.1, A.III.2, B.I.1, B.II.4, B.III.1, B.III.3, C.II.1, D.II.3, and D.III.2), 9 of their unaffected relatives (A.II.1, A.II.3, A.II.5, A.II.6, B.I.2, B.II.1, B.II.3, C.I.2, and D.II.4) and 1 relative with an undetermined phenotype (C.I.1) using standard techniques (Fig. 1). Targeted exome sequencing was performed in individual A.III.2 using the TruSight One Sequencing Panel (Illumina, San Diego, CA, USA) that provides coverage of 6710 genes associated with known human diseases based on the Online Mendelian Inheritance in Man database (OMIM; <http://www.omim.org>). The protocol consisted of genomic DNA fragmentation with transposomes, PCR amplification, purification of libraries, hybridization and capture of target regions (the exons along with flanking intronic regions), followed by additional purification and amplification steps. Paired-end sequencing was performed on an Illumina Next-Seq 500 System (Illumina). Targeted exome sequencing data was processed through an in-house pipeline. Alignment was performed using the BWA Aligner (Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK) (<http://bio-bwa.sourceforge.net/bwa.shtml>) [25] to human genome build 37 (hg37). Variant calling was applied using the following four software tools: SAMtools v.1.5 (Wellcome Trust Sanger Institute), GATK Haplotype Caller package v.3.7 (Broad Institute, Cambridge, MA, USA), FreeBayes v.1.1.0 (Boston College, Boston, MA, USA), and VarScan v.2.4.0 (Washington University, St. Louis, MO, USA). Finally, annotation was performed with SnpEff v.4.3 (Wayne State University, Detroit, MI, USA). Whole exome sequencing (WES) was performed on genomic DNA samples from individuals B.I.1, B.I.2, B.II.1, B.II.3, B.II.4, B.III.1, and B.III.3 at Claritas Genomics (Cambridge, MA, USA) using Ampliseq Exome methodology on an Ion Proton sequencer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Variants were called by the Torrent Suite Variant Caller (<https://github.com/iontorrent/TS/tree/master/plugin/variantCaller>) and annotated using ANNOVAR (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA) [47]. Trio WES was performed on families C (C.I.1, C.I.2, C.II.1) and D

(D.II.3, D.II.4, D.III.2) at the Broad Institute using previously described methods [41].

Variants were annotated using the reference sequences: NM_001390.5 (transcript) and Q9Y4J8 (protein). *DTNA* variant validation and segregation studies were completed using standard Sanger sequencing techniques.

In silico analyses of novel *DTNA* variants

In silico analyses of the genetic variants were performed using FATHMM-MKL (<https://fathmm.biocompute.org.uk/fathmmMKL.htm>); Mutation taster (<http://www.mutationtaster.org>); DANN (https://cbcl.ics.uci.edu/public_data/DANN); PROVEAN (provean.jcvi.org/seq_submit.php); and CADD (<https://cadd.gs.washington.edu>) [8, 23]. Variant classification was assigned using Varsome following ACMG-AMP guidelines [42]. The mutational mapper plot was based on data available from the Human Gene Mutation Database. α -dystrobrevin tolerance landscape was analyzed according to MetaDome software v.1.0.1 (<https://stuart.radboudumc.nl/metadome>). Structural models of α -dystrobrevin were built via homology modeling using Protein Homology/analogy Recognition Engine v2.0 (Phyre²) [22] and visualized using Chimera.

Muscle biopsy, histological, immunohistochemical, immunofluorescence, and ultrastructural studies

Clinical muscle biopsy specimens were obtained from biceps (A.II.2, A.II.7), deltoids (A.III.1, A.III.2), gastrocnemius (B.II.4), or quadriceps (B.III.3, C.II.1, D.III.2) in eight affected individuals. Sections of snap-frozen tissue were processed using routine histochemical stains, including hematoxylin & eosin (H&E), modified Gomori trichrome, nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), succinate dehydrogenase (SDH), cytochrome *c* oxidase (COX), periodic acid–Schiff (PAS), and Oil Red O [10].

Immunofluorescence analysis was performed on sections of the snap-frozen muscle biopsies of individuals A.II.2, A.II.7, A.III.1, A.III.2 and C.II.1 using the antibodies listed in Supplementary Table S1 (online resource), as well as monoclonal mouse anti- α -dystrobrevin (D-9) (1:100; sc271630; Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA), targeting amino acids 301–600 that map to an internal region of α -dystrobrevin. Goat anti-mouse Alexa fluor-594 (1:500; A21207; Invitrogen, Waltham, MA, USA) was the secondary antibody. Samples from individual A.III.1 and a control were stained with Alexa Fluor 488-conjugated α -bungarotoxin (1 μ g/mL; B13422; Life Technologies, Grand Island, NY, USA) to label acetylcholine receptors to observe the structure of the neuromuscular junctions. Superresolution imaging was performed on a Leica TCS SP8 confocal microscope using a 63 $\times$ NA 1.12 objective (Leica Microsystems,

Wetzlar, Germany). Fluorescence intensity was quantified using ImageJ v.1.46 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Ultrathin sections were prepared for electron microscopy and examined with transmission electron microscopy (JEOL model 1100). Electron micrographs were obtained using the Gatan Orius CCD camera (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany).

Western blot analysis

For total protein extraction from skeletal muscle specimens in family A, we used RIPA lysis buffer (Bio Basic, ON, Canada) containing protease inhibitor cocktail (Bio Basic). The sample lysates were homogenized using pellet pestles (Merck, Darmstadt, Germany), then centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. The protein solutions were diluted in 2×Laemmli buffer prior to loading on gels. Western blots were performed following standard protocols. Precast gels TGX 4–15% gradient gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) were used, with proteins transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories). Membrane blocking was performed with Odyssey Blocking Buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). The membranes were subsequently incubated with the primary antibody monoclonal rabbit anti-DTNA (1:1000; ab191395; Abcam, Cambridge, UK) that targets amino acids 600–743, mapping to the C-terminal protein domain, at 4 °C overnight with gentle agitation. Anti- α -tubulin (1:1000; T6199; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as a housekeeping protein loading control. IRDye 680CW goat anti-rabbit IgG and IRDye 800CW goat anti-mouse IgG (1:10,000; LI-COR Biosciences) were used as secondary antibodies. Protein bands were visualized on the Odyssey LI-COR fluorescent system (LI-COR Biosciences) and quantified using ImageJ v.1.46 (National Institutes of Health).

Vector construction, GST pulldown, and immunoblotting assays

We generated constructs containing human control and mutant *DTNA* by cloning the cDNA of human WT *DTNA* into pEBG containing an N-terminal GST tag. The mutant containing the 21 bp c.1567_1587 deletion was generated using the Quick Change Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with the primers designed using Agilent's online primer design program. For transfection, C2C12 myoblasts were cultured in DMEM (Gibco, Waltham, MA, USA) supplemented with 20% FBS and 1% penicillin–streptomycin (Gibco). The cells were cultured to 70% confluency, then transfected with the control, mutant, GST only, or empty vector constructs using Lipofectamine 3000 reagent in Opti-MEM (Gibco) medium according

to the manufacturer's protocol (Invitrogen). At 48 h post-transfection, cells were harvested and lysed in RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 50 mM NaF, 1 mM Na_2VO_4). Protein concentration was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay kit. For GST pulldowns, the cell lysates were incubated with glutathione-agarose beads (ThermoFisher Scientific) overnight at 4 °C under gentle rotation. After incubation, the beads and bound proteins were washed 4 times, and eluted in sample loading buffer by boiling for 10 min at 100 °C. Whole cell lysates and GST pulldowns were loaded onto 4–12% SDS-PAGE gels for immunoblotting analysis as described previously [4]. Primary antibodies used for immunoblotting were as follows: anti-synrophin (ThermoFisher Scientific), anti-GST (Cell Signaling), and anti-GAPDH (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Immunoblotting was performed in triplicate.

RNA sequencing

We performed bulk transcriptome sequencing (RNAseq) as previously described [1, 36–38] on muscle biopsy samples from three affected individuals in family A and compared the data to muscle RNAseq data from 33 healthy control subjects, 132 individuals with myositis (44 with dermatomyositis, 18 with antisynthetase syndrome, 54 with immune-mediated necrotizing myositis, and 16 with inclusion body myositis). Briefly, RNA was extracted with TRIzol (Thermo Fisher Scientific). Libraries were either prepared with the NeoPrep system according to the TruSeqM Stranded mRNA Library Prep protocol (Illumina), or with the NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module and Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs; #E7490 and #E7760).

Reads were demultiplexed using bcl2fastq/2.20.0 and pre-processed using fastp/0.21.0. The abundance of each gene was generated using Salmon/1.5.2 and quality control output was summarized using multiqc/1.11. Counts were normalized using the Trimmed Means of M values (TMM) from edgeR/3.34.1 for graphical analysis. Differential expression was performed using limma/3.48.3.

For visualization purposes, we used the ggplot2/3.3.5 package of the R programming language.

Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). The Kolmogorov–Smirnov normality test and Student's *t* test or one-way ANOVA followed by the Tukey–Kramer post hoc test were performed. *P*-values are indicated by the following symbols: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001. Statistical

analyses were performed using the GraphPad Prism v.8.0.2 (GraphPad Inc, La Jolla, CA, USA).

Data availability

Any data not published within the article will be shared by the corresponding authors upon reasonable request.

Results

Clinical features

Most affected individuals reported myalgia and exercise intolerance (10/12), with a variable age of onset, ranging from early childhood to the fourth decade of life. Exercise intolerance was defined as a significant decrease in the ability to perform moderate age-appropriate physical activities. Muscle weakness was not detected in any affected members of family A, but mild proximal lower limb weakness (Medical Research Council (MRC) Scale for Muscle Strength: 4/5) was identified in three of the affected individuals of families B and C. Muscle cramps associated with physical activity were reported by affected individuals from families A and C. No cramping or myotonia was elicited by hand grip in any individual. Calf hypertrophy was not reported in any individual. A persistent elevation of serum CK was detected in 11/12 affected individuals from the four families (Table 1). Individual A.III.1 had an episode of rhabdomyolysis with a peak serum CK of 87,800 IU/L at 20 years. Two affected individuals (B.III.3 and D.III.2) were diagnosed with autism spectrum disorder, and two additional individuals (B.I.1 and C.II.1) were reported to have milder neurodevelopmental issues; all four of these individuals harbor the *DTNA* c.1567_1587 deletion; brain MRI scans were not performed on any of these individuals, though D.III.2 had an electroencephalogram that was normal (Table 1). In contrast, none of the individuals from family A, with the *DTNA* c.1585G>A variant, showed cognitive impairment.

Nerve conduction studies and electromyography performed on individuals A.II.4 at the age of 51 years and C.II.1 at the age of 8 years demonstrated normal conduction velocities and low-amplitude, short duration motor unit potentials, consistent with a myopathic condition without membrane irritability. There was no evidence of a neuromuscular junction disorder since repetitive nerve stimulation in distal muscles at 3 and 50 Hz did not show a decremental or incremental response, respectively. Single fiber electromyography was not performed. Active fasciculations in the deltoid, biceps, triceps, forearm flexors, vastus lateralis, vastus intermedius and hamstrings were detected on muscle ultrasound in individual C.II.1 at 12 years. An ischemic forearm exercise test performed in individual A.III.2 showed a normal trajectory

of plasma lactate and ammonia levels during the test. Whole-body MRI of individual A.III.2 at 14 years revealed T1 signal hyperintensity suggestive of a mild focal fatty replacement in the gluteus maximii and tensor fasciae latae, with no signs of edema, while a lower extremity muscle MRI in individual C.II.1 at 12 years showed normal muscle bulk and signal intensities of all muscles (Supplementary Figure S1, online resource). Cardiac evaluations with echocardiography performed in individuals A.II.2, A.III.1, A.III.2, and C.II.1 at 54, 23, 18, and 12 years, respectively, were normal. Liver transaminases of all individuals were normal, as well as an abdominal ultrasound performed on individual A.III.2. Liver biopsy performed in individual C.II.1 at the age of 8 years showed rare foci of lobular inflammation and portal tracts with minimal ductular reaction and no evidence for glycogen storage disease, suggestive of a mild nonspecific reactive hepatitis.

Molecular genetic findings

WES identified the heterozygous *DTNA* (MIM*601,239) variant [chr18:34,863,985G>A (GRCh38/hg38)] (NM_001390.5; c.1585G>A, p.(Glu529Lys)) in individual A.III.2, and a heterozygous in frame deletion in *DTNA* [chr18:34,863,966–34,863,986 (GRCh38/hg38)] (NM_001390.5; c.1567_1587del, p.(Gln523_Glu529del)) in individuals B.I.1, B.II.4, B.III.1, B.III.3, C.I.1, C.II.1, D.II.3, and D.III.2. These variants were absent from population databases [21], affected highly conserved residues of the protein and were predicted to be pathogenic by *in silico* predictors: variant c.1585G>A has a CADD score of 32 and variant c.1567_1587del a CADD score of 22.2 (Supplementary Table S2, online resource). Pathogenic variants in *DTNA* were not identified in the WES performed in the unaffected individuals B.I.2, B.II.1, B.II.3, C.I.2, and D.II.4. Sanger sequencing confirmed the presence of the heterozygous c.1567_1587del variant in the four affected members of family B and its absence in the unaffected members of family B.

Segregation analysis performed by Sanger sequencing in the members of family A identified the heterozygous c.1585G>A variant in the five affected members of family A (A.II.2, A.II.4, A.II.7, A.III.1, A.III.2), while it was absent in the four unaffected members who were sequenced (A.II.1, A.II.3, A.II.5, A.II.6) (Fig. 1).

No other pathogenic or likely pathogenic variants were identified in *DTNA* or other genes, except the monoallelic variant *POMGNT1* (NM_001243766.1): c.187C>T, p.Arg63* that was found in individual A.III.2 and in her asymptomatic mother (A.II.1) but not in her affected brother (A.III.1) or in other relatives. No pathogenic or likely pathogenic variants in *SGCA*, *SGCB*, *SGCG*, *SGCD*, or any other

Table 1 Clinical features of individuals with dominantly inherited variants in *DITPA*

Individual	Family	Sex	Age at last examination	CK (U/L)	Muscle weakness	Myalgias	Exercise intolerance	Rhabdomyolysis	Muscle biopsy	Cognitive impairment	Genetic variant
A.II.2	A	M	55y	1780	No	Yes	Yes	No	Variability in fiber size, fibers with internalized nuclei, irregular intermyofibrillar pattern, slightly increased endomysial and/or perimysial connective tissue	No	c.1585G>A; p.(Glu529Lys)
A.II.4	A	F	51y	150–200	No	Yes	Yes	No	Not performed	No	c.1585G>A; p.(Glu529Lys)
A.II.7	A	F	49y	380	No	Yes	Yes	No	Variability in fiber size, fibers with internalized nuclei, irregular intermyofibrillar pattern, slightly increased endomysial, and/or perimysial connective tissue	No	c.1585G>A; p.(Glu529Lys)
A.III.1	A	M	24y	830–1590	No	Yes	Yes	Yes	Variability in fiber size, fibers with internalized nuclei, irregular intermyofibrillar pattern, slightly increased endomysial, and/or perimysial connective tissue	No	c.1585G>A; p.(Glu529Lys)
A.III.2	A	F	18y	490–3990	No	Yes	Yes	No	Variability in fiber size, fibers with internalized nuclei, irregular intermyofibrillar pattern, slightly increased endomysial, and/or perimysial connective tissue	No	c.1585G>A; p.(Glu529Lys)
B.I.1	B	M	70's	Elevated	No	No	No	Unknown	Not performed	Learning delay	c.1567_1587; p.(523_529del17)

Table 1 (continued)

Individual	Family	Sex	Age at last examination	CK (IU/L)	Muscle weakness	Myalgias	Exercise intolerance	Rhabdomyolysis	Muscle biopsy	Cognitive impairment	Genetic variant
B.II.4	B	M	40's	elevated	No	Yes	No	Unknown	Internalized nuclei and focal areas of inflammation involving connective tissue. Mild to moderate fiber atrophy without regeneration. It was felt that the findings suggested myositis	No	c.1567_1587; p.(523_529del17)
B.III.1	B	M	8y	3000–3500	Yes	Yes	Yes	Unknown	Not performed	Unknown	c.1567_1587; p.(523_529del17)
B.III.3	B	M	16y	4000–6000	Yes (onset at 8y)	Yes	Yes	No	Severe fiber size variation, striking patchy endomysial and perimysial inflammation, focal patchy aggregates of regenerating fibers, some of which contain vacuoles. The inflammatory infiltrate is composed of lymphocytes, significant numbers of eosinophils and rare neutrophils and is centered on myofibers as well as blood vessels	Autism spectrum disorder and ADHD	c.1567_1587; p.(523_529del17)
C.II.1	C	M	12y	8000	Yes (hip adduction and hip extension 4+/5)	Yes	Yes	No	Mild myopathic features including internalized nuclei and type 1 fiber predominance	Learning disability	c.1567_1587; p.(523_529del17)
D.II.3	D	M	43y	388	No	No	No	Unknown	Not performed	Unknown	c.1567_1587; p.(523_529del17)

Table 1 (continued)

Individual	Family	Sex	Age at last examination	CK (IU/L)	Muscle weakness	Myalgias	Exercise intoler	Rhabdomyolysis	Muscle biopsy	Cognitive impairment	Genetic variant
D.III.2	D	M	8y	2500–5100	No	Yes	Yes	No	Mild variation in fiber size, slight increase in internalized nuclei, focal rare endomysial lymphocytes and rare foci of myophagocytosis. Small foci of basophilic regenerative fibers are seen	Autism spectrum disorder	c.1567_1587del; p.(Gln523_Glu529del)

M = male, F female, y years, IU International Units, NA/NP not available/not performed

known muscular dystrophy gene were identified in any of the exomes from affected individuals.

In silico and in vitro pathogenic role of novel DTNA variants

Both variants *DTNA* c.1585G>A; p.(Glu529Lys) and c.1567_1587del; p.(Gln523_Glu529del) are located in the second helix of the coiled-coil domain of α -dystrobrevin. This coiled-coil domain mediates the interaction with dystrophin, indicating that α -dystrobrevin acts as a structural scaffold linking the DGC to the intracellular cytoskeleton (Fig. 2a, b). Structural protein prediction tools suggest that the variants introduce subtle changes in the secondary structure of the protein (Fig. 2c, d). Based on data from gnomAD, *DTNA* is not tolerant to loss-of-function variants [21], and MetaDome showed that the variants were located in a region mostly intolerant to genetic variation [48] (Supplementary Fig. S2, online resource). Figure 2e, f shows the genomic structure of human *DTNA* and common isoforms, including notations of the locations of the two variants found in the four families.

Morphological findings in muscle biopsies

Muscle biopsies were performed on eight individuals (4 individuals from family A, 2 individuals from family B, 1 individual from family C, and 1 individual from family D) at a mean age of 27 years (range: 8–48 years). The main features of muscle biopsies are shown in Figs. 3 and 4 and in Tables 1 and 2. Muscle histology showed variability in fiber size, some fibers with internalized nuclei, and irregular intermyofibrillar pattern, with some areas devoid of staining for oxidative enzymes (NADH and SDH). Fiber splitting and a few regenerating fibers were detected. Slightly increased endomysial or perimysial connective tissue with fibrosis or fatty infiltration was observed. Muscle biopsy obtained from the quadriceps on individual B.III.3 at 8 years of age showed fiber necrosis and regenerating fibers.

Immunofluorescence analysis of the muscle samples from four affected individuals (3 from family A (*DTNA* c.1585G>A; p.(Glu529Lys)) and 1 from family C (*DTNA* c.1567_1587del; p.(Gln523_Glu529del)) demonstrated consistently reduced α -dystrobrevin immunoreactivity at the sarcolemma, as well as variably reduced immunoreactivity levels of several other proteins within the DGC, including dystrophin, α , β , δ and γ -sarcoglycans, and α and β -dystroglycans (Fig. 4 and Table 2). A total absence of any of the proteins studied was not observed in any biopsy that was examined via immunofluorescence. Ten neuromuscular junctions were identified in the muscle biopsy of individual A.III.1 on immunofluorescence. The morphology of these neuromuscular junctions was slightly different from that of

the neuromuscular junctions of a control specimen: the neuromuscular junctions of individual A.III.1 were thinner, in contrast to the large “crescent moon” appearance of a typical neuromuscular junction (Fig. 5).

Electron microscopy performed on the biopsy from individual A.III.1 showed muscle fibers with variability in size and normal sarcomeric structure. In the sarcolemma, slight folds into the extracellular space were observed, as well as minimal redundancy of the basement membrane in the extracellular space, with no thickening of the basal lamina. Non-specific findings included lipofuscin granules and pseudomyelinic debris that were in the normal range (Fig. 3).

Analysis of α -dystrobrevin expression and protein–protein interactions

In contrast to the reduced immunoreactivity at the sarcolemma found on immunofluorescence of histological slides, no alterations in protein expression levels of α -dystrobrevin were detected on western blot analysis of total protein extracts from muscle biopsy samples from affected individuals of family A. Western blots showed decreased expression of α , δ , and γ -sarcoglycans in muscle representing individuals from family A compared to controls, whereas protein expression levels of dystrophin using antibodies DYS1, DYS2 and DYS3 in individuals from family A were normal (Supplementary Fig. S3, online resource).

An interaction between full-length α -dystrobrevin and syntrophin was detected by GST pulldown and immunoblotting assays. This interaction was disrupted when a variant *DTNA* construct containing the c.1567_1587 deletion was expressed in C2C12 myoblasts (Fig. 6). Proliferation, migration, and differentiation/fusion assays performed on C2C12 myoblasts transiently transfected with wild-type *DTNA* fused to GST and a *DTNA* construct containing the c.1567_1587 deletion, also fused to GST, showed decreased proliferation of cells transfected with the *DTNA* c.1567_1587 deletion construct compared to those transfected with the WT *DTNA* construct, with no differences in migration and differentiation/ myoblast fusion patterns (Supplementary Fig. S4, online resource).

Transcriptome analysis

The expression levels of the 65 known *DTNA* transcripts were quantified from the RNAseq data. Among these, only transcript ENST00000681470 displays significant overexpression and none of the transcripts have significantly reduced expression in the skeletal muscle samples analyzed from three individuals with the *DTNA* c.1585G>A variant compared to controls (data not shown).

Discussion

Here, we present 12 individuals from four families who harbor monoallelic *DTNA* variants in the setting of persistent hyperCKemia ($n=11$), myalgia ($n=10$), exercise intolerance ($n=9$), rhabdomyolysis ($n=1$), and proximal muscle weakness in the lower limbs ($n=3$). Our findings suggest that variants in the coiled-coil domain of α -dystrobrevin lead to a mild skeletal muscle phenotype with variable penetrance. The p.Gln523_Glu529del deletion is associated with a more severe clinical phenotype, involving muscle weakness, while the p.Glu529Lys missense variant results in a milder phenotype of hyperCKemia, myalgia, and exercise intolerance. It is notable that the coiled-coil domain of α -dystrobrevin mediates the interaction with dystrophin and its utrophin homolog, and no other pathogenic missense variants in this domain have been previously described in humans. The central nervous system manifestations in a few affected individuals are intriguing. α -dystrobrevin is expressed in multiple brain regions in humans [45] and zebrafish [3], suggesting that *DTNA* variants may be associated with neurodevelopmental impairments. Specifically, expression of *DTNA* rises during the late prenatal period, followed by a plateau and a potential slow decline after early childhood [45]. Based on these findings, Simon et al. suggested that the elevated expression of *DTNA* at the earliest stages of astrogliogenesis may reflect a role of astrocytes in distributing secreted factors critical to developmental processes such as blood brain barrier maintenance and neuronal maturation [45].

Immunofluorescence of muscle biopsy specimens showed a marked reduction in α -dystrobrevin at the membrane, as well as of other components of the DGC, suggesting that potential mechanisms by which the variants p.Glu529Lys and p.Gln523_Glu529del give rise to the dystrophic phenotype may include disrupted interactions between α -dystrobrevin and one or more proteins in the DGC, thereby destabilizing the complex with reduced immunohistochemical localization of multiple components at their expected membrane based location. In contrast to the immunohistochemical deficit at the membrane, western blots did not show a corresponding depletion of α -dystrobrevin in total muscle lysates from affected individuals. While the antibodies used for the two assays were different (the antibody we used for immunofluorescence targets the inner region of α -dystrobrevin (amino acids 366–422), whereas the antibody used for the Western blot targets the c-terminal region of α -dystrobrevin (amino acids 600–743) (Supplementary Fig. S3, online resource), the targeted regions do not include the amino acids affected by the variants in our cohort. A more plausible explanation for the discordant findings between our

Acta Neuropathologica



Fig. 2 *In silico* analyses of α -dystrobrevin variants found in the four families included in our cohort. **a** α -dystrobrevin domain structure (Uniprot: Q9Y4J8) and location of the variants found in families A, B, C, and D (in red), as well as the previously reported variant associated with left ventricular noncompaction (LVNC) cardiomyopathy (in black). **b** Partial schematic representation of the dystrophin glycoprotein complex (DGC). **c** Modeled 3D structure of wild-type α -dystrobrevin with coiled-coil domain indicated in salmon. Wild-type and affected individuals modeled residues indicated in boxes. All residues in all 3D structures were modeled at >90% confidence using Phyre² software. **d** Sequence alignment of part of the coiled-coil domains of wild-type and mutated α -dystrobrevin and wild-type dystrophin. Abbreviations: EF, EF hand region; ZZ, zinc-binding domain; CC, coiled-coil. **e** The genomic structure of human *DTNA* indicating the two variants found in the four families. Also shown is a schematic representation of the exons included in 9 isoforms of *DTNA* that are expressed in skeletal muscle. Exons encoding the calcium-binding EF hand domains are shaded in teal, exons encoding the zinc finger domains are shaded in lime green, and exons encoding the coiled-coil domain are shaded in salmon. **f** The selected *DTNA* isoforms (Uniprot: Q9Y4J8-1 through Q9Y4J8-8 and Q9Y4J8-13) are listed with National Center for Biotechnology Information (NCBI) transcript accession number, number of amino acids, and tissues in which the isoforms are highly expressed. B, brain; SkM, skeletal muscle; CM, cardiac muscle

immunohistochemical and western blot studies is that some variant forms of α -dystrobrevin such as the ones in our cohort are not able to localize properly to the DGC, leading to a dominant negative effect characterized by the destabilization of other components of the DGC while the total amount of α -dystrobrevin protein present in muscle remains unchanged. In support of this hypothesis we found that the interaction between α -dystrobrevin and syntrophin was disrupted by a mutant *DTNA* construct containing the c.1567_1587 deletion. Also consistent with this scenario is that α -dystrobrevin interacts directly with dystroglycans through its EF domain [7]. As strong mechanical dissociation techniques were not applied to solubilize the muscle proteins prior to our western blots, another possible explanation for the discordant findings is that the variants reported here could lead to the formation of soluble aggregates, which would be an alternative explanation for the diminished expression of α -dystrobrevin on immunofluorescence but not on western blot.

A different monoallelic pathogenic variant in *DTNA*, (NM_001390.5) c.362C>T; p.(Pro121Leu), was previously identified in six individuals from one family with left ventricular noncompaction cardiomyopathy [17] and more recently a different *DTNA* variant (NM_001,198,943.1) c.681G>C; p.(Glu227Asp) was associated with atrial fibrillation in another family; however, there are genotype-phenotype discordances in the latter family that were not resolved [26]. Neither hyperCKemia nor other skeletal muscle symptoms were described in any of the affected individuals in these two reports. No cardiac involvement was detected in any of the affected individuals in our cohort, suggesting a

lack of overlap in these two phenotypes to date. The locations of the variants associated with muscular dystrophy and cardiomyopathy in different domains suggest that (i) the location of pathogenic variants in *DTNA* has a significant influence on the associated clinical phenotype and (ii) the coiled-coil domain of α -dystrobrevin is sensitive to variants that alter the structure and interactions of the DGC in skeletal muscle. This interpretation is supported by the high levels of conservation of the coiled-coil domain across evolutionarily divergent species, and the interaction between α -dystrobrevin and dystrophin at the coiled-coil domain. The identification of additional affected individuals and natural history data will be crucial to developing a better understanding of the phenotypic spectrum and long-term clinical manifestations of this form of muscular dystrophy, which is milder than the phenotype observed in *Dtna* knockout mice [14]. The absence of individuals reported to have biallelic pathogenic variants in *DTNA* suggests that a complete lack of *DTNA* in humans may be consequential enough to be incompatible with life.

In addition to being localized at the sarcolemma, α -dystrobrevin is abundant at the neuromuscular junction, especially at the crest of the junctional folds, with a key role in tethering acetylcholine receptors to the postsynaptic membrane [2]. In the affected individuals presented here, no typical symptoms of neuromuscular junction involvement were detected, including fatigability on clinical examination, ptosis, or a decrement in compound motor action potential (CMAP) amplitude after low frequency repetitive stimulation, thus we did not investigate whether either of the variants reported here disrupted normal acetylcholine receptor tethering. However, in the muscle biopsy of one affected individual we identified ten neuromuscular junctions with a slightly abnormal morphology, as they were thinner than those of the control (Fig. 3). These findings should be interpreted with caution due to the variable labeling of neuromuscular junctions in cryostat sections and the limited number of visualized neuromuscular junctions. Future studies of the potential effects of variant forms of α -dystrobrevin on the neuromuscular junction would be illuminating, and it is possible that individuals with pathogenic variants in other domains of *DTNA* will be found to have a myasthenic phenotype in the future.

α -Dystrobrevin is an integral and evolutionarily conserved component of the DGC (Supplementary Fig. S5, online resource) [35]. Studies in multiple model organisms including the mouse (*Mus musculus*), zebrafish (*Danio rerio*), fruit fly (*Drosophila melanogaster*) and nematode (*Caenorhabditis elegans*) have shown that dystrobrevin orthologs in these species (*Dtna*, *dtna*, *Dyb* and *dyb-1*, respectively) are expressed in skeletal muscles as well as in the central nervous system [3, 9]. The generation of *Dyb*-deficient animal models in these species facilitated

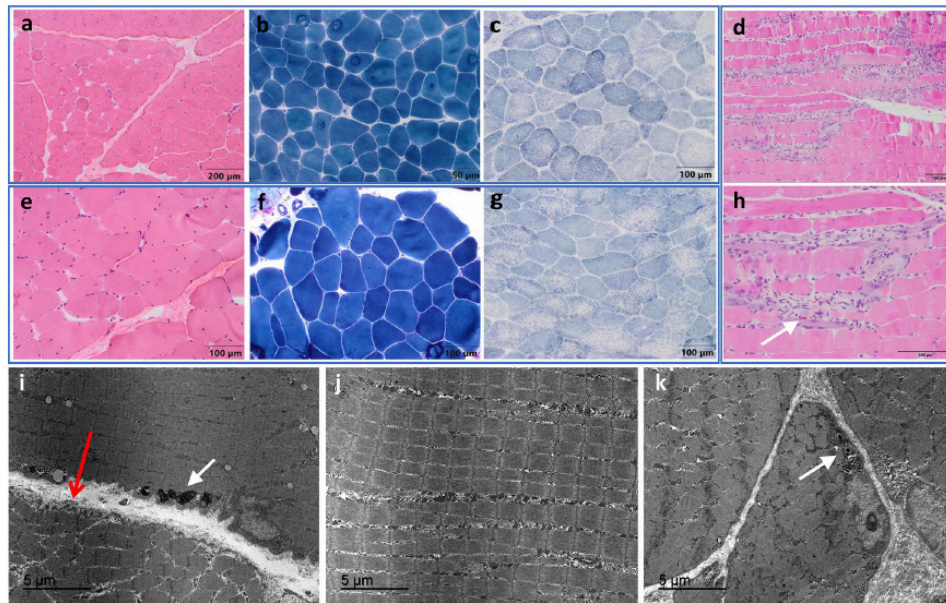


Fig. 3 Muscle histology findings from biopsies of individuals with pathogenic *DTNA* variants. The biopsy from individual A.III.2 was taken at 17 years (a–c) and the biopsy from individual A.III.1 at 23 years (e–g). Variability in fiber size (range: 31–105 μ m in individual A.III.2; range 37–178 μ m in individual A.III.1) and fibers with internalized nuclei (10.9% in individual A.III.2 and 26% in individual A.III.1) were observed on hematoxylin and eosin (H&E) and modified Gomori trichrome stainings, as well as slightly increased endomysial or perimysial connective tissue with fibrosis or fatty replacement (a, b, e, f). An irregular intermyofibrillar pattern, with small areas devoid of staining for oxidative enzymes, were identi-

fied with SDH (c, g). Biopsy of individual B.III.3 showed necrotic and regenerating muscle fibers, as well as some eosinophils (white arrow in h) d, h Electron microscopy performed in individual A.III.1 showed muscle fibers with fiber size variability and normal sarcomeric structure. i–k Slight folds into the extracellular space were observed in the sarcolemma, as well as minimal redundancy of the basement membrane into the extracellular space, with no thickening of the basal lamina (long thin red open arrow in i). Note that the orientation of the lower fiber is not optimal. Non-specific lipofuscin granules (white arrow in i) and pseudomyelinic debris (white arrow in k) were observed. Scale bars are indicated in the panels

investigations of this protein's function at the postsynaptic neuromuscular junction, where it is enriched. Loss-of-function *Dyb* mutant organisms are viable; however, abnormalities in motor activity, muscle fiber integrity, neurotransmitter release at the neuromuscular junction, and neuromuscular junction structure have been reported in multiple species (Supplementary Table S3, online resource). These studies revealed an important role for *DTNA/Dyb* at the neuromuscular junction [16, 19].

Dominant forms of muscular dystrophy remain much less common than recessive forms, as illustrated by the genetic distribution seen in limb-girdle muscular dystrophy (LGMD) [46]. This likely reflects to some extent the true

epidemiologic patterns in the muscular dystrophy population, but as our study shows, genetic analyses of dominant families are often hampered by milder phenotypes than are seen in recessive families, as is the case in some individuals with LGMD-1D [49]. This raises the possibility of phenotyping errors that could confound segregation analyses of candidate pathogenic variants as well as linkage analysis [24]. Thus, we believe that dominant forms of muscular dystrophy may be under-recognized and that additional genes with dominantly inherited causative variants are likely to be discovered in the future.

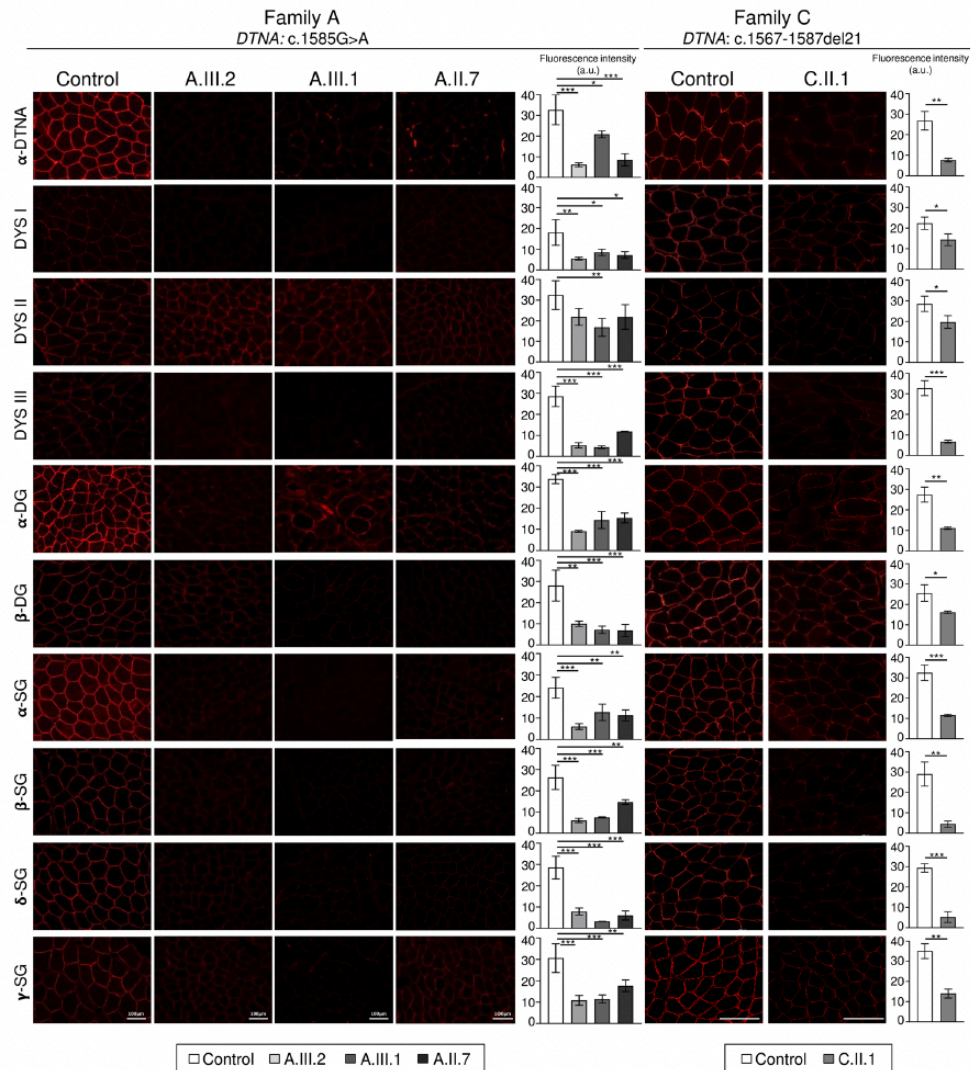


Fig. 4 Immunofluorescence showed significantly reduced signal intensity in several sarcolemmal proteins in individuals from families A and C, who carry the *DTNA* c.1585G>A; p.Glu529Lys and c.1567_1587del21; p.Gln523_Glu529del7 variants. Representative images of α-dystrobrevin and different dystrophin–glycoprotein complex proteins in healthy controls and affected individuals (family A: A.III.2, A.III.1, A.II.7; family C: C.II.1) and quantification of fluorescence intensity signal (mean±SD; n=3; statistical analyses were performed using Student's *t* test (family C) and one-way ANOVA, followed by the Tukey–Kramer post hoc test (family A). **p*<0.05;

p*<0.01; *p*<0.001. In addition to reduced α-dystrobrevin immunoreactivity at the sarcolemma, variable reductions in immunoreactivity levels of other proteins in the dystrophin–glycoprotein complex were identified, including dystrophin, α, β, δ and γ-sarcoglycans and α and β-dystroglycans. β-DG β-dystroglycan, DYS1 dystrophin antibody 1 (rod domain), DYS2 dystrophin antibody 2 (C-terminal domain), DYS3 dystrophin antibody 3 (N-terminal domain), α-DG α-dystroglycan, α-SG α-sarcoglycan, β-SG β-sarcoglycan, δ-SG δ-sarcoglycan, γ-SG γ-sarcoglycan, α-DTNA α-dystrobrevin. Scale bars, 100 μm; a.u. arbitrary units

RESULTADOS

Acta Neuropathologica

Table 2 Variability of sarcolemmal protein reduction in several individuals with DTNA-related muscular dystrophy with the same variant *DTNA* c.1585G>A; p.Glu529Lys (family A) and with variant c.1567_1587del21; p.Gln523_Glu529del7 (family C)

	A.III.2	A.III.1	A.II.7	A.II.2	C.II.1
Beta-spectrin	++++	+++	++++	++++	
DYS1	++	++	++	+++	++
DYS2	+++	+	++++	++	+
DYS3	+	-	++++	+	+
Beta-dystroglycan	++++	++	++++	++	+++
Alpha-dystroglycan (VIA4)	++	+	++++	++	
Alpha-dystroglycan (IIH6)	+	+	+++	++	+++
Alpha-sarcoglycan	+++	-	++	+	+
Beta-sarcoglycan	+	++	++	++	+
Delta-sarcoglycan	+++	+	+++	+	
Gamma-sarcoglycan	++	+	+++	+	+
Alpha-dystrobrevin	+++	++	+	+	+

++++ normal staining, +++ mildly diminished, ++ moderately diminished, + severely diminished, - absent

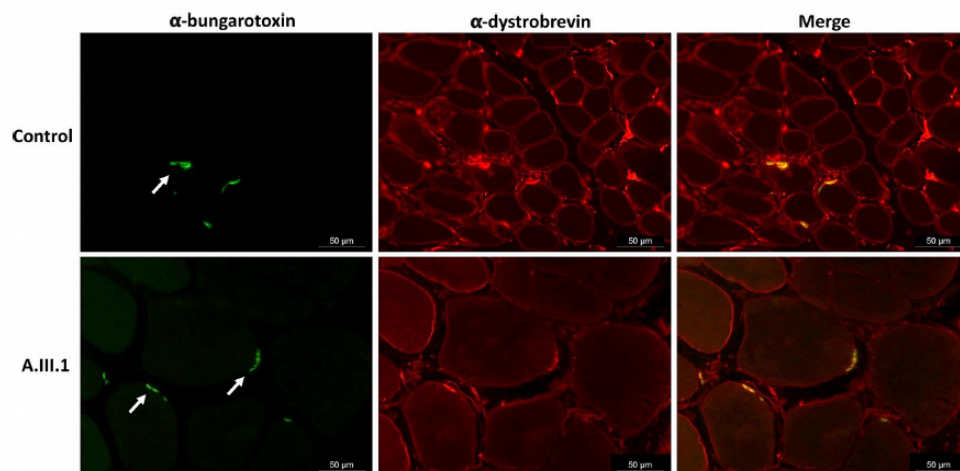


Fig. 5 Neuromuscular junction imaging. Immunofluorescence stains for α -dystrobrevin were merged with images of fluorescently labeled α -bungarotoxin staining acetylcholine receptors to show that the neu-

romuscular junctions in individual A.III.1 were thinner compared to control neuromuscular junctions (arrows). Scale bars: 50 μ m

In summary, we provide clinical, genetic, and histopathological evidence for the pathogenicity of particular autosomal dominant variants in a specific domain of α -dystrobrevin, as well as a notable expansion of the phenotypic spectrum associated with *DTNA* to muscular dystrophy. Our observations suggest that the coiled-coil

domain of α -dystrobrevin is intolerant of genetic variation in skeletal muscle. The identification of additional affected individuals will assist in a more comprehensive description of the phenotypic spectrum and long-term clinical manifestations of *DTNA*-associated muscular dystrophy.

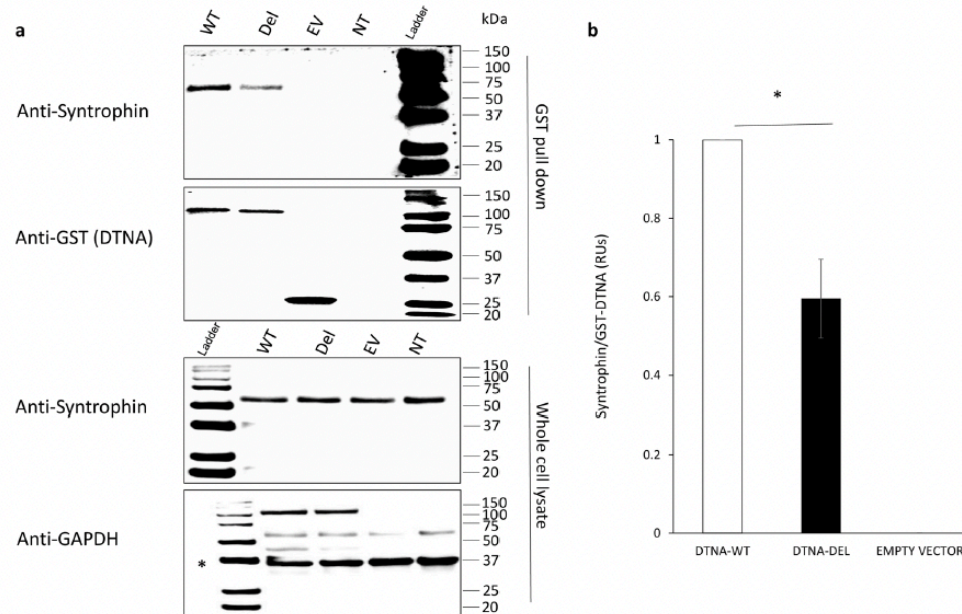


Fig. 6 Immunoprecipitation and GST pulldown assays. **a** Lysates were prepared from C2C12 cells that were transiently transfected with WT *DTNA* (WT) fused to GST, variant *DTNA* (Del) fused to GST, and empty vector containing GST as a negative control (EV). We also included a non-transfected cell control (NT). Input and GST pulldowns were analyzed by immunoblotting with anti-syntrophin, anti-GST, and anti-GAPDH antibodies (the asterisk indicates the GAPDH band). The anti-syntrophin immunoblot of the GST pull-

down shows decreased syntrophin for the deletion construct versus WT *DTNA*, while the anti-GST immunoblot shows no discernable difference in α -dystrobrevin levels. In contrast, anti-syntrophin immunoblot of the whole cell lysate reveals no discernable differences in syntrophin levels. Anti-GAPDH was used as a loading control. **b** Quantification of syntrophin in GST pulldowns normalized to GST- α -dystrobrevin

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00401-023-02551-7>.

Acknowledgements We are indebted to the “Biobanc de l’Hospital Infantil Sant Joan de Déu per a la Investigació”, part of the Spanish Biobank Network of ISCIII for the sample and data procurement.

Funding Daniel Natera-de Benito is supported by the Miguel Servet program from Instituto de Salud Carlos III, Spain (CP22/00141). Jordi Pijuan is supported by a Carmen de Torres fellowship of the SJD Research Institute. Francesc Palau is supported by Fundacion Isabel Gemio and AGAUR (2017 SGR 324). Janet Hoenicka is supported by the Torro Solidari-RAC1 i Torrons Vicens. The work in Peter B. Kang’s laboratory was supported in part by NIH R01 NS080929. The work in Louis M. Kunkel’s laboratory was supported in part by NIH R01AR064300 and the Bernard F. and Alva B. Gimbel Foundation. Work in Carsten G. Bönneman’s laboratory is supported by intramural funds by the NIH National Institute of Neurological Disorders and

Stroke. Sequencing and analysis of families C and D were provided by the Broad Institute of MIT and Harvard Center for Mendelian Genomics (Broad CMG) and was funded by the National Human Genome Research Institute, the National Eye Institute, and the National Heart, Lung and Blood Institute grant UM1HG008900 and in part by National Human Genome Research Institute grant R01HG009141.

Data availability Any data not published within the article will be shared from the corresponding authors upon reasonable request.

Declarations

Conflict of interest None of the authors has any conflict of interest to disclose.

Ethics/consent to participate This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Hospital Sant Joan de Déu Clinical Research Ethics Committee (reference PIC-04-18). Data were collected in accordance with the ethical guidelines of each of the institutions involved. Written informed consent for study participation was obtained by qualified clinicians.

References

- Amici DR, Pinal-Fernandez I, Mázala DAG, Lloyd TE, Corse AM, Christopher-Stine L et al (2017) Calcium dysregulation, functional calpainopathy, and endoplasmic reticulum stress in sporadic inclusion body myositis. *Acta Neuropathol Commun* 5:24. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0427-7>
- Belhasan DC, Akaaboune M (2020) The role of the dystrophin glycoprotein complex on the neuromuscular system. *Neurosci Lett* 722:134833. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134833>
- Böhm S, Jin H, Hughes SM, Roberts RG, Hinitz Y (2008) Dystrobrevin and dystrophin family gene expression in zebrafish. *Gene Expr Patterns* 8:71–78. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2007.10.004>
- Bruels CC, Li C, Mendoza T, Khan J, Reddy HM, Estrella EA et al (2019) Identification of a pathogenic mutation in ATP2A1 via in silico analysis of exome data for cryptic aberrant splice sites. *Mol Genet Genom Med* 7:e552. <https://doi.org/10.1002/mgg3.552>
- Cagliani R, Comi GP, Tancredi L, Sironi M, Fortunato F, Giordano R et al (2001) Primary beta-sarcoglycanopathy manifesting as recurrent exercise-induced myoglobinuria. *Neuromuscul Disord* 11:389–394. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(00\)00207-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(00)00207-8)
- Chen B, Liu P, Zhan H, Wang ZW (2011) Dystrobrevin controls neurotransmitter release and muscle Ca²⁺-transients by localizing BK channels in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 31:17338–17347. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3638-11.2011>
- Chung W, Campanelli JT (1999) WW and EF hand domains of dystrophin-family proteins mediate dystroglycan binding. *Mol Cell Biol Res Commun* 2:162–171. <https://doi.org/10.1006/mcbr.1999.0168>
- Davydov EV, Goode DL, Sirotka M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S (2010) Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. *PLoS Comput Biol* 6:e1001025. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001025>
- Dekkers LC, van der Plas MC, van Loenen PB, den Dunnen JT, van Ommen GJB, Fradkin LG et al (2004) Embryonic expression patterns of the *Drosophila* dystrophin-associated glycoprotein complex orthologs. *Gene Expr Patterns* 4:153–159. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2003.09.004>
- Dubowitz V, Sewry C, Oldfors A (2013) Muscle biopsy: a practical approach, 4th edn. Saunders Elsevier, Philadelphia
- Figarella-Branger D, Machado AMB, Putzu GA, Malzac P, Voelckel MA, Pellissier JF (1997) Exertional rhabdomyolysis and exercise intolerance revealing dystrophinopathies. *Acta Neuropathol* 94:48–53. <https://doi.org/10.1007/s004010050671>
- Gieseler K, Mariol MC, Bessou C, Migaud M, Franks CJ, Holden-Dye L et al (2001) Molecular, genetic and physiological characterisation of dystrobrevin-like (dyb-1) mutants of *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 307:107–117. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4480>
- Grady RM, Akaaboune M, Cohen AL, Maimone MM, Lichtman JW, Sanes JR (2003) Tyrosine-phosphorylated and nonphosphorylated isoforms of α -dystrobrevin: Roles in skeletal muscle and its neuromuscular and myotendinous junctions. *J Cell Biol* 160:741–752. <https://doi.org/10.1083/jcb.200209045>
- Grady RM, Grange RW, Lau KS, Maimone MM, Nichol MC, Stull JT et al (1999) Role for α -dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nat Cell Biol* 1:215–220. <https://doi.org/10.1038/12034>
- Grady RM, Wozniak DF, Ohlemiller KK, Sanes JR (2006) Cerebellar synaptic defects and abnormal motor behavior in mice lacking α - and β -dystrobrevin. *J Neurosci* 26:2841–2851. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4823-05.2006>
- Grady RM, Zhou H, Cunningham JM, Henry MD, Campbell KP, Sanes JR (2000) Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin–glycoprotein complex. *Neuron* 25:279–293. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80894-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80894-6)
- Ichida F, Tsubata S, Bowles KR, Haneda N, Uese K, Miyawaki T et al (2001) Novel gene mutations in patients with left ventricular noncompaction or Barth syndrome. *Circulation* 103:1256–1263. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.103.9.1256>
- Ishikawa-Sakurai M, Yoshida M, Imamura M, Davies KE, Ozawa E (2004) ZZ domain is essentially required for the physiological binding of dystrophin and utrophin to β -dystroglycan. *Hum Mol Genet* 13:693–702. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh087>
- Jantrapirom S, Nimlamool W, Temviriyakul P, Ahmadian S, Locke CJ, Davis GW et al (2019) Dystrobrevin is required postsynaptically for homeostatic potentiation at the *Drosophila* NMJ. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1865:1579–1591. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.03.008>
- Jones KJ, Compton AG, Yang N, Mills MA, Peters MF, Mowat D et al (2003) Deficiency of the syntrophins and α -dystrobrevin in patients with inherited myopathy. *Neuromuscul Disord* 13:456–467. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(03\)00066-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(03)00066-X)
- Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q et al (2020) The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 581:434–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10:845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kircher M, Witten DM, Jain P, O’Roak BJ, Cooper GM, Shendure J (2014) A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* 46:310–315. <https://doi.org/10.1038/ng.2892>
- Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES (1996) Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 58:1347–1363
- Li H, Durbin R (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 26:589–595. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>
- Malakootian M, Jalilian M, Kalayinia S, Hosseini Moghadam M, Heidarali M, Haghighi M (2022) Whole-exome sequencing reveals a rare missense variant in DTNA in an Iranian pedigree with early-onset atrial fibrillation. *BMC Cardiovasc Disord* 22:37. <https://doi.org/10.1186/s12872-022-02485-0>
- Mathews KD, Stephan CM, Laubenthal K, Winder TL, Michele DE, Moore SA et al (2011) Myoglobinuria and muscle pain are

- common in patients with limb-girdle muscular dystrophy 2I. *Neurology* 76:194–195. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182061ad4>
28. Mercuri E, Bönnemann CG, Muntoni F (2019) Muscular dystrophies. *The Lancet* 394:2025–2038. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32910-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32910-1)
29. Metzinger L, Blake DJ, Squier MV, Anderson LVB, Deconinck AE, Nawrotzki R et al (1997) Dystrobrevin deficiency at the sarcolemma of patients with muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 6:1185–1191. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.7.1185>
30. Nakamori M, Takahashi MP (2011) The role of alpha-dystrobrevin in striated muscle. *Int J Mol Sci* 12:1660–1671. <https://doi.org/10.3390/ijms12031660>
31. Nallamilli BRR, Chakravorty S, Kesari A, Tanner A, Ankala A, Schneider T et al (2018) Genetic landscape and novel disease mechanisms from a large LGMD cohort of 4656 patients. *Ann Clin Transl Neurol* 5:1574–1587. <https://doi.org/10.1002/actn.3.649>
32. Nguyen K, Bassez G, Krahn M, Bernard R, Laforêt P, Labelle V et al (2017) Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Arch Neurol* 64:1176–1182. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.8.1176>
33. Panadés-de Oliveira L, Bermejo-Guerrero L, de Fuenmayor-Fernández de la Hoz CP, Cantero Montenegro D, Hernández Lain A, Martí P et al (2020) Persistent asymptomatic or mild symptomatic hyperCKemia due to mutations in ANO5: the mildest end of the anoctaminopathies spectrum. *J Neurol* 267:2546–2555. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-09872-7>
34. Pena L, Kim K, Charrow J (2010) Episodic myoglobinuria in a primary gamma-sarcoglycanopathy. *Neuromuscul Disord* 20:337–339. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.02.015>
35. Pilgram GSK, Potikanond S, Baines RA, Fradkin LG, Noordermeer JN (2010) The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. *Mol Neurobiol* 41:1–21
36. Pinal-Fernandez I, Amici DR, Parks CA, Derfoul A, Casal-Dominguez M, Pak K et al (2019) Myositis autoantigen expression correlates with muscle regeneration but not autoantibody specificity. *Arthritis Rheumatol* 71:1371–1376. <https://doi.org/10.1002/art.40883>
37. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Derfoul A, Pak K, Miller FW, Milisenda JC et al (2020) Machine learning algorithms reveal unique gene expression profiles in muscle biopsies from patients with different types of myositis. *Ann Rheum Dis* 79:1234–1242. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216599>
38. Pinal-Fernandez I, Casal-Dominguez M, Derfoul A, Pak K, Plotz P, Miller FW et al (2019) Identification of distinctive interferon gene signatures in different types of myositis. *Neurology* 93:e1193–e1204. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008128>
39. Ponting CP, Blake DJ, Davies KE, Kendrick-Jones J, Winder SJ (1996) ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends Biochem Sci* 21:11–13. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(06\)80020-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(06)80020-4)
40. Quinlivan R, Jungbluth H (2012) Myopathic causes of exercise intolerance with rhabdomyolysis. *Dev Med Child Neurol* 54:886–891. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2012.04320.x>
41. Reddy HM, Cho KA, Lek M, Estrella E, Valkanas E, Jones MD et al (2017) The sensitivity of exome sequencing in identifying pathogenic mutations for LGMD in the United States. *J Hum Genet* 62:243–252. <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.116>
42. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J et al (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17:405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
43. Rubegni A, Malandrini A, Dosi C, Astrea G, Baldacci J, Battisti C et al (2019) Next-generation sequencing approach to hyperCKemia: a 2-year cohort study. *Neurol Genet* 5:e352. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000352>
44. Scalco RS, Gardiner AR, Pitceathly RDS, Hilton-Jones D, Schapira AH, Turner C et al (2016) CAV3 mutations causing exercise intolerance, myalgia and rhabdomyolysis: Expanding the phenotypic spectrum of caveolinopathies. *Neuromuscul Disord* 26:504–510. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.05.006>
45. Simon MJ, Murchison C, Iliff JJ (2018) A transcriptome-based assessment of the astrocytic dystrophin-associated complex in the developing human brain. *J Neurosci Res* 96:180–193. <https://doi.org/10.1002/jnr.24082>
46. Straub V, Murphy A, Udd B (2018) 229th ENMC international workshop: limb girdle muscular dystrophies—nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17–19 March 2017. *Neuromuscul Disord* 28:702–710. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.05.007>
47. Wang K, Li M, Hakonarson H (2010) Analysing biological pathways in genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 11:843–854
48. Wiel L, Baakman C, Gilissen D, Veltman JA, Vriend G, Gilissen C (2019) MetaDome: pathogenicity analysis of genetic variants through aggregation of homologous human protein domains. *Hum Mutat* 40:1030–1038. <https://doi.org/10.1002/humu.23798>
49. Zima J, Eaton A, Pál E, Till Á, Ito YA, Warman-Chardon J et al (2020) Intrafamilial variability of limb-girdle muscular dystrophy, LGMD1D type. *Eur J Med Genet* 63:103655. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2019.04.012>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Authors and Affiliations

Andres Nascimento^{1,2,3} · Christine C. Bruels⁴ · Sandra Donkervoort⁵ · A. Reghan Foley⁵ · Anna Codina^{2,6} · Jose C. Milisenda⁷ · Elicia A. Estrella^{8,9} · Chengcheng Li¹⁰ · Jordi Pijuan^{3,11} · Isabelle Draper¹² · Ying Hu⁵ · Seth A. Stafki⁴ · Lynn S. Pais^{8,13,14} · Vijay S. Ganesh^{8,13,14,15} · Anne O'Donnell-Luria^{8,13,14} · Safoora B. Syeda⁵ · Laura Carrera-García^{1,2} · Jessica Expósito-Escudero^{1,2} · Delia Yubero^{3,16} · Loreto Martorell^{3,16} · Iago Pinal-Fernandez^{17,18} · Hart G. W. Lidov¹⁹ · Andrew L. Mammen^{17,18} · Josep M. Grau-Junyent^{3,7} · Carlos Orteiz^{1,2,3} · Francesc Palau^{3,11,16} · Partha S. Ghosh⁹ · Basil T. Darras⁹ · Cristina Jou^{2,3,6} · Louis M. Kunkel⁸ · Janet Hoenicka^{3,11} · Carsten G. Bönnemann⁵ · Peter B. Kang^{4,20}  · Daniel Natera-de Benito^{1,2} 

¹ Neuromuscular Unit, Department of Neurology, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu 2, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain

² Applied Research in Neuromuscular Diseases, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

³ Center for Biomedical Research Network on Rare Diseases (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain

⁴ Department of Neurology, Paul and Sheila Wellstone Muscular Dystrophy Center, University of Minnesota Medical School, 420 Delaware Street SE, MMC 295, Minneapolis, MN 55455, USA

⁵ Neuromuscular and Neurogenetic Disorders of Childhood Section, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

⁶ Department of Pathology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

⁷ Department of Internal Medicine, Hospital Clinic of Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁸ Division of Genetics and Genomics, Boston Children's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA

⁹ Department of Neurology, Boston Children's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA

¹⁰ Division of Pediatric Neurology, University of Florida College of Medicine, Gainesville, FL 32610, USA

¹¹ Laboratory of Neurogenetics and Molecular Medicine-IPER, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

¹² Molecular Cardiology Research Institute, Tufts Medical Center, Boston, MA 02111, USA

¹³ Program in Medical and Population Genetics, Center for Mendelian Genomics, Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA

¹⁴ Analytic and Translational Genetics Unit and Center for Genomic Medicine, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA

¹⁵ Department of Neurology, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA

¹⁶ Department of Genetic and Molecular Medicine-IPER, Hospital Sant Joan de Déu and Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

¹⁷ National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

¹⁸ Department of Neurology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA

¹⁹ Department of Pathology, Boston Children's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA

²⁰ Institute for Translational Neuroscience, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA

VI. DISCUSIÓN

La presente tesis aborda el fenotipado de precisión y el estudio sistemático mediante la aplicación de escalas funcionales para medir la trayectoria clínica de los pacientes con distrofia muscular. El objetivo principal es mejorar la estratificación de los pacientes y evaluar el impacto de los tratamientos administrados. Esta investigación ha sido posible gracias a la colaboración con diversos centros de referencia en enfermedades neuromusculares nacionales e internacional, lo que ha permitido reunir un número significativo de pacientes. Esta cohesión ha sido crucial para categorizar y correlacionar datos clínicos con la progresión a largo plazo de los pacientes, especialmente en el caso de la distrofia muscular por déficit de colágeno VI.

Por otro parte, la aplicación de métodos de secuenciación masiva y la agrupación de pacientes con fenotipos similares, utilizando una red de colaboración a nivel internacional, ha permitido identificar una nueva causa de distrofia muscular en humanos. Este hallazgo ha demostrado que variantes en el gen *DTNA* están implicadas en la fisiopatología de las distrofias musculares. La presente tesis, por lo tanto, no solo ofrece un análisis exhaustivo de los pacientes estudiados, sino que también amplía el conocimiento sobre las bases moleculares de las enfermedades musculares y su tratamiento, sentando las bases para futuras investigaciones y estrategias terapéuticas.

En este apartado de discusión se analizan los resultados obtenidos, su relevancia clínica, y las implicaciones futuras para el manejo y tratamiento de estas patologías. Se discuten en profundidad los resultados obtenidos enumerados de acuerdo con los objetivos planteados en la tesis, tratando de subrayar el valor que a día de hoy sigue teniendo la semiología clínica clásica como pilar de la práctica médica, aplicada en este caso a las enfermedades neuromusculares. Identificar, describir e

interpretar los signos y síntomas de los pacientes para llegar a un diagnóstico clínico, mantener un seguimiento a largo plazo para conocer la historia natural de las enfermedades y aplicar con criterio las pruebas complementarias es más relevante que nunca a la hora de llevar a cabo una investigación clínica de calidad. A lo largo del texto de abordan también las limitaciones del estudio y se proponen nuevas líneas de investigación para continuar avanzando en el conocimiento y tratamiento de las distrofias musculares.

6.1 CATEGORIZACIÓN DE LOS FENOTIPOS DE DISTROFIA POR DÉFICIT DE COLÁGENO VI, CON EL OBJETIVO DE PREDECIR LA FUNCIÓN MOTORA Y RESPIRATORIA A LARGO PLAZO

La capacidad de categorizar con precisión a los pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI en subgrupos fenotípicos clínicamente relevantes desde los primeros años de vida ayudará a optimizar la atención clínica, anticipando problemas potenciales que podrían aparecer, y facilitará el diseño de ensayos clínicos para las estrategias terapéuticas actualmente en desarrollo ^{48,49,52,54–59,93}. Los estudios de historia natural y de cohortes de pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI han destacado la dificultad de distinguir entre los fenotipos de este tipo de distrofia, especialmente para aquellos fenotipos que se encuentran entre la distrofia de Ullrich y la miopatía de Bethlem y, en particular, para los casos que bordean los fenotipos establecidos. Hasta el momento se carecía de criterios clínicos claros para diferenciar entre fenotipos ubicados en estas zonas grises ^{38,45}. Además, el uso de hitos motores como alcanzar la capacidad de saltar y correr, aunque útil, no permiten distinguir entre los pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI en los primeros años de vida.

La capacidad de levantarse del suelo sin ayuda y subir 4 escalones sin usar una barandilla fueron los dos hitos motores seleccionados entre los 6 hitos del desarrollo motor previamente recopilados como parte de un estudio piloto de los hitos de la función motora en pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI. Estos hitos evaluaron la capacidad de sentarse sin ayuda, caminar de manera independiente, correr, saltar y levantarse del suelo. Sentarse sin ayuda y caminar de manera independiente no fueron suficientes para discriminar entre los fenotipos de distrofia por déficit de colágeno VI, ya que la gran mayoría de los pacientes alcanzan estos hitos. Los hitos motores de correr y saltar fueron propensos a ser malinterpretados por los pacientes y los padres que

participaron en el estudio piloto. Por lo tanto, estos hitos no se recopilaban como parte de este estudio multicéntrico.

En este estudio, demostramos que el uso de dos hitos motores alcanzados en los primeros años de la vida, como la capacidad de levantarse del suelo sin ayuda y la capacidad de subir 4 escalones sin agarrarse de la barandilla, permiten distinguir de manera fiable entre varios fenotipos de distrofia por déficit de colágeno VI, con una correlación clínica significativa, y permite ofrecer un pronóstico preciso de la gravedad y progresión de la enfermedad. Nuestros datos muestran que la función motora a largo plazo está muy relacionada con la función pulmonar en todos los pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI. Demostramos que el máximo hito motor a edades tempranas permite predecir otros eventos relevantes de la enfermedad, como la edad de pérdida de la deambulación y la necesidad de iniciar ventilación no invasiva nocturna. Este trabajo muestra que clasificar a los pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI en grupos fenotípicos en base a los mencionados hitos motores es efectivo para estudiar la historia natural de los subgrupos específicos de distrofia por déficit de colágeno VI y facilita la preparación de los ensayos clínicos en distrofia por déficit de colágeno VI.

Algunas variantes patogénicas con efecto dominante se encontraron muy asociadas a fenotipos específicos. Entre ellas se encuentra la variante intrónica profunda recurrente en *COL6A1* (c.930 + 189C>T), que muestra un fenotipo caracterizado por una relativa escasez de síntomas prominentes durante los primeros 1 a 2 años de vida, seguido de una progresión acelerada hacia un fenotipo grave de distrofia muscular congénita de Ullrich. Algunos pacientes con esta variante lograron la deambulación independiente, pero posteriormente la perdieron entre los 6 y 9 años de edad, consistente con UCMD. Dada esta nueva y consistente observación de rápida progresión en la severidad fenotípica asociada con este genotipo y la posibilidad de que nuestra clasificación propuesta de distrofia por déficit de colágeno VI pueda no ser tan

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

precisa en predecir prospectivamente el fenotipo en este grupo particular de pacientes, se está llevando a cabo un trabajo para definir este fenotipo específico de la mutación en una cohorte internacional.

Nuestro estudio también confirma otras correlaciones generales previamente propuestas entre genotipo y fenotipo para las distrofias por déficit de colágeno VI, como el fenotipo severo asociado con sustituciones de glicina ubicadas en la región crítica que incluye los tripletes Gly-X-Y 10 a 15 en la región N-terminal del dominio TH. También proporcionamos algunas hipótesis que pueden ser útiles para predecir el fenotipo en aquellos pacientes con variantes patogénicas de herencia recesiva.

Cabe destacar que los individuos con un fenotipo intermedio de distrofia por déficit de colágeno VI muestran un deterioro progresivo de la función pulmonar que es comparativamente más pronunciado que el declive en la función motora en el mismo rango de edad. Aunque la trayectoria de la función motora de los individuos con fenotipo intermedio puede ser a veces difícil de distinguir de la de los individuos con fenotipo Bethlem, la trayectoria de la función pulmonar de estos dos fenotipos es diferente. De hecho, la contribución fundamental de esta clasificación propuesta es su capacidad para anticipar un declive en la función pulmonar. Dada la capacidad de la clasificación propuesta para predecir los fenotipos de distrofia por déficit de colágeno VI desde una edad temprana, creemos que permitirá establecer programas de seguimiento que permitan anticipar estos eventos y proponer medidas preventivas: la hipoventilación no reconocida o en algunos casos infradiagnosticada es la principal causa de morbilidad y mortalidad en las pacientes con COL6-RDs y de este modo podría reducirse.

Este estudio tiene algunas limitaciones. Realizamos una revisión retrospectiva de los datos clínicos que se habían recopilado en el curso de la atención clínica de los pacientes; por lo tanto, la mayoría, pero no todos los parámetros, estaban disponibles

para cada paciente. Además, los hitos motores máximos registrados en el expediente médico que no fueron capturados en video y ya no son posibles de demostrar clínicamente, pueden tener una menor precisión debido al sesgo de recuerdo. Esto es particularmente el caso en la consecución de la capacidad de levantarse del suelo, ya que si este hito se logró sin asistencia se utiliza para predecir un futuro fenotipo intermedio frente a un fenotipo Ullrich y sería más preciso si se documentara tras la observación directa o la revisión de una grabación en video de este hito. Por esta razón, sería deseable poner en marcha estudios prospectivos robustos de historia natural con la recopilación de datos de hitos motores máximos mediante observación directa o captura en video para validar esta clasificación fenotípica. La recopilación prospectiva de datos de historia natural también sería útil para validar los análisis de tiempo hasta el evento realizados en este estudio.

Observamos cierta superposición en la edad de la pérdida de la deambulaci3n y la edad de inicio de la ventilaci3n no invasiva entre los fenotipos Ullrich e intermedio. Si bien una superposici3n en la categorizaci3n fenotípica no es del todo inesperada, dado que las distrofias por d3ficit de col3geno VI se comportan como un espectro fenotípico continuo, es importante reconocer que, en referencia al momento del inicio de la VNI, la variabilidad en la atenci3n clínica entre centros y la conformidad/incumplimiento del paciente pueden resultar en una variabilidad significativa en el momento del inicio de la VNI, incluso cuando su inicio est3 clínicamente indicado. Esperamos que nuestra clasificaci3n pueda ser un medio eficaz para el pron3stico individual de los pacientes, lo cual, si se utiliza en diferentes centros, podría afectar positivamente la atenci3n, incluido el momento del inicio de la VNI.

Nuestro estudio de una gran cohorte de pacientes con distrofia por d3ficit de col3geno VI de Espaía y Estados Unidos ($n = 119$) identifica dos hitos iniciales máximos de funci3n motora, la capacidad de levantarse del suelo sin asistencia y la capacidad de

subir cuatro escalones sin apoyarse en una barandilla, como predictivos de los subgrupos fenotípicos de la siguiente manera: (1) levantarse del suelo solo con asistencia (UCMD), (2) levantarse del suelo sin asistencia (COL6-RD intermedio), y (3) subir escaleras (ascender un mínimo de cuatro escalones sin el uso de una barandilla) (BM). Esta clasificación ofrece un enfoque probabilístico para predecir el fenotipo futuro de los pacientes individuales con distrofia por déficit de colágeno VI desde una edad temprana, lo que resulta en una mejor atención anticipatoria y preparación para ensayos clínicos.

Estudios previos de pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI habían categorizado los fenotipos de los pacientes basándose en características de la función motora, como la pérdida de la marcha o la capacidad de correr o saltar; sin embargo, ninguna de esas clasificaciones fenotípicas propuestas permitía una identificación fenotípica precisa desde una edad temprana. En contraste, esta clasificación fenotípica prospectiva propuesta para distrofia por déficit de colágeno VI debería permitir a los clínicos predecir el fenotipo futuro de los pacientes desde los primeros años de vida. Sugerimos que nuestra clasificación fenotípica puede ser tan definitiva y relevante desde una perspectiva de investigación clínica como la clasificación fenotípica de los pacientes con atrofia muscular espinal, la cual ha sido determinante en el diseño de ensayos clínicos y la comprensión de la historia natural y búsqueda e interpretación de biomarcadores modificadores de la enfermedad ⁹⁴.

Este estudio se suma a estudios previos de distrofia por déficit de colágeno VI al demostrar que la función motora máxima lograda se correlaciona con la función motora y pulmonar a largo plazo. Creemos que esta clasificación ayudará a los clínicos a proporcionar un pronóstico más preciso de la función motora y respiratoria, permitiendo así una mejor atención clínica. Esta clasificación distrofia por déficit de colágeno VI también ayudará en el diseño de ensayos clínicos al permitir la estratificación fenotípica

de las cohortes de ensayos clínicos en pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI desde una edad temprana.

6.2 IMPACTO DEL TRATAMIENTO CON ANTICOLINESTERÁSICOS EN PACIENTES CON DISTROFIA MUSCULAR POR GMPPB

Se ha propuesto la piridostigmina como un tratamiento beneficioso en pacientes con distrofia muscular por *GMPPB*, dada la afectación que se sabe que existe a nivel de unión neuromuscular, con un fenotipo de miastenia congénita que se superpone con el fenotipo distrófico. En enfermedades raras tratables como esta, la necesidad de evaluar objetivamente y de manera cuantitativa la respuesta a los tratamientos farmacológicos es cada vez más necesaria. En este estudio, medimos el impacto del tratamiento con piridostigmina en tres pacientes utilizando escalas funcionales motoras validadas. La respuesta al tratamiento fue sobresaliente dentro de las primeras horas, con todas las puntuaciones de las escalas mostrando un aumento drástico en solo dos días. Esta notable mejora se mantuvo estable durante 12 meses, pero posteriormente se detectó una disminución moderada de la función motora. A pesar de este descenso en las puntuaciones de las escalas al final del seguimiento, el estado funcional motor de los pacientes seguía siendo significativamente mejor que antes de iniciar el tratamiento.

Hay condiciones intrínsecas, como la naturaleza degenerativa de la distrofia muscular asociada con la reducción de α -dístroglicano que presentan estos pacientes que creemos que pueden explicar este deterioro funcional motor después de 12 meses de tratamiento. Hipotetizamos que esto puede estar parcialmente asociado con la historia natural de la condición distrófica. En nuestra cohorte de pacientes, no solo este factor intrínseco puede afectar los resultados. Otros factores extrínsecos como la escoliosis y sus complicaciones quirúrgicas también deben tenerse en cuenta en la progresión de la enfermedad, ya que afectaron el seguimiento clínico y la funcionalidad de los pacientes en mayor o menor medida. La escoliosis es un factor relevante a

considerar en términos de progresión de la enfermedad. En nuestra cohorte, la introducción de piridostigmina a una edad temprana de la enfermedad en el paciente 3, antes del inicio de la escoliosis, parece haber tenido un efecto protector sobre esta. El paciente 2 ya mostraba una escoliosis grave cuando tenía 12 años, casi la misma edad que el paciente 3 en el último seguimiento, mostrando que la progresión de la escoliosis en el paciente 3 ha sido más lenta que la observada en sus hermanos.

Cabe destacar que, incluso en aquellos pacientes mayores, o en aquellos en los que se observa infiltración grasa en algunos músculos mediante resonancia magnética, como los pacientes 1 y 2, el tratamiento con piridostigmina confirió un claro beneficio en términos de función motora. Este hallazgo destaca la importancia de incluir en el diagnóstico diferencial de todas las distrofias musculares sin diagnóstico genético a la distrofia muscular por *GMPPB*, dado que la afectación a nivel de unión neuromuscular es tratable. Según nuestros resultados y teniendo en cuenta la presentación clínica heterogénea de los trastornos relacionados con *GMPPB*, consideramos los inhibidores de la acetilcolina como la primera opción terapéutica en pacientes con mutaciones en *GMPPB*, ya desde las primeras etapas de la enfermedad, incluyendo aquellos casos en los que la fatigabilidad no se observa claramente. La fatigabilidad puede presentarse superpuesta con otros síntomas y no siempre es fácil de objetivar ⁸². El empleo adicional de otros tratamientos, incluyendo salbutamol y 3,4-diaminopirimidina, también puede considerarse como un tratamiento complementario ⁹⁵.

6.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, ANATOMOPATOLÓGICAS Y FISIOPATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES CON DISTROFIA POR ALTERACIONES EN *DTNA*

Describimos el fenotipo de 12 pacientes de cuatro familias con variantes monoalélicas en el gen *DTNA* en el contexto de hiperCKemia persistente (n = 11), mialgias (n = 10), intolerancia al ejercicio (n = 9), rabdomiólisis (n = 1) y debilidad muscular proximal en las extremidades inferiores (n = 3). Nuestros hallazgos sugieren que las variantes en el dominio de coiled-coil de α -distrobrevina dan lugar a un fenotipo relativamente leve de distrofia que afecta al músculo esquelético con penetrancia variable. La delección p.Gln523_Glu529del está asociada con un fenotipo clínico más grave, que incluye debilidad muscular, mientras que la variante de cambio de sentido p.Glu529Lys resulta en un fenotipo más leve de hiperCKemia, mialgia e intolerancia al ejercicio. Queremos subrayar que el dominio coiled-coil de α -distrobrevina media la interacción con distrofina y su homólogo utrofina y que otras variantes missense en este dominio no se han descrito previamente en humanos.

La existencia de manifestaciones a nivel de sistema nervioso central en algunos pacientes todavía no sabemos cómo interpretarlas. La α -distrobrevina se expresa en múltiples regiones del cerebro en humanos ⁹⁶ y en peces cebra ⁹⁶. lo que sugiere que las variantes de *DTNA* pueden estar asociadas con alteraciones en el desarrollo neurológico. Específicamente, la expresión de *DTNA* aumenta durante el período prenatal tardío, seguido de una meseta y una posible disminución lenta después de la primera infancia ⁹⁷. Basándose en estos hallazgos, Simon *et al.* sugirieron que la elevada expresión de *DTNA* en las primeras etapas de la astrogliogénesis puede reflejar un papel de los astrocitos en la distribución de factores secretados críticos para procesos

de desarrollo como el mantenimiento de la barrera hematoencefálica y la maduración neuronal ⁹⁷.

La inmunofluorescencia de las muestras de biopsia muscular mostró una marcada reducción de α -distrobrevina en la membrana, así como de otros componentes del DGC, sugiriendo que los posibles mecanismos por los cuales las variantes p.Glu529Lys y p.Gln523_Glu529del dan lugar al fenotipo distrófico pueden incluir interacciones alteradas entre α -distrobrevina y una o más proteínas del DGC, desestabilizando así el complejo con una reducción de múltiples componentes cuando se miden en la ubicación de la membrana donde esperaríamos encontrarlos. En contraste con el déficit inmunohistoquímico en la membrana, los western blots no mostraron una disminución de α -distrobrevina en los lisados musculares totales de los pacientes. Aunque los anticuerpos utilizados para los dos estudios fueron diferentes (el anticuerpo que usamos para la inmunofluorescencia se dirige a la región interna de α -distrobrevina (aminoácidos 366-422), mientras que el anticuerpo utilizado para el western blot se dirige a la región C-terminal de α -distrobrevina (aminoácidos 600-743), las regiones objetivo no incluyen los aminoácidos afectados por las variantes de nuestros pacientes. Una explicación más plausible para los hallazgos discordantes entre los estudios inmunohistoquímicos y los western blots es que algunas variantes de α -distrobrevina, como las de nuestros pacientes, dan lugar a una incapacidad de localizarse adecuadamente en el DGC, lo que lleva a un efecto dominante negativo caracterizado por la desestabilización de otros componentes del DGC mientras que la cantidad total de proteína de α -distrobrevina presente en el músculo permanece sin cambios. En apoyo de esta hipótesis, encontramos que la interacción entre α -distrobrevina y sintrofina se vio interrumpida por una construcción alterada de *DTNA* que contenía la delección c.1567_1587. También consistente con esta hipótesis es que la α -distrobrevina interactúa directamente con distroglicanos a través de su dominio EF

⁹⁸. Como no se aplicaron técnicas de disociación mecánica fuerte para solubilizar las proteínas musculares antes de realizar los western blots, otra posible explicación para los hallazgos discordantes es que las variantes reportadas aquí podrían llevar a la formación de agregados solubles, lo cual sería una hipótesis alternativa para explicar la existencia de una disminución de la expresión de α -distrobrevina en inmunofluorescencia, pero no en western blot.

Una variante patogénica monoalélica diferente en *DTNA*, (NM_001390.5) c.362C>T; p.(Pro121Leu), se había identificado previamente en 6 pacientes con miocardiopatía no compactada del ventrículo izquierdo de la misma familia [17], y más recientemente, una variante diferente de *DTNA* (NM_001198943.1) c.681G>C; p.(Glu227Asp) se asoció con fibrilación auricular en otra familia; sin embargo, existen discordancias genotipo-fenotipo en esta última familia que han quedado suficientemente aclaradas ⁹⁹. No se describió la existencia de hiperCKemia ni otros síntomas musculoesqueléticos en ninguno de los individuos reportados en estos dos artículos. Por otra parte, no se detectó implicación cardíaca en ninguno de los pacientes de nuestra cohorte, lo que sugiere que no existe solapamiento entre estos dos fenotipos. Que las variantes asociadas con distrofia muscular y las asociadas con miocardiopatía estén ubicadas en diferentes dominios sugiere que (i) la localización de las variantes patogénicas en *DTNA* tiene una influencia significativa en el fenotipo clínico asociado y (ii) el dominio coiled-coil de α -distrobrevina es sensible a variantes que alteran la estructura e interacciones del DGC en el músculo esquelético. Esta interpretación está respaldada por los altos niveles de conservación del dominio de coiled-coil a lo largo de especies evolutivamente divergentes, y por la interacción entre α -distrobrevina y distrofina en el dominio coiled-coil. La identificación de más pacientes y los datos de historia natural serán cruciales para comprender mejor el espectro fenotípico y las manifestaciones clínicas a largo plazo de esta forma de distrofia muscular, que es más

leve que el fenotipo observado en ratones knockout de *DTNA*¹⁰⁰. Que no haya reportado ningún paciente con variantes patogénicas bialélicas en *DTNA* sugiere que la ausencia completa de *DTNA* en humanos puede ser tan grave como para ser incompatible con la vida.

Además de estar localizada en el sarcolema, la α -distrobrevina se expresa en la unión neuromuscular, especialmente en la cresta de los pliegues de la unión, con un papel clave para anclar los receptores de acetilcolina a la membrana postsináptica¹⁰¹. En los pacientes presentados aquí no se detectaron síntomas típicos de afectación de la unión neuromuscular, ya que se observó fatigabilidad, ptosis, ni una disminución en la amplitud del potencial de acción motor compuesto (CMAP) después de la estimulación repetitiva de baja frecuencia, por lo que no investigamos si las variantes alteraban el anclaje normal de los receptores de acetilcolina. Sin embargo, en la biopsia muscular de uno de los pacientes, identificamos diez uniones neuromusculares con una morfología ligeramente anormal, ya que eran más delgadas que las del control (**Figura 19**). Estos hallazgos deben interpretarse con cautela debido a la conocida variabilidad de las uniones neuromusculares en secciones de criostato y al número limitado de uniones neuromusculares visualizadas. Estudios futuros sobre los posibles efectos de las variantes de α -distrobrevina en la unión neuromuscular serían esclarecedores, y es posible que en el futuro se encuentren pacientes con variantes patogénicas en otros dominios de *DTNA* que presenten un fenotipo miasténico.

α -Distrobrevina es un componente integral y evolutivamente conservado del DGC¹⁰². Estudios en múltiples organismos modelo, incluyendo el ratón (*Mus musculus*), pez cebra (*Danio rerio*), mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y nematodo (*Caenorhabditis elegans*), han mostrado que los ortólogos de distrobrevina en estas especies (*Dtna*, *dtna*, *Dyb* y *dyb-1*, respectivamente) se expresan en los músculos esqueléticos, así como en el sistema nervioso central^{96,103}. La generación de modelos

DISTROFIAS MUSCULARES: EN BUSCA DE NUEVOS FENOTIPOS

animales deficientes en Dyb en estas especies facilitó la investigación sobre la función de esta proteína en la unión neuromuscular postsináptica, donde está enriquecida. Los organismos mutantes con pérdida de función de Dyb son viables; sin embargo, se han reportado anomalías en la actividad motora, la integridad de las fibras musculares, la liberación de neurotransmisores en la unión neuromuscular y la estructura de la unión neuromuscular en múltiples especies. Estos estudios revelaron un papel importante de DTNA/Dyb en la unión neuromuscular ^{104,105}.

Las formas dominantes de distrofia muscular siguen siendo mucho menos frecuentes que las formas recesivas ¹⁰⁶. Esto probablemente refleja en cierta medida los patrones epidemiológicos de los pacientes con distrofia muscular, pero como muestra nuestro estudio, los estudios genéticos de familias dominantes a menudo se ven obstaculizados por fenotipos más leves que los observados en familias recesivas, como es el caso de algunos individuos con LGMD-1D ¹⁰⁶. Esto plantea la posibilidad de errores de fenotipado que podrían confundir los análisis de segregación de variantes patogénicas candidatas ¹⁰⁷. Por lo tanto, creemos que las formas dominantes de distrofia muscular pueden estar infraestimadas y que es probable que se descubran genes adicionales con variantes causantes de herencia dominante en el futuro.

VII. CONCLUSIONES

- 1) El máximo hito motor alcanzado por los pacientes con distrofia por déficit de colágeno VI a los 5 años de edad, como la capacidad de levantarse del suelo sin ayuda y la capacidad de subir 4 escalones sin agarrarse a una barandilla, demostraron ser fiables para distinguir entre 3 subgrupos fenotípicos: (1) distrofia muscular congénita de Ullrich, (2) fenotipo intermedio y (3) miopatía de Bethlem.
- 2) La función motora y respiratoria a largo plazo de los pacientes con distrofia muscular por déficit de colágeno VI se correlacionan con la clasificación fenotípica propuesta, que permite a clasificar a los pacientes desde sus primeros años de vida. Esta clasificación ayudará a predecir otros eventos relevantes de la enfermedad, como la edad de pérdida de la marcha y la necesidad de iniciar ventilación no invasiva nocturna.
- 3) El tratamiento con piridostigmina en pacientes con distrofia muscular por alteraciones en *GMPPB* mejoró mucho la función motora de todos los pacientes en pocas horas y durante el primer año de tratamiento. No obstante, se detectó un empeoramiento en las escalas funcionales motoras un año después del inicio del tratamiento. Esto sugiere que, a pesar de la respuesta beneficiosa, el curso progresivo asociado al componente distrófico de la enfermedad persiste.
- 4) Aportamos evidencia clínica, genética e histopatológica de la patogenicidad de variantes autosómicas dominantes específicas en un dominio particular de α -distrobrevina, así como una expansión notable del espectro fenotípico asociado con el gen *DTNA*. Nuestras observaciones sugieren que el dominio coiled-coil de α -distrobrevina es intolerante a la variación genética en el músculo esquelético

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Shin J, Tajrishi MM, Ogura Y, Kumar A. Wasting mechanisms in muscular dystrophy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(10):2266-2279. doi:10.1016/J.BIOCEL.2013.05.001
2. Flanigan KM. The muscular dystrophies. *Semin Neurol.* 2012;32(3):255-263. doi:10.1055/s-0032-1329199
3. Mercuri E, Muntoni F. Muscular dystrophies. *The Lancet.* 2013;381(9869):845-860. doi:10.1016/S0140-6736(12)61897-2
4. Mercuri E, Bönnemann CG, Muntoni F. Muscular dystrophies. *Lancet.* 2019;394(10213):2025-2038. doi:10.1016/S0140-6736(19)32910-1
5. Hermans MCE, Pinto YM, Merkies ISJ, de Die-Smulders CEM, Crijns HJGM, Faber CG. Hereditary muscular dystrophies and the heart. *Neuromuscular Disorders.* 2010;20(8):479-492. doi:10.1016/j.nmd.2010.04.008
6. Armijo Gómez JA, Fernandez-Garcia MA, Camacho A, et al. Epilepsy in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Ann Clin Transl Neurol.* 2024;11(6):1456-1464. doi:10.1002/ACN3.52058
7. Natera-de Benito D, Muchart J, Itzep D, et al. Epilepsy in LAMA2-related muscular dystrophy: An electro-clinico-radiological characterization. *Epilepsia.* 2020;61(5):971-983. doi:10.1111/EPI.16493

8. Falsaperla R, Praticò AD, Ruggieri M, et al. Congenital muscular dystrophy: from muscle to brain. *Ital J Pediatr.* 2016;42(1). doi:10.1186/S13052-016-0289-9
9. Kang PB, Griggs RC. Advances in muscular dystrophies. *JAMA Neurol.* 2015;72(7):741-742. doi:10.1001/JAMANEUROL.2014.4621
10. Bönnemann CG, Wang CH, Quijano-Roy S, et al. Diagnostic approach to the congenital muscular dystrophies. *Neuromuscular Disorders.* 2014;24(4):289-311. doi:10.1016/J.NMD.2013.12.011
11. Butterfield RJ. Congenital Muscular Dystrophy and Congenital Myopathy. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology.* 2019;25(6):1640-1661. doi:10.1212/CON.0000000000000792
12. Carter JC, Sheehan DW, Prochoroff A, Birnkrant DJ. Muscular Dystrophies. *Clin Chest Med.* 2018;39(2):377-389. doi:10.1016/J.CCM.2018.01.004
13. Ozisik O, Gorokhova S, Cerino M, Bartoli M, Baudot A. System-level analysis of genes mutated in muscular dystrophies reveals a functional pattern associated with muscle weakness distribution. *Sci Rep.* 2024;14(1). doi:10.1038/s41598-024-60761-9
14. Mah JK, Korngut L, Fiest KM, et al. A Systematic Review and Meta-analysis on the Epidemiology of the Muscular Dystrophies. *Can J Neurol Sci.* 2016;43(1):163-177. doi:10.1017/CJN.2015.311
15. Zambon AA, Muntoni F. Congenital muscular dystrophies: What is new? *Neuromuscul Disord.* 2021;31(10):931-942. doi:10.1016/J.NMD.2021.07.009

16. Perovanovic J, Hoffman EP. Mechanisms of allelic and clinical heterogeneity of lamin A/C phenotypes. *Physiol Genomics*. 2018;50(9):694-704. doi:10.1152/PHYSIOLGENOMICS.00128.2017
17. Cesar S, Campuzano O, Cruzalegui J, et al. Characterization of cardiac involvement in children with LMNA-related muscular dystrophy. *Front Cell Dev Biol*. 2023;11. doi:10.3389/FCELL.2023.1142937
18. Bertrand AT, Chikhaoui K, Yaou R Ben, Bonne G. Clinical and genetic heterogeneity in laminopathies. *Biochem Soc Trans*. 2011;39(6):1687-1692. doi:10.1042/BST20110670
19. Vajsar J, Schachter H. Walker-Warburg syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2006;1(1). doi:10.1186/1750-1172-1-29
20. Beltrán-Valero De Bernabé D, Van Bokhoven H, Van Beusekom E, et al. A homozygous nonsense mutation in the fukutin gene causes a Walker-Warburg syndrome phenotype. *J Med Genet*. 2003;40(11):845-848. doi:10.1136/JMG.40.11.845
21. Balci B, Uyanik G, Dincer P, et al. An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker-Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene. *Neuromuscul Disord*. 2005;15(4):271-275. doi:10.1016/J.NMD.2005.01.013
22. Van Reeuwijk J, Maugendre S, Van Den Elzen C, et al. The expanding phenotype of POMT1 mutations: from Walker-Warburg syndrome to congenital muscular dystrophy, microcephaly, and mental retardation. *Hum Mutat*. 2006;27(5):453-459. doi:10.1002/HUMU.20313

23. van Reeuwijk J, Grewal PK, Salih MAM, et al. Intragenic deletion in the LARGE gene causes Walker-Warburg syndrome. *Hum Genet.* 2007;121(6):685-690. doi:10.1007/S00439-007-0362-Y
24. Benarroch L, Bonne G, Rivier F, Hamroun D. The 2024 version of the gene table of neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul Disord.* 2024;34:126-170. doi:10.1016/J.NMD.2023.12.007
25. Graziano A, Bianco F, D'Amico A, et al. Prevalence of congenital muscular dystrophy in Italy: a population study. *Neurology.* 2015;84(9):904-911. doi:10.1212/WNL.0000000000001303
26. Mah JK, Korngut L, Fiest KM, et al. A Systematic Review and Meta-analysis on the Epidemiology of the Muscular Dystrophies. *Can J Neurol Sci.* 2016;43(1):163-177. doi:10.1017/CJN.2015.311
27. Norwood FLM, Harling C, Chinnery PF, Eagle M, Bushby K, Straub V. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain.* 2009;132(Pt 11):3175-3186. doi:10.1093/BRAIN/AWP236
28. Peat RA, Smith JM, Compton AG, et al. Diagnosis and etiology of congenital muscular dystrophy. *Neurology.* 2008;71(5):312-321. doi:10.1212/01.WNL.0000284605.27654.5A
29. Sframeli M, Sarkozy A, Bertoli M, et al. Congenital muscular dystrophies in the UK population: Clinical and molecular spectrum of a large cohort diagnosed over a 12-year period. *Neuromuscul Disord.* 2017;27(9):793-803. doi:10.1016/J.NMD.2017.06.008
30. Clement EM, Feng L, Mein R, et al. Relative frequency of congenital muscular dystrophy subtypes: analysis of the UK diagnostic service 2001-

2008. *Neuromuscul Disord.* 2012;22(6):522-527.
doi:10.1016/J.NMD.2012.01.010
31. O'Grady GL, Lek M, Lamande SR, et al. Diagnosis and etiology of congenital muscular dystrophy: We are halfway there. *Ann Neurol.* 2016;80(1):101-111. doi:10.1002/ANA.24687
32. Kang PB, Morrison L, Iannaccone ST, et al. Evidence-based guideline summary: evaluation, diagnosis, and management of congenital muscular dystrophy: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Issues Review Panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. *Neurology.* 2015;84(13):1369-1378.
doi:10.1212/WNL.0000000000001416
33. Nickolls AR, Bönnemann CG. The roles of dystroglycan in the nervous system: insights from animal models of muscular dystrophy. *Dis Model Mech.* 2018;11(12). doi:10.1242/DMM.035931
34. Godfrey C, Foley AR, Clement E, Muntoni F. Dystroglycanopathies: coming into focus. *Curr Opin Genet Dev.* 2011;21(3):278-285.
doi:10.1016/J.GDE.2011.02.001
35. Murphy AP, Straub V. The Classification, Natural History and Treatment of the Limb Girdle Muscular Dystrophies. *J Neuromuscul Dis.* 2015;2(s2):S7-S19. doi:10.3233/JND-150105
36. Johnson NE, Statland JM. The Limb-Girdle Muscular Dystrophies. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology.* 2022;28(6):1698-1714.
doi:10.1212/CON.0000000000001178

37. Straub V, Murphy A, Udd B. 229th ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies - Nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17-19 March 2017. *Neuromuscul Disord*. 2018;28(8):702-710. doi:10.1016/J.NMD.2018.05.007
38. Foley AR, Quijano-Roy S, Collins J, et al. Natural history of pulmonary function in collagen VI-related myopathies. *Brain*. 2013;136(Pt 12):3625-3633. doi:10.1093/BRAIN/AWT284
39. Lamandé SR, Bateman JF. Collagen VI disorders: Insights on form and function in the extracellular matrix and beyond. *Matrix Biol*. 2018;71-72:348-367. doi:10.1016/J.MATBIO.2017.12.008
40. Bönnemann CG. The collagen VI-related myopathies: muscle meets its matrix. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(7):379-390. doi:10.1038/NRNEUROL.2011.81
41. Yonekawa T, Nishino I. Ullrich congenital muscular dystrophy: clinicopathological features, natural history and pathomechanism(s). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015;86(3):280-287. doi:10.1136/JNNP-2013-307052
42. Foley AR, Mohassel P, Donkervoort S, Bolduc V, Bönnemann CG. Collagen VI-Related Dystrophies. *GeneReviews®*. Published online March 11, 2021. Accessed July 3, 2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1503/>
43. Deconinck N, Richard P, Allamand V, et al. Bethlem myopathy: long-term follow-up identifies COL6 mutations predicting severe clinical evolution. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015;86(12):1337-1346. doi:10.1136/JNNP-2013-307245

44. Briñas L, Richard P, Quijano-Roy S, et al. Early onset collagen VI myopathies: Genetic and clinical correlations. *Ann Neurol*. 2010;68(4):511-520. doi:10.1002/ANA.22087
45. Toni S, Morandi R, Busacchi M, et al. Nutritional status evaluation in patients affected by bethlem myopathy and ullrich congenital muscular dystrophy. *Front Aging Neurosci*. 2014;6(OCT). doi:10.3389/FNAGI.2014.00315
46. Cruz S, Figueroa-Bonaparte S, Gallardo E, et al. Bethlem Myopathy Phenotypes and Follow Up: Description of 8 Patients at the Mildest End of the Spectrum. *J Neuromuscul Dis*. 2016;3(2):267-274. doi:10.3233/JND-150135
47. Rodríguez MA, Barquero LMDR, Ortiz CI, et al. Differences in Adipose Tissue and Lean Mass Distribution in Patients with Collagen VI Related Myopathies Are Associated with Disease Severity and Physical Ability. *Front Aging Neurosci*. 2017;9(AUG). doi:10.3389/FNAGI.2017.00268
48. López-Márquez A, Morín M, Fernández-Peñalver S, et al. CRISPR/Cas9-Mediated Allele-Specific Disruption of a Dominant COL6A1 Pathogenic Variant Improves Collagen VI Network in Patient Fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2022;23(8). doi:10.3390/IJMS23084410
49. Foley AR, Bolduc V, Guirguis F, et al. The recurrent deep intronic pseudoexon-inducing variant COL6A1 c.930+189C>T results in a consistently severe phenotype of COL6-related dystrophy: Towards clinical trial readiness for splice-modulating therapy. *medRxiv*. Published online 2024.

50. Andrea ZA, Matteo FY, Alessandra B, Carlo PS. Molecular mechanisms and therapeutic strategies for neuromuscular diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2024;81(1). doi:10.1007/s00018-024-05229-9
51. Hwang J, Yokota T. Recent advancements in exon-skipping therapies using antisense oligonucleotides and genome editing for the treatment of various muscular dystrophies. *Expert Rev Mol Med*. 2019;21:e5. doi:10.1017/erm.2019.5
52. Aguti S, Guirguis F, Bönnemann C, Muntoni F, Bolduc V, Zhou H. Exon-Skipping for a Pathogenic COL6A1 Variant in Ullrich Congenital Muscular Dystrophy. *Methods Mol Biol*. 2023;2587:387-407. doi:10.1007/978-1-0716-2772-3_20
53. Aguti S, Bolduc V, Ala P, et al. Exon-Skipping Oligonucleotides Restore Functional Collagen VI by Correcting a Common COL6A1 Mutation in Ullrich CMD. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;21:205-216. doi:10.1016/j.omtn.2020.05.029
54. Aguti S, Bolduc V, Ala P, et al. Exon-Skipping Oligonucleotides Restore Functional Collagen VI by Correcting a Common COL6A1 Mutation in Ullrich CMD. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;21:205-216. doi:10.1016/J.OMTN.2020.05.029
55. Brull A, Sarathy A, Bolduc V, Chen GS, McCarty RM, Bönnemann CG. Optimized allele-specific silencing of the dominant-negative COL6A1 G293R substitution causing collagen VI-related dystrophy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2024;35(2). doi:10.1016/J.OMTN.2024.102178
56. Noguchi S, Ogawa M, Kawahara G, Malicdan MC, Nishino I. Allele-specific Gene Silencing of Mutant mRNA Restores Cellular Function in Ullrich

- Congenital Muscular Dystrophy Fibroblasts. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3(6). doi:10.1038/MTNA.2014.22
57. Bolduc V, Zou Y, Ko D, Bönnemann CG. siRNA-mediated Allele-specific Silencing of a COL6A3 Mutation in a Cellular Model of Dominant Ullrich Muscular Dystrophy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3(2). doi:10.1038/MTNA.2013.74
58. Gualandi F, Manzati E, Sabatelli P, et al. Antisense-induced messenger depletion corrects a COL6A2 dominant mutation in Ullrich myopathy. *Hum Gene Ther*. 2012;23(12):1313-1318. doi:10.1089/HUM.2012.109
59. Marrosu E, Ala P, Muntoni F, Zhou H. Gapmer Antisense Oligonucleotides Suppress the Mutant Allele of COL6A3 and Restore Functional Protein in Ullrich Muscular Dystrophy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017;8:416-427. doi:10.1016/J.OMTN.2017.07.006
60. Taniguchi-Ikeda M, Morioka I, Iijima K, Toda T. Mechanistic aspects of the formation of α -dystroglycan and therapeutic research for the treatment of α -dystroglycanopathy: A review. *Mol Aspects Med*. 2016;51:115-124. doi:10.1016/J.MAM.2016.07.003
61. Song D, Dai Y, Chen X, et al. Genetic variations and clinical spectrum of dystroglycanopathy in a large cohort of Chinese patients. *Clin Genet*. 2021;99(3):384-395. doi:10.1111/CGE.13886
62. Brown SC, Winder SJ, Bevan N, et al. 220th ENMC workshop: Dystroglycan and the dystroglycanopathies Naarden, The Netherlands, 27-29 May 2016. *Neuromuscul Disord*. 2017;27(4):387-395. doi:10.1016/J.NMD.2016.12.010

63. Godfrey C, Clement E, Mein R, et al. Refining genotype–phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain*. 2007;130(10):2725-2735. doi:10.1093/BRAIN/AWM212
64. Guglieri M, Straub V, Bushby K, Lochmüller H. Limb-girdle muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol*. 2008;21(5):576-584. doi:10.1097/WCO.0B013E32830EFDC2
65. Domingos J, Sarkozy A, Scoto M, Muntoni F. Dystrophinopathies and Limb-Girdle Muscular Dystrophies. *Neuropediatrics*. 2017;48(4):262-272. doi:10.1055/S-0037-1601860/ID/JR171657RA-10/BIB
66. Schorling DC, Kirschner J, Bönnemann CG. Congenital Muscular Dystrophies and Myopathies: An Overview and Update. *Neuropediatrics*. 2017;48(4):247-261. doi:10.1055/S-0037-1604154/ID/JR171720RA-10/BIB
67. Astrea G, Romano A, Angelini C, et al. Broad phenotypic spectrum and genotype-phenotype correlations in GMPPB-related dystroglycanopathies: An Italian cross-sectional study. *Orphanet J Rare Dis*. 2018;13(1):1-9. doi:10.1186/S13023-018-0863-X/FIGURES/3
68. Carss KJ, Stevens E, Foley AR, et al. Mutations in GDP-mannose pyrophosphorylase B cause congenital and limb-girdle muscular dystrophies associated with hypoglycosylation of α -dystroglycan. *Am J Hum Genet*. 2013;93(1):29-41. doi:10.1016/j.ajhg.2013.05.009
69. Cabrera-Serrano M, Ghaoui R, Ravenscroft G, et al. Expanding the phenotype of GMPPB mutations. *Brain*. 2015;138(Pt 4):836-844. doi:10.1093/BRAIN/AWV013

70. Belaya K, Rodríguez Cruz PM, Liu WW, et al. Mutations in GMPPB cause congenital myasthenic syndrome and bridge myasthenic disorders with dystroglycanopathies. *Brain*. 2015;138(9):2493-2504. doi:10.1093/BRAIN/AWV185
71. Ramdas S, Beeson D. Congenital myasthenic syndromes: where do we go from here? *Neuromuscular Disorders*. 2021;31(10):943-954. doi:10.1016/j.nmd.2021.07.400
72. Henahan L, Beeson D, Palace J. Congenital myasthenic syndromes. *Pract Neurol*. 2024;24(3):185-187. doi:10.1136/PN-2024-004098
73. Bestué-Cardiel M, Natera-De Benito D. Current status of congenital myasthenic syndromes. *Rev Neurol*. 2017;65(4):161-176. doi:10.33588/rn.6504.2016423
74. Natera-de Benito D, Töpf A, Vilchez JJ, et al. Molecular characterization of congenital myasthenic syndromes in Spain. *Neuromuscular Disorders*. 2017;27(12):1087-1098. doi:10.1016/j.nmd.2017.08.003
75. Cossins J, Belaya K, Hicks D, et al. Congenital myasthenic syndromes due to mutations in ALG2 and ALG14. *Brain*. 2013;136(3):944-956. doi:10.1093/BRAIN/AWT010
76. Bauché S, Vellieux G, Sternberg D, et al. Mutations in GFPT1-related congenital myasthenic syndromes are associated with synaptic morphological defects and underlie a tubular aggregate myopathy with synaptopathy. *J Neurol*. 2017;264(8):1791-1803. doi:10.1007/S00415-017-8569-X/METRICS

77. Houlden H. Defective N-linked protein glycosylation pathway in congenital myasthenic syndromes. *Brain*. 2013;136(3):692-695. doi:10.1093/BRAIN/AWT042
78. Sarkozy A, Torelli S, Mein R, et al. Mobility shift of beta-dystroglycan as a marker of GMPPB gene-related muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(7):762-768. doi:10.1136/JNNP-2017-316956
79. NOMOTO H, TAKAHASHI N, NAGAKI Y, ENDO S, ARATA Y, HAYASHI K. Carbohydrate structures of acetylcholine receptor from *Torpedo californica* and distribution of oligosaccharides among the subunits. *Eur J Biochem*. 1986;157(2):233-242. doi:10.1111/J.1432-1033.1986.TB09661.X
80. Rickert KW, Imperiali B. Analysis of the conserved glycosylation site in the nicotinic acetylcholine receptor: potential roles in complex assembly. *Chem Biol*. 1995;2(11):751-759. doi:10.1016/1074-5521(95)90103-5
81. Luo S, Cai S, Maxwell S, et al. Novel mutations in the C-terminal region of GMPPB causing limb-girdle muscular dystrophy overlapping with congenital myasthenic syndrome. *Neuromuscular Disorders*. 2017;27(6):557-564. doi:10.1016/j.nmd.2017.03.004
82. Rodríguez Cruz PM, Belaya K, Basiri K, et al. Clinical features of the myasthenic syndrome arising from mutations in GMPPB. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(8):802-809. doi:10.1136/JNNP-2016-313163
83. Schüle R, Timmann D, Erasmus CE, et al. Solving unsolved rare neurological diseases—a Solve-RD viewpoint. *European Journal of Human*

- Genetics* 2021 29:9. 2021;29(9):1332-1336. doi:10.1038/s41431-021-00901-1
84. Fortunato F, Bianchi F, Ricci G, et al. Digital health and Clinical Patient Management System (CPMS) platform utility for data sharing of neuromuscular patients: the Italian EURO-NMD experience. *Orphanet J Rare Dis*. 2023;18(1). doi:10.1186/S13023-023-02776-5
85. Boycott KM, Azzariti DR, Hamosh A, Rehm HL. Seven years since the launch of the Matchmaker Exchange: The evolution of genomic matchmaking. *Hum Mutat*. 2022;43(6):659-667. doi:10.1002/humu.24373
86. Azzariti DR, Hamosh A. Genomic Data Sharing for Novel Mendelian Disease Gene Discovery: The Matchmaker Exchange. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2020;21:305-326. doi:10.1146/ANNUREV-GENOM-083118-014915
87. Quinlivan R, Jungbluth H. Myopathic causes of exercise intolerance with rhabdomyolysis. *Dev Med Child Neurol*. 2012;54(10):886-891. doi:10.1111/J.1469-8749.2012.04320.X
88. Nallamilli BRR, Chakravorty S, Kesari A, et al. Genetic landscape and novel disease mechanisms from a large LGMD cohort of 4656 patients. *Ann Clin Transl Neurol*. 2018;5(12):1574-1587. doi:10.1002/ACN3.649
89. Dubowitz V, Oldfors A, Sewry CA. Muscle Biopsy: A Practical Approach. *Muscle Biopsy: A Practical Approach*. Published online January 1, 2020:1-530. doi:10.1016/C2016-0-00124-9
90. Jain MS, Meilleur K, Kim E, et al. Longitudinal changes in clinical outcome measures in COL6-related dystrophies and LAMA2-related dystrophies.

- Neurology*. 2019;93(21):E1932-E1943.
doi:10.1212/WNL.00000000000008517
91. Pace RA, Peat RA, Baker NL, et al. Collagen VI glycine mutations: Perturbed assembly and a spectrum of clinical severity. *Ann Neurol*. 2008;64(3):294-303. doi:10.1002/ANA.21439
 92. Butterfield RJ, Foley AR, Dastgir J, et al. Position of Glycine Substitutions in the Triple Helix of COL6A1, COL6A2, and COL6A3 is Correlated with Severity and Mode of Inheritance in Collagen VI Myopathies. *Hum Mutat*. 2013;34(11):1558-1567. doi:10.1002/HUMU.22429
 93. Bolduc V, Reghan Foley A, Solomon-Degefa H, et al. A recurrent COL6A1 pseudoexon insertion causes muscular dystrophy and is effectively targeted by splice-correction therapies. *JCI Insight*. 2019;4(6). doi:10.1172/JCI.INSIGHT.124403
 94. Zerres K, Schöneborn SR. Natural History in Proximal Spinal Muscular Atrophy: Clinical Analysis of 445 Patients and Suggestions for a Modification of Existing Classifications. *Arch Neurol*. 1995;52(5):518-523. doi:10.1001/ARCHNEUR.1995.00540290108025
 95. Thompson R, Bonne G, Missier P, Lochmüller H. Targeted therapies for congenital myasthenic syndromes: systematic review and steps towards a treatatolome. *Emerg Top Life Sci*. 2019;3(1):19-37. doi:10.1042/ETLS20180100
 96. Böhm S, Jin H, Hughes SM, Roberts RG, Hinitz Y. Dystrobrevin and dystrophin family gene expression in zebrafish. *Gene Expression Patterns*. 2008;8(2):71-78. doi:10.1016/J.MODGEP.2007.10.004

97. Simon MJ, Murchison C, Iliff JJ. A transcriptome-based assessment of the astrocytic dystrophin-associated complex in the developing human brain. *J Neurosci Res.* 2018;96(2):180-193. doi:10.1002/JNR.24082
98. Chung W, Campanelli JT. WW and EF hand domains of dystrophin-family proteins mediate dystroglycan binding. *Molecular Cell Biology Research Communications.* 1999;2(3):162-171. doi:10.1006/mcbr.1999.0168
99. Malakootian M, Jalilian M, Kalayinia S, Hosseini Moghadam M, Heidarali M, Haghjoo M. Whole-exome sequencing reveals a rare missense variant in DTNA in an Iranian pedigree with early-onset atrial fibrillation. *BMC Cardiovasc Disord.* 2022;22(1):1-9. doi:10.1186/S12872-022-02485-0/FIGURES/3
100. Grady RM, Grange RW, Lau KS, et al. Role for α -dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nature Cell Biology* 1999 1:4. 1999;1(4):215-220. doi:10.1038/12034
101. Belhasan DC, Akaaboune M. The role of the dystrophin glycoprotein complex on the neuromuscular system. *Neurosci Lett.* 2020;722:134833. doi:10.1016/J.NEULET.2020.134833
102. Pilgram GSK, Potikanond S, Baines RA, Fradkin LG, Noordermeer JN. The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. *Mol Neurobiol.* 2010;41(1):1-21. doi:10.1007/S12035-009-8089-5/TABLES/2
103. Dekkers LC, van der Plas MC, van Loenen PB, et al. Embryonic expression patterns of the Drosophila dystrophin-associated glycoprotein complex orthologs. *Gene Expression Patterns.* 2004;4(2):153-159. doi:10.1016/j.modgep.2003.09.004

104. Grady RM, Zhou H, Cunningham JM, Henry MD, Campbell KP, Sanes JR. Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: Genetic evidence for roles of the dystrophin-glycoprotein complex. *Neuron*. 2000;25(2):279-293. doi:10.1016/S0896-6273(00)80894-6
105. Jantrapirom S, Nimlamool W, Temviriyankul P, et al. Dystrobrevin is required postsynaptically for homeostatic potentiation at the Drosophila NMJ. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2019;1865(6):1579-1591. doi:10.1016/J.BBADIS.2019.03.008
106. Zima J, Eaton A, Pál E, et al. Intrafamilial variability of limb-girdle muscular dystrophy, LGMD1D type. *Eur J Med Genet*. 2020;63(2):103655. doi:10.1016/J.EJMG.2019.04.012
107. Kruglyak L, Daly, MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. Parametric and Nonparametric Linkage Analysis: A Unified Multipoint Approach. *Am J Hum Genet*. 1996;58:1347-1363.